

MODELO PARA LA PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS
DE LOS ENSAYOS DE LIBERACIÓN INTENCIONAL EN EL MEDIO
AMBIENTE DE PLANTAS SUPERIORES MODIFICADAS
GENÉTICAMENTE CON ARREGLO AL ANEXO XI DEL
REAL DECRETO 178/2004

1 Información general

1.1 Número de notificación europea: **B/ES/08/05**

1.2 Estado miembro de la notificación: **España**

1.3 Fecha de autorización y número de autorización: **9 de Junio de 2008**

2 Tipo de informe

2.1 Especifíquese si, con arreglo a lo dispuesto en el artículo 3 de la presente Decisión, el presente informe es:

- el informe final **X**
- un informe de seguimiento posterior a la liberación
 - final
 - intermedio

3 Características de la liberación

3.1 Nombre científico del organismo receptor: **Naranja dulce (*Citrus sinensis*)**

3.2 Evento(s) de transformación [acrónimo(s)] o vectores¹ utilizados (en caso de no conocerse la identidad del evento de transformación).....

La cepa de *A. tumefaciens* utilizada porta el plásmido binario pROKII, que es un derivado de pBin 19, y en él se encuentran clonados tres módulos de expresión en el T-DNA: el módulo *nptII*, que confiere a las células transformadas resistencia al antibiótico kanamicina, el módulo *uidA*, que permite distinguir los sucesos transgénicos mediante una prueba colorimétrica al añadir el sustrato apropiado, y el módulo *APETALA 1 (API)* de *Arabidopsis thaliana* que inducen floración rápida en cítricos.

El gen *nptII* se encuentra bajo el control de promotor y terminador del gen de la nopalina sintasa (*NOS*) de *A. tumefaciens* en pBI121. El gen *uidA* se encuentra bajo el control del promotor y del terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV*). El cDNA de *APETALA 1 (API)* se ha clonado en pROKII en sentido bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV*) y del terminador *NOS*.

¹ En el caso de los ensayos sobre el terreno a pequeña escala en los que se somete a estudio a varias líneas, será preciso mencionar los vectores para comprender mejor aspectos como los rasgos introducidos y/o los elementos genéticos. Por lo que se refiere a ensayos de mayor escala, bastará con indicar un número reducido de eventos.

Módulo *NOSpro::nptII::NOSter*: 1758 nucleótidos. El gen *nptII* procede del transposón Tn5 de *E. coli*. Las regiones *NOS*, moduladoras de la expresión de *nptII*, proceden del gen de la nopalina sintasa (*NOS*) de *A. tumefaciens*. La expresión del transgén en las células les confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina, la geneticina o la paromomicina.

Módulo *35Spro::uidA::35SpA*: 2800 nucleótidos. El gen *uidA* procede de *E. coli*. Las regiones promotora y terminadora proceden del gen 35S del virus CaMV, y confieren expresión prácticamente constitutiva del transgén en las células transformadas. El gen *uidA* está interrumpido por el intrón IV2 de modo que que dicho gen sólo se pueda expresar en un entorno eucariota. La expresión del transgén que codifica la enzima β -glucuronidasa tiñe las células transformadas de color azul cuando se les añade el sustrato apropiado (X-Gluc; ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -glucurónico) y por tanto se utiliza como delator.

Módulo *35Spro::API::NOSter*: 870, 1054 y 275 nucleótidos, respectivamente.

La región promotora procede del gen 35S del virus CaMV y la región terminadora procede del gen *NOS* de *A. tumefaciens*, que confieren expresión prácticamente constitutiva del transgén en las células transformadas. El transgén *APETALA 1 (API)* procede de *Arabidopsis thaliana*. Su sobre-expresión en citrange Carrizo induce floración rápida en las plantas transgénicas y en sus progenies con lo que se logrado generar cítricos de ciclo corto. *API* se ha incorporado también en naranjo dulce Pineapple y se ha conseguido el mismo efecto de floración rápida.

Línea AP1 166: 1 locus

Línea AP1 393: 2 loci

Línea AP1 481: 1 locus

Línea AP1 532: 1 locus

Línea AP1 554: 1 locus

Línea AP1 555: 4 loci

Línea AP1 569: 1 locus

Línea AP1 583: 1 locus

Línea Control 1-7: 0 loci

3.3 Identificador único, si existe:..... PCR del modulo módulo *APETALA 1 (API)*

3.4 Indique los siguientes datos, así como el diseño del campo o campos:

| Localización geográfica del lugar o lugares (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda) | Superficie del lugar o lugares ⁽¹⁾ (m ²) | Identidad ⁽²⁾ y número aproximado de plantas superiores MG liberadas efectivamente por cada evento (n ^o de semillas/plantas por m ²) | Duración de la o las liberaciones: (de...(día/mes/año)...hasta...(día/mes/año) |
|--|---|--|--|
|--|---|--|--|

| | | | |
|--|-------------------------------|---|---|
| <p>Finca experimental del Servicio de Transferencia Agraria (STA) de la Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, localizada en el término municipal de Villareal, provincia de Castellón</p> | <p>500 m2 aproximadamente</p> | <p>Se plantaron 5 propagaciones de cada una de las líneas transgénicas de naranjo dulce Pineapple: AP1 166, AP1 393, AP1 481, AP1 532, AP1 554, AP1 555, AP1 569 y AP1 583, más 5 propagaciones de naranjo dulce Pineapple control 1-7. La disposición es de árboles al azar. En total hay 45 árboles agrupados en uno de los cuadrantes de la parcela.</p> | <p>Prevista: 30/03/2008 a 20/01/2022 Aunque estaba previsto plantar en la primavera de 2009, diversos problemas con el arrancado de los árboles del experimento anterior en esa parcela, la transformación de la misma y su adecuación para cumplir con las recomendaciones de la Comisión Nacional de Bioseguridad, retrasaron la plantación hasta la primavera de 2010.</p> |
| | | | |

- (1) Indíquese el tamaño de la parcela modificada genéticamente y, cuando sea necesario, el tamaño de la parcela no modificada genéticamente (por ejemplo, linde no modificado genéticamente).
(2) Vectores utilizados

4 Tipos de productos que el notificador tiene previsto notificar en una fase posterior

4.1 ¿Tiene el notificador intención de notificar en una fase posterior el o los eventos de transformación liberados en calidad de producto o productos destinados a la comercialización de acuerdo con la legislación comunitaria?

- Sí (por otra entidad jurídica del grupo) No No se sabe, por el momento

En caso afirmativo, indique el o los país(es) de notificación:

En caso afirmativo, especifique el o los uso(s):

- Importaciones.
- Cultivo (producción de semillas o de material de plantación).
- Alimento.

- Alimento animal.
- Uso farmacéutico (o procesamiento para uso farmacéutico).
- Procesamiento para:
 - Uso alimentario.
 - Uso alimentario animal.
 - Uso industrial.
 - Otros (especificar).

5 Tipo o tipos de liberaciones intencionales

Seleccione los tipos principales (marcar la casilla correspondiente) y los subtipos de liberaciones. En el caso de las liberaciones en varios lugares, de varios eventos y en varios momentos del año, se adjuntará un resumen general de los tipos de liberación intencional llevados a cabo a lo largo de la duración del periodo de autorización. Marque la casilla correspondiente a cada tipo:

5.1 Liberaciones intencionales con fines de investigación

5.2 Liberaciones intencionales con fines de desarrollo

- Selección de eventos.
- Validación².
- Resultados agronómicos (por ejemplo, eficacia/selectividad de los pesticidas, capacidad de rendimiento, capacidad de germinación, implantación del cultivo, vigor de la planta, altura de la planta, sensibilidad a los factores climáticos/enfermedades, etc) (Especificar).
- Modificación de las propiedades agronómicas (por ejemplo resistencia a las enfermedades/plagas/sequía/heladas, etc) (Especificar).
- Modificación de las propiedades cualitativas (prolongación de la conservación, mejora del valor nutritivo, modificaciones de la composición, etc) (Especificar).
- Estabilidad de la expresión.
- Multiplicación de líneas.
- Estudio del vigor híbrido.
- Agricultura molecular³.

² Por ejemplo el ensayo de nuevos rasgos en condiciones medioambientales.

³ Por « agricultura molecular » se entiende la producción de sustancias (por ejemplo, proteínas o sustancias farmacéuticas) por plantas modificadas genéticamente para obtener un rasgo determinado. También podría definirse como la producción de

- Fitorremediación.
- Otros (Describir):

5.3 Ensayos oficiales



- Registro de la variedad en un catalogo nacional de variedades

DHE (= **D**istinción, **H**omogeneidad, **E**stabilidad)
VCU (= **V**alor de **C**ultivo y **U**tilización)

- Otros (Especificar)

5.4 Autorización de los herbicidas



5.5 Liberaciones intencionales de demostración



5.6 Multiplicación de las semillas



5.7 Liberaciones intencionales con fines de investigación en materia de bioseguridad y evaluación del riesgo



- Estudios de la transferencia vertical de genes.

Cruzamiento lejano con cultivos convencionales
Cruzamiento lejano con progenitores silvestres
- Estudios de la transferencia horizontal de genes (transferencia de genes a microorganismos).
- Gestión de rebrotes.
- Cambios potenciales de la persistencia o la dispersión.
- Invasividad potencial.
- Efectos potenciales en los organismos objetivo.
- Efectos potenciales en los organismos no objetivo.
- Observación de progenitores resistentes.

productos farmacéuticos sintetizados por plantas, productos farmacéuticos producidos por plantas, producción de proteínas en plantas, etc.

- Observación de insectos resistentes.
- Otros (Describir)

5.8 Otros tipos de liberaciones intencionales □
 (Describir)

6 Métodos y resultados de la liberación, medidas de gestión y de control de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente

6.1 Medidas de gestión del riesgo

Se indicarán las medidas de gestión del riesgo utilizadas para evitar o reducir al máximo la propagación de OMG fuera de los lugares de liberación, y en particular aquellas medidas:

- que no fueron notificadas en la solicitud,
- que se han aplicado como complemento de las condiciones de la autorización,
- que la autorización exigía únicamente bajo determinadas condiciones (por ejemplo, periodos de sequía, inundaciones),
- que la autorización permitía elegir entre distintas medidas.

Señálense los ejemplos según convenga:

6.1.1. Antes de la siembra/plantación:

- Etiquetado claro de los lotes de semillas/material de siembra MG (distinto del de otras semillas, tubérculos, etc.) (Describir).
- Transporte y procesamiento por separado de las semillas/material de siembra (describir el método utilizado, dar uno o varios ejemplos de los dispositivos de aislamiento utilizados para evitar los vertidos durante las operaciones de procesamiento y transporte).
- Destrucción de las semillas/material de siembra sobrante (describir el método utilizado).
- Aislamiento temporal (especificar).
- Rotación (especificar los cultivos anteriores).
- Otros (especificar)

6.1.2. Durante la siembra/plantación:

- Método de siembra/plantación.
- Vaciado y limpieza de la maquinaria de siembra/plantación en el campo de liberación.
- Separación durante la siembra/plantación (dar uno o varios ejemplos de confinamiento para prevenir el vertido durante la siembra / plantación).
- Otros (especificar).....

6.1.3. Durante el periodo de liberación:

- Distancia o distancias de aislamiento (en metros)
 - De especies vegetales comerciales compatibles sexualmente.
 - De parientes silvestres compatibles sexualmente
- Surco o surcos de separación (con el mismo cultivo u otro diferente, con un cultivo no transgénico, en metros, etc.).
- Jaula/red/cerco/cartel de señalización (especificar).
- Trampa de polen (especificar).
- Eliminación de las inflorescencias MG antes de la floración (indicar la frecuencia de la eliminación).
- Eliminación de rebrotes/parientes silvestres/colaboradores híbridos (indicar la frecuencia de la eliminación, en metros alrededor del campo MG, etc.).
- Otros (especificar).

6.1.4. Al final de la liberación:

- Métodos de destrucción/recolección (de la cosecha o de partes de la misma)/otros medios (por ejemplo, toma de muestras y análisis de la pulpa de remolacha azucarera) (describir).
- Recolección/destrucción antes de que maduren las semillas.
- Eliminación efectiva de partes de plantas.
- Almacenamiento y transporte por separado de la cosecha/residuos (dar uno o más ejemplos de confinamiento para evitar vertidos de las semillas/cosechas/desechos recogidos).

- Limpieza de maquinaria en el lugar de la liberación.
- Destino de los residuos, tratamiento de los desechos/excedentes de producción/residuos de plantas (describir).
- Tratamiento y medidas de preparación para el cultivo del lugar de la liberación después de la cosecha (describir el o los métodos para la preparación y gestión del lugar de la liberación una vez llevada a cabo esta última, incluidas las prácticas de cultivo).
- Otros (describir).....

6.1.5. Medidas para después de la cosecha:

Indicar las medidas adoptadas en el lugar de la liberación con posterioridad a la cosecha:

Frecuencia de las visitas (media):

- Cultivo siguiente (especificar).
- Rotación de cultivos (especificar).
- Barbecho/ausencia de cultivo (especificar).
- Trabajo superficial del suelo/no arado profundo.
- Semilleros falsos.
- Control rebrotes (especificar intervalos y duración).
- Tratamiento(s) químico(s) adecuado(s) (especificar).
- Tratamiento(s) del suelo adecuado(s) (especificar).
- Otros (especificar).

6.1.6. Otra(s) medida(s) (Describir)

En la zona se cultivan cítricos que son sexualmente compatibles con las plantas transgénicas. No existen plantas silvestres compatibles en Europa.

En condiciones naturales, cabe la posibilidad de que se dé polinización cruzada entre dos especies (o híbridos) sexualmente compatibles. La polinización cruzada en cítricos cultivados es exclusivamente entomófila y se produce casi exclusivamente por abejas. Además, en la época de floración existen normas legales dictadas por la Generalidad Valenciana que prohíben la localización de colmenas de abejas en un radio inferior a 5 km de cualquier plantación de clementinos. Además, está permitido el tratamiento contra abejas en este período. Estas medidas se adoptaron para evitar la polinización cruzada, que provoca la aparición de semillas en algunas variedades. La

presencia de semillas reduce drásticamente el valor de la fruta. Los cítricos producen habitualmente frutas sin semillas de forma partenocárpica. En los alrededores del recinto experimental de Villareal son frecuentes las parcelas de cultivo de clementinos. Por lo tanto, ni en el experimento de Villareal ni en los alrededores hay colmenas, lo cual reduce extraordinariamente las posibilidades de que se dé polinización cruzada. En el caso hipotético de que se transfirieran los transgenes a otras plantas por polinización, estos sólo se expresarían en las semillas, que no son comestibles.

6.1.7. Plan(es) de emergencia

Indicar:

a) Si la liberación se desarrolló como se había previsto:

- **Sí**
- No (Indicar la razón, por ejemplo, vandalismo, condiciones climáticas, etc.):.....

b) Si debieran adoptarse medidas de acuerdo con el plan o los planes de emergencia [inciso vi) de la letra a) del apartado 2 del artículo 6 y anexo III.B de la Directiva 2001/18/CE] :

- No
- Si (Describir):.....

6.2 Medidas de seguimiento posteriores a la liberación

Dado que el presente modelo de informe puede usarse para el informe final y para los informes de seguimiento posteriores a la liberación, se ruega al notificador que distinga claramente ambos tipos de informe en este punto 6.2. Indique si

- **El plan de seguimiento posterior a la liberación comenzará** (en el caso de un informe final tras última cosecha de plantas superiores MG).
- **El plan de seguimiento posterior a la liberación sigue en marcha** (en el caso de un informe intermedio de seguimiento posterior a la liberación).
- **El plan de seguimiento posterior a la liberación ha sido completado** (en el caso del informe final de seguimiento posterior a la liberación).
- **No esta previsto ningún plan de seguimiento posterior a la liberación.**

Los resultados del seguimiento deberán confirmar o invalidar las hipótesis formuladas durante la evaluación de los riesgos.

De acuerdo con los casos antes mencionados, indique la medida de seguimiento que se han adoptado, se están aplicando o se adoptarían (en el lugar de la liberación/en las cercanías des

lugar (por ejemplo, en los lindes del campo). Todas las medidas de seguimiento adoptadas durante todo el periodo posterior a la liberación deberán figurar aquí.

Especifíquense:

a) Las medidas de seguimiento en el lugar de la liberación

Duración:

Frecuencia de las visitas (media):

- Observación de progenitores resistentes.
- Observación de insectos resistentes.
- Control de rebrotes (especificar intervalos y duración).
- Seguimiento del flujo de genes (especificar).
- Tratamiento(s) químicos adecuado(s) y/o tratamiento(s) del suelo.
- Otros (especificar).

b) Medidas de seguimiento en áreas adyacentes.

Duración:

Frecuencia de las visitas (media):

Zona objeto del seguimiento:

- Observación de progenitores resistentes.
- Observación de insectos resistentes.
- Control de rebrotes y/o seguimiento de poblaciones silvestres emparentadas (especificar los intervalos y la duración).
- Seguimiento des flujo de genes (especificar).
- Tratamiento(s) químico(s) adecuado(s) y/o tratamiento des suelo.
- Otros (especificar)

El plan de seguimiento posterior a la liberación ha sido completado.

Se ha seguido el plan que figura en la solicitud y en el formulario de síntesis de notificación, parte B.

Se ha seguido el calendario fenológico de las plantas de este experimento, fundamentalmente en lo que se refiere a floración y fructificación. No se ha encontrado ningún caso de rebrote de planta transgénica fuera del experimento ni flujo de transgenes alrededor.

6.3 Plan de observación(es)/método(s) seguido(s)

En esta sección habrá que describir el plan de observación y los métodos utilizados para recabar los efectos sobre los que habrá que informar en el punto siguiente (punto 6.4). Se describirá detenidamente cualquier cambio o modificación del plan que figura en la solicitud y en el formulario de síntesis de notificación, parte B.

En el transcurso de tiempo entre la notificación y la presentación del informe final, podrían desarrollarse nuevos conocimientos o métodos científicos que modifiquen los métodos utilizados. Es importante reflejar tales modificaciones en la presente sección.

Se ha seguido el plan que figura en la solicitud y en el formulario de síntesis de notificación, parte B.

6.4 Efectos observados

6.4.1. Nota explicativa

Deberán declararse todos los resultados de las liberaciones intencionales en relación con la salud humana o el medio ambiente, independientemente de que los resultados indiquen un aumento, disminución o estabilización de los riesgos.

Los principales objetivos de la información recogida en el presente punto son:

- confirmar o invalidar cualquier hipótesis avanzada durante la fase de evaluación des riesgo para el medio ambiente en relación con la prevalencia y el impacto de los efectos potenciales de los OMG, y
- poner de relieve los efectos de los OMG que no fueron detectados durante fase de evaluación del impacto.

Los **efectos/interacciones** de los organismos modificados genéticamente

- con respecto a cualquier riesgo para la salud humana, y
- con respecto a cualquier riesgo para el medio ambiente,

deberán señalarse en el presente punto.

Deberá concederse especial atención a los efectos imprevistos o no esperados.

El notificador encontrará, a continuación, algunas indicaciones sobre los datos que debería incluir en el informe. Los efectos habrán de considerarse en relación con el cultivo, la característica nueva introducida, el medio ambiente receptor y las conclusiones de la evaluación de los riesgos, específica para cada caso. Con el fin de estructurar la información y facilitar una búsqueda eficaz de los datos del informe, el notificador deberá usar palabras claras específicas para completar las casillas de esta sección 6, y en particular los puntos 6.4.2, 6.4.3, y 6.4.4. Una lista actualizada de estas palabras esta disponible en la dirección <http://gmoinfo.irc.it> de Internet.

6.4.2. Efectos previstos

Por “efectos previstos” se entienden los efectos potenciales que ya se señalaron en la evaluación del riesgo medioambiental de la notificación y son, por lo tanto, previsibles. Dichos efectos deberán incluirse en esta sección.

Los notificadores deberán suministrar datos en relación con la liberación intencional que validen las hipótesis de la evaluación medioambiental del riesgo.

6.4.3. Efectos imprevistos⁴

Los “efectos imprevistos” se refieren a los efectos sobre la salud humana o el medio ambiente **que no se previeron o detectaron en la evaluación de los riesgos para el medio ambiente** de la notificación. Esta parte del informe debería contener cualquier información con respecto a los efectos no deseados u observaciones pertinentes en relación con la evaluación inicial de los riesgos para el medio ambiente. En caso de que se produzcan efectos u observaciones imprevistos, los datos correspondientes deberán presentarse de la forma más detallada posible con el fin de hacer una interpretación adecuada de los mismos.

6.4.4. Otras informaciones

Se invita a los notificadores a que suministren cualquier información que sea pertinente para los ensayos sobre el terreno de que se trate aunque se salga del ámbito de la notificación. También se puede incluir información sobre los efectos beneficiosos.

Todos los restos desechables procedentes del cultivo de los árboles transgénicos (plantas transgénicas enteras, restos de poda, fruta, etc.) se quemaron en el quemador dispuesto en el interior de la parcela, como estaba previsto. Se procederá del mismo modo al cerrar ahora el ensayo.

No se han observado efectos imprevistos.

7 Conclusión

En esta sección se deberán incluir las conclusiones y las medidas adoptadas o por adoptar en función de los resultados de la liberación de cara a nuevas liberaciones y, en su caso, hacer referencia a cualquier tipo de producto que el notificador tenga previsto notificar en una fase posterior.

El objetivo de la actividad es el cultivo de naranjo dulce transgénico que sobreexpresa un gen de floración de *Arabidopsis thaliana* para investigar la modificación del crecimiento de los árboles y del desarrollo floral y del fruto. Se ha sobre-expresado el gen de identidad de meristemo floral *APETALA 1 (AP1)* de

⁴ Sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 8 de la Directiva 2001/18/CE por lo que se refiere al tratamiento de las modificaciones o de nueva información.

Arabidopsis thaliana en naranjo dulce Pineapple juvenil y se ha conseguido el efecto de floración rápida. Se ha investigado si la sobre-expresión de dicho transgén afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas en campo. Concretamente, se ha investigado:

- 1) La posible modificación del crecimiento de los árboles al producir mucha floración.
- 2) La posible modificación del desarrollo floral y del fruto.
- 3) La calidad de la fruta.

Actualmente estamos escribiendo un artículo científico con los resultados de estos experimentos, generados en Villareal.

FECHA: 15 de Enero de 2022