



INFORME DE EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA LIBERACIÓN EN CAMPO DE VECTOR VIRAL BASADO EN EL GENOMA DEL *CITRUS LEAF BLOCH VIRUS* (CLBV) (Notificación B/ES/14/07)

Características, objetivo y duración del ensayo

El Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), en Valencia, ha presentado al Comité Valenciano de Control de organismos modificados genéticamente, la propuesta para realizar un ensayo de campo, en dos parcelas del propio IVIA (una bajo malla y otra sin ella), con un vector viral modificado genéticamente, basado en el genoma del *Citrus leaf bloch Virus* (CLBV).

El objetivo de la liberación es plantar cítricos inoculados con el vector viral modificado genéticamente basado en el genoma del virus del manchado foliar de los cítricos (CLBV) para que exprese el gen FLOWERING LOCUS T (FT) de *Arabidopsis thaliana* (*clbvINprFT*). La expresión de FT desde el genoma del virus hace que se adelante la floración y fructificación en varios años.

El virus del manchado foliar tiene como único huésped natural a los cítricos y es asintomático en todas las variedades comerciales, solo induce síntomas suaves de manchado en hojas y acanaladuras en la madera en Dweet tangor y cidro, respectivamente. Estas plantas se utilizan rutinariamente como plantas indicadoras para el diagnóstico de virus por su alta sensibilidad a todos los patógenos, pero no se utilizan comercialmente.

El vector viral modificado se multiplica en el meristemo y al expresar la proteína FT (Florigeno) induce la floración. Esto permitirá una evaluación más temprana de la calidad de la fruta en procesos de mejora de los cítricos, sin que se vea modificado el crecimiento ni la arquitectura de la planta, y así también poder eliminar los genotipos que no interesen. Con este procedimiento se podrá evaluar un gran número de genotipos en un corto periodo de tiempo en una superficie pequeña de suelo.

Es importante resaltar que el genoma del virus no se integra en el genoma de la planta por lo que la planta inoculada no se puede considerar un organismo modificado genéticamente.

Se propone comenzar el ensayo en febrero de 2015, con una duración aproximadamente de 5 años.

Características del ensayo:

Se propone propagar 6 plantas de híbridos triploides sobre cinco hibridaciones de *Citrus macrophylla* (Temple x Kara 4x, Moncada x Nadorcott 4x, Imperial x Sanguinelli, Ellendale x Ananas 4x y Fortune x Wilking), que se inocularan simultáneamente en el patrón con el vector *clbvINpr-FT*. Las plantas se inocularán y se propagarán en invernadero y posteriormente se plantarán en dos parcelas experimentales ubicadas en el IVIA.

Una parcela estará bajo malla (Experimento M) y otra parcela al aire libre (Experimento A). Como control se multiplicaran el mismo número de híbridos triploides sin ser inoculados con el vector viral.



Se plantarán un total de 62 plantas inoculadas con el vector viral en cada parcela, siendo la extensión de cada una de ellas de 150 m². Los terrenos del IVIA están vallados y el acceso vigilado por cámara y guardia jurado durante las 24 horas. Ambas parcelas están rodeadas por otras ocupadas por cítricos de otras experimentaciones del IVIA.

Identificación y caracterización de riesgos potenciales

a) Caracterización molecular

Con el objetivo de desarrollar un vector viral para cítricos se introdujo el gen FT de *A. thaliana* en el virus para que lo exprese desde su genoma. Se clonó el fragmento amplificado *atFT* en el vector viral *clbvINpr* para obtener la construcción *clbvINpr-Ft*. Para ello el vector *clbvINpr* se digirió con la enzima de restricción *Pml* I, se defosforiló y se ligó el inserto *atFT* inmediatamente después del promotor duplicado del CP-sgARN. El vector *clbvINpr* está clonado en el plásmido binario pBIN 19 lo que permite transformar la construcción tanto en células de *E. coli*, para multiplicar y aislar el plásmido, como en células de *A. tumefaciens* para expresar la construcción en plantas mediante agroinoculación. Se agroinocularon plantas de *Nicotiana benthamiana* con el cultivo de *A. tumefaciens* transformado con la construcción *clbvINpr-Ft*. Una vez establecida la infección viral se preparó un extracto semipurificado de viriones a partir de estas plantas. Una vez infectada una planta de cítrico con el virus recombinante, para inducir la floración en nuevos genotipos de cítricos se inoculan mediante injerto utilizando trozos de corteza de las plantas de cítricos infectadas con *clbvINpr-Ft*.

b) Capacidad de transferencia del material genético

Mientras que las plantas de cítricos estén vivas el vector viral se multiplicará en ellas pero se considera que no hay riesgo de dispersión del vector, ni horizontal ni verticalmente, de forma natural.

Se ha comprobado en experimentos previos en condiciones controladas de invernadero que el virus salvaje (CLBV) no se transmite por el polen de la planta, y aunque la transmisión por semilla en algunos genotipos de cítricos se produce en baja proporción (menos del 2%), el análisis de más de 150 plantas obtenidas mediante germinación de semillas de plantas infectadas con el vector *clbvINprFT*, no ha detectado en ningún caso el vector, por lo que no hay evidencias que este se transmita por semilla. Este resultado probablemente es debido a la menor tasa de acumulación del vector viral respecto al virus original.

De todas formas, las plantas que se inocularán son híbridos triploides que no producen semillas y en caso de producir alguna, la probabilidad de germinar en condiciones de cultivo tradicional de los cítricos se considera prácticamente nula. Incluso aunque germinase la semilla el vector viral no se diseminaría ya que el vector viral no se transmite de forma natural.

Por otro lado, el vector viral solo puede intercambiar material genético con otro genoma del mismo virus. Por estudios de variabilidad genética con aislados de todo el mundo no se ha detectado ningún



genoma viral que pueda ser recombinación de otros. De todas formas no supondría ningún aumento de la virulencia ya que no se han encontrado aislados que sean más severos. Por ello, y aunque las parcelas de ensayo estarán rodeadas de cítricos, el riesgo no es significativo ya que el virus no se transmite de forma natural.

En resumen, según los datos y evidencias que se disponen hasta la fecha, no hay ninguna referencia científica de que el CLBV se transmita de forma natural, y por tanto se considera que el riesgo de contaminación genética o de provocar enfermedades a otras plantas de cítricos próximas o de otras especies cultivadas o silvestres, es insignificante.

Por todo ello, la CNB considera que en este caso no es necesario mantener una distancia de aislamiento con respecto a otras plantas de cítricos existentes en el IVIA.

c) Estabilidad genética y fenotípica

Según el notificador la construcción del vector viral es muy estable. En caso de mutar el virus, no supondría cambios en su virulencia ya que no se conocen aislados virulentos del virus. En el caso de mutar el gen FT, éste no induciría la floración pero tampoco variaría la virulencia del virus.

Además por estudios de variabilidad genética realizados por los investigadores del IVIA con aislados de CLBV de todo el mundo, se ha comprobado que este virus es de los más estables, con una diversidad nucleotídica menor del 1 % y no encontrándose ningún genoma producto de la recombinación de otros.

El notificador indica que, para una mejor verificación de la estabilidad genética del vector viral, éste se amplificará mediante RT-PCR, utilizando iniciadores del virus flanqueantes al punto de inserción del gen FT y se secuenciarán los fragmentos amplificados.

La CNB considera que estos análisis deberán realizarse anualmente, tomando muestras de los árboles inoculados y que mantengan el vector. El tamaño de la muestra deberá ser estadísticamente significativo.

d) Efectos sobre la salud

Según el notificador no existe ninguna razón para pensar que se producirá algún efecto tóxico o perjudicial sobre la salud humana o de los animales. El virus original solo infecta de forma natural cítricos y es asintomático en todas las variedades comerciales. No se trasmite de forma natural, ni por vectores ni por polen.

Este virus está presente en plantaciones comerciales y nunca se ha detectado ningún caso de alergia asociado a él. Tampoco en los experimentos controlados previos que se han realizado nunca se ha notificado ninguna reacción alérgica atribuible a los árboles de cítricos infectados con el virus modificado genéticamente que expresan el gen FT.



e) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

El único huésped natural del virus son los cítricos y, como se ha mencionado anteriormente, no se dispersa por vectores ni por polen. No se conoce ningún otro vector capaz de transmitir este vector viral.

La única forma de infectar una planta es por la inoculación mediante injerto con material vegetal infectado. Las evidencias existentes de la no dispersión natural son: 1) en prospecciones realizadas en todo el mundo nunca se ha visto que se infecte un árbol sano con el virus junto o cerca de una plantación comercial infectada; 2) nunca se ha detectado el virus en la progenia tras la fecundación con polen obtenido de un árbol infectado; 3) tampoco se ha detectado el virus mediante análisis RT-PCR a tiempo real de polen de un árbol infectado; y 4) nunca se consiguió la transmisión utilizando distintos vectores (varias especies de pulgones, mosca blanca, etc.).

No obstante, el solicitante indica que, aunque no existen evidencias de transmisión natural del virus, para confirmarlo se tomarán muestras de los árboles colindantes y se analizará, mediante RT-PCR, la presencia del vector viral. Este control se realizará una vez al año.

f) Efectos sobre otros organismos

El vector viral no afecta a la fauna existente o a otro tipo de flora que no sean los cítricos.

g) Control y tratamiento de residuos:

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera, en general, adecuadas las medidas propuestas por el IVIA para llevar a cabo el control de las parcelas, durante y después del ensayo.

Como técnica de eliminación de los vectores virales modificados genéticamente y de los árboles de cítricos utilizados después del experimento, se deberá proceder a la quema de todos los árboles inoculados, del material de poda y de cualquier material vegetal que se desprenda del árbol. **No se dejará que ningún material vegetal procedente de los ensayos se seque en las parcelas utilizadas en el mismo.**

Adicionalmente se deberá limpiar adecuadamente el material de poda empleado para garantizar que se elimina la posibilidad de transmisión.

Por último, se informa que ante cualquier anomalía o incidencia se informará inmediatamente a la Autoridad Competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad y se tomarán las medidas adecuadas, incluida la destrucción de los ensayos si fuera necesario.

Además se comunica que la Autoridad Competente, en su caso, realizará las visitas de inspección que considere oportunas, antes, durante y tras la finalización del ensayo.



CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las condiciones de uso propuestas, el ensayo propuesto no supone un riesgo significativo para la salud humana y/o el medio ambiente.

Una vez concluido dicho ensayo **se remitirá un informe de resultados** del mismo, en español y en inglés, al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad conforme al modelo que figura en el Anexo XI del Reglamento 178/2004, de 30 de enero, de desarrollo de la Ley 9/2003. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 8 de enero de 2015