



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN EN CAMPO DE PLANTAS DE CIRUELO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (B/ES/15/01)

Características, objetivo y duración del ensayo:

El Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) ubicado en Murcia, ha presentado esta solicitud, cuyo objetivo es realizar un ensayo de campo con ciruelo modificado genéticamente (línea J8-1), utilizando éste como porta-injerto para otras plantas frutales, en concreto como patrones de variedades comerciales de melocotonero y albaricoquero.

El objetivo del ensayo es investigar el comportamiento de la línea J8-1 de *Prunus domestica* (Claudia Verde), como patrón para diferentes variedades comerciales bajo las condiciones de cultivo normales de las zonas donde se va a experimentar. Estas plantas superiores modificadas genéticamente (PSMG) presentan un mayor vigor y desarrollo radicular que las plantas no transformadas, y por ello se emplearán como patrones que serán injertados con diferentes variedades comerciales del género *Prunus* (albaricoquero, melocotonero, ciruelo). El empleo de estas plantas como patrón podría aumentar la producción de las variedades comerciales a ensayar.

La línea de ciruelo J8-1, modificada genéticamente, contiene 4 copias de un cDNA que codifica para la enzima ascorbato peroxidasa, APX citosólica (*cytapx*) (APX) de guisante. Esta inserción le confiere tolerancia a NaCl en condiciones *in vitro* y a estrés hídrico en plantas aclimatadas. En ningún caso, la línea J8-1 se llevará a floración, con lo que el riesgo de diseminación es nulo.

Plantas PSMG adultas crecidas en macetas en los invernaderos se trasplantarán en la zona de liberación. Las PSMG aclimatadas en cámaras de crecimiento durante 2 meses se cultivan en macetas en los invernaderos del CEBAS-CSIC durante 12 meses adicionales. Durante el transcurso de ese periodo se injertan las variedades comerciales de melocotonero y de albaricoquero. Estas instalaciones (cámaras de crecimiento e invernadero) recibieron la autorización para el cultivo de este tipo de material vegetal (Notificación A/ES/06/I-13, autorizado por el CIOMG con fecha 14-02-07).

El ensayo se realizará en la “Finca experimental La Matanza”, perteneciente al CEBAS-CSIC, y que está situada en el término municipal de Santomera (a 18 km de Murcia). Esta finca está totalmente vallada y consta de sistema de video-vigilancia. Las PSMG ya injertadas se trasplantarán a su ubicación definitiva en la zona del ensayo, en marcos de plantación de 4 x 4 m., situándose las plantas en dos hileras de 5 plantas cada una.

Para el transporte de las PSMG desde el CEBAS-CSIC hasta el lugar de liberación en la Finca Experimental del CEBAS-CSIC, las plantas se confinarán en cajas cerradas y serán transportadas por miembros del equipo investigador en un vehículo con distintivos oficiales.

El periodo de liberación propuesto para este ensayo es desde abril 2015 a diciembre 2018.



Identificación y caracterización de riesgos potenciales

a) Capacidad de transferencia del material genético:

El ciruelo utilizado es *Prunus domestica* cv. Claudia Verde, de la familia de las *Rosaceas*, y son plantas que se reproducen sexualmente.

Aunque en las zona de liberación se cultivan especies del mismo género, y por tanto compatibles sexualmente con la PSMG, sin embargo en este caso, la posibilidad de intercambio genético con la misma especie o con otras especies que puedan crecer en el área de cultivo o de forma natural en el medioambiente circundante se considera nula pues no hay posibilidad de intercambio sexual ya que no se llegará a la fase reproductora. Nunca se llegará al estado de floración, pues se sólo se usarán como portainjerto (patrón), el cual nunca florecerá. De cualquier manera, se evitará el desarrollo de estructuras reproductivas de la PSMG mediante podas. Tampoco hay riesgo de liberación después de la cosecha ya que, como la PSMG nunca dará flores, tampoco emitirá polen o semillas.

La Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) solicita que se extremen las medidas de vigilancia para asegurar que se realiza la poda indicada siempre antes de que se produzca la floración.

b) Estabilidad genética y fenotípica:

No se han observado cambios en los datos de expresión durante los sucesivos pasos de micropropagación de la planta.

La Comisión Nacional de Bioseguridad recuerda la necesidad de informar sobre cualquier cambio advertido durante o después del ensayo en relación con la estabilidad genética.

c) Caracterización molecular:

El notificador indica que, mediante transformación con *A. tumefaciens*, se han introducido 4 copias del gen *cytapx* de *Pisum sativum* en la línea J8-1. La función de la proteína APX citosólica es la de eliminar H_2O_2 en el citosol. El cDNA que codifica para la *apx1* citosólica tiene un tamaño de 1054 pb, y se clonó en el sitio de restricción HindIII del plásmido pcGN1578. El transgen *cytapx* está bajo el control del promotor CaMV35S duplicado, la secuencia TEV y el terminador Nos. La construcción resultante también porta en el T-DNA el gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) para seleccionar las células transformadas mediante la aplicación de kanamicina al medio de cultivo.

Esta inserción le confiere un crecimiento más vigoroso, tanto de la parte aérea como de la raíz, así como una mayor capacidad antioxidante, ya que estas plantas presentan un 40% más de actividad de la proteína APX. El transgen *cytapx* está bajo el control del promotor CaMV35S duplicado, la secuencia TEV y el terminador Nos.



La CNB ha comprobado que en la información aportada sobre caracterización molecular, no hay información suficiente sobre el lugar de inserción del transgén, y por lo tanto, existen dudas en el número de inserciones del éste. De momento tampoco se conocen las secuencias flanqueantes a las inserciones, por lo que es imposible en estos momentos diseñar métodos fiables de detección basados en la PCR. No obstante, la CNB considera así mismo que para este primer ensayo, dicha información no es relevante para la seguridad del mismo.

La Comisión Nacional de Bioseguridad solicita que se vaya avanzando en la caracterización molecular de este ciruelo modificado genéticamente (posición exacta de cada una de las integraciones del T-DNA, posibilidad de que éstas hayan podido afectar la expresión de algún gen de la planta y la localización de las 4 integraciones del T-DNA) a medida que se vaya avanzando en el desarrollo de este proyecto, y en su caso para futuros ensayos.

d) Patogenicidad:

Al no haber productos derivados del PSMG no se esperan efectos tóxicos y/o alergénicos. En relación a otros organismos vivos, la interacción será mínima ya que se aplicarán los medios habituales empleados en el control de este tipo de cultivos para evitar la infección por patógenos. Además, se considera insignificante la interacción tanto de seres humanos como de predadores naturales a través de la ingesta de los frutos de estos cultivos, ya que éstos no se producirán en ningún caso por las PSMG.

No obstante, en un futuro podría ser necesaria la realización de estudios bioinformáticos para demostrar la usencia de alergenicidad por las nuevas proteínas expresadas en la planta transgénica, estudiando su secuencia a nivel aminoacídico y comparándolas con bases de datos de secuencias de alérgenos y toxinas conocidas.

e) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

No se espera ningún cambio o efecto adverso producido por la planta modificada respecto a la planta original en relación con el establecimiento o diseminación dada la naturaleza de la modificación genética introducida. Sin embargo, la línea J8-1 si tiene una mayor capacidad de supervivencia para determinadas condiciones ambientales, ya que presenta un crecimiento más vigoroso y una mejor adaptación a condiciones de salinidad (Díaz-Vivancos *et al.*, 2013, Plant Biotech J, 11, 976–985) y de déficit hídrico.

Además, en ensayos realizados en maceta se observa un mayor desarrollo radicular en las PSMG que en las plantas no transgénicas.

En este sentido la CNB considera que se deberá hacer un seguimiento durante el ensayo, reportando información sobre sí se mantienen estas características en condiciones de campo y como afectan al entorno, o para detectar cualquier posible cambio en dichas propiedades.



f) Efectos sobre otros organismos:

El notificador afirma que no es de esperar ninguna interacción entre las nuevas proteínas expresadas y los organismos no diana. No se esperan consecuencias con los insectos polinizadores ya que no habrá floración y no existen consecuencias por el contacto directo con la PSMG. Con respecto a la rizosfera, no está descrita la transferencia horizontal de material genético de una raíz a un hongo micorrízico.

En cualquier caso, la **Comisión Nacional de Bioseguridad recomienda que se aprovechen estos ensayos para observar posibles efectos sobre organismos no diana y sobre la biodiversidad en general**, cuestiones que serían relevantes de cara a un potencial cultivo a escala comercial de este ciruelo modificado genéticamente, objeto de esta notificación.

g) Control y tratamiento de residuos:

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera, en general adecuadas las medidas propuestas por el notificador para llevar a cabo el control, durante y después del periodo post-liberación de la zona.

Se aplicarán las prácticas de cultivo y preparación del lugar de liberación, comúnmente empleadas para el cultivo de frutales del género *Prunus*. En concreto, previamente a la liberación se procederá al arado de la tierra del lugar de liberación y éste se realizará 3 veces al año para evitar el crecimiento de otros tipos de vegetación. La irrigación de las plantas se realizará mediante riego por goteo con un sistema automatizado.

Respecto a la poda, esta se realizará por el personal especializado de la Finca Experimental del CEBAS-CSIC, el cual, junto con el equipo investigador, se encargará de la supervisión del desarrollo de las PSMG con el objetivo de evitar la formación de estructuras de supervivencia o latencia. El material de poda será incinerado de forma controlada en las instalaciones de la Finca Experimental del CEBAS-CSIC.

Los únicos residuos esperables serán los restos de poda que se realizará en primavera y otoño para evitar el desarrollo de tallos y hojas de las PSMG, ya que su finalidad es emplearlas sólo como portainjertos (patrón). Los restos de poda serán incinerados de forma controlada en las instalaciones de la Finca Experimental del CEBAS-CSIC. Tras los ensayos, todos los PSMGs serán arrancadas y **también destruidas por incineración.**

En el informe de resultados de este ensayo se deberá indicar como se ha procedido a realizar la destrucción del ensayo y como se ha realizado el transporte de restos desde la parcela del ensayo hasta la incineradora del CEBAS.

En cuanto al seguimiento de las parcelas, los responsables de las parcelas acudirán a ellas 2-3 veces por semana, mientras que los miembros del equipo de investigación acudirán a las parcelas una vez al mes y se reunirán con los responsables de la misma para conocer de primera mano el desarrollo de la experiencia.



Así mismo, las muestras tomadas para análisis deberán envasarse y etiquetarse convenientemente para su correcta identificación, extremando las medidas de precaución para evitar un posible vertido accidental durante el transporte de las muestras.

Por último indicar 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 medidas de uso propuestas, el ensayo no supone un riesgo significativo para la salud humana y/o el medio ambiente.

Una vez concluidos el ensayo, se remitirá un **informe de resultados** del mismo en español y en inglés a la Autoridad competente 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 30 de abril de 2015