

PARTE 2 (DECISIÓN DEL CONSEJO 2002/813/CE)

MODELO DE INFORMACIÓN DEL RESUMEN DE LA NOTIFICACIÓN (SNIF)
PARA LA LIBERACIÓN DE PLANTAS SUPERIORES MODIFICADAS
GENÉTICAMENTE (PSMG)
(ANGIOSPERMAE AND GYMNOSPERMAE)

A. *INFORMACIÓN GENERAL*

1. *Detalles de la notificación*

(c) (a) Número de notificación:	B/ES/08/05
(d) (b) Fecha de reconocimiento de la notificación:	
(e) Título del proyecto:	Liberación de naranjo y citrange transgénicos que sobreexpresan genes de floración de <i>Arabidopsis thaliana</i> para investigar la modificación del crecimiento de los árboles y del desarrollo floral y del fruto.
(f) (d) Periodo de liberación propuesto:	Primavera de 2008 a primavera de 2018.

2. *Notificador*

(g) (a) Nombre del instituto o compañía:	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Generalitat Valenciana.
--	---

3. *¿Esta planificada la comercialización de la misma PSMG en otra zona, dentro o fuera de la Comunidad [según el Artículo 6(1)] por el mismo notificador?*

Si <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indicar los códigos del país o países:	

4. *¿Se ha notificado la comercialización de la misma PSMG en alguna zona dentro o fuera de la Comunidad, por el mismo notificador?*

Si <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
(h)	

B. INFORMACIÓN DE LA PLANTA MODIFICADA GENÉTICAMENTE

1. Nombre completo

(i) (a) Familia
Rutaceae
(j) (b) Género
<i>Citrus</i> y <i>Citrus X Poncirus</i> .
(k) (c) Especie
<i>Citrus sinensis</i> L. Osb. y <i>Citrus sinensis</i> L. Osb. X <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.
(l) (d) Subespecie
(m) (e) Cultivar/línea de reproducción
Pineapple y Carrizo
(n) (f) Nombre común
Naranja dulce Pineapple y citrange Carrizo

2. Descripción del carácter y características que se han sido introducido o modificado

Se han sobre-expresado los genes de identidad de meristemas floral *LEAFY (LFY)*, *APETALA 1 (API)*, *SUPPRESSOR OF CONSTANS 1 (SOC1)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)* de *Arabidopsis thaliana* en citrange Carrizo y con ello se ha conseguido inducir 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 naranja dulce Pineapple y se ha conseguido el mismo efecto de floración rápida. Pretendemos ahora investigar si la sobre-expresión de dichos transgenes afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas en campo.

A todas las líneas transgénicas se les ha introducido resistencia a kanamicina. Todas las líneas transgénicas codifican la enzima β -glucuronidasa.

3. Tipo de modificación genética

<u>Inserción de material genético</u>
(b) Delección del material genético
(c) Sustitución de bases
(d) Fusión celular
(e) Otras, especificidad

4. **En el caso de inserción de material genético, describir el origen y la función de cada componente del fragmento de ADN insertado**

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 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.

Módulo *35Spro::FT::NOSter*: 870, 864 y 275 nucleótidos, respectivamente.

Módulo *35Spro::SOC1::NOSter*: 870, 1320 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. Los transgenes *APETALA 1 (API)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)* proceden 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.

5. **En caso de delección u otra modificación de material genético, indicar la función de las secuencias suprimidas o modificadas**

No procede

6. **Breve descripción de los métodos usados para la modificación genética**

Cocultivo de segmentos de entrenudo de plántulas de naranjo dulce Pineapple con la cepa desarmada EHA 105 de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración de plantas enteras a partir de las células transformadas en los explantes mediante cultivo in vitro en los medios apropiados, inductores de organogénesis.

Cocultivo de segmentos de epicotilo de citrange Carrizo con la cepa desarmada EHA 105 de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración de plantas enteras a partir de las células transformadas en los explantes mediante cultivo in vitro en los medios apropiados, inductores de organogénesis.

7. **Si la planta parental es una especie forestal arbórea, describir las vías y extensión de la diseminación y los factores específicos que la afectan.**

No procede.

C. INFORMACIÓN SOBRE LA LIBERACIÓN EXPERIMENTAL

1. *Objetivos de la liberación (incluyendo cualquier información relevante disponible en este estadio) como objetivos agronómicos, test de hibridación, cambios en la supervivencia o en la diseminación, test de efectos en organismos objetivo y no-objetivo*

Liberación de naranjo y citrange transgénicos que sobreexpresan genes de floración de *Arabidopsis thaliana* para investigar:

- 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 en el caso de las plantas transgénicas de naranjo dulce Pineapple.

2. *Localización geográfica del lugar de la liberación*

Finca experimental del Servicio de Transferencia Agraria (STA) del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), localizado en el término municipal de Villareal, provincia de Castellón. La parcela del ensayo está a varios kilómetros de distancia de plantaciones comerciales y tendrá una extensión de unos 7500 m² para realizar distintos experimentos de liberación de cítricos transgénicos.

3. *Tamaño del sitio (m²)*

Tendrá una extensión de unos 7500 m² en total para cuatro ensayos de liberación entre los que se incluye éste (B/ES/08/02, B/ES/08/03, B/ES/08/04 y B/ES/08/05). Este ensayo ocupará 1000 m² aproximadamente en la parte central de la parcela.

4. *Datos relevantes en cuanto a liberaciones anteriores llevadas a cabo con la misma planta genéticamente modificada, si existen, específicamente relacionados con los posibles impactos en el medio ambiente y la salud humana*

Notificación B/ES/96/15. El ensayo tiene una superficie total de 1638 m². Contiene un total de 130 árboles, que incluyen 16 plantas transgénicas de naranjo Pineapple, 16 de lima Mexicana y 16 de citrange Carrizo, más los testigos no transgénicos de las mismas especies y las plantas borde de clementino de Nules. Se ha introducido en las plantas los genes marcadores *nptII* y *uidA* (GUS), que codifican las enzimas neomicina fosfotransferasa II y β -glucuronidasa, respectivamente. Se está investigando los caracteres morfológicos y fenológicos de los árboles, la calidad de la fruta producida, la expresión de los transgenes en hojas, flores y frutos, la estabilidad

de la integración y expresión de los transgenes en las plantas, la transmisión de los transgenes a la progenie y la posibilidad de dispersión de los transgenes a través del polen de las plantas transgénicas a los árboles de Clemenules que bordean la parcela. Se ha evaluado todos los años desde 2001 el número de semillas que expresan uno de los transgenes marcadores (*uidA*) del total de semillas que produce la fruta de los árboles de Clemenules. Los resultados se muestran a continuación:

Año	Nº semillas analizadas	Nº Frutos analizados	Nº semillas GUS- positivas	% semillas GUS- positivas
2001	2990	378	5	0.17 %
2002	1359	1119	13	0.96 %
2003	2171	810	9	0.41 %
2004	603	750	5	0.67 %
2005	2619	560	75	2.9 %
2006	1573	590	22	1.4%

Dado que los árboles de Clemenules no transgénico están muy próximos a los árboles transgénicos, nuestros resultados revelan que las posibilidades de dispersión de transgenes por polen a árboles de otras parcelas son muy bajas en nuestras condiciones.

Notificación B/ES/06/43. Liberación de citrange Carrizo transgénico que sobreexpresa un gen precursor de GA 20-oxidasa en sentido o en antisentido para investigar la modificación de la arquitectura de las plantas, su floración y fructificación, y el potencial carácter modulador del desarrollo de una variedad no transgénica injertada sobre el mismo. Se ha modificado el contenido endógeno de GA1 en las plantas. La GA1 es la giberelina activa que determina el tamaño de las plantas en cítricos. Como consecuencia de ello, se ha modificado la arquitectura de las plantas transgénicas. El ensayo se está realizando en la Finca experimental del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), localizado en el término municipal de Moncada, provincia de Valencia. La parcela del ensayo está a más de 100 m de distancia de plantaciones comerciales y tiene una extensión de unos 1000 m². La plantación se empezó a realizar en la primavera de 2007. La duración prevista del ensayo es de unos 10 años. Se va a para investigar:

- 4) la modificación de la arquitectura de las plantas en condiciones de campo.
- 5) su floración y fructificación; en los mismos árboles descritos en el primer objetivo.
- 6) el potencial carácter modulador del desarrollo de una variedad no transgénica injertada sobre el mismo. Se investigará la posible variación del porte de los árboles, sus características fenológicas y la producción y calidad de la fruta.

D. RESUMEN DEL POSIBLE IMPACTO AMBIENTAL DEBIDO A LA LIBERACIÓN DE LA PSMG DE ACUERDO CON EL APARTADO D2 DEL ANEXO II DE LA DIRECTIVA 2001/18/EC

Observe sobre todo si los rasgos presentados directa o indirectamente pudieran conferir una ventaja selectiva en ambientes naturales; explicar también cualquier ventaja significativa esperada en el medio ambiente.

Los cítricos comerciales se reproducen vegetativamente en viveros especializados mediante injerto de variedades bien conocidas sobre portainjertos también bien conocidos. En nuestras condiciones y teniendo en cuenta las especies con las que trabajamos, no hay posibilidad de que las plantas transgénicas se establezcan en campo como mala hierba.

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. 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 STA del IVIA en Villareal hay un polígono industrial, lo cual reduce extraordinariamente las posibilidades de que se dé polinización cruzada con árboles de fincas comerciales, ya que las más próximas se encuentran a varios kilómetros de distancia. 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.

Las variedades de cítricos no se reproducen por semilla. En el caso hipotético de que apareciesen plántulas germinadas a partir de semilla en un huerto, serían arrancadas por los agricultores al realizar las prácticas de cultivo habituales. Además, estas plántulas no llegarían a florecer ya que el periodo juvenil de los cítricos es de varios años.

E. BREVE DESCRIPCIÓN DE CUALQUIER MEDIDA TOMADA POR EL NOTIFICADOR PARA EL CONTROL DEL RIESGO

La parcela se está preparando de acuerdo con las prácticas habituales del cultivo de los cítricos. Los árboles previamente existentes se han arrancado, se han eliminado todos sus restos (incluyendo raíces), se han efectuado varias labores de preparación del terreno y se ha nivelado por medio de sistema láser. Se utilizarán las prácticas habituales de cultivo, eliminando las malas hierbas por sistema combinado de escarda química y mecánica. Se plantarán 5 propagaciones de cada una de las líneas transgénicas de citrange Carrizo: AP1 13.5, AP1 13.20, FT 12, FT 14b, FT 24, FT 65, SOC1 25, SOC1 46a, SOC1 48b y SOC1 67b, más 5 propagaciones de citrange Carrizo control y 5 propagaciones de cada una de las líneas transgénicas de naranja dulce Pineapple: AP1 166, AP1 393, AP1 481, AP1 532, AP1 554, AP1 555, AP1 569 y AP1 583, más 5 propagaciones de naranja dulce Pineapple control 1-7. La disposición será de árboles al azar. En total habrá 100 árboles agrupados en uno de los cuadrantes de la parcela.

Rodeando a la parcela en que se pretende hacer éste y otros tres experimentos más de liberación de cítricos transgénicos se dispondrá una línea cordón control de árboles de clementino Clementines injertados sobre citrange Carrizo, que servirá de tampón para investigar la frecuencia de flujo génico a través del polen en la parcela.

Todos los restos desechables procedentes del cultivo de los árboles transgénicos (plantas transgénicas enteras, restos de poda, fruta, etc.) se quemarán en alguno de los dos quemadores que se están construyendo en el interior de la parcela.

F. RESUMEN DE LOS ENSAYOS PLANEADOS DE CAMPO DESIGNADOS PARA OBTENER NUEVOS DATOS ACERCA DEL IMPACTO SOBRE A SALUD HUMANA Y AMBIENTAL DE LA LIBERACIÓN (DONDE SEA APROPIADO)

La frecuencia de dispersión por polen se está evaluando desde hace varios años en la parcela con nº de notificación B/ES/96/15.

No se prevé ningún experimento de posible impacto sobre la salud humana ya que ésta no es la finalidad de nuestras investigaciones por el momento.