

RESUMEN DE LA NOTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE PLANTAS SUPERIORES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (ANGIOSPERMAS Y GIMNOSPERMAS)

A. Información de carácter general

1. Detalles de la notificación

a) Numero de notificación: B/ES/19/07
b) Fecha de acuse de recibo de la notificación: 15/04/2019
c) Título del proyecto: Producción en campo (limitado por redes) de plantas de arroz que acumulan 3 moléculas microbicidas en el endospermo.
d) Período propuesto para la liberación: 1 de junio a 31 de octubre, 2019

2. Notificador

(a) Nombre de la institución o empresa: Universitat de Lleida

3. *¿Tiene previsto el mismo notificador la liberación de esa misma PSMG en algún otro lugar dentro o fuera la Comunidad (de acuerdo con el apartado 1 del artículo 6)?*

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indique el código o códigos del país:	

4. *¿Ha notificado el mismo notificador la liberación de esa misma PSMG en algún otro lugar dentro o fuera de la Comunidad?*

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indique el número de notificación:	

B. Información sobre la planta modificada genéticamente

1. Identidad de la planta receptor o parental.

a) Familia: Graminea
b) Género: Oryza
c) Especie: sativa
d) Subespecie (si procede):
Cultivar/línea de reproducción (si procede): EYI 105 (Japonica)
e) Nombre vulgar: arroz

2. Descripción de los rasgos y características que se han introducido o modificado, incluidos los genes marcadores y las modificaciones anteriores.

La línea transgénica de arroz, H136 que acumula en su endospermo tres moléculas microbicidas, el anticuerpo 2G12, Grifitsina y Cianovirina fue obtenida a partir de la línea asiática de arroz Japonica EY105. Se le han incorporado 2 genes que codifican para el anticuerpo monoclonal 2G12, un gen que codifica para la lectina Grifitsina (GRFT) y otro gen que codifica para la lectina Cianovirina (CV-N). Los granos de arroz transgénicos de la línea H136 contienen: 17.2 µg/g de 2G12; 1.2 µg/g de GRFT y 6.4 µg/g de CV-N cuando se compara con la línea control EY105. Dicha línea no está diseñada contra ningún organismo vivo.

La H136 también contiene el gen *hpt* que la hace resistente al antibiótico higromicina.

3. Tipo de modificación genética.

(a) Inserción de material genético: Si
(b) Eliminación de material genético: No
(c) Sustitución de una base: No
(d) Fusión celular: No
(e) Otro (especifíquese): No

4. En caso de inserción de material genético, indique la fuente y la función prevista de cada fragmento componente de la región que se inserte.

Producción del anticuerpo 2G12 y funciones

2G12 es un anticuerpo monoclonal que se ha aislado de humanos y se ha producido de forma sintética por la empresa Polymun (<https://www.polymun.com/research-reagents/hiv-antibodies/>). El anticuerpo 2G12 reconoce el epítipo gp120 y lo neutraliza in vitro.

Producción de la lectina GRIFITSINA y funciones

GRFT es una lectina de 12.7-kDa aislada de la alga roja *Griffithsia* spp. Es una proteína dimerica acidica de 121 aminoácidos, con una estructura de dominios intercambiables. Inhibe selectivamente la unión de HIV-1 a glicanos ricos en manosas que se encuentran en la glicoproteínas de la envoltura del virus, y ha demostrado un amplio espectro de actividad antiviral contra *Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus* (SARS-CoV) y otros coronavirus, *Hepatitis C virus*, *Japanese encephalitis virus*, y *Herpes simplex virus*. GRFT no tiene actividad mitogénica en las células mononucleares de la sangre periférica, pero demuestra actividad completa en la presencia de secreciones vaginales de macaco y tiene un buen perfil de seguridad en el modelo de irritación vaginal de ratón. GRFT también puede inhibir la unión de HIV-1 a las células dendríticas molécula de adhesión intercelular célula específica-3-grabbing non-

integrin (DC-SIGN) y evita la transferencia del virus mediada por DC-SIGN a las células diana. Solo se pueden aislar cantidades muy pequeñas de GRFT del alga por lo que el desarrollo de microbicidas basados en lectinas requiere de la expresión de lectinas recombinantes en grandes cantidades. GRFT ha sido expresada por nuestro grupo como proteína recombinante en arroz. Al plásmido resultante se le denominó pgZ63-Griff.

Producción la lectina CIANOVIRINA y funciones

La lectina 11-kDa cianovirina-N (CV-N) procedente de la cianobacteria *Nostoc ellipsosporum*. Es una proteína de 101 aminoácidos que puede existir en forma de un monómero de dos dominios casi simétricos o como un dímero de dominios cambiantes. Se une a los residuos de manosa de los glicanos N-linked de la superficie de diferentes virus incluyendo la glicoproteína gp120 de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). CV-N actúa como un inhibidor de la entrada contra todos los tipos de HIV in vitro mediante el bloqueo de la fusión de la membrana y la entrada del virus en diferentes estados. Al plásmido resultante se le denominó pRPS-CV-N.

Gen de selección

El gen de selección introducido es el *hpt* (Rao et al., 1983), en la siguiente construcción: Promotor: el promotor 35S del Cauliflower mosaic caulimovirus (CaMV), que da expresión constitutiva.

Gen: *hpt* de *Escherichia coli* – Hygromycin B. Confiere resistencia a higromicina.

Terminador: pA35S de Cauliflower mosaic caulimovirus NOS polyA terminador.

5. En caso de eliminación u otra modificación del material genético, indique la función de las secuencias eliminadas o modificadas.

No aplicable

6. Descripción resumida de los métodos utilizados en la modificación genética.

Transformación de arroz. Las plantas de arroz (*Oryza sativa* L., cv. EY1105) se cultivan en invernadero a una temperatura de 28/28 °C día/noche con un fotoperiodo de 12h y una humedad relativa del 80% hasta la producción de semillas. Las semillas maduras de arroz son esterilizadas y colocadas en medio de inducción para que crezcan los embriones zigóticos (EZ). Los EZ después de 5-7 días de incubación son subcultivados a medio osmótico Murashige and Skoog (MS con: 4.4 g/L de polvo MS que incluye la vitaminas Gamborg B5 (Duchefa Biochemie M0231), 78.2 g/L manitol, 30 g/L sacarosa y 2.5mg/L 2,4-acido diclorofenoxiacético) donde se mantienen 4 horas antes de la transformación. El bombardeo se realiza con 10-mg de partículas de oro recubiertas con las construcciones que llevan al transgen microbicida y el agente de selección *hpt* (Christou et al., 1991a; Sudhakar et al., 1998). El ratio que utilizamos es 6:6:3:3:1, con el agente de selección *hpt* como componente minoritario. Los embriones se mantienen en medio osmótico durante 12 horas. Luego son subcultivados al medio de selección MS [4.4 g/L polvo MS que incluye Gamborg B5 Vitamins (Duchefa Biochemie M0231), 30 g/L sacarosa y 2.5 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético] al que se le añade 30 mg/L higromicina, manteniendo los tejidos en la oscuridad durante 2–4 semanas. La regeneración de plantas se realiza en medio MS regeneración y las plántulas son adaptadas al suelo y cultivadas en cámara de cultivo a 28/28°C día/noche de temperatura con un fotoperiodo de 12-h y 80% de humedad relativa.

Análisis moleculares. Las reacciones de PCR son realizadas en condiciones estándar utilizando 100 ng de ADN genómico y 0.5 unidades de la enzima GoTaq DNA polimerasa en un volumen total de reacción de 20 microlitros. El ADN y los cebadores son desnaturalizados a 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de reacciones a 94 °C durante 45 s, 60 °C durante 45 s, 72 °C durante 3 min, y un ciclo final de extensión de 72 °C durante 10 min.

Las semillas de la línea H136 T0 contienen: 17.2 µg/g de 2G12; 1.2 µg/g de GRFT y 6.4 µg/g de CV-N cuando se compara con la línea control EY1105.

7. Si la planta receptor o parental pertenece a una especie de árboles forestales, describa las vías y la extensión de la diseminación, así como los factores que afectan a esta.

No aplicable

C. Información sobre la liberación experimental

1. Finalidad de la liberación (incluida toda información pertinente disponible en esta fase) como, por ejemplo: fines agronómicos, ensayo de hibridación, capacidad de supervivencia o diseminación modificada, ensayo de los efectos en los organismos diana y en los que no lo son.

El objetivo principal de esta liberación es la *producción en campo (limitado por redes)* de plantas de arroz que acumulan 3 moléculas microbicidas en el endospermo. La línea a utilizar es la homocigótica H-136 (generación T3).

Las moléculas son un anticuerpo monoclonal 2G12 y dos lectinas GRFT y CV-N, con capacidad para neutralizar el virus del sida.

Los objetivos secundarios a conseguir con esta liberación son:

- a) Multiplicación del material para estudios posteriores de neutralización del virus *in vitro*
- b) Evaluación de la línea respecto a su línea original en los siguientes aspectos
 - o caracterización agronómica de la planta
 - o efectos de las plagas/fenómenos meteorológicos sobre las moléculas producidas

2. Localización geográfica del lugar de la liberación.

Se prevén una localización en el Municipio de Lleida

3. Área del lugar (m²).

10 m² rodeado de mallas

4. Datos pertinentes sobre liberaciones anteriores de esa misma PSMG, si los hubiera, específicamente relacionados con las repercusiones potenciales de su liberación en el medio ambiente y la salud.

D. Resumen del impacto ambiental potencial de la liberación de la PSMG de conformidad con el apartado D.2 del anexo II de la Directiva 2001/18/EC

Indique, en especial, si los rasgos introducidos podrían conferir directa o indirectamente una ventaja selectiva mayor en medios ambientes naturales; explique también todo beneficio ambiental significativo esperado.

- En las sucesivas generaciones de multiplicación realizadas, no se ha detectado ninguna diferencia morfológica, fisiológica ni agronómica entre las plantas transformadas y las plantas convencionales salvo en lo referente a la presencia de los 3 microbicidas incorporados
- La modificación genética introducida en el material que se solicita liberar consiste en la incorporación de varios genes responsables de la síntesis de diferentes microbicidas con la finalidad de producir microbicidas del grano. No se prevé ningún efecto negativo sobre la salud humana.
- La modificación genética no tiene como objetivo organismos diana a eliminar. No se prevé por tanto ningún efecto tóxico sobre éstos ni sobre otros organismos del ecosistema.
- Dada su condición de especie cultivada, las variedades de arroz están seleccionadas para germinar el siguiente ciclo de cultivo cuando se den las condiciones ambientales adecuadas. Su supervivencia asilvestrada es difícil por estar adaptada a las condiciones de cultivos intensivos y sumergidos por agua. En nuestra zona de ensayo los granos que hayan logrado germinar después de la cosecha mueren por los fríos otoñales e invernales o por la falta de agua. No se prevé por tanto ninguna ventaja selectiva en ambientes naturales respecto a plantas no modificadas genéticamente.
- No se prevén efectos sobre los ciclos biogeoquímicos ya que los microbicidas producidos se mineralizan de la misma manera que la mayoría de moléculas orgánicas.

E. Descripción resumida de todas las medidas tomadas por el notificador para controlar el riesgo, incluido el aislamiento para limitar la dispersión, como, por ejemplo, propuesta de seguimiento incluido el seguimiento después de la cosecha.

Se tomarán las siguientes medidas de seguridad:

- La parcela principal de la ETSEA se localizará en una zona urbana donde no se cultiva arroz, dentro del recinto de la Escuela. La parcela donde se plantara el arroz esta aislada del resto de campo por una malla que la recubre.
- El transporte del material biológico entre el campo, laboratorio y almacén autorizado para guardas las semillas se realizará cuidadosamente dentro de cajas herméticas de plástico para evitar la posible pérdida de semillas.
- El grano de arroz será recogido a mano y embolsado.
- Las bolsas se manipularán, transportarán y conservarán en envases cerrados por personal cualificado
- Después de cortar las semillas, se recogerán los restos vegetales, se embolsaran y autoclavarán. Una vez autoclavados serán desechados en el contenedor de residuos biológicos.
- Se recogerá el agua que pueda quedar en el contenedor y será filtrada para ver si contiene alguna semilla. El agua será autoclavada y desechada.
- El siguiente año, la parcela utilizada será sembrada por un cultivo diferente para controlar el posible rebrote de algunos restos de semilla.
- El ensayo será revisado periódicamente para registrar cualquier información relacionada con algún efecto adverso para el medio ambiente y la seguridad alimentaría que será notificada a la autoridad competente.
- Al final del ensayo se enviará un informe a la autoridad competente

F. Resumen de los ensayos de campo previstos para obtener nuevos datos sobre las repercusiones de la liberación en el medio ambiente y la salud humana (si procede)

--