

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_21_28
b) Fecha de acuse de recibo de la notificación: 21 de enero de 2022
c) Título del proyecto: Aproximaciones Moleculares para incrementar la tolerancia a salinidad y a sequía del Brócoli - R17MOLBROC
d) Período propuesto para la liberación: abril de 2022 a febrero de 2025

2. Notificador

(a) Nombre de la institución o empresa: Asociación Hortofrutícola Grupo Lucas

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: Brassicaceae
b) Género: <i>Brassica</i>
c) Especie: Oleracea
d) Subespecie (si procede): Italica
Cultivar/línea de reproducción (si procede): No procede
e) Nombre vulgar: Brócoli

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

Se trata de una edición genética en brócoli utilizando el sistema CRISPR/Cas9. La principal ventaja de este sistema es que, a diferencia de la transgénesis, podemos hacer una modificación genética sobre el ADN de la planta (eliminar o insertar unos pocos nucleótidos de la secuencia de ADN, lo que se conoce como un *indel*), sin incorporar ADN foráneo.

Se muestra a continuación una relación de los genes elegidos para su *knockout*:

- ABI1. Codifica para una fosfatasa de tipo IIC, que es un regulador negativo de la vía de señalización del ácido abscísico. Su *knockout* da tolerancia a sequía y aumenta la sensibilidad a ácido abscísico.
- HAB1. Fosfatasa de tipo IIC que, al igual que ABI1, es un regulador negativo de la vía de señalización del ácido abscísico y su *knockout* hace a la planta más tolerante a sequía y más sensible a ABA.
- GSTU17. Glutación S-transferasa U17. Enzima cuyo *knockout* da tolerancia a sequía y a salinidad.
- RPT2. Regulador del transportador de potasio KAT1 que, según datos de nuestro laboratorio, genera tolerancia a sequía.

No obstante, la información fenotípica descrita se basa en información obtenida a partir de estudios en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Por tanto, en fases previas hemos estudiado los genes ortólogos en brócoli y sus niveles de expresión. De esta forma los genes de brócoli que no se van a expresar en las plantas que van a ser ensayadas son:

- ABI1 (accesión GenBank, LOC106307446) presenta un solo ortólogo en el genoma de brócoli.
- HAB1 (accesión GenBank, LOC106312703), también presenta un solo ortólogo en el genoma de brócoli.
- GSTU17 presenta dos ortólogos en tándem (accesiones GenBank, LOC106295499 y LOC106295500); por lo que el diseño de las guías de ARN se llevó a cabo para que éstas complementen en regiones que son idénticas en los dos ortólogos. Esto permite que se produzca la edición genética en ambos genes.
- RPT2 también presenta dos ortólogos (accesiones GenBank LOC106342193 y LOC106336492). Por lo que utilizaremos una estrategia similar silenciando ambos genes con la misma construcción.

3. Tipo de modificación genética.

(a) Inserción de material genético:
(b) Eliminación de material genético:
(c) Sustitución de una base:
(d) Fusión celular:
(e) Otro (especifíquese): Edición mediante CRISPR/Cas

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.

No Aplica

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

No Aplica

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

Se trata de una edición genética en brócoli utilizando el sistema CRISPR/Cas9. La principal ventaja de este sistema es que, a diferencia de la transgénesis, podemos hacer una modificación genética sobre el ADN de la planta (eliminar o insertar unos pocos nucleótidos de la secuencia de ADN, lo que se conoce como un *indel*), sin incorporar ADN foráneo. Para esto utilizaremos el sistema de clonaje GoldenBraid, que a través de dos enzimas de restricción de tipo IIS (BsaI y BsmBI) y los vectores que se mencionarán a continuación, permite obtenerlas construcciones necesarias para realizar esta modificación en el genoma del brócoli. El protocolo seguido para construir cada vector ha sido:

El protocolo de CRISPR/Cas9 requiere de un armazón (*scaffold*) y un ARN-t que permite que el ARN se autocorte. A esto se le denominan piezas de nivel 0. Entre estos dos módulos en el vector se inserta una guía, que será la que indicará en que parte concreta y específica del genoma se va a producir el cambio. La secuencia de la guía se obtiene a partir de dos oligonucleótidos sintéticos diseñados de forma que puedan anillarse entre sí. Para esto utilizaremos el vector pUPD2 como vector de entrada. Los tres módulos se insertan en el sitio de corte de la enzima BsmBI.

Posteriormente, se insertará en el sitio BsaI, una pieza de nivel 1 (una por cada gen diana) con las piezas de nivel 0 previamente mencionadas amén de una pieza de nivel 0 correspondiente al promotor de la ARN polimerasa 3 (U6-26) empleando el vector alpha2 como vector destino. Tras ello, se construye el vector final mediante BsmBI con el vector alpha2 con las guías y el promotor y un vector alpha 1 con la Cas9 en un vector de entrada omega 1.

La descripción de los diferentes vectores y de la metodología utilizada puede encontrarse en “Design and construction of multigenic constructs for plant biotechnology using the GoldenBraid cloning strategy” Alejandro Sarrion-Perdigones et al., *Methods Mol Biol* . 2014;1116:133-51.

Con esta construcción final se transforma en *Agrobacterium tumefaciens*. El cultivo de esta bacteria, que contiene el plásmido con nuestra construcción, serán utilizados para transformar explantes de cotiledón, que se seleccionarán gracias al gen de resistencia a kanamicina NptII que incorpora la construcción final (se confirmará con PCR). Estos explantes iniciales (To) se crecerán en invernadero y se autofecundarán para obtener plantas T1. Seleccionaremos aquellas en las que se haya producido la recombinación y por tanto la planta presente los dos alelos editados en los cuales

no se produzca la proteína por haber eliminado una pequeña secuencia. Por otra parte, en las plantas que vayan a campo, no estará presente el alelo que incorporó la construcción final CRISPR/Cas9. Por tanto, conseguiríamos una planta con una pequeña modificación que cambia la pauta de lectura de la proteína diana sin haber incorporado material genético foráneo.

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 aplica

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.

Fines agronómicos:

El objetivo principal del presente proyecto la obtención de líneas de brócoli con mayor resistencia a salinidad y sequía. Con estos ensayos de campo evaluar si el material editado obtenido mediante la tecnología CRISPR/Cas9 presenta mayor resistencia a salinidad y sequía, sin repercusiones en otras cualidades comerciales. Mas concretamente, evaluar su aptitud agronómica..

2. Localización geográfica del lugar de la liberación.

La liberación tendrá lugar en una parcela alquilada por la empresa Grupo Lucas en el municipio de Pilar de la Horadada, provincia de Alicante. Las dos ubicaciones diferentes dentro de la propiedad tienen como referencia catastral (1) Parcela 22 con 418.537 m² y (2) Parcela 42 con 2.296.697 m².

3. Área del lugar (m²).

La superficie de las localizaciones dentro de las parcelas son: (1) 418.537 m² y (2) 2.296.697 m².

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.

No tenemos constancia de estudios en España llevados a cabo con brócoli modificado genéticamente, ni estudios donde pretendan evaluar estos genes. Sin embargo, una búsqueda por bases de datos europeas nos indica que actualmente hay en curso un ensayo con brócoli en Gran Bretaña con número de notificación B/GB/19/52/01 y cuyos datos se pueden consultar en el siguiente enlace: https://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp_report.aspx?CurNot=B/GB/19/52/01

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.

1. Probabilidad de que las PSMG se conviertan en más persistentes que el receptor o las plantas parentales en los hábitat agrícolas o más invasoras en los hábitats naturales.

Mínima, no hay posibilidad de que la planta llegue a poder reproducirse, sobrevivir y por tanto persistir ni en el medio agrícola ni en el medio natural.

2. Cualquier ventaja o desventaja que haya adquirido la PSMG.

Esperamos que las líneas sean más resistentes a sequía y salinidad que los cultivares comerciales pero no así que las especies silvestres.

3. Potencial de transferencia de genes a las mismas o a otras especies de plantas sexualmente compatibles en las condiciones de plantación de las PSMG y cualquier ventaja o desventaja selectiva que adquirieran dichas especies de plantas.

No es viable que se produzca transferencia de genes con otro material vegetal ya que las plantas se cosechan previamente a la floración, lo que impide formación de polen/semillas y evita el riesgo de dispersión. Por otro lado, los niveles de resistencia que se esperan conseguir están por debajo de los niveles de resistencia de las plantas silvestres.

4. Impacto potencial sobre el medio ambiente inmediato y/o diferido resultado de interacciones directas e indirectas entre las PSMG y los organismos objeto de la investigación como predadores, parasitoides y patógenos (en su caso).

No se aprecia ningún impacto potencial.

5. Posible impacto sobre el medio ambiente inmediato y/o diferido resultado de interacciones directas e indirectas entre las PSMG y los organismos ajenos a la investigación (teniendo también en cuenta los organismos que interactúan con los organismos que constituyen el objetivo), incluido el impacto sobre los niveles de población de los competidores, herbívoros, simbioses (en su caso), parásitos y patógenos.

No se aprecia ningún impacto potencial.

6. Posibles efectos inmediatos y/o diferidos sobre la salud humana resultado de las potenciales interacciones directas e indirectas entre las PSGM y las personas que trabajan con ellas, están en contacto con ellas o cerca de la o de las liberación(es) de PSMG.

No se aprecia ningún impacto potencial.

7. Posibles efectos inmediatos y/o diferidos sobre la salud animal y consecuencias para la cadena de alimentación humana y animal del consumo del OMG y de cualquier producto derivado de él que se prevea utilizar en la alimentación animal.

No se aprecia ningún impacto potencial.

8. Posible impacto directo e indirecto en el medio ambiente inmediato y/o diferido de

las técnicas de cultivo, gestión y cosecha específicas empleadas para las PSGM cuando sean diferentes de las que se usan para las plantas superiores que no han sido modificadas genéticamente.

No se aprecia ningún impacto potencial.

9. Posibles efectos inmediatos y/o diferidos sobre los procesos biogeoquímicos resultantes de interacciones potenciales directas e indirectas entre el OMG y los organismos objeto de la investigación o ajenos a ella que se encuentren cerca de las liberaciones de OMG.

No se aprecia ningún impacto potencial.

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.

1. Medidas Previas a la Implantación del primer ensayo

- a. Las plántulas provendrán del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas “Primo Yúfera” con autorización para realizar operaciones con organismos genéticamente modificados con notificación A/ES/04/I-06. En cuanto al transporte, este se realizará en vehículo particular por personal involucrado en el proyecto. Las plántulas se transportarán en un contenedor de poliestireno sellado con cinta adhesiva. En los contenedores se indicará el lugar de origen y destino y una advertencia de riesgo biológico. Se realizará un registro de entrega que deberá cumplir con los siguientes datos:
 - i. Lugar, fecha e identificación de la persona que entrega el material del IBMCP, así como de la entidad a la que pertenece.
 - ii. Lugar, fecha e identificación de la persona que entrega el material en campo, así como la entidad a la que pertenece.
 - iii. Identificación de la persona que recibe el material en campo y estará a cargo de la siembra. En caso de que se produzca material sobrante, este material será triturado y enterrado en el sitio.
- b. La parcela seleccionada está rodeada de cultivos de cítricos. Para llevar a cabo las pruebas se han seleccionado dos emplazamientos dentro de la parcela que permiten mantener a más de 600m de cualquier otra parcela productora de *brassicas*.
- c. El área destinada a los ensayos estará identificada y separada del resto del campo por una malla o valla. Indicando la prohibición expresa del paso de personal no autorizado y la advertencia de riesgo biológico.
- d. Sobre la zona de ensayo se establece un perímetro sembrado de brócoli convencional con un ciclo similar al editado, que actuará como borde de contención y se destruirá junto con el resto del ensayo, con una anchura en torno a los 5m.
- e. Se realizará una aplicación de herbicida previa a la implantación del ensayo para evitar cualquier rebrote de malas hierbas o cualquier otro material vegetal.
- f. El personal que realice el seguimiento agronómico del cultivo será identificado e instruido para que:

- i. Más allá de indicar la advertencia de riesgo biológico en la cerca que rodea el juicio, la ubicación del juicio se mantendrá confidencial.
- ii. Se va a llamar inmediatamente a las autoridades pertinentes en caso de identificar la presencia de personal no autorizado en la parcela.

2. Medidas durante la realización de los ensayos

- a. Se mantendrá libre de malas hierbas o cualquier material vegetal en la parcela toda la superficie del ensayo, así como 50 m de margen.
- b. Se mantendrá una distancia de seguridad de 600 m de cualquier cultivo de brassica durante las pruebas.
- c. Se realizará un control de acceso (registro de entrada) y se mantendrá la prohibición de entrada a todo el personal no autorizado.
- d. En el caso de utilizar maquinaria, se limpiará in situ tras su uso en la zona de suelta.
- e. Las plantas se cosecharán antes de la floración, lo que evitará la formación de polen/semillas y evita el riesgo de dispersión. Para ello se realizará al menos 1 evaluación cada 15 días hasta la aparición del botón floral. Luego de la aparición del botón floral, se realizará al menos una evaluación semanal hasta la formación de las cabezas de brócoli. Después de la formación de las cabezas de brócoli, se realizará una evaluación por lo menos cada 3 días.
- f. Después de cada evaluación, todas las plantas espigadas o ya evaluadas serán destruidas por trituración y enterradas en la propia parcela. Una vez finalizada la evaluación, se quemará todo el ensayo aplicando herbicidas, posteriormente se destruirá el material resultante mediante trituración mecánica (pasos de desbrozadora) y finalmente se labrará el terreno. Esto asegura que todo el material vegetal se destruya en el sitio.
- g. El transporte de las muestras desde la parcela hasta el IBMCP para los análisis se realizará en un contenedor de poliestireno sellado con cinta adhesiva, en los contenedores se indicará el lugar de origen y destino y una advertencia de riesgo biológico. Se realizará un parte de entrega que deberá ser completado con los siguientes datos:
 - i. Lugar, fecha e identificación de la persona que entrega el material en campo, así como la entidad a la que pertenece.
 - ii. Lugar, fecha e identificación de la persona que entrega el material al IBMCP, así como de la entidad a la que pertenece.
 - iii. Identificación de la persona que recibe el material en el IBMCP y es responsable de su tratamiento y posterior destrucción. Tras realizar los análisis, las muestras, junto con los restos vegetales que no hayan sido analizados, serán destruidos mediante autoclave y desechados en un contenedor de residuos biológicos.

3. Medidas tras el levantamiento

- a. Tras cada evaluación todas las plantas espigadas serán destruidas mediante trituración y enterradas en la propia parcela. Una vez finalizada la evaluación, todo el ensayo se quemará mediante aplicación de herbicidas, posteriormente el material resultante será destruido mediante trituración mecánica (pasos de desbrozadora) y finalmente el terreno será labrado. De esta forma se garantiza que todo el material

vegetal queda destruido in situ.

- b. El transporte de las muestras desde la parcela hacia el IBMCP para los análisis se realizará en contenedor de poliespán sellados con cinta adhesiva, en los contenedores se indicará lugar de procedencia y de destino y una advertencia del riesgo biológico. Se realizará un parte de entrega que deberá cumplimentarse con los siguientes datos:
 - i. Lugar, fecha e identificación de la persona que hace entrega del material en la parcela, así como de la entidad a la que pertenece.
 - ii. Lugar, fecha e identificación de la persona que hace entrega del material en el IBMCP, así como de la entidad a la que pertenece.
 - iii. Identificación de la persona que recibe el material en el IBMCP y se hace responsable de su tratamiento y posterior destrucción. Tras la realización de los análisis, las muestras junto con los restos vegetales que no se hayan analizado, se pasarán por autoclave y se desecharán en un contenedor de residuos biológicos.

4. Medidas tras el levantamiento

- a. Tras la conclusión del último ensayo, además de la destrucción del ensayo (aplicación de herbicida, desbrozado y labrado) el área dedicada al ensayo se mantendrá 2 meses arada, sin riego y libre de malas hierbas. Se llevará a cabo un control de posibles germinaciones en el área dedicada al ensayo y eliminación de estas cada 15 días durante los primeros dos meses.
- b. Durante un periodo de 6 meses posteriores al levantamiento del último ensayo, no se plantará ningún cultivo vegetal del género Brassica en la parcela. Se llevará a cabo un control del cumplimiento de esto cada 2 meses.

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)

No procede