



MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO TECNOLÓGICO**

INFORME FINAL

Investigador Principal:	Joaquima Messeguer Peypoch
Título del Proyecto:	Nuevas estrategias para la transformación de arroz.
Organismo:	IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries)
Centro:	Cabrils
Departamento:	Genética Vegetal
Fecha de Inicio:	28/12/2000
Fecha de Finalización:	28/12/2003

Fecha:16 de febrero de 2004

Conforme el
Representante Legal
del Organismo:

El Investigador Principal:

Fdo: Agustí Fonts

Fdo: Joaquina Messeguer

A. MEMORIA. Resumen de los resultados del proyecto en relación con los objetivos propuestos (máximo 2.000 palabras)

Destaque su relevancia científica y/o su interés tecnológico.

En el caso de haber obtenido resultados no previstos inicialmente, indique su relevancia para el proyecto.

En caso de resultados fallidos, indíquense las causas.

De acuerdo con el plan de trabajo previsto, se han llevado a cabo las siguientes actividades:

I. Desarrollo de nuevas estrategias de transformación

El objetivo de este apartado del proyecto era estudiar diversos métodos de co-transformación para poder eliminar el gen de selección y así poder tener plantas transgénicas que solamente tuvieran integrado el gen de interés.

I.A. Co-transformación con *Agrobacterium*

Se realizaron diversos ensayos de co-transformación utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, al cual se le habían introducido (en colaboración con el grupo del subproyecto 1) los plásmidos recombinantes portadores de cassetes 35S-*gfp*-tnos, 35S-*hptII*-tnos y/o 35S-*gus*-tnos. Las estrategias de co-transformación que se han evaluado son:

a) Co-transformación mediante infección simultánea o con un desfase en el tiempo de 2 y 5 días con dos cepas de *Agrobacterium* EHA105, cada una de ellas portadora de un plásmido con un gen marcador distinto. El análisis histoquímico de la expresión del gus y del marcador visual de la *gfp* demostró que solamente se ha obtenido la co-integración cuando la infección se realiza simultáneamente. Las líneas que expresaban los dos genes marcadores se analizaron por Southern blot para determinar el número de copias. El análisis de las descendencias T1 demuestra que aunque los transgenes se insertan muy frecuentemente en el mismo loci, es posible obtener líneas en las cuales los transgenes segregan, lo que hace viable su utilización para eliminar en un futuro, los genes de selección.

b) Co-transformación con la cepa LBA4404 portadora de dos plásmidos.

A lo largo del desarrollo del proyecto se han realizado 5 ensayos de transformación. Si bien en cada uno de ellos se han regenerado diversas líneas transgénicas, en ninguna de ellas se ha obtenido la co-transformación.

c) Co-transformación con EHA105 portadora de un plásmido con dos T-DNAs (cedido por el CIRAD de Montpellier). En este caso en un T-DNA se ha insertado el cassette: t35S:*hptII*:p35S::pgos2:*gfp*:trbcs mientras que el otro T-DNA contiene: tnos:*bar*:pUbi.

Durante el proceso de regeneración de los transformantes primarios se evaluó la tasa de co-transformación. El análisis por Southern blot demostró que los patrones de integración de estos cassetes eran más complejos de lo esperado, tanto en lo que se refiere al número de copias como al hecho de que muy frecuentemente se habían integrado en tandem diversas copias. Por ello, los análisis de las descendencias T1 y T2 para determinar la proporción de líneas que segregan todavía están en marcha ya que es necesario analizar un gran número de semillas de cada una de las líneas.

I.B. Co-transformación mediante biolística.

Aunque a lo largo del proyecto se han realizado diversos ensayos de transformación utilizando los cassetes de DNA lineal monocatenario, (35S:*gfp*:nos y 35S:*hph*:nos) no se ha obtenido hasta el momento ninguna línea transgénica a pesar de que en cada una de los ensayos se comprobaba previamente, mediante ensayos de expresión transitoria, la funcionalidad de estos cassetes.

Esta previsto durante este año terminar de evaluar las poblaciones obtenidas en todos estos ensayos de co-transformación, que forman parte de la tesis doctoral de Gisela Peñas, la cual se presentará a final de año.

II. A.2. Transformación de arroz con genes antifúngicos. Cultivo en invernadero y obtención de las líneas homocigóticas

II.A.2.a. Transformación con genes antifúngicos.

Tal y como estaba previsto en el proyecto, se obtuvieron líneas transgénicas de la variedad Senia con todas las construcciones de genes antifúngicos proporcionadas por la Dra. Blanca San Segundo (subproyecto 1). Los transformantes primarios se clonaban *in vitro* para asegurar el proceso de aclimatación y transferir una muestra de los mismos (subproyecto 1) para analizarlos por Northern y poder seleccionar los que presentaban un nivel más alto de expresión. Así, de 36 transformantes primarios obtenidos con el gen *afp* nativo (cDNA de *Aspergillus giganteus*) (*ubi::AP24afp::nos*) se seleccionaron 10 líneas; para el gen *Cecropina A* (*Ubi::cecAKDEL::nos*) se seleccionaron 7 plantas de las 27 obtenidas; para el gen (*Ubi::cecA trimer::nos*) se seleccionaron 18 de 29 líneas y para la *afp* sintética (*Ubi::ap24afp*vs3::nos*) se seleccionaron 8 de 47 líneas. Todas las líneas seleccionadas por su alto nivel de expresión se cultivaron en el invernadero para obtener la descendencia (T1).

II.A.2.b. Obtención de líneas homocigóticas.

Con el fin de identificar las plantas homocigóticas de cada línea seleccionada, se sembraban *in vitro*, en presencia de higromicina 24 semillas T1, cultivándose en invernadero 16 plantas T1 resistentes (en total, se cultivaron 400 plantas). Una vez obtenida su descendencia (T2), se analizaba cada una de ellas (24 semillas) para identificar cuales eran homocigóticas. Así, de la *afp* nativa se identificaron 28 plantas homocigóticas; con la *afp* sintética 14 y de las *CecA-KDEL* 22 plantas eran homocigóticas. De todas estas líneas se ha obtenido la generación T3 por lo que se dispone de suficiente material vegetal para poder evaluar la estabilidad del transgen y la resistencia frente a hongos patógenos (ver subproyecto 1).

En el caso de las 28 líneas seleccionadas de la *Ubi::cecA trimer::nos*, aunque se realizaron dos procesos de aclimatación independientes, se observó que ninguna de las plantas sobrevivía. De hecho, al transferirlas al invernadero, pararon el crecimiento y se necrosaron por completo al poco tiempo. Así pues, la no viabilidad de estas plantas no puede atribuirse al proceso de aclimatación sino más bien a que el gen introducido, de secreción extracelular, era letal para la planta, por lo que se decidió abandonar esta estrategia. El efecto antifúngico de la *afp* nativa y sintética ya ha sido evaluado (subproyecto 1) y la publicación de los resultados obtenidos ha sido aceptada recientemente.

III.A.2.a. Transformación de arroz con genes insecticidas.

Tal y como constaba en el informe de segundo año, las tareas previstas de combinar el gen *ChiA* con el gen *cry1B* o con el gen *pci* fueron descartadas debido a que los eventos de transformación obtenidos, eran estériles o bien producían muy pocas semillas, las cuales no contenían el transgen.

Sin embargo, en el laboratorio de la Dra San Segundo (subproyecto 1) se está preparando una construcción con los genes de la proteína fusión *mpi:2A:pci*, como estrategia alternativa para la expresión simultánea de dos genes insecticidas. Así, se va a utilizar una secuencia de 16-20 aminoácidos (secuencia 2A, de origen viral) para secuencia de autoprosesamiento para fusionar dos inhibidores de proteasas, MPI y PCI. Esta línea de trabajo se va a continuar desarrollando en el transcurso del proyecto recientemente aprobado (BIO2003-04936-CO2-02))

IV. Estudios de posible flujo genético

Los resultados obtenidos en el ensayo de campo realizado el año 2000 (anterior al inicio de éste proyecto) demostraron la existencia de un flujo genético de plantas transgénicas a plantas no transgénicas de la misma variedad que decrecía con la distancia. Por otra parte, se detectó la existencia de un flujo significativo tanto

de plantas transgénicas hacia el arroz salvaje como del arroz salvaje hacia las plantas transgénicas (flujo inverso). Estos resultados hicieron replantear el diseño y los objetivos de los ensayos previstos en éste proyecto (Tareas IV.A y IV.B). Así, durante el verano del año 2001 se realizó el ensayo de campo referencia B/ES/01/07 autorizado el 18 de mayo por la "Direcció General de Producció i Indústries Agroalimentàries" del DARP de la Generalitat de Catalunya" de acuerdo con el informe favorable de la "Comisión Nacional de Bioseguridad". El objetivo de éste ensayo era cuantificar la variación del flujo genético con la distancia tanto de plantas transgénicas hacia la misma variedad como hacia el arroz salvaje.

El diseño del ensayo consistía en un núcleo de plantas transgénicas en el centro (Variedad Senia resistente al herbicida fosfotricina y que también contiene el gen marcador *gus*) y alrededor, en círculos concéntricos se sembraron plantas no transgénicas de la misma variedad a 1, 2, 5 y 10 m de distancia. Tanto entre las plantas transgénicas como entre las no transgénicas se intercalaron plantas de arroz salvaje.

Las plantas se sembraron en invernadero y se transplantaron al campo el 29 de mayo de 2001.

Se cultivaron siguiendo las pautas usuales de cultivos comerciales, controlándose la fenología y el estado sanitario. Las semillas se recolectaron manualmente, planta por planta el 31 de Agosto (arroz salvaje) y el 12 de Septiembre (variedad Senia, transgénica y no transgénica). La detección del flujo genético se realizó sembrando 500 semillas de cada planta y tratándolas con el herbicida Finale (dosis equivalente a 800gma/ha) Se analizaron unas 125 000 plántulas de arroz salvaje y 148 000 de arroz no transgénico. Las plántulas que sobrevivían el tratamiento con el herbicida se analizaban mediante la prueba histoquímica del *gus* y se cultivaban en el invernadero par analizar su descendencia y confirmar que eran producto de la polinización cruzada entre transgénicas y no transgénicas. La frecuencia de flujo genético detectada, teniendo en cuenta todas las direcciones del viento fue de $0.036 \pm 0.006\%$ y de $0.086 \pm 0.007\%$ para el arroz salvaje o el no transgénico respectivamente. Sin embargo tanto para el arroz salvaje como para el convencional se observó una clara distribución asimétrica de tal manera que la frecuencia de polinización cruzada estaba favorecida en las plantas localizadas en la dirección del viento dominante de la zona. El análisis de las semillas producidas por las plantas de arroz no transgénico situadas a 1,2, 5 y 10 m de distancia de las transgénicas reveló que el flujo de genes decrece a medida que aumenta la distancia, pero que este hecho es menos notable en la dirección del viento dominante. Los resultados obtenidos en este estudio (publicados en Mol. Breeding 13: 103-112; 2004) permiten apuntar la posibilidad de co-existencia entre cultivos de arroz transgénicos y no transgénicos mediante el establecimiento de una distancia de seguridad relativamente escasa, o mediante el establecimiento de una barrera vegetal que disminuya la influencia del viento dominante. Sin embargo, la eficiencia de estos factores deberá confirmarse en un campo de dimensiones comerciales. Asimismo, si bien se ha detectado un flujo de genes significativo hacia el arroz salvaje, el impacto ambiental que pueda tener dependerá del grado de introgresión real que se observe a lo largo de diversos años de cultivo. Estos dos últimos aspectos se abordarán en el proyecto recientemente aprobado (BIO2003-04936-CO2-02)

VII.a. Estudios de expresión del promotor del gen ZmPR4 de maíz.

Dado que los estudios preliminares realizados por los miembros del subproyecto 1 demostraron que la expresión del gen *ZmPR4* se induce por herida mecánica, elicitores, infección fúngica y mordedura de insectos (*Spodoptera littoralis*), se pensó en profundizar en el estudio de la funcionalidad del promotor de este gen, en comparación con el promotor *mpi* también de maíz, ampliamente estudiado en el proyecto europeo ERRI. Para ello, aunque no estaba previsto en este proyecto, se planteó la obtención de plantas transgénicas de arroz que hubieran integrado el gen *gus* fusionado o bien a un fragmento del promotor ZmPR4 de 950 pb (S-pZmPR4) o bien al fragmento de 1500 pb (L-ZmPR4).

Con la construcción S-pZmPR4:*gus*:tnos se obtuvieron 30 eventos de transformación, mientras que con la construcción L-pZmPR4:*gus*:tnos se obtuvieron 86. El análisis por Southern blot y el estudio histoquímico permitió seleccionar 4 y 10 líneas respectivamente, las cuales se cultivaron en el invernadero, tal y como se ha descrito en el apartado IIA.IIb para obtener las líneas homocigóticas. Actualmente se dispone de semillas de la generación T3 de 3 líneas con el fragmento corto y de 29 con el largo, las cuales se están analizando para determinar la funcionalidad del promotor (subproyecto 1).

B. RESULTADOS MÁS RELEVANTES ALCANZADOS EN EL PROYECTO

Los estudios realizados en nuestro laboratorio ponen de manifiesto que las técnicas de transformación simultánea con dos cepas de *Agrobacterium* y la del doble T-DNA permiten la segregación de los transgenes en la descendencia, con lo cual es posible utilizar el gen de selección y eliminarlo posteriormente, obteniéndose así plantas transgénicas que solo tendrían integrado el gen de interés.

La optimización del proceso de transformación en arroz via *Agrobacterium* ha permitido obtener líneas transgénicas con todos los genes que se estudiaban en este proyecto. Además, se han obtenido las líneas homocigóticas y se ha demostrado que la integración del gen es estable a lo largo de tres generaciones.

Los estudios de flujo genético realizados aportan datos suficientes que permiten sentar las bases para el establecimiento de la normativa que regule la co-existencia entre cultivos de arroz transgénicos y convencionales.

C. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

C1. Formación del personal	Nº			
Personal formado	()			
Personal formado o en formación que se ha transferido al sector industrial:				
Doctores () Titulados Superiores ()		Técnicos ()		
C2. Tesis doctorales	()			
C3. Artículos científicos en revistas	()	nacionales (2)		internacionales
C4. Artículos de divulgación en revistas	(1)	nacionales ()		internacionales
C5. Artículos de revisión en revistas	()	nacionales (1)		internacionales
C6. Libros, capítulos de libros y monografías	()	nacionales ()		internacionales
C7. Conferencias en congresos (por invitación)	(2)	nacionales (3)		internacionales
C8. Patentes y otros títulos de propiedad	()	registrados ()		en explotación industrial
	()	España ()		extranjero

C1. FORMACIÓN DE PERSONAL EN RELACIÓN AL PROYECTO, describir brevemente.

La Sra Gisela Peñas está finalizando su tesis doctoral, sobre técnicas de co-transformación, mediante una beca de la Generalitat de Catalunya.

Por otra parte, cada año, se admite a 3-4 estudiantes de último curso para realizar una estancia de prácticas o bien las prácticas en empresa. Permanecen en nuestro laboratorio durante 4-6 meses para aprender el proceso de transformación genética.

C2. TESIS DOCTORALES REALIZADAS TOTAL O PARCIALMENTE EN EL PROYECTO

Indicar: Título, nombre del doctorado, Universidad, Facultad o Escuela, fecha de comienzo, fecha de lectura, calificación y director.

C3. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS EN REVISTAS

Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación, **(adjuntar separatas)**

Messeguer, J. Marfà V. Català MM, Guiderdoni E & Melé E 2004. A field study of pollen-mediated gene flow from GM Mediterranean rice to conventional rice and the red rice weed. *Molecular Breeding* 13:103-112

Coca, M, Bortolotti C, Rufat M, Peñas G, Eritja R., Tharreau D, Martínez del Pozo A, Messeguer J and San Segundo B. 2004. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from the mold *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* J. Mol. Biology (accepted)

C4. ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN EN REVISTAS

Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación.

Melé E, Messeguer J. 2002. Plantes Ornamentals transgèniques? La Gasetta. Mercat de Flor i Planta Ornamental de Catalunya: 163:10-13.

C5. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación, **(adjuntar separatas)**

J. Messeguer. 2003. Gene flow assessment in transgenic plants. Plant, Cell, Tissue & Organ culture 73:201-212.

C6. LIBROS, CAPÍTULOS DE LIBROS Y MONOGRAFÍAS

Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación, **(adjuntar un ejemplar)**

C7. CONFERENCIAS EN CONGRESOS, SIMPOSIOS Y REUNIONES (POR INVITACIÓN)

Indicar: Autor(es), nombre del congreso, lugar de celebración, año.

J. Messeguer. Plantas transgénicas de arroz resistentes a plagas y enfermedades. Jornadas Municipales sobre: "Reflexiones en torno a los alimentos transgénicos". Valencia. 1-2 de Octubre de 2002

Messeguer J. Título: Plantas transgénicas de arroz. Evaluación y perspectivas. Congreso Nacional de Biotecnología. Biotec 2002. Sevilla, 2-5 Julio de 2002

Messeguer J. Field assessment of gene flow from transgenic rice to cultivated and red rice. Rice Euconf. Villa Gualino. Torino (Italy), 6-8, June, 2002

Messeguer, J. Marfà V. Cálala MM, Guiderdoni E & Melé E. A field study of pollen-mediated gene flow from GM Mediterranean rice to conventional rice and the red rice weed. 1rst European Conference on the co-existence of genetically modified crops with conventional and organic crops. Helsingor, Denmark, 13-14 Nov. 2003

J. Messeguer. Circular designs as a tool to study the gene flow in rice. Symposium on Rice. Copenhagen, 11 de diciembre de 2003.

C8. PATENTES Y OTROS TÍTULOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

Indicar: Autor(es), título, registro, entidad titular de la patente, año, países, clase.

D. CARACTER DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO (señalar hasta dos opciones)

- Teóricos Teórico-prácticos
 Prácticos De inmediata aplicación industrial

E1. SI EL PROYECTO HA DADO LUGAR A COLABORACIONES CON OTROS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN, coméntelas brevemente.

En caso contrario, indicar qué dificultades ha encontrado.

La experiencia adquirida en la evaluación del flujo de genes nos ha llevado a participar en un macro proyecto europeo, el SIGMEA (Sustainable introduction of GM Crops into European Agriculture). Este proyecto se iniciará el 1 de marzo y en él participaremos evaluando toda una serie de factores que inciden en la co-existencia entre cultivos transgénicos y no transgénicos no solo de arroz sino también de maíz.

En cuanto a la transformación genética de arroz, se han establecido colaboraciones puntuales con la Dra. Salomé Prats del CSIC y con el Dr. Luis Cañas del IBMP de Valencia. Asimismo, se estableció un contrato de colaboración con la empresa Oryzon.

E2. SI HA PARTICIPADO EN PROYECTOS DEL PROGRAMA MARCO DE I+D DE LA UE Y/O EN OTROS PROGRAMAS INTERNACIONALES EN TEMÁTICAS RELACIONADAS CON LAS DE ESTE PROYECTO, indique programa, tipo de participación y beneficios para el proyecto.

Mencione las solicitudes presentadas al Programa Marco de la UE durante la ejecución del proyecto, aunque no hayan sido aprobadas.

Participación en programas de la UE:

- Proyecto ERRI (Engineering rice for resistance to insects). 1998-2003. En este proyecto se optimizó la técnica de transformación genética por biolística y por *Agrobacterium* de variedades comerciales de arroz. Se realizó el primer ensayo de campo sobre la evaluación del flujo de genes que sirvió como punto de partida para los ensayos que se han realizado en este proyecto. Por otra parte, se obtuvieron plantas transgénicas de arroz con genes que codifican para toxinas de *B. Thuringiensis* (cry1B y cry1Aa dirigidos por promotores constitutivos (pUbi) o de herida (pmpi, clonado por la Dra. San Segundo) que se mostraron totalmente resistentes al taladro (*Chilo suppressalis*). También se obtuvieron líneas con el gen *mpi* de maíz, para poder evaluar la eficacia de este inhibidor de proteasas sobre el control de la plaga. La resistencia de estas plantas se demostró tanto en condiciones de laboratorio e invernadero como también en los dos ensayos de campo que se realizaron. Finalmente, en el CIRAD de Montpellier se sintetizó un plásmido con doble T-DNA el cual hemos utilizado en nuestros estudios de co-transformación.

- Proyecto EURICE ((European rice: transgenes for crop protection against fungal diseases) 2000-2003. El trabajo que se ha desarrollado en éste proyecto es totalmente complementario al descrito en este informe. Así, se han obtenido plantas transgénicas de arroz que expresan de una manera estable genes con una posible actividad antifúngica entre los que cabe destacar el gen *b32* de maíz o el gen de la *CecA* de insectos. Se ha estudiado la inducibilidad por hongos y por herida del promotor ZmPR4 de maíz y se han obtenido también plantas transgénicas con el gen de la *afp* sintética fusionado a éste promotor. Las líneas homocigóticas obtenidas se están evaluando actualmente para determinar su eficacia ante la infección por *Magnaporthe grisea*. En cuanto al flujo de genes, durante el desarrollo de éste proyecto se iniciaron una serie de estudios mediante AFLP y análisis de las descendencias orientados a cuantificar el flujo inverso, es decir, el flujo genético debido a la polinización del arroz transgénico por el arroz salvaje.

Solicitudes presentadas y no aprobadas:

Proyecto VALEURICE: Evaluation of rice engineered with anti-fungal genes respect to the grain quality and environmental interaction: an RTD/demonstration project under a European point of view. Referencia QLRT-2001-02175.

Proyecto GMONIT: Generic and dynamic methods and tools for a Sustainable Management of GM crops in Europe. Referencia FP6-501986. Este proyecto se evaluó muy bien (A plus) pero se obligó a que se fusionara con otro proyecto también muy bien evaluado. El resultado de ello ha sido el proyecto SIGMEA (citado anteriormente) y que extraoficialmente se tiene constancia de que se iniciará el 1 de marzo de este año.

F. PROYECTOS COORDINADOS ¹

1. Describa el desarrollo de la coordinación entre subproyectos, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto.

G. RELACIONES O COLABORACIONES CON DIVERSOS SECTORES

G1. SI EN EL PROYECTO HA HABIDO COLABORACIÓN CON ENTES PROMOTORES OBSERVADORES (EPO) PARTICIPANTES:

1. Describa en detalle la relación mantenida con los EPO's, y la participación concreta de éstos en el proyecto, especificando, si procede, su aportación al mismo en todos sus aspectos. (Si se ha modificado la relación y/o el apoyo del EPO, en relación con lo previsto a la aprobación del proyecto, descríbalo brevemente).
2. Describa, si procede, las transferencias realizadas al (los) EPO (s) de los resultados obtenidos, indicando el carácter de la transferencia y el alcance de su aplicación.
3. Indique si esta colaboración ha dado lugar a la presentación de nuevos proyectos o si se tiene intención de continuarla en el futuro. En caso afirmativo, describa brevemente cómo va a concretarse.

G2. SI EL PROYECTO HA DADO LUGAR A OTRAS COLABORACIONES CON EL ENTORNO SOCIOECONÓMICO (INDUSTRIAL, ADMINISTRATIVO, DE SERVICIOS, ETC.), NO PREVISTAS INICIALMENTE EN EL PROYECTO, descríbalas brevemente.

¹ A rellenar sólo por el coordinador del proyecto.

H. RESUMEN DE GASTO DEL PROYECTO

Euros

1. Gastos de personal (indicar datos personales, situación laboral y función desempeñada,)

Total €

2. Material inventariable (describir brevemente el material adquirido)

Total €

3. Material fungible (describir brevemente el tipo de material)

Total €

4. Viajes y dietas (describir brevemente)

Total €

5. Otros gastos (describir brevemente)

Total €

6. Costes indirectos

Total €

TOTAL GASTOS EJECUTADOS DEL PROYECTO €

CON ESTE INFORME DEBERÁ ADJUNTARSE:

Organismos sujetos al control del Tribunal de Cuentas y de la Intervención General de la Administración del Estado:

- **Certificado de la Gerencia o Servicio de Contabilidad** de la entidad participante (nombre, cargo, fecha, firma y sello) en el que se especifiquen los gastos efectuados, desglosados en: personal, costes de ejecución y costes indirectos.
- **Fotocopia de reintegro al Tesoro Público**, si procede, de los fondos no utilizados.

Entidades restantes:

- **Certificado de la Gerencia o Servicio de Contabilidad** de la entidad participante (nombre, cargo, fecha, firma y sello) en el que se especifiquen los gastos efectuados, desglosados en: personal, costes de ejecución y, si procede, costes indirectos. Asimismo, se presentarán los justificantes originales de los gastos realizados.
- **Documento original que acredite el reintegro al Tesoro Público**, si procede, de los fondos no utilizados.