



EVALUACIÓN DEL RIESGO DE UN ENSAYO DE LIBERACIÓN EN CAMPO CON UNA LÍNEA DE CHOPO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (NOTIFICACIÓN B/ES/12/34)

Características, objetivo y duración del ensayo:

El Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (Universidad Politécnica de Madrid/INIA) ha presentado la solicitud para la realización de un ensayo de campo con una línea de plantas de chopos modificados genéticamente (*PtaRAV1&2-KD*).

El objetivo de proyecto completo es evaluar el papel de los genes RAV (RAV1 y RAV2) en el desarrollo de ramificación siléptica y proléptica de una plantación de chopos modificados genéticamente a lo largo del tiempo, y el impacto de los rasgos fenotípicos modificados en el rendimiento en biomasa en una plantación en turno corto y alta densidad.

El ensayo se llevará a cabo en una era de 300 m² (30 x 10 m), ubicada en las dependencias del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), en la Autopista A6 Madrid - La Coruña Km. 7,5, 28040 - Madrid.

Para ello, se prevé realizar un ensayo en el que se plantarán 75 clones híbridos femeninos de *Populus tremula x P. alba*: 30 plantas *PtaRAV1&2-KD#1*, otras 30 plantas *PtaRAV1&2-KD#22* y 15 plantas control sin transformar.

Aunque la liberación estaba prevista para la primavera de 2012, finalmente comenzará en verano de este año y su finalización será en 4 años como máximo.

Antecedentes:

Es la primera vez que se propone llevar a cabo en España ensayos de campo con estos chopos modificados genéticamente, aunque estos clones han sido ya ensayados en otros países, como en Francia (INRA).

Los plantones modificados genéticamente proceden del invernadero del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid (CBGP-UPM), notificación A/ES/12/I-03.

Identificación y caracterización de riesgos potenciales:

a) Caracterización molecular:

La modificación genética introducida en las plantas *PtaRAV1&2-KD* consiste en un T-DNA en el que han incluido dos copias invertidas de un segmento del gen *RAV1* de *Populus alba* separadas por una secuencia intrónica. Dicha construcción genera un transcrito con estructura en horquilla que induce el silenciamiento de dos genes parálogos AP2/B3.



Planta modificada genéticamente *PtaRAV1&2-KD*:

- Organismo receptor: *Populus tremula* x *Populus alba*. Se trata de un clon femenino que no florece antes del cuarto o quinto año de vida.
- Organismo donante: *Castanea sativa*.
- Inserto: Consta de un primer casete compuesto de un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV35S*, 1346 pb) que dirige la expresión de dos copias invertidas de un segmento del gen *RAV1* de *P. alba* (552 pb) separadas por una secuencia intrónica del gen *pyruvate orthophosphate dikinase* (*pdk*, 1599 pb), seguido de un terminador del gen *octopine synthase* (*OCS*, 766 pb). Los segmentos del gen *RAV1* de *P. alba* corresponden a la región comprendida entre los dominios de unión a DNA AP2 y B3 presentes en este tipo de factores de transcripción. Este casete genera un mRNA con estructura en horquilla que induce el silenciamiento post-transcripcional de los genes endógenos del chopo híbrido *PtaRAV1* y *PtaRAV2*. El segundo casete confiere resistencia a la kanamicina, y está compuesto por un promotor del gen *nopaline synthase* (*NOS*, 184 pb) que dirige la expresión del marcador de selección *neomycin phosphotransferase II* (*nptII*, 822 pb), seguido de un terminador de *NOS* (706 pb).

Para la selección de los transformantes se han utilizado los genes de resistencia a antibióticos *npt-II* y *hpt*. Estos genes marcadores que confieren resistencia a la kanamicina e higromicina B, respectivamente, están clasificados por EFSA en el Grupo I, es decir el riesgo para la salud y/o el medio ambiente se considera muy bajo (son genes que confieren resistencia a antibióticos poco utilizados ya en terapias contra enfermedades humanas o animales y además, estas resistencias ya están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en el tracto digestivos de los animales. Por otro lado, la probabilidad de transferencia genética horizontal planta-bacteria, se considera muy baja. **No obstante, la CNB recomienda la futura eliminación de los genes de resistencia a los antibióticos (GMRA) clasificados en el Grupo I de EFSA de cara a una futura comercialización**, aunque no ve problema en la utilización de éstos durante estas fases preliminares de investigación y desarrollo.

a) Capacidad de transferencia del material genético:

Los clones híbridos del organismo receptor (*Populus tremula* x *Populus alba*) pertenecen a la sección Leuce, compatible por tanto con las secciones Turanga, Tacamahaca y Leucoides. No obstante, estos híbridos son normalmente estériles debido al emparejamiento y recombinación imperfectos durante la meiosis. Por otra parte, *P. x canadiensis* pertenece a la sección Aigeiros, incompatible con la sección Leuce.

Aunque el notificador informa que el riesgo de cruzamiento con las colecciones de mantenimiento de los híbridos *P. x canadiensis* y *P. x generosa* que crecen a unos 5 metros de la era donde se realizaría el ensayo es remoto, también se indica que ninguna medida de barrera física impide en su totalidad el desarrollo de brotes vegetativos. No obstante, dado que la aplicación del riego se realizará por goteo, se favorecerá el desarrollo radicular muy constreñido al bulbo húmedo que éste genera, lo que en principio minimiza la aparición de brotes de raíz.



Sin embargo, aunque se informa que la era donde se realiza el ensayo está rodeada por un camino compactado, de todos modos cabe la posibilidad de que brotes de otra plantación próxima de chopos no transgénicos puedan aparecer en la parcela de experimentación aunque se reconoce que los injertos radiculares es un hecho infrecuente. Ante el caso de aparición de brotes, debe garantizarse su eliminación, por ejemplo mediante herbicidas de contacto, tal y como propone el notificador.

El notificador considera que el riesgo de afectar a la vegetación próxima es inexistente, más teniendo en cuenta la ausencia de floración y la imposibilidad de cruzamiento con árboles adultos ya existentes del arboreto. Son estériles y los árboles se van a cortar el 3er año (florecerían a partir del 4º año).

Por otro lado, los momentos de floración de los híbridos *P. tremula x P. alba* y *P. x generosa* son distintos. Es importante señalar que los chopos aledaños se recepan anualmente, y los chopos en ensayo se van a recepar cada dos años, así que en ningún caso van a llegar a florecer.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, la CNB opina que deberán implementarse escrupulosamente las medidas de gestión propuestas y que el notificador se responsabilizará de la eliminación de los brotes vegetativos y de asegurar el aislamiento y de la protección de la colección de mantenimiento del híbrido *P. x generosa* (*P. trichocarpa x P. deltoides*), asegurando la no interferencia entre el ensayo de chopos modificados y dicha colección.

c) Estabilidad genética y fenotípica:

El notificador señala que la integración del T-DNA en los cromosomas nucleares de las células vegetales es genéticamente estable. En el caso particular de las plantas *PtaRAV1&2-KD* en las que se ha introducido un T-DNA que genera un RNA de interferencia, se ha descrito que este tipo de T-DNAs se mantienen activos a lo largo del tiempo en árboles crecidos en campo sin que se produzca silenciamiento de los distintos casetes que lo componen.

La CNB solicita que se vayan aportando los resultados de dichos estudios de estabilidad cuando estén disponibles, coincidiendo con algún informe intermedio o el informe final (ver conclusiones finales de este informe de evaluación).

d) Toxicidad y alergenidad:

Dadas las características de los genes introducidos en estos árboles con un mayor rendimiento en biomasa, y que estas plantas modificadas genéticamente no están destinadas a la alimentación animal, sino que su posible aplicación futura es la producción de biomasa con fines energéticos, la producción de pasta de papel o de madera, en las condiciones propuestas para el ensayo no se prevén efectos adversos sobre la salud o el medio ambiente.

Además la malla metálica que rodea la era donde se realizaría el ensayo contribuirá a evitar la presencia de animales que pudieran consumir alguna parte del árbol. El riesgo de toxicidad para seres humanos, animales vertebrados e invertebrados y otros organismos se considera bajo dada la naturaleza de los productos proteicos expresados en los árboles por los transgenes introducidos.



No obstante, **la Comisión Nacional de Bioseguridad se reserva el derecho de solicitar información adicional sobre estudios toxicológicos en un futuro (ej. estudios sobre efectos adversos potenciales sobre organismos no diana), si se continúa con este proyecto con vistas a un posible cultivo comercial de estos árboles.**

e) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

El híbrido de *P. tremula* x *P. alba* es común en Europa. Los pies adultos suelen formar yemas de renuevo que brotan a su alrededor.

El ensayo que se propone es una plantación en turno corto que se cortará cada 2 años. En todo caso, antes de que estos chopos híbridos empiecen a florecer, que se estima a partir del cuarto o quinto año de vida, por lo que no existe riesgo de dispersión de semillas. Las plantas modificadas tampoco muestran ningún carácter que les pueda conferir una mayor competitividad respecto a las plantas control no transformadas.

La posibilidad de diseminación de semillas es prácticamente inexistente puesto que la plantación se recepará cada 2 años, antes de que los rebrotes florezcan y puedan producirlas. Existe la posibilidad de aparición de brotes, pero el muro de cemento (profundidad 40 cm) que contiene la tierra de la era evitará su propagación fuera de la misma.

f) Efectos sobre organismos no diana:

El notificador indica que no se esperan efectos adversos sobre organismos no diana derivados del cultivo de estos chopos modificados genéticamente.

No obstante **la Comisión Nacional de Bioseguridad considera que el posible impacto sobre estos organismos es un factor importante a tener en cuenta ya en las primeras fases experimentales y sugiere que se tengan en cuenta los siguientes criterios de vigilancia general para el seguimiento y evaluación desde las primeras fases de investigación, que posteriormente pasan a ser relevantes con vistas a la comercialización:**

- a) **Estudios comparativos sobre la biodiversidad y capacidad de crecimiento de especies vegetales en el entorno en las distintas etapas anuales de crecimiento utilizando material vegetal de parcelas de chopos situados en el mismo área geográfica y que carecen del transgén.**
- b) **Presencia y efecto de los transgenes sobre los microorganismos del suelo.**
- c) **Se realizará en la medida de lo posible un seguimiento de impacto sobre la población de la fauna autóctona de la zona.**



h) Medidas propuestas de preparación y gestión del lugar de liberación:

Las dependencias del INIA se encuentran en terreno cedido por Patrimonio Nacional, situado en el eje Casa de Campo–El Pardo y su acceso está sujeto a un control de seguridad, 24 horas al día, todos los días de la semana.

Las medidas de gestión del ensayo propuestas por el notificador son:

- El ensayo se llevará a cabo en una parcela rodeada por una malla metálica enterrada al menos a 30 cm y 150 cm de valla volada, que evitará la presencia de animales que pudieran consumir alguna parte del árbol.
- El ensayo se realizará a unos 5 metros de dos colecciones de mantenimiento de los híbridos *P. x canadienses* y *P. x generosa* que se recepan anualmente. No obstante, existe un muro de cemento con una profundidad de 40 cm que cierra el perímetro de la parcela. Además, la aplicación del riego se realizará por goteo, lo que favorecerá el desarrollo radicular muy constreñido al bulbo húmedo que éste genera, y esta práctica minimiza la aparición de brotes de raíz.
- Los chopos aledaños se recepan anualmente, y los chopos en ensayo se van a recepar cada dos años, así que en ningún caso van a llegar a florecer.
- Se llevará a cabo una vigilancia anual, en primavera, de la posible aparición de amentos florales, si bien el clon a ensayar no florece hasta pasados 4 ó 5 años de vida y la plantación se va a recepar cada 2 años. En caso de aparición, el/los individuos se talarán y se incinerarán.
- El personal del INIA se encargará del riego, abonado y control mecánico de la vegetación competidora.
- El personal investigador del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas irá una vez al menos (o más frecuentemente si fuera necesario) al lugar del ensayo para realizar un seguimiento.

La CNB, además, considera que deberán tomarse las siguientes medidas:

- **El notificador se responsabilizará de la eliminación de los brotes vegetativos y de asegurar el aislamiento y de la protección de la colección de mantenimiento del híbrido *P. x generosa* (*P. trichocarpa x P. deltoides*), asegurando la no interferencia entre el ensayo de chopos modificados y dicha colección.**
- **Por otro lado, y dado que, tal y como se ha descrito anteriormente, el híbrido *P. tremula X P. alba* suele florecer entre el cuarto y el quinto año de crecimiento, el notificador se comprometerá a asegurarse que, para garantizar que no se dispersen ni polen o semillas, la tala de los árboles se llevará a cabo con anterioridad a la aparición de las flores. Además, después de la tala se procederá al destocoado en una profundidad de 50 cm. y al posterior tratamiento con un herbicida de pre-emergencia para evitar posibles rebrotes.**



- **El acceso al lugar del ensayo deberá estar controlado y restringido únicamente al personal autorizado.**
- **El seguimiento y control del ensayo debe ser exhaustivo, por lo que deberá ser visitado asiduamente por personal responsable del mismo para detectar posibles incidencias.**

i) Control y tratamiento de residuos:

Las medidas propuestas por el notificador y otras sugeridas por la CNB que deberán llevarse a cabo son:

- Durante la liberación se eliminarán y destruirán, cada 15 días, las plantas herbáceas que hayan crecido en la parcela experimental mediante eliminación mecánica y en ocasiones aplicación de herbicidas en las filas de plantación.
- Al finalizar el ensayo los árboles se talarán. Inmediatamente después se utilizará un herbicida total (glifosato), y posteriormente se levantarán con retroexcavadora para proceder a su incineración (el INIA dispone en sus dependencias unas instalaciones destinadas a la incineración de material vegetal).
- Se comunicará a la Autoridad competente el día y hora de la tala de los árboles para la destrucción del ensayo con la suficiente antelación para que ésta pueda acudir.
- Una vez destruido el ensayo, todo el material procedente de los árboles será almacenado en bolsas para su posterior incineración. El traslado hasta las mismas se hará en un vehículo con pala protegida con una lona.
- La eliminación de los fustes de los árboles después de su aprovechamiento, medición y análisis para su estudio, se astillarán y se incinerarán para su total destrucción.
- La eliminación de los tocones, se realiza mediante una trituradora hasta una profundidad de 50 cm, que hace imposible su regeneración con la posterior eliminación de los residuos restantes por incineración.
- No se realizará ninguna otra plantación de chopos en la parcela del ensayo durante los tres años siguientes a la finalización del ensayo y se hará un seguimiento de la ausencia de rebrotes en la misma y durante el mismo periodo, principalmente durante la primavera, época de mayor crecimiento.
- Finalmente, así mismo se comunicará a la Autoridad competente el final de dicho seguimiento.

La Autoridad competente, en su caso, realizará las visitas de inspección que considere oportunas, antes, durante y tras la finalización de los ensayos.



CONCLUSIONES:

Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de control y uso propuestas, este proyecto de liberación al medio ambiente no supone un riesgo significativo para la salud humana y/o el medio ambiente.

No obstante la CNB considera que, teniendo en cuenta que es un ensayo de liberación plurianual, se remitirá un **Informe Intermedio de Resultados (al año y medio o dos años desde el comienzo 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.

Así mismo, se remitirá un **Informe de Resultados Final** comprendiendo la totalidad de años de ensayo conforme, igualmente, con el modelo antes indicado. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Por último, cualquier modificación que se proponga realizar antes, durante o tras la finalización del ensayo deberá comunicarse previamente a la Autoridad competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad, para que éstos sean evaluados y aceptados, si fuera el caso.

Madrid, a 5 de julio de 2012