



INFORME DE EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA LIBERACIÓN EN CAMPO DE PLANTAS DE TRIGO MODIFICADO GENETICAMENTE

(Notificación B/ES/17/01)

Objetivo, características del OMG y duración del ensayo

IDEN BIOTECHNOLOGY S.L. (en representación de INDEAR, Argentina), y con sede en Cordovilla, Navarra, ha presentado a la Autoridad competente del Gobierno de Aragón una solicitud de autorización para realizar un ensayo de campo de trigo modificado genéticamente (evento IND-ØØ412-7) tolerante al estrés hídrico y resistente al glufosinato de amonio.

El objetivo de la liberación es la multiplicación de líneas transgénicas de trigo derivadas del evento de transformación IND-ØØ412-7 que contiene el gen *bar* que otorga resistencia al glufosinato de amonio (utilizado como marcador de selección) y el gen HaHB4 que expresa tolerancia al estrés hídrico.

El trigo IND-ØØ412-7 expresa el factor de transcripción HAHB4, que está asociado a un fenotipo de tolerancia a diversos estreses ambientales, incluida la tolerancia a sequía, lo que permite a la planta mantener el rendimiento en condiciones ambientales adversas de mejor forma que el cultivo no modificado. Además, este evento contiene el gen *bar*, que confiere tolerancia a herbicidas basados en glufosinato de amonio debido a la expresión de la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT).

La Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) constató que de varias publicaciones parecía deducirse que este gen induce también resistencia a insectos y podría, así mismo, aumentar la susceptibilidad a patógenos. Se solicitó que se aportara más información en relación con la tolerancia a otros estreses ambientales que pudiera manifestarse por la expresión de este gen.

El notificador contestó que en efecto existen vías moleculares que involucran genes implicados en más de un tipo de estrés (biótico y abiótico) pero el factor de transcripción del trigo IND-ØØ412-7 es principalmente tolerante a sequía, aunque debido a la interacción existente entre los mecanismos de respuesta de las plantas a condiciones ambientales, no puede descartarse la tolerancia diferencial a otros estreses como la salinidad, viento y calor. Sin embargo, dado el fenotipo, el modo de acción y el contexto fisiológico no se esperan interacciones con organismos no diana de este trigo, diferentes al trigo convencional.

En cuanto a la caracterización molecular, el organismo receptor es el trigo (*Triticum aestivum L.*) y los organismos donantes en IND-ØØ412-7 son el girasol (*Helianthus annuus*), que aporta el gen principal *hahb4*; el maíz (*Zea mays*), que aporta la función promotora de los genes principales y la estimulación de su expresión; *Streptomyces hygroscopicus*, del que proviene el marcador de selección y la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio (*pat*), y finalmente *Agrobacterium tumefaciens*, que aporta la señal de terminación (*Tnos*) de la expresión de los genes introducidos.



Los vectores utilizados en la obtención del trigo IND-ØØ412-7 se basan en una serie de plásmidos (pIND4-HB4 y el pIND4-Bar) que utilizan el promotor de ubiquitina de maíz para dirigir la expresión de genes en plantas monocotiledóneas, el extremo 5' no traducido del exón del gen *Ubi-1* de maíz y el primer intrón del gen *Ubi-1* de maíz. Aunque también contienen elementos regulatorios necesarios para la expresión de los correspondientes genes marcadores de resistencia a antibiótico (β -lactamasa y β -glucoronidasa, ambas de *E. coli*) no están presentes en la PMG final (en el caso de *bla*, su secuencia codificante está bajo la regulación de un promotor procariota, no funcional en plantas). Para el gen *gus*, tanto la secuencia codificante como los elementos reguladores que lo acompañan, no están completos.

Se considera que están bien caracterizados los elementos genéticos que conforman los dos vectores utilizados.

El evento IND-ØØ412-7 se obtuvo mediante co-transformación por microbombardeo.

Por todo ello, se espera que estas plantas de trigo IND-ØØ412-7 HAHB4, sometidas a sequía, presenten mayor supervivencia en comparación con plantas que no lo expresan. Este fenotipo de tolerancia aportado por la expresión de HAHB4 se ha comprobado anteriormente en maíz y soja.

En relación con las características del ensayo y lugar de liberación, se propone un ensayo de campo que se llevará a cabo en el Municipio 20 Alcalá de Obispo (Huesca). El área total del ensayo será de 0,54 ha. La finca está situada en esta localidad, a las afueras del pueblo, en una parcela delimitada en el perímetro por carretera, caminos y una construcción sin uso.

Se formarán surcos donde se sembrarán las líneas MG (4,5 m longitud cada surco) y la distancia entre ellas será de 0,4 m. Las dos filas de surcos (inferior y superior) estarán separadas por 0,3 m.

El objetivo del ensayo es la multiplicación de las líneas transgénicas con una duración del ensayo de seis meses (se proponía comenzar el ensayo en Enero de 2017 y finalizarlo en Julio de 2017). Se sembrarán unas 300 plantas/m² (unas 25.000 semillas) para obtener unas 20.000 plantas a cosecha.

Aunque inicialmente se proponía una distancia de aislamiento de 50 m con respecto a cualquier otro cultivo de trigo, a petición de la CNB, el notificador ha aumentado esta distancia a 80 m. de aislamiento. También se rodeará el ensayo con 5 m. de borde de trigo no transgénico.

No existen la presencia de de biotopos reconocidos oficialmente o zonas protegidas que puedan verse afectados en los alrededores del sitio de la liberación.

Las prácticas de cultivo incluyen la aplicación de un herbicida selectivo (glufosinato de amonio). El momento de aplicación será entre el inicio y el fin del macollaje, con una dosis de 5 l ha⁻¹ de formulado de glufosinato de amonio al 20 % y con un volumen de aplicación de entre 80 y 12 l ha⁻¹. El resto de las actividades de cultivo son similares a las usadas para el cultivo de trigo convencional (control de malezas, enfermedades y plagas, fertilización, etc.).



Identificación y Caracterización de Riesgos Potenciales

a) Capacidad de transferencia del material genético:

El trigo (*Triticum aestivum*) es una planta alohexaploide ($2n = 6x = 42$), anual, monoica y autógama, con reproducción sexual mediante la producción de semillas (OCDE, 1999). La inflorescencia (espiga) del trigo está compuesta por una serie de espiguillas asentadas en un eje central (raquis), que proporcionan la base de las flores cleistógamas, envueltas por las glumas. La floración de la espiga no ocurre de forma simultánea, sino que transcurre durante dos o tres días. Asimismo, se da una débil floración en la parte interior de cada espiguilla.

La dispersión del polen en las plantas de trigo es mediada por el viento, siendo el polen de trigo relativamente más pesado en comparación con el de otras gramíneas y, además, no permanece viable durante largos períodos pues es muy sensible a las condiciones ambientales. En condiciones naturales, el polen de trigo solo conserva su viabilidad hasta 30 minutos (OECD, 1999).

En cuanto a la transferencia genética vertical (a otras plantas de trigo), en condiciones naturales, la polinización del trigo es principalmente mediante autopolinización. La transferencia de genes a través de la polinización cruzada sólo puede ocurrir a otras plantas de trigo a través de una floración sincronizada, y aun así, las frecuencias suelen ser bajas. No obstante, estudios más recientes han comprobado que el trigo puede tener hasta un 10% de alogamia y el cruzamiento puede alcanzar distancias de hasta 100 m. (Loureiro et al., 2012).

Con la finalidad de reducir al máximo la probabilidad de cruce genética con otras plantas de trigo, el notificador propone una distancia de aislamiento de este ensayo con respecto a otros cultivos comerciales de trigo como mínimo de 80 m. Adicionalmente, el notificador ha propuesto plantar 5 m. de filas de plantas de trigo convencionales alrededor del ensayo, borde que la CNB considera adecuado para servir de trampa de polen.

En relación con la transferencia genética horizontal (a otras especies de *Triticum* o *Aegilops*), en general, las especies de *Triticum* y géneros afines son compatibles y, bajo condiciones de laboratorio, es posible obtener híbridos que normalmente son androestériles. Otros híbridos intergenéricos que implican *Triticum spp.* y *Secale*, *Hordeum*, *Elytrigia*, *Haynaldia* y *Elymus spp.* ya fueron analizados en diversos estudios científicos en los que se concluye que la mayoría de los híbridos entre *T. aestivum* y otros géneros obtenidos mediante cultivo de embriones resultaron estériles.

En concreto sobre la existencia de híbridos entre *Triticum* y especies del género *Aegilops*, en líneas generales las barreras reproductivas parece que limitarían la introgresión de un género a otro (Arrigo, et al, 2011) y si bien es cierto que puede haber cruzamiento, las poblaciones naturales tienden a producir híbridos con un alto grado de esterilidad. De cualquier forma en las condiciones del ensayo se han tenido en cuenta estas consideraciones y tienen previsto un control de malezas, con especial atención a las gramíneas y al género *Aegilops*.



b) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

Durante los ensayos que se realizaron para estudiar sus parámetros agronómicos (dormición y caracterización agronómica), en los estadios de desarrollo del cultivo evaluados periódicamente en 15 ambientes diferentes, no se evidenciaron diferencias entre IND-ØØ412-7 y el control parental Cadenza. Estos mostraron que ni las formas naturales de supervivencia, ni sus características reproductivas, ni el potencial para la adquisición de rasgos asociados al fenotipo de maleza o que favorezcan la emergencia de plantas voluntarias, han sido alterados en el evento IND-ØØ412-7 en comparación con el control parental no transgénico.

Por otra parte, las vías metabólicas y mecanismos fisiológicos asociados a la reproducción y la supervivencia no están vinculados a las vías y mecanismos a través de los cuales el factor de transcripción HAHB4 y la proteína PAT ejercen sus mecanismos de acción. En razón de todas estas circunstancias, es muy poco probable que las semillas de trigo del evento IND-ØØ412-7 modifiquen el comportamiento del cultivo en cuanto a su capacidad de sobrevivir tras la cosecha y generar plantas voluntarias. No existe ninguna evidencia que sugiera que la modificación realizada afecte a la supervivencia de la planta y la convierta en más persistente que las plantas parentales en los hábitats agrícolas, o más invasivas.

c) Estabilidad genética y fenotípica:

La estabilidad del trigo HB4 fue examinada utilizando dos estrategias: individuos de diferentes generaciones obtenidas por autofecundación del evento IND-ØØ412-7 y un análisis de segregación en individuos resultantes del cruzamiento del evento con un trigo comercial. En ambos casos, el análisis de estabilidad se hizo mediante PCR. Para el análisis de distintas generaciones se examinó no sólo la presencia de los transgenes HaHB4, *bar* y *bla*, sino también la conservación de los sitios de inserción, mediante el análisis de las secuencias flanqueantes ubicadas a ambos lados del inserto corto y largo. El tejido foliar proveniente de cinco plantas de las generaciones T5, T6 y T7 fue utilizado para extraer ADN genómico, que fue utilizado como molde en reacciones de RT-PCR. Todas las plantas resultaron positivas para todos los elementos analizados. Estos resultados confirman que el inserto es estable a lo largo de las generaciones.

Para el análisis de segregación, plantas homocigotas del evento IND-ØØ412-7 fueron sometidas a cruzamiento con la variedad comercial Baguette 17 para obtener la generación F1. Los individuos F1 se autopolinizaron para producir semillas F2. Tras sembrar 349 semillas F2, con las plantas obtenidas fueron realizados análisis de segregación comprobándose que se heredan de acuerdo a los principios Mendelianos. La co-segregación de los mismos permite concluir que la inserción reside en un único locus. Estos resultados representan una verificación sólida de que, más allá de su complejidad, el evento IND-ØØ412-7 es estable.

En cuanto a la genealogía de las 500 líneas que se quieren ensayar son variedades adaptadas al cultivo de trigo en Argentina. El donante del evento fue Cadenza-HB4 o una línea denominada Baguette 17/Cadenza-HB4. Se realizaron entre 2 y 4 retrocruces y algunas autofecundaciones que se describen en la información aportada por el notificador. Se indica así mismo, que todas las líneas



seleccionadas presentan un alto grado de estabilidad, pero podían presentar algún grado de segregación. Se presentó, a requerimiento de la CNB, el detalle de pedigree de las diferentes líneas a sembrar y de la segunda y tercera generación de autofecundación.

d) Efectos alérgicos o tóxicos

En primer lugar, ya se han realizado estudios bio-informáticos de los nuevos productos de expresión para analizar la alergenidad y/o toxicidad potencial de la modificación genética introducida en el trigo HB4. No se han obtenido similitudes (homologías, alineamientos o identidades) entre la secuencia aminoacídica de la proteína HAHB4 con toxinas o alérgenos, que hagan pensar en algún problema desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, en relación a la reactividad cruzada con proteínas alérgicas o tóxicas.

Por otro lado se estudió la ausencia de glicosilación en la proteína HAHB4, pues este factor puede generar algún riesgo de alergenidad (Huby y col., 2000; Furmonaviciene y col., 2005; Shakib y col., 2008). En la notificación se explican en detalle las diferentes herramientas bio-informáticas utilizadas. La ausencia de las dos condiciones esenciales para la glicosilación, como son la señal para el transporte al RE y los sitios aceptores, indica que la probabilidad de que exista glicosilación de la proteína HAHB4 parece ser extremadamente baja.

e) Efectos para la salud animal y humana

De los estudios antes mencionados (bioinformáticos) se puede indicar que no se esperan efectos adversos para la salud.

f) Efectos sobre organismos no diana

Según el notificador, dado el fenotipo, el modo de acción y el contexto fisiológico en que actúa la proteína HaHB4, no se esperan interacciones con organismos no diana con respecto al fenotipo que aporta este gen. Por otra parte, la ausencia de efectos de la expresión del gen bar sobre organismos no diana ha sido repetidamente comprobada a través de los varios eventos transgénicos aprobados que se encuentran en uso actualmente (CERA, 2011).

De los estudios comparativos realizados con el evento IND-ØØ412-7 y su homólogo convencional se puede indicar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación con las interacciones de este trigo transgénico con las poblaciones de artrópodos que puedan estar presentes en el agroecosistema receptor, incluyendo artrópodos beneficiosos. En este sentido se aportó información adicional sobre estudios realizados en cuatro ambientes diferentes y durante tres años y en cuatro estados fenológicos diferentes (macollaje, elongación-espigazón, llenado de grano madurez fisiológica) donde se identificaron distintas clases de artrópodos y se constató su abundancia. De 48 comparaciones realizadas, únicamente se encontró una diferencia significativa entre el evento transgénico y su control, pero ésta no mostró consistencia a través de los muestreos.



Con respecto a los potenciales efectos sobre herbívoros, se analizó el daño por enfermedades a Rolla de la Hoja, Rolla del Tallo, Mancha Amarilla, Estriado Bacteriano y Fusariosis de la Espiga en quince ambientes distintos y durante dos años. En cinco de ellos la incidencia fue baja y el nivel de daño no pudo ser cuantificado. En los diez sitios restantes, que presentaron niveles de moderados a severos de infestación, no se encontraron diferencias entre el evento transgénico y su línea parental.

No obstante, la CNB considera adecuado que se realice una observación detallada durante el ensayo para comprobar que no se produce algún efecto adverso sobre alguna especie no diana, en las condiciones ahora propuestas, pues es la primera vez que se ensayará en España.

g) Interacciones con el entorno abiótico

En ensayos realizados en Argentina para la caracterización agronómica de IND-ØØ412-7 se observó la respuesta a diversos estreses abióticos. El análisis de los datos obtenidos de la estimación visual de daño, sin embargo, no mostró en ningún caso diferencias significativas entre IND-ØØ412-7 y el control Cadenza. Para evaluar el rendimiento del evento IND-ØØ412-7, en respuesta a distintos factores de estrés abiótico, se realizaron ensayos comparativos de rendimiento en tres campañas (2011, 2012 y 2013) en diferentes localidades y fechas de siembra, con un total de 20 ambientes evaluados (combinación de sitio de ensayo y fecha de siembra). Los resultados obtenidos en el análisis del rendimiento de los 11 ambientes que resultaron más adecuados para evaluar el efecto de HAHB4 (por tener mayor probabilidad de presentar estrés hídrico) confirmaron la interacción esperada entre genotipo y los diferentes lugares. En cinco de estos ambientes, IND-ØØ412-7 presentó diferencias significativas respecto del control Cadenza, que en promedio representaron un 20,4% de mayor rendimiento en la variedad transgénica.

Se deberán presentar, así mismo, los resultados del comportamiento de este trigo en condiciones españolas.

Control del ensayo y tratamiento de residuos

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera, en general, adecuadas las medidas propuestas por la empresa IDEN Biotechnology S.L. para llevar a cabo el control de la parcela y zona de bioseguridad, durante y después del ensayo que se detallan a continuación. No obstante, se indican algunas medidas adicionales que deberán ser tenidas en cuenta (en negrita):

- **Todas las semillas y granos utilizados para el ensayo serán almacenados en recipientes cerrados herméticamente y correctamente identificados.**
- Las semillas de las líneas transgénicas y sus respectivos controles, se cultivarán exclusivamente en el sitio de liberación. Dicho sitio, se encuentra confinado en una finca con acceso restringido a personas no autorizadas por IDEN. Además la finca cuenta con un perímetro delimitado que impide el posible ingreso de animales de granja.
- **Después de la siembra la sembradora será limpiada convenientemente.**



- Se mantendrá una **distancia de aislamiento de 80 m** con respecto a cualquier otro cultivo de trigo. Así mismo, se rodeará el ensayo con **5 metros de borde perimetral** de trigo no transgénico como trampa de polen.
- Aunque en la notificación se indica que no se constató la presencia de especies compatibles con trigo en los alrededores al sitio de liberación, **se asegurará que en el área de aislamiento no se encuentren plantas de trigo u otras especies sexualmente compatibles con trigo. Para ello se deberá realizar un seguimiento durante el ensayo por si se observaran dichas especies y proceder a eliminarlas mediante controles mecánicos o químicos.**
- **Así mismo, se eliminarán en el borde y en el propio ensayo, todas las plantas de especies emparentadas con trigo, en especial las especies de *Aegilops*, desde el espigado hasta la maduración de la espiga del trigo el primer año.**
- **Al año siguiente, también en toda la zona de liberación (incluyendo la zona de aislamiento), se eliminarán las gramíneas incluyendo rebrotes de trigo, *Aegilops* y posibles híbridos que son de difícil detección antes de la aparición de la espiga.**
- El método de recolección será manual y la trilla de espigas se realizará en el sitio de liberación con trilladora estacionaria o en las instalaciones de IDEN. El personal dedicado a la siembra, cultivo y cosecha del material estará capacitado para asegurar el confinamiento del material hasta su eliminación.
- Se cosechará todo el material sembrado, tanto las plantas OMG como los bordes perimetrales de trigo convencional. De acuerdo a las condiciones ambientales, la trilla de espigas se realizará en el sitio de la liberación o en las instalaciones de IDEN. Para el traslado hasta las instalaciones de IDEN, las semillas o espigas serán colocadas en recipientes seguros, con doble contención, y selladas con precintos de seguridad. Todos los recipientes llevarán una etiqueta indicando la leyenda “Material OVGM” indicando además, el código de las autorizaciones correspondientes a la liberación. Se procederá a la limpieza de la maquinaria utilizada.
- **Después se aplicará un herbicida de amplio espectro sobre la superficie del campo de ensayo.**
- **El material vegetal remanente tras el tratamiento con el herbicida será triturado e incorporado al terreno a una profundidad de 20 cm tan pronto como las condiciones agronómicas y medioambientales lo permitan.**
- Finalmente se reitera que, aunque durante el año siguiente al ensayo se cultive otra especie que no sea un cereal, se llevará a cabo un **seguimiento periódico de la parcela de ensayo durante el año siguiente a la realización del mismo** para identificar y eliminar cualquier posible rebrote de plantas espontáneas de trigo modificado genéticamente.

Se solicita que el ensayo sea controlado por los inspectores de la Autoridad competente del Gobierno de Aragón durante la siembra del ensayo, la cosecha y destrucción del mismo, y también durante el seguimiento de un año de la parcela tras la finalización del ensayo, con el fin de garantizar el cumplimiento de todas estas medidas de control y gestión.

Por último, se informa que ante cualquier incidencia se informará a la Autoridad Competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad y se tomarán las medidas adecuadas, incluida la destrucción del ensayo si fuera necesario.



CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las condiciones de uso propuestas, el ensayo propuesto no supone un riesgo significativo para la salud humana o animal y el medio ambiente.

Una vez concluido dicho ensayo **se remitirá un informe de resultados** 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. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 3 de marzo de 2017