



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

(Notificación B/ES/18/03)

Antecedentes

En el año 2017 esta empresa solicitó y obtuvo autorización para la realización de un ensayo de tabaco modificado genéticamente en las instalaciones del Campus de Aula Dei, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en Zaragoza. El ensayo programado tenía como número de referencia: B/ES/17/09.

Por cuestiones técnicas finalmente no pudieron realizarlo y por ello retoman, con el mismo protocolo de ensayo, una nueva propuesta para llevar a cabo el mismo ensayo durante este año.

Objetivo y características del OMG

La empresa Biomass Booster, S.L., ubicada en Logroño, ha presentado a la Autoridad competente del Gobierno de Aragón una solicitud de autorización para realizar un ensayo de campo tabaco modificado genéticamente cuya finalidad es una mayor producción de biomasa.

Se propone esta liberación mediante un ensayo experimental de tabaco modificado genéticamente que expresa el gen humano de la adrenomedulina. Dicha expresión permitiría incrementar la productividad en el cultivo de tabaco. El objetivo del ensayo es comparar, en condiciones de campo, las diferencias en cuanto a crecimiento y generación de biomasa de la planta modificada genéticamente respecto a su control.

La empresa Biomass Booster S.L. ha llegado a un acuerdo con la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, para la realización de este ensayo experimental en su centro “Estación Experimental de Aula Dei-CSIC, (EEAD)”, al estar enmarcado en proyectos relacionados con el objetivo de aumentar la productividad en especies vegetales.

Características y duración del ensayo

La liberación se realizará en la finca de la Estación Experimental de Aula Dei, compuesta por 48 hectáreas de regadío situadas en el Campus de Aula Dei (Zaragoza) donde se llevan a cabo ensayos de colaboración público-privada. Los cultivos en los que, por lo general, se trabaja en la finca son de maíz, olivo, veza, cebada, trigo y árboles frutales (manzano, melocotonero, ciruelo, cerezo y albaricoquero). En cuanto al lugar de liberación, se trata de un agroecosistema de terreno aterrazado y “saso”, con regadío por distintos sistemas, goteo, aspersión y riego a manta, donde se llevan a cabo ensayos de los diferentes grupos de investigación.



En cuanto a la flora y la fauna que se encuentra en la finca, se indica que es la habitual de zonas agrícolas, encontrándose flora silvestre en los lindes de las parcelas, aunque suele limpiarse para que evitar que sea refugio de plagas, siendo las más habituales *Shorgum halepense* (jaraz), *Cyperus rotundus* (junquilla), *Cynodon dactylon* (grama), *Portulaca oleracea* (verdolaga), *Echinochloa crus-galli* (viñaruela), *Digitaria sanguinalis* (pata gallina), *Setaria spp.* (lapa), *Oxalis spp.* (trebolillo), *Convolvulus arvensis* (correhuela) y *Chenopodium álbum* (bledo). En cuanto a la fauna, la más habitual son ratón de campo, palomo, tordo, gorrión, abubilla, zorzal, urraca y cuervo.

La parcela en la que se llevará a cabo el ensayo posee una superficie total de 3.250 metros cuadrados, de los cuales sólo se ocupará para el ensayo unos 225 metros cuadrados. El resto estará o vacío u ocupado por otro cultivo de especie diferente al tabaco. Se han aportado los datos de localización exacta de la parcela (SIGPAC).

Se utilizarán 96 plantas, de las cuales 48 (12 plantas por 4 repeticiones) serán las modificadas genéticamente y otras 48 plantas control no modificadas (12 plantas por 4 repeticiones), todo ello rodeado por un borde de plantas de tabaco no modificado. Se ha aportado el diseño del ensayo.

Las fechas previstas para la realización del ensayo serán entre los meses de mayo a octubre de 2017. Desde el trasplante hasta la cosecha pueden pasar 7-8 semanas. La recolección se realizará en uno o dos días en cuanto se alcance el momento óptimo.

Identificación y Caracterización de Riesgos Potenciales

a) Caracterización molecular

El tabaco (*Nicotiana tabacum*), como organismo receptor, se ha modificado utilizando el plásmido comercial pBI-121, derivado del plásmido Ti de *A. tumefaciens*.

El inserto consiste en un fragmento de 570 pb que codifica para la secuencia de la proteína adrenomedulina. Este gen se obtuvo de la línea celular humana (*Homo sapiens*) A549 mediante técnicas de PCR. Este gen sustituye al gen GUS dentro del plásmido pBI-121 y su función es la de aumentar el ritmo de mitosis y por tanto, la productividad y tasa de crecimiento de la planta.

El plásmido modificado (pBI-AM) fue introducido en *A. tumefaciens* mediante electroporación, que luego se utilizó para infectar pequeños fragmentos de hojas de tabaco. La inserción de los derivados del plásmido pBI-121 se realizó al azar en el genoma de la planta y se insertó toda la región comprendida entre las regiones RB y LB. Esta región comprende el gen de resistencia a neomicina (*nptII*) y el gen de la adrenomedulina (*h AM*) regulado por el promotor 35S. Se ha proporcionado análisis de la expresión tanto del mRNA (mediante la técnica de PCR a tiempo real, como de la proteína (mediante la técnica de Western blot).

La CNB considera que la caracterización molecular realizada se considera suficiente para esta primera fase de experimentación.



Sin embargo, la Comisión Nacional de Bioseguridad aconseja que, en el caso de que se prevea un futuro uso comercial de esta planta transgénica, previamente se elimine cualquier gen de resistencia a antibiótico expresado por la planta.

b) Capacidad de transferencia del material genético:

Nicotiana tabacum no es una planta autóctona de España y solo se encuentra como cultivo comercial. El cultivo de tabaco en rama en España se concentra en Extremadura (95,38% en 2014), seguida de Andalucía (3,36%), Castilla y León (0,64%), Castilla la Mancha (0,42%), País Vasco (0,12%) y Navarra (0,08%) (Web MAPAMA, abril 2018). El cultivo está muy poco representado en Aragón, región donde se propone realizar la liberación de esta PMG.

Dado que el tabaco es una especie que utiliza fundamentalmente la autofecundación, y que se va a proceder a eliminar las flores antes de que éstas maduren, con esta medida la probabilidad de diseminación se reduce significativamente.

No obstante, la Comisión Nacional de Bioseguridad recomienda mantener una distancia de aislamiento de 100 m. entre los ensayos con plantas de tabaco modificadas genéticamente y los cultivos de plantas de tabaco convencionales. El notificador asegura que al hacer este ensayo dentro de la finca de “Aula Dei” (donde no habrá otro ensayo con tabaco coincidiendo con el de Biomass Booster), se garantiza el mantenimiento de dicha distancia de aislamiento. Adicionalmente, se procederá a la eliminación manual de las flores, para evitar la producción de semillas.

Por otra parte, en la zona en la que se va a llevar a cabo el ensayo no hay especies silvestres compatible con las que *Nicotiana tabacum* pueda cruzarse formando híbridos fértiles.

c) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

Aparte de las semillas no se conocen otras formas de supervivencia de esta especie. El notificador indica que hasta la fecha 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.

Se propone que en estudios futuros podrían abordar si las plantas transgénicas que expresan AM son más resistentes a los factores estresantes típicos de plantas tales como al estrés hídrico o a patologías bacterianas, ya que sobre esto último, hay que recordar que la AM tiene propiedades antimicrobianas debido a su estructura en hélice-alfa y una capacidad de insertarse en la membrana del patógeno, abriendo los poros hidrofílicos que dan lugar a la desaparición bacteriana (Allaker et al 2006; Martínez et al., 2006).

Cualquier cambio observado durante o tras finalizar este ensayo en relación con estas características deberá comunicarse a la CNB.



d) Estabilidad genética y fenotípica:

Dado que el promotor asociado al transgén se activa en todos los tejidos de la planta, el fragmento de inserción se expresa en todos los tejidos de la planta y se mantiene a lo largo del todo el ciclo vital de la planta. Todavía no ha sido estudiada la estabilidad del rasgo introducido a lo largo de las generaciones y por ello, *la Comisión Nacional de Bioseguridad considera que deberían aprovecharse estos estudios para avanzar en los estudios de estabilidad.*

e) Efectos alérgicos o tóxicos

Esta planta modificada genéticamente no está destinada a la alimentación humana o animal. Por otra parte, la expresión de la adromedulina no parece tener efectos tóxicos o alérgicos sobre la salud humana o animal debido a su exposición.

f) Efectos para la salud animal y humana

Dado que la adrenomedulina es una proteína que se produce de manera habitual en el hombre y en otras especies animales, el notificador considera que la expresión de esta proteína en las plantas de tabaco no debería presentar ningún riesgo para la salud de estos organismos. Además, es conocido que la adrenomedulina se encuentra en altas concentraciones en la leche humana y de otros mamíferos, por lo que forma parte habitual de nuestra dieta.

Por otro lado el tabaco no se utiliza para alimentación animal.

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera que, teniendo en cuenta las múltiples publicaciones científicas que ya destacan que los niveles de esta proteína podían estar implicados en efectos cardiovasculares, renales y neuroendocrinos, si se continúa con el desarrollo de estos productos y dependiendo del fin último de una posible comercialización (distinta de la producción de biomasa), sería necesario realizar estudios ulteriores para comprobar la ausencia de posibles efectos adversos sobre la salud humana.

g) Efectos sobre organismos no diana

Según el notificador, dado el fenotipo, el modo de acción y el contexto fisiológico en que actúa esta proteína, no se esperan interacciones con organismos no diana debido a las propias características del ensayo y la eliminación de cualquier residuo una vez finalizado.

No obstante, la CNB considera adecuado que se realice una observación detallada durante el ensayo para comprobar si se produce algún efecto adverso sobre alguna especie no diana, en las condiciones del ensayo propuesto.



h) Interacciones con el entorno abiótico

No se esperan cambios. *Cualquier efecto no esperado sobre los procesos biogeoquímicos que se puedan producir deberá, así mismo, comunicarse.*

i) Posible impacto en el medio ambiente debido a las técnicas de cultivo, gestión y cosecha

Se indica que las técnicas que se utilizarán no son diferentes a las del cultivo del tabaco convencional por lo que no esperan impactos distintos.

Medidas de gestión: control del ensayo y tratamiento de residuos

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera adecuadas, en general, las medidas propuestas por la empresa Biomass Booster S.L. para llevar a cabo el control de la parcela de la Estación Experimental Aula Dei (EEAD) y la zona de bioseguridad, antes, 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):

- **En relación al transporte todas las semillas, plántulas y otro material utilizado para el ensayo serán almacenados y transportados en recipientes cerrados herméticamente y correctamente identificados.** Las semillas se transportarán en envases herméticamente cerrados y éstos a su vez incluidos en cajas selladas y correctamente identificadas. Otro material vegetal se envasará en doble bolsa o malla, según el caso, que se introducirán en cajas herméticamente cerradas y correctamente etiquetadas.
- El lugar del ensayo se encuentra confinado en una finca vallada y con acceso restringido únicamente para personas autorizadas. **Además, deberá asegurarse que se impida el posible ingreso de animales silvestres o de granja a la finca de la EEAD-CSIC.**
- Se llevará a cabo un control de toda persona que tenga acceso a la parcela del ensayo, mediante un registro de entrada, y que no se tomen muestras sin autorización.
- Están previstas labores previas de preparación del terreno que se llevarán a cabo en la parcela destinada para el ensayo. **Después de la siembra, la maquinaria utilizada será limpiada convenientemente.**
- Se mantendrá una **distancia de aislamiento de 100 m** con respecto a cualquier otro cultivo de tabaco. Así mismo, se rodeará el ensayo con un **borde perimetral formado por al menos tres filas de plantas de tabaco no transgénico**, como trampa de polen.
- En el momento óptimo de recolección, las plantas serán cosechadas manualmente, incluyendo toda la raíz, **y serán transportadas en cajas cerradas y perfectamente etiquetadas a un laboratorio situado en la Estación Experimental**, donde se llevarán a cabo todas las determinaciones necesarias.
- Una vez realizados todos los análisis y guardada una pequeña muestra para posibles posteriores análisis, finalmente se propone que todos los restos de material vegetal serán introducidos en bolsas y **serán sometidos a un tratamiento de esterilización en autoclave** antes de ser



eliminados por los medios convencionales para evitar de esta manera el innecesario transporte del material de nuevo a la parcela del ensayo.

- Se llevará a cabo, tal como está previsto, un control semanal por los técnicos de la EEAD-CSIC durante el ciclo de cultivo. Ante cualquier anomalía detectada se procederá a avisar al investigador responsable.
- Tras la cosecha, y aunque la posibilidad de rebrotes es baja debido a la eliminación de las flores durante el ciclo de cultivo, se procederá a realizar una inspección visual de la parcela semanalmente para detectar y eliminar con herbicida las posibles plantas que aparezcan con posterioridad. Cualquier anomalía que surja será comunicada al investigador responsable.
- Aunque durante el año siguiente al ensayo se cultive otra especie que no sea tabaco, 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 tabaco modificado genéticamente.
- Finalmente, en el laboratorio de la EEAD-CSIC se trabajará bajo las normas de laboratorio establecidas por el CSIC, evitando el contacto con material vegetal presente en el laboratorio.

La CNB recomienda que, tal y como se establece en la Ley 9/2003, de 25 de abril, el ensayo sea controlado por los inspectores de la Autoridad competente del Gobierno de Aragón durante la siembra, 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 25 de abril de 2018