



EVALUACIÓN DE RIESGO DE UNA LIBERACIÓN EN CAMPO DE PLANTAS DE MAÍZ EDITADAS GENÉTICAMENTE (B/ES/24/22)

Antecedentes

El 17 de julio de 2024 se recibió desde la Autoridad competente de la Junta de Andalucía la notificación **B/ES/24/22**, correspondiente a una liberación voluntaria, distinta de la comercialización, de maíz *NLB18 CRISPR-Cas9*, de Pioneer Hi-Bred Spain S.L., solicitando su estudio por la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB).

Esta notificación se estudió en las reuniones 183^a y 184^a de la CNB, celebradas los días 17 de septiembre y 12 de noviembre de 2024, respectivamente.

Características del OMG, objetivo y duración del ensayo:

Pioneer Hi-Bred Spain S.L. (miembro del grupo de empresas Corteva Agriscience) propone este ensayo de liberación voluntaria con el maíz *NLB18 CRISPR-Cas9* con resistencia mejorada al tizón (NCLB), y cuya liberación sería de abril a diciembre de 2025.

El maíz editado genéticamente *NLB18 CRISPR-Cas9* con resistencia mejorada al tizón del maíz se ha obtenido utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 mediante la sustitución dirigida del alelo susceptible a la enfermedad del gen *NLB18* (*NLB18-S*) con el alelo resistente a la enfermedad del mismo gen (*NLB18-R*). Se indica que la resistencia frente a cepas específicas de este patógeno puede mejorarse mediante ciertos genes nativos de maíz de resistencia a enfermedad.

Los fines principales del ensayo de campo son educativos y de demostración sobre el potencial de la tecnología de edición genética.

Evaluación del riesgo

a) Planta receptora

El maíz es una especie anemófila y monoica, es decir, posee dos inflorescencias separadas sobre un mismo pie. En condiciones normales, el maíz suele polinizarse en más de un 95% por polinización cruzada. No obstante, también se da una pequeña tasa de autopolinización (menos del 5%). El maíz es una especie típicamente alógama.

En cuanto a los factores específicos, en su caso, que afecten a la reproducción, los estadios más críticos del crecimiento son la formación de los penachos y sedas, la polinización, y las situaciones de estrés relacionadas con la humedad y la fertilidad, las cuales influyen enormemente en el rendimiento del grano. Por regla general, el polen de maíz es viable durante poco tiempo. En condiciones de altas temperaturas y desecación, el polen solo es viable durante minutos. Unas condiciones más benignas podrían alargar la vida del polen en el campo hasta algunas horas.

En cuanto a su período de generación, el maíz es un cultivo anual con un ciclo vegetativo que varía entre 10 y 48 semanas, desde la emergencia de las plántulas hasta la madurez. Esta diferencia de tiempo que precisan los diferentes tipos para alcanzar la madurez es la que permite cultivar el maíz en gran cantidad de condiciones climáticas diferentes.



b) Modo y tasa de reproducción

El alelo NLB18-R de la línea pura PH26N está presente en varios híbridos de maíz Corteva desarrollados mediante mejora convencional y comercializados desde hace más de 20 años con un amplio historial de uso seguro. Se prevé que el maíz *NLB18 CRISPR-Cas9* sea comparable en relación con el modo o modos y/o la tasa de reproducción del maíz convencional, donde la sustitución del alelo *NLB18* puede lograrse alternativamente mediante mejora convencional.

c) Diseminación

El alelo NLB18-R de PH26N está presente en varios híbridos de maíz Corteva desarrollados mediante mejora convencional y comercializados desde hace más de 20 años con un amplio historial de uso seguro. Se prevé que el maíz *NLB18 CRISPR-Cas9* sea comparable en relación con la diseminación del maíz convencional, donde la sustitución del alelo *NLB18* puede lograrse alternativamente mediante mejora convencional.

d) Capacidad de supervivencia

El maíz se cultiva en una amplia gama de condiciones climáticas y es adecuado para climas cálidos y templados (OECD, 2003). La supervivencia y la reproducción del maíz están limitadas por condiciones ambientales extremas (estrés por calor, heladas, sequías, lluvias excesivas, etc.) (Shaw, 1988) y también es poco probable que las poblaciones de maíz sobrevivan fuera de entornos agrícolas manejados. En general, después de haberse cultivado maíz en un campo no se producen rebrotos. En los casos en los que aparecen rebrotos en los días posteriores a la cosecha, las nuevas plantas suelen morir por el frío del invierno. No obstante, en condiciones favorables (invierno suave), los rebrotos pueden encontrarse en la primavera, pero raramente llegan a alcanzar la fase reproductora.

e) 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.

El maíz no posee los rasgos de plantas invasoras y el fenotipo ‘NLB18-R’ no da lugar a dichos rasgos. El alelo NLB18-R de PH26N y alelos de resistencia similares a *NLB18* de otras fuentes convencionales están presentes en varios híbridos de maíz de Corteva obtenidos mediante mejora tradicional y comercializados durante más de 20 años con un amplio historial de uso seguro. No se espera que el maíz *NLB18 CRISPR-Cas9* difiera del maíz convencional NLB18-S o NLB18-R en relación con el modo o modos y/o la tasa de reproducción, diseminación y supervivencia, y cuando el maíz *NLB18 CRISPR-Cas9* se ha cultivado fuera de la UE no se ha observado ninguna diferencia.

En el caso de liberación involuntaria del maíz *NLB18 CRISPR-Cas9* pueden aplicarse prácticas agronómicas habituales que se usan para el control del maíz comercial, tales como el arranque manual o mecánico o la utilización de herbicidas e incorporación al suelo.

f) Compatibilidad sexual con otras especies vegetales cultivadas o silvestres, indicando la distribución de las especies compatibles en Europa

La región mesoamericana (centro sur de México y Centroamérica) es reconocida como el centro de origen del maíz (OECD, 2003). El maíz tiene una alta tasa de entrecruzamiento y puede polinizar



variedades sexualmente compatibles (otros híbridos de maíz cultivados, variedades locales y teosinte) (OECD, 2003).

En el verano de 2014 se detectó el teosinte (*Zea mays spp.*) como mala hierba en campos de maíz de Aragón y, en menor medida, en Cataluña. Hasta la fecha no se ha descrito la presencia de teosinte en Andalucía. Además, la finca donde se realizará el ensayo es propiedad de Pioneer Hi-Bred Spain S.L., y desde hace más de 10 años se realizan ensayos en la misma, no habiéndose detectado la presencia de teosinte en todo este periodo. Por lo tanto, no se espera que haya presencia de teosinte en el área donde se realizará el ensayo, y por ello, el notificador indica que la probabilidad de que haya flujo de genes de los maíces objeto de las notificaciones a la planta silvestre es extremadamente baja.

CNB: se deberá controlar el área del ensayo durante el tiempo de desarrollo del mismo, y también durante el año posterior, para comprobar la aparición potencial de plantas de teosinte.

g) Modificación genética

El maíz *NLB18* CRISPR-Cas9 se ha desarrollado con la tecnología CRISPR-Cas9. En ausencia de una plantilla de reparación de ADN, la rotura de doble cadena de ADN (DSB) generada se repara mediante la unión de extremos no homólogos (Non-Homologous End Joining - NHEJ), que es un proceso propenso a errores y puede dar lugar a la eliminación o adición de nucleótidos en el sitio de reparación. En presencia de un molde de reparación del ADN, la DSB puede repararse a través de un mecanismo llamado reparación dirigida por homología [HDR; o recombinación homóloga (HR)].

La sustitución dirigida del alelo sensible a la enfermedad (*NLB18-S*) por el alelo resistente a la enfermedad (*NLB18-R*) se realizó en una línea de maíz pura. El enfoque más directo para la sustitución del alelo *NLB18* sería simultáneamente, en una sola transformación, una delección del alelo *NLB18-S* en una línea pura y su sustitución con el alelo *NLB18-R* procedente de la línea PH26N; la secuencia *NLB18-R* se proporciona en la plantilla de reparación del ADN.

Para llevar a cabo el proceso de sustitución del alelo *NLB18*, se utilizó la progenie de una sola planta T0 con alelo *NLB18-S* suprimido para incorporar la secuencia *NLB18-R* en una segunda transformación. En la planta T0 se había eliminado el alelo *NLB18-S* en un estado hemicigoto sin delección o inserción de nucleótidos adicionales en la unión de la secuencia durante la reparación de NHEJ. La delección del alelo *NLB18-S* se convirtió a un estado homocigoto a través de la reproducción (denominada delección *NLB18-S*) y se utilizaron embriones inmaduros de estas plantas en la segunda transformación. Se utilizó un ARN guía homólogo a la secuencia en el sitio de reparación de NHEJ en la línea con el *NLB18-S* suprimido para generar el DSB. El alelo *NLB18-R* se suministró con la plantilla de reparación del ADN, que consistía en la secuencia *NLB18R* flanqueada por las mismas dos secuencias de brazo de homología que son idénticas a las secuencias de ADN que ahora estaban aguas arriba y aguas abajo del DSB diana ARNg#3 (delección *NLB18-S*).

Las secuencias del brazo de homología se originan en la línea de maíz receptora y habilitan el mecanismo HDR nativo descrito anteriormente. Como resultado, se obtuvieron plantas de maíz con alelo *NLB18-R*. Por lo tanto, la sustitución del alelo *NLB18* se logró con éxito y el resultado de la sustitución del alelo tampoco fue diferente a lo que se puede obtener a través de mejora convencional. El análisis molecular posterior confirmó que el maíz *NLB18* CRISPR-Cas9 no



contenía secuencias no intencionales de ADN de los plásmidos utilizados en ambas transformaciones. Por lo tanto, el maíz *NLB18 CRISPR-Cas9* no contiene secuencias de ADN de una especie diferente sexualmente incompatible, y la planta final podría haberse desarrollado mediante mejora convencional.

Información relativa a la liberación voluntaria

1) Localización y extensión del lugar o lugares de liberación

Se planea llevar a cabo esta liberación voluntaria durante la campaña de cultivo de maíz 2025, a partir del 1 de abril 2025 hasta el 31 de diciembre 2025.

Este ensayo, junto con otros dos propuestos por la misma empresa (B/ES/24/21 y B/ES/24/23) se llevarán a cabo en la Finca de La Rinconada. Se ha presentado el diseño experimental del conjunto de las líneas de las plantas editadas, así como las líneas de maíz convencional no modificado que se van a sembrar rodeándolos, indicando así mismo, que se van a disponer los tres ensayos en la misma parcela de liberación dentro de dicha finca.

Se indica que se podrán sembrar hasta 500 m² de plantas de maíz *NLB18 CRISPR-Cas9*.y la superficie total ocupada por la liberación (incluyendo todas las líneas y bordes) no será superior a 5.000 m².

El alelo *NLB18-R* de *PH26N* está presente en varios híbridos de maíz Corteva desarrollados mediante mejora convencional y comercializados desde hace más de 20 años con un amplio historial de uso seguro.

Se prevé que el maíz *NLB18 CRISPR-Cas9* sea comparable en relación con la diseminación del maíz convencional, donde la sustitución del alelo *NLB18* puede lograrse alternativamente mediante mejora convencional.

2) Potencial de transferencia de genes a las mismas o a otras especies de plantas sexualmente compatibles en las condiciones del ensayo

El ensayo se encuentra en zonas en las que suele cultivarse maíz. En Europa no había especies vegetales silvestres sexualmente compatibles con el maíz, sin embargo, desde 2014 se detecta la presencia de un pariente silvestre (teosinte), especie de origen mesoamericana solo el maíz cultivado sería sexualmente compatible, pero se mantendrá una distancia de aislamiento de 200 metros a otros campos de maíz cultivado.

3) Descripción del ecosistema del lugar de liberación, con inclusión de datos sobre el clima, flora y fauna

El lugar elegido para la realización de este ensayo se encuentra en una zona agrícola fuera de biotopos oficialmente reconocidos o de áreas protegidas. La fauna y la flora no presentan características especiales.



4) Método de preparación y gestión del lugar de liberación, con carácter previo, simultáneo o posterior a la liberación, con inclusión de prácticas de cultivo y métodos de recolección

El lugar se preparará según las prácticas agronómicas corrientes para el cultivo de maíz en el área. La máquina sembradora, y también la cosechadora si las hubiera, se limpiarán antes de salir del lugar del ensayo. Si se tuviesen que recoger algunas semillas, se recogería toda la mazorca y se destruirán la mazorca y todas las semillas que no se utilicen. Al terminar la liberación, todos los restos vegetales, incluyendo las filas del borde agronómico sembradas con maíz convencional que rodean al lugar del ensayo, serán destruidos mediante su troceado e incorporación al suelo mediante un roturado profundo.

Tras la liberación, la parcela se visitará durante un periodo de un año para asegurar la retirada de plantas adventicias de maíz si las hubiera. Aunque las plantas adventicias en general no pueden sobrevivir a un invierno duro, se llevará a cabo un seguimiento de las posibles plantas adventicias de maíz para asegurarse de su destrucción antes de la floración.

No se plantará maíz comercial en la misma parcela el año siguiente, aunque el notificador indica que se podrá utilizar la misma parcela para realizar ensayos en Parte B.

El número aproximado de plantas (o plantas por metro cuadrado) será de una densidad de plantas de hasta 100.000 plantas/ha.

CNB: el seguimiento de las posibles plantas adventicias o rebrotes deberá realizarse en la parcela utilizada durante el año siguiente a la finalización de este ensayo.

5) Método de liberación de las plantas modificadas genéticamente

Las semillas se recibirán en recipientes individuales y debidamente etiquetados y serán transportadas al campo el mismo día de la siembra. Las actividades de manipulación necesarias para la realización del ensayo serán llevadas a cabo por personal cualificado y familiarizado con las medidas preventivas para evitar la dispersión.

Las semillas serán sembradas en filas, manualmente o utilizando una máquina sembradora. Para facilitar el acceso a las plantas, se crearán pasillos al final de las líneas. Se ha adjuntado el mapa del ensayo y la referencia catastral de la parcela.

El polen liberado de las plantas de maíz *NLB18 CRISPR-Cas9* se controlará manteniendo una distancia de aislamiento de 200 metros con cualquier otro cultivo comercial de maíz. Como se hace en cualquier ensayo con maíz convencional, el sitio del ensayo estará rodeado de hileras agronómicas de maíz convencional de madurez similar. Las filas de borde agronómico también se destruirán al final de la liberación.

Los granos se adhieren a una mazorca y quedan encerrados en múltiples espatas que protegen las semillas del contacto exterior. Por lo tanto, no es probable que se produzca la eliminación de granos individuales. Si se tuviesen que recolectar semillas, esto se hará tomando muestras de la mazorca entera y las semillas no utilizadas se destruirán.



6) Descripción de los métodos de tratamiento del lugar tras la liberación

Una vez finalizada la liberación, todos los restos de material vegetal (todas las partes vegetativas de las plantas y el grano si lo hubiera) se destruirán troceándolos e incorporándolos en el suelo mediante un roturado profundo. Las filas del borde agronómico sembradas con maíz convencional que rodean al lugar del ensayo se destruirán también al terminar la liberación.

El año siguiente no se plantará maíz comercial en la misma parcela. Aunque las plantas adventicias en general no pueden sobrevivir a un invierno duro, las plantas adventicias de maíz, si las hubiera, serían sometidas a seguimiento. La parcela será inspeccionada regularmente durante un periodo de un año tras el final de la liberación para asegurarse de la destrucción de plantas adventicias de maíz, si las hubiera, antes de la floración.

Ninguna planta o producto vegetal procedente del ensayo entrará en las cadenas alimentarias o de piensos.

CNB: Si aparecieran rebrotos, se deberá comunicar a la Autoridad competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad, y éstos deberán ser eliminados.

7) Información sobre los planes de control, seguimiento y tratamiento de residuos tras la liberación

- a) Distancia o distancias de especies vegetales compatibles sexualmente, tanto variedades silvestres afines como cultivadas: se mantendrá una distancia de aislamiento de 200 metros a otros campos de maíces que pueden ser compatibles sexualmente.
- b) Medidas para reducir o evitar la dispersión de cualquier órgano reproductor de las PSMG (por ejemplo, polen, semillas, tubérculos): se recibirán las semillas en envases individuales según las necesidades de la siembra, cerrados, debidamente etiquetados como “conteniendo material modificado genéticamente”, y serán transportadas al campo el mismo día de la siembra en un doble embalaje.

Además de la distancia de aislamiento de 200 metros a otros cultivos no experimental de maíz, como se hace en los ensayos de maíz convencional, el lugar del ensayo se rodeará con filas de bordura agronómica de maíz convencional de una madurez similar. Estas filas de bordura agronómica también se destruirán al final de la liberación.

Los granos están fijados a una mazorca y rodeados de muchas espatas que les protegen del contacto con el exterior. Así, no es probable que ocurra la dispersión de las semillas individuales. Si se tuviesen que recolectar algunas semillas, se recogería toda la mazorca y se destruirán la mazorca y todas las semillas que no se utilicen.

- c) Descripción de los planes y técnicas de seguimiento: durante la liberación se visitarán regularmente las parcelas de ensayo a fin de satisfacer las necesidades agronómicas y experimentales, o al menos una vez cada cuatro semanas. Estas visitas también permitirán seguir el crecimiento de las plantas y controlar que no se disperse el material. Tras el final de la liberación, la parcela será inspeccionada regularmente por un periodo de un año, y al menos en los momentos importantes para el cultivo de maíz (siembra, floración, cosecha), para vigilar la aparición de plantas adventicias. Si surgieran plantas adventicias, estas serían retiradas manualmente o destruidas antes de su floración con un herbicida. Además, para facilitar el



control de cualquier posible planta adventicia, no se sembrará ningún cultivo comercial de maíz en la misma parcela el año siguiente.

Al finalizar la liberación se entregará a la Autoridad competente un informe de acuerdo con la Decisión 2003/701/CE.

- d) Descripción de los planes de emergencia: el seguimiento regular del ensayo permitirá la identificación inmediata de cualquier hecho o situación no deseados provocados por factores externos, como por ejemplo condiciones climáticas desfavorables. En caso de emergencia, la persona de contacto informará inmediatamente a la Autoridad competente encargada del control del ensayo para definir cuáles son las medidas que deberán aplicarse. Según las necesidades, el ensayo podría detenerse y destruirse mediante la destrucción mecánica o la pulverización con un herbicida y mediante la incorporación en el suelo con un roturado profundo. En cualquier caso, la evaluación del impacto medioambiental no ha identificado ningún efecto adverso para la salud humana o animal ni para el medio ambiente derivado de la liberación voluntaria maíz *NLB18 CRISPR-Cas9*.

Consideraciones finales y conclusión

La CNB considera adecuadas las medidas propuestas para la liberación voluntaria notificada **B/ES/24/22** por Pioneer HiBred Spain S.L., así como las medidas de bioseguridad, antes, durante y después del ensayo, que deberán aplicarse teniendo en cuenta las consideraciones de la CNB contenidas en este informe.

La CNB recomienda que, tal y como se establece en la Ley 9/2003 y Real Decreto 452/2019, de 19 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, el ensayo sea **controlado** por la Autoridad competente para los casos relacionadas con la realización de los programas de investigación a que se refiere el artículo 3.2.b) de la Ley 9/2003, de 25 de abril, **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, ante cualquier incidencia se deberá informar a la Autoridad competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad y se tomarán las medidas adecuadas, incluida la destrucción del ensayo de campo si fuera necesario.

CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de control y uso propuestas, este ensayo experimental en campo con maíz modificado genéticamente no supone un riesgo significativo para la salud humana y/o el medio ambiente.

Una vez concluido los ensayos de campo de cada campaña, se remitirá un **informe de resultados** de los mismos, 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 como la información adicional solicita por la CNB en este informe. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 22 de noviembre de 2024