



INFORME DE EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA LIBERACIÓN VOLUNTARIA EN CAMPO DE PLANTAS DE TABACO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/24/42)

Antecedentes

El 18 de diciembre de 2024 se recibió desde el CIOMG la notificación **B/ES/24/42**, correspondiente a la liberación voluntaria de plantas de tabaco (cv K326) editado genéticamente en genes de la familia MPO, de Madeinplant S.A.

Esta liberación se enmarca en un proyecto de investigación presentado a la convocatoria de Proyectos de Innovación de Interés General por Grupos Operativos Supraautonómicos de la Asociación Europea para la Innovación en materia de Productividad y Sostenibilidad Agrícolas que tiene por objeto avanzar en el desarrollo de líneas de tabaco biofactorías de moléculas de alto valor añadido para su aplicación industrial.

El objetivo de la presente liberación es determinar las condiciones óptimas de crecimiento en campo de las plantas derivadas de la línea MPO24-1-7-1 para su uso como biofactoría de anatabina. Para ello se estudiarán distintas condiciones de irrigación, fertilización, marcos de plantación y fechas de siembra, evaluándose posteriormente el rendimiento en anatabina en cada una de las condiciones ensayadas.

Esta notificación se estudió en la reunión 186ª de la CNB, celebrada el día 28 de enero de 2025.

La generación T3 de plantas derivadas de la línea T2 MPO24-1-7-1 (libre de transgenes) ha sido objeto de dos liberaciones voluntarias en las campañas 2021 y 2022 (**B/ES/21/01** y **B/ES/22/05**) en el marco del proyecto Newcotiana, cuyo objetivo fue evaluar su comportamiento en campo y confirmar los fenotipos observados en condiciones de crecimiento controladas en invernadero. Estas plantas también fueron objeto de otra liberación en la campaña 2024 (**B/ES/23/36**) dentro del mismo proyecto que enmarca la liberación de esta solicitud cuyo objetivo fue estudiar la producción de anatabina en distintas condiciones de irrigación y fertilización.

Se han presentado los informes de resultados de las liberaciones voluntarias anteriores, en los que se indica que, hasta el momento, no se ha detectado ningún efecto adverso para la salud o el medio ambiente.

Objetivo y características de la Planta Modificada Genéticamente (PMG)

El grupo de investigación de genómica y biotecnología de plantas del IBMCP de la Universidad Politécnica de Valencia (CSIC-UPV) ha generado mutantes CRISPR/Cas de tabaco cv K326 que presentan mutaciones en genes de la familia MPO. Estas mutaciones, consistentes en inserciones o deleciones, resultan en su mayoría, en proteínas truncadas y potencialmente en la pérdida de función de estos genes. Las generaciones T0, T1 y T2 de las líneas generadas han sido evaluadas en un invernadero experimental. En estas condiciones, los mutantes MPO muestran un incremento en los niveles de anatabina y una reducción en los niveles de nicotina.

El objetivo de esta nueva solicitud de liberación de plantas derivadas de la línea T2 MPO24-1-7-1, es ensayar distintas condiciones de irrigación, fertilización, marcos de plantación y fechas de siembra para

optimizar la producción de anatabina en condiciones de crecimiento en campo. El proyecto de investigación tiene prevista la realización de otra liberación en la campaña 2025 con la misma línea de plantas (B/ES/24/41) a cargo del CTAEX en la provincia de Badajoz, con el objeto de evaluar el comportamiento de las plantas en dos localizaciones diferentes.

Evaluación del riesgo

1) Modificación genética

Las líneas objeto de esta liberación presentan mutaciones en genes endógenos de tabaco generadas mediante la técnica CRISPR/Cas, utilizando para ello la transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes*. Como vector de transformación se ha utilizado el vector GB2484, que contiene las unidades transcripcionales de las proteínas DsRed y NptII (marcadores de selección), la unidad transcripcional de la proteína Cas9, y las unidades transcripcionales para la expresión de los gRNAs complementarios a los genes diana.

La línea MPO24-1-7-1-1 de la que originan las semillas T4 objeto de esta liberación se ha obtenido a partir de una planta silvestre de la variedad comercial K326 y presenta mutaciones en genes MPO1. MPO1 cataliza el segundo paso de la ruta de biosíntesis de alcaloides en tabaco en el que N-methylputrescina es oxidativamente deaminada a 4-aminobutanal que espontáneamente forma el catión N-metilpirrolinio.

La posterior condensación del catión N-metilpirrolinio con un derivado del ácido nicotínico da lugar a la formación de nicotina y el ácido nicotínico es, a su vez, un precursor de la síntesis de la anatabina. El análisis del contenido en alcaloides de esta línea muestra una fuerte reducción en el contenido en nicotina acompañada de un aumento significativo en el contenido de anatabina conforme a lo que se esperaría en mutantes de pérdida de función de MPO1. Las líneas de tabaco objeto de este estudio no contienen ningún fragmento de inserción.

Este fenotipo se ha observado tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo (B/ES/21/01, B/ES/22/05 y B/ES/23/36).

2) Probabilidad de mayor persistencia que el receptor o las plantas parentales en los hábitat agrícolas o más invasoras en los hábitats naturales

Actualmente 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 invasoras en los hábitats naturales.

Además, las prácticas de cultivo empleadas minimizan el riesgo de persistencia o invasión. Durante la liberación se procederá al despunte de las plantas antes de la emisión del botón floral previniendo la formación de polen y semillas. Asimismo, se procederá a enterrar los restos de cultivo para evitar posibles rebrotes. Durante el año siguiente a esta liberación se llevará a cabo un seguimiento periódico de la parcela para identificar y eliminar cualquier posible rebrote de plantas de tabaco modificado.

En cualquier caso, la CNB recomienda que, como parte de esta nueva liberación voluntaria, se continúe vigilando esta eventualidad.

3) Modo, tasa de reproducción, diseminación y capacidad de supervivencia

El tabaco presenta reproducción natural autógama (porcentaje de autofecundación superior al 96%). La diseminación del polen de las flores del tabaco es entomófila por lo que, en el hipotético caso de que hubiera polen maduro, podría producir polinización cruzada en parcelas vecinas cultivadas con otras variedades de tabaco. Con una separación de 45 metros entre variedades, cada variedad de tabaco se autofecundará casi al 100%.

En la Comunidad Valenciana no se conoce de producciones comerciales de tabaco, concentrándose el 98% de la producción en Extremadura (Norte de Cáceres). El resto de la producción se sitúa en Castilla y León, Castilla-La Mancha y Navarra. Las semillas de tabaco podrían dispersarse a través del aire, el agua o animales. La práctica habitual del despunte de la planta antes de la apertura del botón floral y el control de los brotes axilares asegura la no producción de polen maduro ni de semilla.

4) Presencia de especies vegetales compatibles sexualmente, tanto cultivadas como silvestres, que sean parientes

El tabaco es una especie subtropical originaria de Centroamérica y América del Sur que no tiene especies antecesoras en Europa, por lo que no existen especies compatibles silvestres que puedan cruzarse formando híbridos fértiles. Puede ser compatible con el tabaco comercial cultivado, pero en la Comunidad Valenciana no se cultiva tabaco.

En este ensayo experimental, las plantas de tabaco se despuntarán antes de que la yema terminal evolucione a flor, se aplicará un producto controlador de brotes, y se eliminarán a mano los brotes que escapen al tratamiento. No habrá por tanto producción de polen maduro ni de semillas. Se considera que no existe, por tanto, ningún riesgo de transferencia de material genético a plantas de la misma u otra especie.

Se indica que la probabilidad de que se produzca una polinización cruzada entre las plantas transgénicas y una planta de *N. glauca* que eventualmente pudiese crecer en las proximidades del área de liberación es, en base a lo expuesto anteriormente, mínima.

La CNB considera que se deben realizar inspecciones periódicas durante el período de floración de las plantas transgénicas para detectar la posible existencia de plantas de *N. glauca* en las proximidades de la liberación (zona perimetral a la parcela).

5) Posible impacto sobre el medio ambiente inmediato y/o diferido resultado de interacciones directas e indirectas entre las PMG y los organismos ajenos a la investigación, incluido el impacto sobre los niveles de población de los competidores, herbívoros, simbioses (en su caso), parásitos y patógenos.

La planta de tabaco es susceptible a diferentes plagas que pueden producirse en la región de Valencia, presentando la variedad K326 resistencia a nematodos. El control de plagas se realizará de acuerdo con la práctica de cultivo habitual por lo que sus efectos no diferirán de los del cultivo comercial de tabaco.

Las hojas de tabaco contienen nicotina, un alcaloide tóxico para insectos y mamíferos, incluido el hombre, si se ingiere o se absorbe a través de la piel. Durante el cultivo de las líneas modificadas se aplicarán las medidas de protección habituales por lo que sus efectos no diferirán de los del cultivo comercial de tabaco.

Las modificaciones introducidas en los genes MPO resultan en una reducción en los niveles de nicotina que podría potencialmente hacer las plantas más susceptibles a herbívoros.

La CNB considera que se deben reportar cualquier efecto inesperado sobre organismos ajenos a esta investigación.

- 6) Posibles efectos sobre la salud humana resultado de las potenciales interacciones entre las PMG y las personas que trabajan/están en contacto con ellas o cerca de la liberación de la PMG.

Los efectos negativos para la salud humana derivados del contacto con las plantas de tabaco modificadas no difieren de los del cultivo de tabaco convencional: la manipulación de hojas de tabaco verde sin la protección adecuada puede provocar intoxicación por nicotina al ser esta absorbida por la piel (enfermedad del tabaco verde). Asimismo, la aplicación de productos fitosanitarios para el control de plagas durante el cultivo requiere el uso de equipo adecuado para la protección personal por parte de los trabajadores.

Como se indica por el propio notificador, la CNB considera que durante esta liberación se deben aplicar las medidas de protección adecuadas.

Características y duración de la liberación

- Localización y extensión del lugar o lugares de liberación

El lugar de liberación está situado en la finca Sinyent de la Asociación Valenciana de Agricultores (AVA-ASAJA) situada en Poliñá de Júcar (Polinyà de Xúquer). La finca tiene una extensión de 25 ha y cuenta con 28 parcelas. La liberación ocupará una superficie de 2.500 m² y 0.86 ha. Se indican las coordenadas geográficas de la parcela.

En cuanto al número aproximado de plantas, en los ensayos de riego y fertilización, fechas de siembra y marcos de plantación se trasplantarán un máximo de 2.136 plantas de la línea MPO24-1-7-1, y un máximo de 2.136 plantas de la línea parental K326 lo que supone un total de 4.272 plantas.

El diseño experimental de riego y fertilización que se ha presentado será en bloques, separados por una zona central de riego, con 48 parcelas experimentales de 50 plantas, resultando en 2.400 plantas en total. Cada parcela tendrá unas dimensiones de 4.5 m (tres líneas de cultivo) x 5.6 m = 25.2 m². En esta liberación se alternará el riego al 100% de las necesidades del cultivo y con un porcentaje de reducción en torno al 30% de las necesidades del cultivo, en combinación con distintos patrones de fertilización.

Además, se ensayarán tres fechas de siembra en 18 parcelas experimentales de 50 plantas, requiriendo 900 plantas para esta liberación voluntaria. Por último, se ensayarán tres marcos de plantación (45, 50 y 67 plantas/parcela), en 18 parcelas experimentales, requiriendo 972 plantas.

El lugar de liberación presenta un clima mediterráneo típico (clasificación climática de Köppen Csa). La temperatura media anual de la zona Ribera Baja en la Comunidad Valenciana es de 17,5 °C, con una temperatura máxima media de 24,8 °C y una temperatura mínima media de 10,1 °C. El número medio de horas de frío se sitúa en torno a las 450 horas, y el número medio de heladas en la serie histórica desde 1992 hasta 2012 es de 1 a 10 días. La precipitación media en esta zona es de 450 mm, y el periodo de sequía medio es de 3 meses.

La parcela se halla situada en un área cultivable agrícola con ausencia de bosques, prados o ganadería cercanos. Los cultivos principales en la zona son cítricos, caqui, aguacate, kiwi, vid, olivos y hortícolas de verano e invierno. La fauna silvestre existente es la característica de las zonas agrícolas en esta región; son frecuentes las urracas, lagartijas, erizos, ratones, conejos y zorros.

Está previsto que esta liberación voluntaria empiece a principios de febrero de 2025 con la siembra de las primeras semillas en invernadero en condiciones confinadas. Además, se ensayarán otras fechas de siembra (principios de marzo y finales de abril). La fecha estimada de inicio de la liberación voluntaria con el trasplante a campo de las primeras plántulas germinadas en invernadero es principios de abril de 2025 (para las otras fechas de siembra, el trasplante se realizará a finales de mayo y junio). La liberación se extenderá hasta el 30 de noviembre de 2025.

- Proximidad de biotopos reconocidos oficialmente o zonas protegidas que puedan verse afectados

El área de liberación no está incluida en ninguna zona protegida. Sin embargo, se encuentra cerca de la Zona Especial de Protección de Aves (ZEPA) l'Albufera (ES0000471), situado a aproximadamente 2 km de distancia en su punto más cercano. No se espera que el cultivo del tabaco tenga un efecto negativo sobre esta zona.

- Medidas para reducir o evitar la dispersión de cualquier órgano reproductor de las PMG

Las semillas se producen en el IBMCP, UPV (Valencia), que cuentan con la correspondiente autorización para realizar actividades con OMG en condiciones confinadas (notificación **A/ES/04/I-06**).

Las semillas serán trasladadas desde el IBMCP (Valencia) a las instalaciones de la Asociación Valenciana de Agricultores (AVA-ASAJA, instalaciones ya comunicadas) en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml con tapón de rosca. Cada tubo irá identificado con una etiqueta adhesiva en la que se indicará el nombre de la línea de tabaco a que corresponde. El cierre de los tubos se sellará con parafilm como medida de seguridad adicional, lo que evitará su apertura accidental. Los tubos así preparados se embolsarán en una bolsa termosellada, que se introducirá en un sobre acolchado para su envío. Tanto el sobre como la bolsa termosellada con los tubos de semillas llevarán anexa una ficha con la información relevante que incluirá: (i) la identificación de la mercancía como semillas editadas genéticamente, y (ii) el nombre y datos de contacto del remitente y del destinatario. El traslado se realizará en vehículo particular o a través de una empresa de mensajería.

La siembra se realizará en la nave agrícola de la Finca Sinyent, de forma manual en bandejas de poliestireno expandido rellenas con sustrato. Las bandejas se codificarán para tener las plántulas identificadas a lo largo de todo el proceso. Tras la siembra, las bandejas se transportarán al invernadero para la germinación de las plantas. En este tiempo se controlarán las condiciones de temperatura, humedad del sustrato, y la sanidad de las plantas que vayan germinando. En caso de ser necesarias se aplicarán medidas de control de plagas.

La germinación de las semillas se llevará a cabo en un invernadero situado en la finca Sinyent de AVA-ASAJA bajo condiciones confinadas. Para su traslado al lugar de liberación, se procederá a cubrir los semilleros con plástico evitando así la posible dispersión accidental de las plántulas de tabaco. Se procederá a vaciar los semilleros de las plántulas y sustrato sobrantes que se embolsarán para su autoclavado. Las bandejas de poliestireno utilizadas para el semillero ya vacías se limpiarán.

- Método de liberación de las plantas modificadas genéticamente

En la primera semana de abril se procederá al trasplante de las plantas sembradas en febrero (las plantas sembradas en marzo y abril se trasplantarán en mayo y junio, ver punto anterior) en la localización de la liberación manualmente o mediante el uso de una trasplantadora mecánica. Tanto la nave agrícola donde se realizará la siembra como el invernadero en el que se germinarán las semillas contarán con los permisos necesarios para la realización de actividades tipo 1 con OMG en condiciones confinadas.

El invernadero utilizado para la germinación de las semillas se preparará de forma estándar. Una vez se hayan enviado las bandejas con las plantas germinadas listas para su trasplante a la localización de la liberación en campo, se procederá a limpiar y desinfectar el invernadero de la forma habitual. Tras el trasplante las bandejas se devolverán vacías al semillero, se lavarán, desinfectarán con agua e hipoclorito (lejía comercial al 10 %) y se dejarán secar. Una vez finalizados los ensayos experimentales se enviarán a empresas homologadas para su reciclado.

En cuanto a la preparación y gestión del lugar de liberación, la preparación de la parcela de cultivo será la habitual para el cultivo de tabaco, aplicando al suelo las enmiendas orgánicas y la fertilización necesaria, según la Norma Técnica de Producción Integrada del Tabaco. Se ensayará la aplicación de distintos regímenes de fertilización combinados con distintos regímenes de irrigación. Siguiendo las prácticas habituales de cultivo de tabaco se procederá al despunte de las plantas antes de la apertura del botón floral. Se aplicará a continuación un tratamiento controlador de brotes y se procederá a eliminar manualmente los brotes que puedan escapar al tratamiento.

Se procederá a la cosecha de las hojas y eventualmente de los tallos de forma manual. Los restos de hojas y tallos que queden en el terreno serán triturados y enterrados junto con los restos de raíces en el suelo de la parcela de ensayo con pases de rotovator. Esta práctica, junto con el efecto de la baja temperatura mantendrá el suelo libre de vegetación hasta el final del invierno. Además, personal de AVA realizará un seguimiento de la parcela durante el año posterior a la liberación para eliminar cualquier rebrote que pudiese aparecer.

– Descripción de los métodos de tratamiento del lugar tras la liberación

Para evitar el posible rebrote de restos vegetales que permanezcan en el terreno tras la cosecha, se realizarán pases de rotovator que triturará los restos de raíces, tallos y hojas y los enterrará en el suelo. Se realizará un seguimiento del área de liberación durante el año siguiente a la misma para controlar y eliminar potenciales rebrotes. Durante ese año, podría solicitarse un nuevo permiso de liberación que incluya las mismas líneas u otras líneas editadas genéticamente en los mismos genes y libres de T-DNA. En caso de no repetirse una nueva liberación, el terreno se dejará en barbecho o se cultivará con otras especies sexualmente incompatibles.

– Descripción de los métodos de tratamiento tras la liberación en cuanto a la recogida y los residuos de la planta modificada genéticamente

Las hojas de tabaco cosechadas se secarán al aire en la nave industrial donde también se realizará la siembra, extendidas en el suelo de cemento de la nave sobre una lona y cubiertas con una malla para impedir la posible dispersión accidental de las hojas. El secado también se podrá realizar en el invernadero donde germinen las semillas, disponiendo las hojas en bandejas de madera con rejilla, situadas encima de cajas de plástico para favorecer la aireación. Alternativamente, se podrá utilizar para el secado una estufa localizada en el laboratorio de AVA. Los restos vegetales que permanezcan en el suelo tras la cosecha se triturarán y enterrarán mediante pases de rotovator.

Una parte de las hojas secas se envasarán en cajas debidamente selladas e identificadas y se trasladarán a los laboratorios de la empresa Idoasis para la extracción y análisis de su composición en alcaloides y otros productos de interés en procesos de biorrefinería. Las hojas secas restantes se destruirán mediante incineración en la finca de AVA. El material que recibirá la empresa Idoasis será en todo caso material derivado NO VIABLE (hojas secas) sin capacidad de reproducción o regeneración, ni de replicación del material genético.

Si se elige destruir las partes aéreas de las plantas mediante incineración, se solicitaría el permiso de la autoridad competente de la Comunidad Valenciana.

– Descripción de los planes y técnicas de seguimiento

Durante el ciclo de cultivo, personal de AVA realizará un seguimiento semanal (o más frecuente en algunos periodos) del cultivo e informarán al investigador responsable de cualquier anomalía detectada. Tras la cosecha se procederá al triturado y enterrado de los restos de tallos y raíces mediante pases de rotovator. Durante el año posterior a la liberación personal de AVA realizará inspecciones visuales semanales de la parcela para detectar y eliminar posibles rebrotes. Al finalizar la liberación se enviará un informe de resultados a la autoridad competente.

– Métodos y procedimientos de protección del lugar de la liberación

En el caso de que surja una situación de emergencia derivada de fenómenos naturales, se constituirá un grupo de trabajo formado por el coordinador del proyecto y los responsables de la solicitud y de los ensayos experimentales. El grupo hará una evaluación de la situación, tomará las decisiones más apropiadas y realizará el seguimiento posterior. La situación será notificada inmediatamente a la autoridad competente.

– Métodos y procedimientos de protección del lugar de la liberación

La liberación voluntaria se ubicará en una explotación agrícola privada y el propietario se ha comprometido a realizar inspecciones periódicas semanales. La parcela en la que se establecerá la liberación se encuentra vallada en su totalidad. Además, se realizará un segundo vallado de alambre del área de 2.500 m² que contendrá las plantas de tabaco, dejando espacio para permitir trabajar con el tractor. Este segundo vallado dispondrá de una puerta con llave, limitándose el acceso a las personas autorizadas, que serán algunos de los trabajadores de AVA. AVA cuenta con un equipo de vigilantes que trabajan 365 días al año, 24 horas al día, de modo que en todo momento hay un vigilante en las instalaciones.

La CNB considera adecuados las medidas y métodos propuestos y espera que se presenten los resultados de esta liberación una vez finalizada.

Consideraciones finales y conclusión

La CNB considera adecuadas, las medidas propuestas para la liberación voluntaria propuesta por Madeinplant S. A., así como las medidas de bioseguridad, antes, durante y después de la liberación voluntaria 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, esta liberación voluntaria sea **controlada** 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 de la misma**, y también durante el seguimiento de un año de la parcela tras su finalización, 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 experimental de campo si fuera necesario.

CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las condiciones de uso propuestas y las consideraciones adicionales propuestas por la CNB, la liberación propuesta no supondría un riesgo significativo para la salud humana, animal y el medio ambiente.

Una vez concluido esta liberación **se remitirá un informe final de resultados** de la misma, 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 liberaciones voluntarias en campo con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 6 de febrero de 2025