



INFORME DE EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA LIBERACIÓN EN CAMPO DE PLANTAS DE TABACO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/22/01)

Antecedentes

El 23 de noviembre se recibió de la Junta de Extremadura, la notificación B/ES/22/01 relativa a un ensayo de tabaco cv Burley B5 derivado de la línea estable NtB538061T0#1(T1#1T2#1T3#1) modificada genéticamente, de la empresa Nomad Bioscience GmbH (Halle, Alemania), solicitando informe de evaluación de la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB).

Esta notificación se estudió en la reunión 161ª de la Comisión Nacional Bioseguridad (CNB), celebrada el 1 de diciembre de 2021.

Objetivo y características del OMG

El objetivo del ensayo es la evaluación del comportamiento agronómico y de la producción de taumatina-2 en plantas de tabaco cv Burley B5 derivadas, por autopolinización, de la línea transgénica estable NtB538061T0#1(T1#1T2#1T3#1), modificada genéticamente para la expresión inducible por etanol de taumatina-2. El ensayo propuesto es continuación de otro realizado en 2021 (B/ES/21/03) y el notificador ha presentado el Informe de Resultados de este ensayo previo.

El objetivo de la presente liberación es la optimización de la producción de taumatina-2 en condiciones de campo en relación con parámetros tales como la edad de la planta en el momento de la inducción, la concentración de etanol y su forma de aplicación, o el tratamiento del material vegetal tras la cosecha.

Este ensayo de liberación se enmarca en un proyecto de investigación que tiene por objeto la producción en plantas de tabaco de la proteína edulcorante, taumatina-2, cuyo dulzor es 100.000 veces superior al del azúcar en términos molares. La taumatina está compuesta por varias proteínas extraídas de los arilos de la fruta del Katemfe (*Thaumatococcus danielli*), un arbusto nativo de África, y su uso como modificador y potenciador del sabor en la cocina tradicional de África occidental se remonta a hace más de cien años.

Características y duración del ensayo

El lugar de liberación está situado en la finca experimental del Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX) situado en Villafranco del Guadiana, provincia de Badajoz. La finca tiene una extensión de alrededor de 25 ha y cuenta con 4 parcelas. El ensayo ocupará una superficie de unos 1.256 m² dentro de la parcela indicada en la notificación de 1,464 ha (se ha proporcionado la identificación de la parcela por coordenadas geográficas y también el plano localización de la finca). Cabe señalar que la parcela es la misma en la que se realizó el ensayo durante 2021 (B/ES/21/03).

Está previsto que el ensayo empiece el 1 de marzo de 2022 y se extienda hasta el 31 de diciembre de 2022.



No existen en las proximidades de la localización de los ensayos biotopos reconocidos oficialmente o zonas protegidas que puedan verse afectadas.

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 el tomate de industria y el maíz; también se pueden encontrar cultivos de especies hortícolas como pimiento y brócoli y un poco más alejados olivos, vid y frutales de hueso. La fauna silvestre existente es la característica de las zonas agrícolas en esta región; son frecuentes las urracas, lagartijas, erizos, ratones y zorros.

No existen especies vegetales sexualmente compatibles con la planta de tabaco próximas a localización prevista para la liberación de plantas modificadas genéticamente. 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 la localización en la que se prevé realizar la producción del tabaco de ensayo se encuentra a una distancia de 100 km de las zonas de producción de tabaco comercial.

Podrían realizarse ensayos adicionales de liberación de plantas de tabaco modificadas genéticamente en las instalaciones de CTAEX. En caso de realizarse, en estos ensayos se seguirán las mismas medidas de control de riesgo descritas en esta solicitud manteniéndose una distancia mínima de 100 m entre los ensayos.

Método de liberación de las plantas modificadas genéticamente

Esquema del diseño experimental

El número aproximado de plantas que se trasplantarán serán de un máximo de 4.500 plantas de la línea NtB538061T0#1(T1#1T2#1T3#1).

Las plantas se distribuirán en 8 bloques de 500 plantas cada uno, dispuestos en cuatro filas con 2 bloques por fila. La separación entre filas será de 1,5 m resultando en una superficie total ocupada de 1.256 m².

Medidas de gestión: control del ensayo y tratamiento de residuos

Las medidas propuestas por Nomad Bioscience, junto con el CTAEX, en donde se realizará el ensayo, así como las medidas de bioseguridad, antes, durante y después del ensayo, se detallan a continuación:

Las semillas serán trasladadas desde Nomad Bioscience (Alemania) a las instalaciones de CTAEX en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml con tapón de rosca. Una vez recibidas las semillas desde Nomad Bioscience, se procederá a su entrada en la cámara de semillas de CTAEX, previo registro interno, hasta el momento de su siembra para garantizar su calidad.

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, siguiendo las indicaciones del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología: (i) la identificación de la mercancía como semillas modificadas genéticamente, y (ii) el nombre y datos de contacto del remitente y del destinatario. El traslado se realizará a través de una empresa de mensajería.

La germinación de las semillas se llevará a cabo en un invernadero situado en la finca experimental de CTAEX bajo condiciones confinadas (ya autorizado, Notificación A/ES/19/I-52). Las semillas se sembrarán 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. 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.

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. En caso de no trasplantarse todas las plántulas, aquellas que no se utilicen se sacarán del semillero y se embolsarán para su autoclavado. Asimismo, las bandejas de poliestireno utilizadas para el semillero se devolverán vacías al invernadero donde se procederá a su limpieza: se lavarán, desinfectarán con agua e hipoclorito (lejía comercial al 10 %) y se dejarán secar. Una vez finalizados los ensayos se enviarán a empresas homologadas para su reciclado.

La preparación de la parcela de cultivo será la habitual para el cultivo de tabaco en la zona. Se aplicarán al suelo las enmiendas orgánicas y la fertilización necesaria, según la Norma Técnica de Producción Integrada del Tabaco.

La inducción de la expresión de taumatina-2 se llevará a cabo mediante la aplicación en spray de una solución de etanol a no más del 15% (v/v). El tratamiento se realizará por bloques de 500 plantas cada uno aplicándose a cada bloque dos tratamientos en días consecutivos. La mitad de los bloques se cubrirán con una carcasa portátil hecha de plástico de invernadero antes de la aplicación del tratamiento con etanol. La utilización de estas carcasas, que contarán con aperturas laterales para evitar un ascenso excesivo de la temperatura, tiene por objeto evitar una evaporación demasiado rápida del etanol aplicado. Los bloques así tratados permanecerán cubiertos por la carcasa durante un máximo de 48 h en las que se prevé realizar los dos tratamientos.

Las plantas de tabaco (parte aérea de la planta: tallos y hojas) se cosecharán de forma manual aproximadamente 8 días tras la inducción con etanol y se cosecharán antes del inicio de la floración por lo que no existe riesgo de diseminación a través del polen o semillas. Para evitar el posible rebrote de restos que permanezcan en el terreno tras la cosecha se realizarán pases de grada de discos que triturará los restos de hojas, raíces y tallos y los enterrará en el suelo. Esta práctica, junto con el efecto de la baja temperatura mantendrá el suelo libre de vegetación hasta el final del invierno.

Tras su cosecha, el material vegetal se secará al aire en bandejas colocadas en el lugar de liberación. El material seco se envasará en cajas debidamente selladas e identificadas y se trasladará a los



laboratorios de la empresa Nomad Bioscience para el análisis y purificación de la proteína recombinante taumatina-2.

En caso de existir material sobrante este se eliminará por incineración, para la que se solicitará el permiso de la autoridad competente de la Junta de Extremadura. El material que se trasladará a la empresa Nomad Bioscience será en todo caso material derivado no viable sin capacidad de reproducción o regeneración, ni de replicación del material genético.

Control y seguimiento

Durante el ciclo de cultivo, personal de CTAEX realizará un seguimiento semanal del cultivo e informará al investigador responsable de cualquier anomalía detectada. Tras la cosecha se procederá al triturado y enterrado de los restos de hojas, tallos y raíces mediante pases de grada de discos. Durante el año posterior a la liberación, personal de CTAEX realizará inspecciones visuales semanales de la parcela para detectar y eliminar posibles rebrotes. Para facilitar esta tarea la parcela será dejada en barbecho o bien cultivada con otras especies sexualmente incompatibles.

Actualmente, la parcela en la que se establecerá el ensayo se encuentra parcialmente vallada. Se indica que el CTAEX completará el vallado de la parcela antes del inicio del ensayo. Además, se vallará el área de 1.225 m² que contenga las plantas de tabaco con alambre y se habilitará una puerta con llave, limitándose el acceso a las personas autorizadas, que serán algunos de los trabajadores del área de Agricultura del CTAEX. Asimismo, se completará el sistema de videovigilancia existente con la instalación de una cámara adicional que cubra la parcela destinada a este ensayo. CTAEX 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 el centro. Este vigilante, además de revisar personalmente las instalaciones del centro, tiene acceso a las imágenes que capta el sistema de videovigilancia.

Situaciones de emergencia

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, que 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.

Identificación y Caracterización de Riesgos Potenciales

a) Caracterización molecular

La línea de tabaco objeto de este ensayo contiene en su genoma una inserción de T-DNA para la expresión inducible por etanol de la proteína taumatina-2 y se ha generado mediante transformación genética mediada por *Agrobacterim tumefaciens* de plantas de *N. tabacum* cv Burley B5 con el plásmido pNMD38061.

Este plásmido cuya secuencia completa se ha incluido en la notificación, contiene casetes de expresión para:



- (i) la expresión constitutiva del marcador de selección de resistencia a kanamicina en planta, y contiene el origen de replicación pVS1 así como los genes *staA* y *repA* (proteínas de estabilización y de replicación, respectivamente) del plásmido pVS1 de *Pseudomonas aeruginosa* para su replicación y estabilidad en *Agrobacterium*, obtenidas a partir del vector pPZP2007;
- (ii) la expresión constitutiva del activador transcripcional *alcR*, y contiene la unidad transcripcional de la resistencia a kanamicina en bacteria (*E. coli* y *Agrobacterium*) formado por el promotor *bla* (promotor sintético para la expresión del gen de resistencia a ampicilina) obtenido del plásmido pUC19 y el gen *nptII* de *Enterococcus faecalis*, clonado a partir del plásmido pBIN19;
- (iii) la expresión de la proteína taumatina-2 mediante un sistema viral basado en el virus del mosaico del tabaco e inducible por etanol, y contiene el origen de replicación pMB1, derivado del vector pUC19 y originario de la cepa K12 de *E. coli*, para su replicación y estabilidad en *E. coli*;
- (iv) la expresión inducible por etanol de la proteína del movimiento del virus del mosaico de tabaco y contienen los bordes derecho e izquierdo del T-DNA de *A. tumefaciens* clonados a partir del plásmido pBIN19;
- (v) Además, contiene una unidad transcripcional compuesta por el promotor y el operador *lac* y el fragmento LacZ α de la β - galactosidasa de *E. coli* como marcador de selección blanco/azul (clonado a partir del plásmido pUC19).

Se detallan los métodos de transformación utilizados desde los transformantes T0 generados mediante transformación de discos de hoja y regeneración *in vitro* de los explantos y utilizando kanamicina como marcador de selección, hasta la generación T4.

La línea de tabaco NtB538061T0#1 objeto de este ensayo presenta una inserción de 17.094 pb, resultante de la transferencia de T-DNA mediada por *Agrobacterium* en los que el T-DNA es transportado al núcleo de la célula y, por tanto, integrado en el cromosoma nuclear. Se han descrito los métodos utilizados para la determinación del número de copias del T-DNA y su localización en el genoma. La línea vNtB538061T0#1 no contiene ninguna otra inserción.

La línea NtB538061T0#1 presenta una delección de 12 pb en el lugar de inserción del T-DNA. No obstante, el análisis de la secuencia genómica adyacente al punto de inserción no ha identificado ningún gen endógeno cuya función pudiese verse afectada por la inserción del T-DNA. La secuencia genómica modificada por la inserción del T-DNA no posee ninguna función conocida.

El sistema de expresión inducible por etanol utilizado se basa en la expresión inducible de un replicón viral a partir de un pro-replicón integrado establemente en el genoma de la planta. Este sistema consta de dos elementos:

- (i) el replicón viral, donde la expresión de la RNA polimerasa está regulada por el promotor inducible por etanol *alcA* y en el que se ha eliminado la proteína del movimiento y se ha sustituido la proteína de la cápside por la secuencia codificante de la taumatina-2; y
- (ii) la proteína del movimiento del virus, regulada también por el promotor inducible por etanol *alcA*.

Así, la liberación del replicón viral y la síntesis de taumatina-2 por un lado, y la expresión de la proteína de movimiento por otro, se producirán únicamente en presencia de etanol. Esta deconstrucción del vector viral en dos componentes, replicón y proteína del movimiento de célula a



célula, cada uno bajo el control de un promotor inducible, proporciona un control preciso de la expresión del transgén. La presencia de la proteína de movimiento permite el movimiento célula a célula del replicón viral, sin embargo, no existe movimiento sistémico al haberse eliminado la proteína de la cápside. En ausencia de la proteína de la cápside los replicones de ARN no pueden ser encapsulados en partículas virales y por tanto no pueden ser transferidos a otras plantas o generar virus silvestres. No parece existir, por tanto, riesgo de propagación accidental del vector viral al medioambiente.

La expresión del fragmento de inserción se ha analizado mediante la evaluación de la producción de taumatina-2 inducida por etanol en hojas adultas. No se ha analizado la expresión en otros órganos como flores, polen, semillas, tallo o raíces. Con respecto a los órganos reproductivos, las plantas se cosecharán antes de la floración por lo que no habrá desarrollo de flores, polen o semillas.

A este respecto, sin embargo, cabe señalar que el análisis de otros eventos de transformación en los que se utiliza el mismo sistema de expresión viral inducible por etanol para la producción de otras proteínas recombinantes, muestran expresión del transgén en tallo, además de en hojas, pero no en raíces. Con respecto a los órganos reproductivos, las plantas se cosecharán antes de la floración por lo que no habrá desarrollo de flores, polen o semillas.

b) Capacidad de transferencia del material genético

El tabaco (*Nicotiana tabacum*) 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 pudiendo producirse polinización cruzada entomófila. En este ensayo, la distancia de aislamiento respecto a otras plantaciones de tabaco comerciales es de 100 km. La distancia entre este ensayo y otros ensayos (B/ES/21/01 y B/ES/21/02) en el CTAEX será de 100 m. Adicionalmente, en este ensayo, las plantas de tabaco se cosecharán antes de la floración. No habrá por tanto producción de polen maduro ni de semillas. Se considera que no existe, por tanto, riesgo significativo de transferencia de material genético a plantas de la misma u otra especie.

En este caso, la CNB considera suficiente y necesaria la distancia de aislamiento de 100 m de este ensayo con respecto a otros ensayos que se desarrollan en el CTAEX.

c) Estabilidad genética y fenotípica

La estabilidad genética del fragmento de inserción y estabilidad fenotípica de la planta modificada se ha demostrado a lo largo de las generaciones T0, T1, T2, T3 y T4 crecidas en invernadero. La presencia del transgén en estas plantas se ha verificado mediante PCR y test de resistencia a kanamicina. Adicionalmente, la expresión funcional de los transgenes se ha verificado mediante el análisis de la producción inducida por etanol de taumatina-2 sin que se haya observado en ningún caso silenciamiento del transgen. Se prevé por tanto que la inserción del T-DNA en el genoma se mantenga estable en las siguientes generaciones.



d) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Según el notificador 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. Las plantas se cosecharán antes de la floración por lo que no habrá producción de polen o semillas. Asimismo, se procederá a enterrar los restos de cultivo para evitar posibles rebrotes. Durante el año siguiente al ensayo se llevará a cabo un seguimiento periódico de la parcela para identificar y eliminar cualquier posible rebrote de plantas de tabaco modificado.

e) Cualquier ventaja o desventaja que haya adquirido la PMG

La modificación introducida está orientada a la producción inducible por etanol de la proteína taumatina-2. Conforme al conocimiento actual, no se prevé ninguna ventaja selectiva derivada de la modificación genética.

De cualquier modo, cualquier cambio observado durante o tras finalizar este ensayo en relación con esta característica deberá comunicarse a la CNB.

f) Impacto potencial sobre los organismos diana y no diana

No se conoce ninguna característica derivada de esta modificación que pueda producir ningún impacto sobre los niveles de población de competidores, herbívoros, simbioses, parásitos o patógenos. Asimismo, no se prevé que el tratamiento de las plantas con una solución de etanol tenga ningún efecto sobre el medioambiente ya que no es tóxico a esta concentración y se evapora rápidamente.

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

g) Posibles efectos sobre la salud humana y salud animal

La taumatina no es tóxica, genotóxica o teratogénica, no está asociada con efectos alérgicos u otros efectos nocivos, y su uso como aditivo alimentario está aprobado en Unión Europea desde 1984 según el Reglamento (CE) No. 1333/2008; anexo II y corroborado por el Panel de EFSA sobre *Food Additives and Nutrient Sources added to Food*, 2015 conforme al Reglamento (UE) 2018/677. Por ello no se espera ningún efecto significativo sobre la salud humana o animal.

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

En este ensayo se aplicarán las mismas técnicas de cultivo, gestión y cosecha que en la producción de tabaco con fines comerciales. La única diferencia consistirá en la aplicación de un tratamiento con etanol para la inducción de la expresión de la proteína recombinante. No se prevé que este



tratamiento tenga ningún efecto sobre el medio ambiente ya que el etanol no es tóxico a esta concentración y se evapora rápidamente.

i) Posibles efectos inmediatos y/o diferidos sobre los procesos biogeoquímicos

En este ensayo, las plantas de tabaco modificadas genéticamente se cultivarán siguiendo las mismas prácticas agronómicas que en la producción comercial de tabaco, tales como la aplicación de enmiendas orgánicas, fertilización del suelo, o tratamientos fitosanitarios de control de plagas. La única diferencia entre estas plantas y la línea parental es la producción de taumatina-2 tras una inducción por etanol. No se prevé por tanto que el cultivo de las plantas modificadas tenga ningún efecto sobre los procesos biogeoquímicos distinto al cultivo convencional del tabaco. **Cualquier efecto no esperado sobre los procesos biogeoquímicos que se pueda producir deberá, así mismo, comunicarse.**

Medidas de gestión propuestas por la CNB

La CNB considera adecuadas, en general, las medidas propuestas para el ensayo por la empresa NOMAD junto con el CTAEX, así como las medidas de bioseguridad, antes, durante y después del ensayo. No obstante, se indican algunas medidas adicionales y relevantes que deberán ser tenidas en cuenta:

- **Será condición indispensable que se complete el vallado de la parcela antes del inicio del ensayo.**
- Todas las posibles plántulas que no se utilicen para su plantación, se sacarán del semillero y se embolsarán para su autoclavado, **así como la tierra del semillero y las semillas no germinadas.**
- Para evitar la posible dispersión de polen o semilla se procederá, tal y como se propone, al despunte de las plantas antes de la emisión del botón floral y se aplicará un tratamiento de control de los brotes. **Se realizará un seguimiento de las plantas para eliminar manualmente cualquier brote** que escape al tratamiento.
- **Se realizará, tal y como se propone, un seguimiento de la parcela durante el año siguiente a la liberación para controlar y eliminar potenciales rebrotes.**
- **Las cajas en las que se transportarán las hojas secas a la empresa Nomad Bioscience GmbH deben ser herméticas.**
- Las hojas secas restantes se destruirán mediante incineración, **para lo que se solicitará permiso a la autoridad competente de la Junta de Extremadura.**
- Durante el ciclo de cultivo, personal del CTAEX realizará un **seguimiento semanal** del cultivo e informarán al investigador responsable de cualquier anomalía detectada.
- El siguiente año, cuando finalicen los ensayos, la parcela utilizada, si no se utiliza para un nuevo ensayo con este mismo tabaco modificado genéticamente, **será dejada en barbecho o bien cultivada con otras especies sexualmente incompatibles.**
- Al finalizar el ensayo se enviará un informe de resultados a la Autoridad competente.
- 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 del ensayo. 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.



Consideraciones finales y conclusión

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 condiciones de uso propuestas, el ensayo propuesto no supone un riesgo significativo para la salud humana, animal y el medio ambiente.

Una vez concluido el ensayo **se remitirá un informe final 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 en campo con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 14 de diciembre de 2021