



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

(Notificación B/ES/13/20)

Características, objetivo y duración del ensayo

El grupo de Genómica Funcional del Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), ubicado en Córdoba, ha presentado al CIOMG este ensayo de campo con trigo modificado genéticamente que presenta muy baja reactividad en relación con la enfermedad celíaca, debido a la disminución en los epítomos tóxicos en cien veces menos que el trigo normal. Esto se ha conseguido mediante el silenciamiento de gliadinas en el grano de trigo con técnicas RNAi basadas en fragmentos homólogos a los tres grupos de gliadinas presentes en el grano (omega, gamma y alpha gliadinas) y un fragmento específico de las gamma gliadinas.

El objetivo de la liberación es producir 500 kg de grano de la línea de trigo E82 con muy baja reactividad con respecto a la enfermedad celíaca. En ensayos previos realizados, esta línea mostró niveles 10 veces más bajos de proliferación de linfocitos T, específicos para epítomos relacionados con la enfermedad celíaca que la línea control (Gil-Humanes et al., 2010).

Se propone comenzar el ensayo en diciembre de 2013 y finalizarlo en julio de 2014.

Con el trigo recolectado de este ensayo se plantearía un ensayo clínico con enfermos celíacos utilizando galletas fabricadas con harina de esta línea de trigo E82 y realizado por un equipo médico del hospital Reina Sofía de Córdoba. Dicho equipo médico gestionaría los permisos necesarios ante los comités médicos correspondientes.

Teniendo en cuenta esto último, **la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) quiere señalar que en este informe se valora únicamente el riesgo ambiental o para la salud que podría suponer la realización del ensayo en campo propuesto, no entrando a evaluar ulteriores consideraciones sobre el posible ensayo clínico previsto, ya que se considera que no es competencia de esta Comisión.**

Características del ensayo:

Se propone un ensayo de campo que se llevaría a cabo en el municipio de Fuente Palmera (Córdoba), a unos 25 Km. del Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC.

La finca donde se realizará el ensayo está dedicada a la explotación agrícola y ésta no se encuentra próxima a ningún área o biotopo con protección especial. El área sembrada con el trigo modificado genéticamente ocuparía una superficie aproximada de 1000 m². Se dejará una franja de 2 m de ancho entre el trigo y el cultivo circundante (colza) a lo largo de todo el perímetro, que será mantenida libre de malas hierbas durante todo el período. Alrededor de esta franja de seguridad se establecerá una



valla perimetral para impedir el acceso de animales a la misma. La distancia mínima a cualquier superficie que pudiera ser sembrada de trigo será de 200 m. Las parcelas de cultivo a menos de 200 m. susceptibles de ser ocupadas por cultivos herbáceos, pertenecen a los mismos propietarios y serán sembradas en marzo con maíz y girasol.

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 autógena, 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.

En condiciones naturales, la polinización del trigo es principalmente mediante autopolinización (entre el 99 y 97%). Únicamente en condiciones muy propicias de humedad y temperatura (20 °C y un 60% de humedad relativa) podría ocurrir la polinización cruzada ya que el polen del trigo es muy sensible a las condiciones ambientales. El polen del trigo se dispersa por la acción del viento, aunque al ser bastante pesado su distancia de dispersión es reducida y permanece viable durante un corto periodo de tiempo, generalmente no superior a 30 minutos. Aunque en experimentos de campo llevados a cabo por Wilson (1968) se observó un 10% de polinización entre plantas estériles masculinas de trigo y el foco emisor del polen, en distancias de 30 metros aproximadamente, con estudios realizados más recientemente, Waines and Hedge (2003) consideraron que una distancia de aislamiento de 3 a 6 m. es suficiente para evitar efectivamente el flujo de genes del trigo.

No obstante, el notificador propone una distancia de este ensayo con respecto a otros cultivos comerciales de trigo, cebada, centeno o triticale como mínimo de 200 m., **distancia que la CNB considera adecuada y suficiente para mantener el aislamiento.**

Por otra parte, aunque el notificador había propuesto plantar filas de 5 m. de plantas de trigo convencionales alrededor del ensayo, **la CNB considera que, aunque la probabilidad es baja, para evitar el posible cruzamiento de las plantas de trigo modificadas genéticamente con estas convencionales no se deben plantar estas filas de trigo no modificado, ya que podría tener efectos negativos en los pacientes celíacos en el caso de que finalmente se utilice para realizar un ensayo clínico.**

b) Estabilidad genética y fenotípica:

En el trigo, los cloroplastos y mitocondrias tienen herencia materna, por lo que, si el vector de silenciamiento se ha integrado en cloroplastos o mitocondrias, éste no se transmitiría en el polen. Por



el contrario, si dicho vector se integra en el genoma nuclear se producirá la transmisión en el polen. En el caso del silenciamiento de gliadinas, para corroborar que la integración del vector de silenciamiento se ha producido en el genoma nuclear el equipo investigador ha realizado cruzamientos entre la línea E82 (silenciamiento de gliadinas) y tres trigos no transgénicos. En todos los cruzamientos, la línea E82 actuó como parental masculino aportando el polen. Posteriormente, analizando en geles A-PAGE las proteínas de los granos obtenidos en dichos cruzamientos (generación F1) se vio que eran homogéneas y tenían la fracción de gliadinas silenciadas en los tres cruzamientos realizados dada la naturaleza dominante del carácter silenciamiento de gliadinas. Se concluye, por tanto, que el vector de silenciamiento se encuentra integrado en el genoma nuclear. Por otra parte la semilla ha pasado cinco generaciones de producción de semillas y se ha comprobado la estabilidad de la inserción genética realizada.

c) Caracterización molecular:

El propósito de la modificación genética fue silenciar los genes de las gliadinas en el grano de trigo, responsables de la enfermedad celíaca, utilizando técnicas de ARN de interferencia. En la transformación genética se han utilizado dos plásmidos, el plásmido pDhp_omega_alpha, dirigido a silenciar los tres grupos de gliadinas omega, gamma y alfa, y el plásmido pAHC25, que contiene el gen de selección *bar*, procedente de *Streptomyces hygroscopicus* y que confiere tolerancia a la fosfotricina, y el gen marcador GUS procedente de *E. coli*.

El método de transformación aplicado es la transferencia directa de genes utilizando un cañón de microproyectiles para cultivos celulares producidos a partir del cultivo de embriones inmaduros.

Si bien se considera suficiente la información aportada sobre caracterización molecular para la realización de este ensayo, se solicita al notificador que vaya ampliando y completando la caracterización molecular del evento para futuras notificaciones.

d) Efectos sobre la salud:

Según el notificador no existe ninguna razón para pensar que se producirá algún efecto tóxico o perjudicial sobre la salud humana, sino que esperan todo lo contrario, ya que la variedad ha sido seleccionada por su baja toxicidad en relación a la enfermedad celíaca en los ensayos con linfocitos T (Gil-Humanes et al., PNAS 2010).

De todas las líneas producidas, el notificador ha seleccionado finalmente la línea E82. Esta línea tiene un buen nivel silenciamiento de las gliadinas del gluten, y los ensayos realizados con linfocitos T que reconocen epítomos específicos presentes en las gliadinas han mostrado una reducción en 100 veces en la toxicidad del gluten de este línea en comparación con la línea control. Además, se ha comprobado en la Facultad de Farmacia de Sevilla que la disminución en el contenido en gluten en la harina de la línea E82 es superior al 95% y disminuye todavía más cuando es procesada en la elaboración del pan debido a la proteólisis provocada durante la cocción.



Cabe señalar al respecto que la normativa existente (Reglamento 41/2009, de 20 de enero) sobre la composición y etiquetado de los productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten, establece que éstos deben ser procesados de forma que se garantice un contenido en gluten inferior a 100 mg/kg en el alimento tal y como se presenta en el consumidor final y llevar la mención “*muy bajo en gluten*”. Si el contenido no supera los 20 mg/kg puede etiquetarse como “*sin gluten*”.

No obstante lo anteriormente señalado, y con objeto de descartar la posibilidad de la aparición de efectos no intencionados debidas a la inserción, **la CNB considera adecuado que el notificador realice un estudio de toxicidad oral de dosis repetidas de 90 días en ratas con el trigo modificado genéticamente para poder valorar sus posibles efectos toxicológicos antes de ser administrado, en su caso, a pacientes celíacos. Dicho estudio se llevará a cabo siguiendo el protocolo 408 de la OCDE y en un laboratorio homologado en el cumplimiento de las normas GLPs, para garantizar la validez de los resultados.**

Por último, y aunque no se ha descrito la celiaquía en animales, se deberán extremar las precauciones para que ningún producto del ensayo de campo entre en la cadena alimentaria animal.

e) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

La línea elegida para el ensayo ha pasado por un número de ciclos sexuales. En ensayos previos realizados en invernadero no se observaron diferencias respecto a las líneas no-modificadas en términos de floración o establecimiento de semillas. Tampoco se detectó que la línea modificada genéticamente difiera de la planta receptora en la forma de reproducción o en el ritmo de reproducción. 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.

f) Efectos sobre otros organismos:

Los organismos no-diana, que pueden interactuar con las plantas del ensayo son la fauna que se alimenta de la planta o la semilla o insectos herbívoros que puedan visitar la planta. Teniendo en cuenta que la expresión de la modificación genética es el silenciamiento de las gliadinas del grano, no parece probable que estas modificaciones tengan ningún efecto en organismos no-diana. Por otro lado, los genes marcadores y de selección insertados proceden de organismos que se hallan de forma natural en el medio ambiente (*S. hygroscopicus* y *E. coli*).

Otros organismos no-diana que pueden ser expuestos son las bacterias del suelo. Varios estudios han mostrado que la probabilidad de transferencia genética horizontal planta-bacteria, se considera muy baja, con frecuencias no apreciables en condiciones naturales (Nielson *et al.*, 1997; Nielsen & Townsend; 2004, entre otros).



g) Control y tratamiento de residuos:

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera, en general, adecuadas las medidas propuestas por el Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC para llevar a cabo el control de la parcela y zona de bioseguridad, durante y después del ensayo:

- No se plantarán trigo ni especies compatibles (trigo, cebada, centeno y triticale) a distancias inferiores a 200 m. respecto al ensayo. Las parcelas de cultivo a menos de 200 m. susceptibles de ser ocupadas por cultivos herbáceos pertenecen a los mismos propietarios de la parcela de ensayo, y serán sembradas con maíz y girasol en marzo.
- Se dejará una banda de 2 m. libre de toda hierba alrededor del ensayo, entre el trigo y el cultivo circundante (colza). Alrededor de la franja de seguridad se pondrá una red perimetral con el fin de prevenir el acceso de conejos u otros roedores tras la aparición de las primeras espigas. **Se realizará una inspección frecuente de la misma para asegurarse de que no ha sufrido daños.**
- **No se plantará el borde de 5 m. de ancho de trigo convencional rodeando el lugar del ensayo.**
- **Se utilizará una sembradora de precisión para la siembra.** Después de la siembra la sembradora será limpiada convenientemente.
- Todas las semillas y granos serán almacenados en recipientes cerrados e identificados.
- Las espigas de las plantas modificadas genéticamente y de las plantas control serán recolectadas de forma manual antes de alcanzar su completa madurez con el fin de evitar el descascarillado espontáneo. Una vez recolectadas las espigas, serán introducidas en bolsas perfectamente identificadas y almacenadas en condiciones de confinamiento. Cualquier otra espiga de trigo seleccionada para análisis será recolectada de forma manual.
- 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.
- Se tomarán muestras de espigas de trigo maduro, tanto de plantas modificadas como no modificadas, para su análisis en los laboratorio del Instituto de Agricultura Sostenible. Las espigas recolectadas serán guardadas en bolsas debidamente identificadas y almacenadas bajo condiciones de confinamiento. Las semillas llevadas para su análisis serán claramente identificadas como modificadas genéticamente.
- A la finalización del ensayo se realizarán controles adicionales y se eliminará cualquier mala hierba susceptible potencialmente de cruzamiento con el trigo que crezca a menos de 200 m. del lugar del ensayo.
- La molienda de la harina procedente del trigo se realizará en los molinos experimentales del Instituto de Agricultura Sostenible.
- Deberá así mismo, procederse a una minuciosa limpieza de cualquier maquinaria utilizada durante la siembra y cosecha del ensayo.
- 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 de las plantas espontáneas de trigo modificado genéticamente.

Por último, se informa que ante cualquier anomalía 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.

Además se comunica que la Autoridad Competente, en su caso, realizará las visitas de inspección que considere oportunas, antes, durante y tras la finalización del ensayo.

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 y/o el medio ambiente.

Una vez concluido dicho ensayo **se remitirá un informe de resultados** del mismo, en español y en inglés, al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) 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 9 de octubre de 2013