



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN EN CAMPO DE PLANTAS DE MAÍZ MODIFICADO GENÉTICAMENTE (B/ES/17/06)

Características, objetivo y duración del ensayo:

La empresa Iden Biotechnology, S.L. propone la realización de un ensayo en campo, en una parcela perteneciente al Aula Dei (CSIC), en un polígono del término municipal de Zaragoza.

La finalidad del ensayo es la evaluación de 54 líneas de la variedad A188-Susy de maíz modificado genéticamente, que expresa alto contenido en almidón mediante el incremento de la actividad sacarosa sintetasa (gen *SuSy*).

Se realiza esta solicitud con la finalidad de poder multiplicar las líneas obtenidas de los híbridos generados a partir de las variedades A188 y HiII-Susy, y realizar un posterior procesado analítico de las semillas obtenidas en cada una de las líneas para seleccionar aquellas que presenten unas mejores características agronómicas a partir de su evaluación de homogeneidad, porte agronómico, características fisiológicas, productividad, etc.

Iden Biotechnology S.L. ha contratado con el Centro Aula Dei (CSIC) la realización de este ensayo en una parcela que se encuentra en la parte central de la finca. El área de la liberación voluntaria será de 550 m² para la siembra de líneas A188-Susy, más una bordura con maíz no modificado de la variedad A188, de 750 m² de superficie. El area total destinada al ensayo sera de 1300 m².

La parcela en el interior de las instalaciones del Aula Dei, CSIC, es de acceso restringido, en un entorno agrícola, con parcelas de regadío, donde prevalece el cultivo de frutales de hueso y a más de 700 m. de distancia de la cuenca del rio Gállego.

En esta solicitud, se propone realizar dos liberaciones en dos años consecutivos. La primera liberación se realizará entre mayo-diciembre de 2017, con el fin de obtener resultados preliminares. La segunda se pretende realizar entre mayo-diciembre de 2018.

En este sentido, se comunica que para el segundo año de ensayo, **deberá presentarse a la Autoridad competente una nueva solicitud que consista únicamente en los formularios resumidos de información (SNIF, en español e inglés)** con el fin de contabilizar el ensayo de 2018 y que contenga la misma información relativa a la planta modificada genéticamente y cualquier nueva información (lugar o parcela de liberación, fechas de ensayo, diseño o distintas condiciones del ensayo, etc.).

Antecedentes

Cabe destacar que ya se han evaluado las líneas parentales HiII-SuSy en solicitudes anteriores de ensayos de campo (B/ES/11/10 y B/ES/12/18), aunque para estos ensayos el notificador fue el Instituto de Agrobiotecnología (IDAB) de la Universidad Pública de Navarra/Consejo Superior de



Investigaciones Científicas, que envió los informes de resultados correspondientes una vez finalizados los mismos.

Los informes de resultados se remitieron a la Comisión Nacional de Bioseguridad, no habiéndose detectado efectos adversos sobre la salud humana o animal, ni en el medio ambiente.

Identificación y caracterización de riesgos potenciales

a) Caracterización molecular:

Para profundizar aún más en el papel del gen *Susy* en la conversión de sacarosa en almidón, con anterioridad se realizó una transformación de la variedad HiII de maíz con el gen de la sacarosa sintasa de patata (*Sus4*), gen homólogo a la sacarosa sintasa de maíz, bajo la acción del promotor de ubiquitina (promotor constitutivo comúnmente utilizado en monocotiledóneas). De esta forma, el transgen introducido es similar al del organismo receptor. Se pudo confirmar que efectivamente, se incrementaba el contenido de almidón en los granos de algunas de las líneas obtenidas, demostrándose que también en monocotiledóneas esta enzima juega un papel clave en la biosíntesis de ADPG ligada a la biosíntesis de almidón.

Para la transformación genética de la variedad HiII se empleó el método biolístico. Tres de las líneas obtenidas fueron utilizadas como parental masculino (polen) para realizar un cruce con la variedad A188 como parental femenino (mazorca).

Para la transformación de las tres líneas HiII-Susy (usadas como parental masculino) se utilizó como base el plásmido pAHC25, que contiene originalmente el gen *gus* bajo el control del promotor de la ubiquitina de maíz y el marcador de selección *bar* (que induce la resistencia al herbicida glufosinato de amonio) que se introdujeron mediante biobalística. En la transformación, al vector pAHC25 se le ha eliminado la zona del gen *gus* y en su lugar se ha incorporado el gen *SuSy* (plásmido pAHC25-SuSy).

Finalmente, las líneas A188-Susy han sido obtenidas mediante el cruzamiento entre HiII-Susy (parental masculino) con la variedad A188 (parental femenino).

Se ha determinado por Southern blot que el fragmento de inserción está integrado en el cromosoma de las líneas HiII usadas como parentales masculinos. Las líneas de HiII-Susy usadas como parental masculino también fueron caracterizadas cuantificando la expresión de proteínas. El western blot realizado muestra que las tres líneas presentaron niveles superiores de expresión de la proteína SuSy comparado con el parental (WT).

La cuantificación se ha realizado también mediante determinación de la actividad enzimática. Los análisis realizados muestran que los granos de maíz obtenidos a partir de las plantas modificadas genéticamente crecidas en condiciones de invernadero difieren de su parental en que presentan mayores niveles de actividad sacarosa sintasa. Estos cambios también afectan el contenido en adenosina difosfato glucosa (ADPG), la molécula precursora del almidón, así como a los niveles de almidón.



b) Capacidad de transferencia del material genético:

Hasta hace poco tiempo el maíz (*Zea mays*) no tenía parientes silvestres en Europa, por lo que la posible transferencia génica de este maíz modificado genéticamente se reducía a los cultivos de maíz tradicionales. Sin embargo, desde hace algunos años una nueva mala hierba que se identifica como teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana*), perteneciente a la misma especie del maíz, está ya presente en diversas zonas de la geografía española produciendo una infestación muy severa en algunas parcelas y llegando a ocasionar una importante reducción en la cosecha, ya que la competencia del teosinte con el maíz cultivado es muy importante. En este sentido, ya se están implementando en España medidas de gestión para la erradicación o reducción del teosinte.

El polen de maíz es bastante pesado y no suele recorrer distancias de más de 20 metros, por lo que el riesgo de cruce con cultivos vecinos de maíz se reduce considerablemente a medida que aumenta la distancia. La probabilidad de intercambio genético depende de factores como la sincronización de la polinización, la dirección y la intensidad del viento.

En este caso, se propone cultivar una extensión total de 1300 m², de los que 550 m² corresponderán al área empleada para el cultivo transgénico y 750 m² corresponderán a la bordura empleada como trampa de polen. Un total de 810 plantas estarán incluidas en el estudio, que estarán separadas en grupos de 54 líneas, con 15 plantas/línea. Se utilizará semillas de maíz A188 y HiII-Susy como control (parentales usados en el cruce). Alrededor del área destinada para el ensayo de maíz transgénico se dispondrá de 5 líneas de cultivo de plantas borde no modificadas genéticamente de la variedad A188 que funcionará de trampa para el polen. **Se ha presentado el diseño detallado del ensayo.**

A fin de asegurar que no se produce la contaminación de otros cultivos de maíz mediante el polen de estas líneas transgénicas, el Aula Dei se comprometerá a no realizar ningún cultivo de maíz a menos de 200 metros, dentro de su finca de 60 ha. La parcela de liberación voluntaria se encuentra en la parte central de la finca, por lo que la zona de liberación voluntaria para el ensayo dista más de 200 metros de las parcelas vecinas no propiedad de este Centro.

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera adecuado mantener la **distancia de aislamiento de 200 m con respecto a otros cultivos de maíz convencional y/o ecológico que se puedan encontrar dentro o fuera de la finca experimental.**

Así mismo, el notificador debe controlar que no existan plantas de teosinte en el área del ensayo, y **se deberán extremar las precauciones y aplicar medidas de gestión en su caso, para evitar cualquier cruzamiento con esta especie emparentada.**

c) Estabilidad genética y fenotípica:

Todos los tejidos de la planta transgénica expresan el gen, ya que se encuentra clonado bajo el promotor constitutivo pUbiquitina.

Se indica que las líneas transgénicas son estables, ya que el fragmento insertado en las líneas de la variedad HiII se ha transmitido a su descendencia (hasta una F8 en condiciones de confinamiento



controlado en invernadero). Esto se ha verificado realizando un seguimiento de la presencia del gen *SuSy* en las plantas transgénicas mediante PCR a partir de material vegetal procedente de hoja.

d) Patogenicidad:

Según el notificador, no se tiene constancia de que estas líneas produzcan efectos tóxicos. El gen de interés *Susy* proviene de la patata, por lo que en principio no se espera ningún efecto perjudicial para la salud humana, animal o para el medio ambiente.

No obstante se deberán ir planteando estudios toxicológicos (inicialmente un estudio de toxicidad aguda) y alergénicos en el caso de que se considere una futura comercialización de este maíz modificado genéticamente.

Además, las plantas y semillas obtenidas durante este ensayo y que no se utilicen para ulteriores ensayos analíticos, deberán ser destruidos y así evitar cualquier desvío accidental a la cadena alimentaria.

e) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

No se espera ningún efecto diferencial de la planta modificada respecto a la planta original en relación con el establecimiento, supervivencia, diseminación o al modo o tasa de reproducción dada la naturaleza de la modificación genética introducida, ya que la expresión de los genes insertados en las plantas transformadas no parece tener incidencia en estas características. **No obstante, se deberá hacer un seguimiento durante el ensayo para detectar cualquier posible cambio en dichas capacidades.**

f) Efectos sobre otros organismos:

El notificador afirma que de los estudios realizados hasta la fecha tampoco identificaron ninguna relación directa entre la acción del gen en la planta (incremento de los niveles de almidón) con interacciones con algún organismo no diana o con el entorno abiótico.

La Comisión Nacional de Bioseguridad recomienda que se siga observando si durante el ensayo si se produce cualquier efecto y que se planteen estudios adicionales para observar posibles efectos sobre organismos no diana y sobre la biodiversidad en general, de cara al cultivo a escala comercial del maíz objeto de esta notificación si fuera el caso.

g) Transporte y control y tratamiento de residuos:

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera adecuadas las medidas propuestas por la empresa para el transporte, las medidas propuestas para el ensayo y para el control post-liberación de la zona.

Se propone que para el transporte del material vegetal del invernadero confinado de tipo 1 de Iden Biotechnology a la finca donde se realiza la liberación voluntaria, se hará el siguiente seguimiento: las semillas y/o el plantel estarán identificados en todo momento y se transportarán en un recipiente



cerrado, que a su vez se colocara dentro de una bolsa para su transporte. En el caso de que el material a transportar sean plántulas, éstas estarán colocadas en bandejas de alveolos, generando grupos compactos que se depositaran en bandejas de transporte durante el desplazamiento.

Salvo por la realización de un mayor seguimiento del desarrollo fenológico del ensayo y un control más exhaustivo de malezas, las labores culturales que se proponen son las propias del cultivo del maíz hasta la fecha de floración donde, previo al desarrollo de la flor femenina, se cubrirán las mismas con bolsas de papel, a fin de evitar posibles polinizaciones cruzadas y forzar la autopolinización de cada individuo.

Una vez hayan autopolinizado las plantas, se procederá a retirar y eliminar la flor masculina. La recolección de las líneas A188-Susy transgénicas se realizará de forma manual, identificando cada una de ellas y colocando las mazorcas obtenidas en una bolsa de papel precintada que se colocaran en cajas o bolsas estancas para su transporte de vuelta al laboratorio de Iden Biotechnology, que se encuentra localizada en Navarra.

Al inicio, durante el primer mes de la siembra se plantea hacer un seguimiento semanal del cultivo para controlar su desarrollo. Posteriormente, se realizarán visitas cada dos semanas. Durante la etapa de inicio de la floración, se realizarán visitas frecuentes para garantizar la polinización manual de cada una de las plantas. Además, se seguirá un control de toda persona que tenga acceso a la parcela donde se realiza la liberación voluntaria, mediante un registro de entrada y se controlará que todo el personal autorizado a entrar a la zona experimental no arranque ninguna planta o parte de la misma, ni la saque fuera de la finca.

Tras el cosechado del material, se procederá a cosechar el borde perimetral de los maíces de la variedad A188. Las semillas recolectadas serán quemadas o autoclavadas, mientras que los restos vegetales de las plantas transgénicas y de los bordes serán triturados con una grada de discos e incorporados de fondo al terreno **y cubiertos por una capa de al menos 30 cm de suelo**. Se evitará el cultivo de cualquier tipo maíz al año siguiente de finalizar los ensayos de liberación voluntaria solicitados.

En referencia a la presencia del gen *bar*, no se emplearán herbicidas bialafos o glufosinato de amonio.

Se llevará a cabo un seguimiento de los posibles rebrotes en la parcela experimental **durante 1 año tras la finalización del ensayo para eliminar plantas de maíz que germinen de forma espontánea**.

Los equipos empleados (sembradora y desgranadora) deben ser convenientemente limpiados en el lugar del ensayo.

Ya en las instalaciones de IDEN, el notificador indica que procederá a coleccionar las semillas, las cuales serán almacenadas en condiciones adecuadas para sus futuros análisis. Las mazorcas vacías serán depositadas en bolsas plásticas y serán destruidas en el autoclave ubicado dentro de las instalaciones del laboratorio de IDEN. Los granos se almacenarán para realizar los análisis pertinentes de caracterización bioquímica, y una parte se guardará para los futuros ensayos de liberación.



Por último se informa que la Autoridad Competente, en su caso, realizará las visitas de inspección que considere oportunas, antes, durante, en el momento de la cosecha y en el periodo post-liberación.

Cualquier accidente o incidencia que pueda ocurrir durante o después de la realización del ensayo deberá comunicarse inmediatamente a la Comisión Nacional de Bioseguridad y a la Autoridad competente.

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

Una vez concluido cada ensayo anual, se remitirá un **informe de resultados** en español y en inglés a la Autoridad competente de Aragón 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 20 de abril de 2017