



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

(Notificación B/ES/20/01)

Antecedentes

Con fecha 30/08/19 se recibió por Sede electrónica la solicitud de notificación **B/ES/20/01**, relativa a un ensayo de campo con líneas de tabaco modificadas genéticamente, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Agencia Estatal-Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Esta notificación se estudió en las reuniones 143^a y 145^a de la Comisión Nacional Bioseguridad (CNB), celebradas el 25 de septiembre y el 11 de diciembre de 2019, respectivamente. Tras su primera revisión se acordó pedir información adicional al notificador, que contestó con fecha 13/11/19 y, en opinión de la CNB, de forma satisfactoria.

Objetivo y características del OMG

El objetivo del ensayo consiste en realizar un ensayo en campo para valorar el desarrollo de plantas de tabaco cv K326 derivadas, por autopolinización, de las líneas L157-5, L192-6, L226-2 y L259-1, con mutaciones en la secuencia de factores de transcripción SPL generadas mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Dichas plantas se generaron en laboratorios e invernadero del IBMCP-CSIC que fueron autorizados en 2004 (Notificación A/ES/04/I-06).

El ensayo de campo se realizaría en una parcela de la finca experimental del Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CTAEX), situada en Villafranco del Gadiana, provincia de Badajoz. El CTAEX también ha sido notificado para cumplir con la normativa de utilización confinada de OMG (Notificación A/ES/19/I-52).

Este ensayo que presenta el IBMCP-CSIC, de la Universidad Politécnica de Valencia, se enmarca dentro del desarrollo del Proyecto Europeo H2020 760331 Newcotiana. Dicho proyecto de investigación tiene como objeto la optimización de la planta de tabaco como biofactoría de moléculas de alto valor añadido. Esta optimización incluye, entre otros aspectos, la prolongación de la fase vegetativa del desarrollo bajo la hipótesis de que una prolongación de la fase vegetativa puede resultar en un aumento de biomasa. Asimismo, el retraso o la inhibición de la floración podrían suponer una ventaja agronómica al facilitar la tarea del despunte del tabaco y/o aumentar la bioseguridad de las plantas de tabaco modificadas genéticamente.

En este contexto, un grupo de investigación ha generado plantas de tabaco cv K326 editadas genéticamente mediante CRISPR/Cas9, con mutaciones en factores de transcripción de la familia de los SPLs pertenecientes a los grupos VI y VIII. Estas mutaciones, consistentes en pequeñas inserciones y deleciones, dando lugar en su mayoría a proteínas truncadas que podrían resultar en la pérdida de función de estos genes. Ya se ha evaluado en invernadero, bajo condiciones confinadas, el tiempo de floración de varios eventos de transformación en las generaciones T0 y T1. Sin embargo, dada la gran variabilidad observada en el tiempo de floración del parental K326 bajo las condiciones



de invernadero, no es posible obtener conclusiones sobre el posible papel de los genes mutados en el control de la transición de la fase juvenil a adulta y vegetativa a reproductiva en tabaco.

Por ello, la razón de esta solicitud es contar con un tamaño muestral suficiente que permita evaluar el efecto de las mutaciones introducidas, así como realizar esta evaluación bajo las prácticas agronómicas habituales utilizadas en el cultivo comercial del tabaco. Adicionalmente, dado que las modificaciones introducidas intervienen en la regulación del desarrollo y la composición metabólica de las plantas que varía a lo largo de estas fases, se pretende evaluar el interés de las plantas generadas en procesos de biorrefinería en comparación con la línea original.

Características y duración del ensayo

El lugar de liberación propuesto está localizado en la finca experimental del CTAEX situada en Villafranco del Gadiana, 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 500 m² dentro de una parcela de 12,38 ha. Se ha aportado el plano de localización, localización exacta de la parcela y el diseño del ensayo.

La parcela en la que se encuentra el invernadero donde germinarán las semillas de tabaco, y donde se realizará el ensayo a campo abierto, 1, está totalmente vallada y permanentemente vigilada por una cámara. Además, se vallará el área de 500 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.

La localización en la que se prevé realizar la producción del tabaco de ensayo se encuentra a una distancia de al menos 2 km de las zonas de producción de tabaco comercial con el que podría ser compatible.

Por otra parte, no están previstos otros ensayos de tabaco en la finca experimental del CTAEX, dado que no participa en ningún otro proyecto que requiera dichos ensayos. El notificador indica que en el hipotético caso de que se necesitase realizar un ensayo no previsto se respetaría una distancia de 400 m.

La parcela se haya 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.

Tampoco existen en las proximidades biotopos reconocidos oficialmente o zonas protegidas que puedan verse afectados.

En cuanto al periodo de liberación se propone que el ensayo empiece el 1 de marzo de 2020 y se extienda hasta el 31 de octubre de 2020.



Desarrollo del ensayo:

En primer lugar, las semillas serán trasladadas desde el IBMCP (Valencia) a las instalaciones del CTAEX 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: (1) la identificación de la mercancía como semillas editadas genéticamente, y (2) 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.

Una vez recibida la semilla desde el IBMCP, se procederá a su entrada en la cámara de semillas del CTAEX previo registro interno, hasta el momento de su siembra, para garantizar la calidad de las semillas, gracias a las condiciones de temperatura y humedad de dicha cámara. Se colocarán en un estante aparte del resto de material vegetal de la cámara. En esta cámara permanecerán con el embalaje de transporte, el cual no se abrirá hasta la siembra.

En el invernadero se realizará la siembra en semillero (bandejas de poliestireno expandido rellenas con sustrato) de cada una de las 4 líneas modificadas descritas anteriormente, así como la línea parental de K326, donde también germinarán y se mantendrán las plántulas hasta el momento del trasplante a campo. La parcela donde se cultivarán las plántulas de tabaco germinadas en invernadero está situada al lado del invernadero.

Para controlar las especies no deseadas (insectos y otros artrópodos, roedores, etc.), en el invernadero, la zona con las bandejas de siembra se cubrirá de arriba abajo con malla anti-insectos. Si se detecta, mediante observaciones periódicas del personal, que hay plagas que puedan comprometer el desarrollo del cultivo, se realizarán tratamientos fitosanitarios con productos autorizados a las dosis establecidas. Igualmente, si esto ocurre durante el ensayo de campo, desde el trasplante hasta la recolección, ya sea con insectos o con otros patógenos que provocan enfermedades.

Para el control de roedores y otras especies no deseadas el CTAEX contrata a una empresa especializada que pone trampas, etc.

El trasplante de las plantas en la localización de la liberación mediante el uso de una trasplantadora mecánica se prevé para la primera semana de mayo de 2020. Se trasplantarán un máximo de 200 plantas de cada línea seleccionada (L157-5, L192-6, L226-2, L259-1), y el mismo número de plantas de la línea parental K326 lo que supone un total de 1.000 plantas. La densidad de plantación será de 2 plantas por m², lo que supone una superficie total de 500 m².

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. 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 siguiendo la práctica de cultivo habitual, y se realizará de forma manual. Los restos de hojas serán trituradas y enterradas junto con los restos de tallos y raíces en el suelo de la parcela de ensayo con pases cruzados de grada de discos. Esta práctica, junto con el efecto de la baja temperatura mantendrá el suelo libre de vegetación hasta el final del invierno. Además, personal del CTAEX realizará un seguimiento de la parcela durante el año posterior a la liberación para eliminar cualquier rebrote que pudiese aparecer.

Las hojas de tabaco cosechadas se secarán en un secadero localizado en las instalaciones del CTAEX junto a la finca experimental. Tras su secado, las hojas se envasarán en cajas debidamente selladas e identificadas para su traslado a los laboratorios de la empresa Idoasis para el análisis de su composición en alcaloides y compuestos fenólicos. Una vez finalizado el análisis, los restos de material no empleado serán eliminados convenientemente.

Los restos vegetales que permanezcan en el suelo tras la cosecha se triturarán y enterrarán mediante pases de grada de discos. Se realizará un seguimiento de la parcela durante el año siguiente a la liberación para controlar y eliminar potenciales rebrotes. El secadero se limpiará de hojas o restos de hojas, que se incluirán en las cajas herméticas de hojas de tabaco ya envasadas.

Identificación y Caracterización de Riesgos Potenciales

a) Caracterización molecular

Estas líneas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, cultivar/línea de reproducción K326) presentan mutaciones en genes de la familia de los SPL (*SQUAMOSA promoter binding protein like*) y han sido generadas a partir de plantas de tabaco del cultivar comercial K326 mediante la técnica CRISPR/Cas9. Para ello, se procedió a la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de las plantas de tabaco con el vector GB2138, 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.

Se ha presentado en una tabla las mutaciones (inserciones y deleciones) presentes en las líneas parentales T1, editadas por CRISPR/Cas9. La presencia de estas mutaciones resulta en su mayoría en un cambio en la pauta de lectura que genera la producción de formas truncadas de la proteína, con la sustitución de un número variable de aminoácidos.

Los transformantes T0 (resistentes a kanamicina y DsRed(+)) se crecieron en invernadero bajo condiciones confinadas procediéndose a su genotipado para determinar la presencia y naturaleza de las mutaciones generadas. Se procedió a continuación a la recogida de las semillas T1 obtenidas por autopolinización de las plantas T0 y a su germinación *in vitro*. Las plantas T1 obtenidas fueron analizadas para la presencia del T-DNA, seleccionándose líneas que no contuviesen T-DNA (líneas DsRed(-), 35S(-), TNos(-); ver sección D.2). Estas líneas se crecieron en invernadero y se procedió de nuevo a su genotipado en los genes diana.



Las plantas objeto de este ensayo de liberación corresponden a la generación T2, obtenida por autopolinización de las líneas T1 seleccionadas. **Estas plantas no contienen ningún transgen en su genoma**, pues se seleccionaron plantas DsRed negativas y se procedió a confirmar la ausencia de transgenes por PCR: no contienen T-DNA (ni TNos ni NptII).

Se han presentado los resultados de la amplificación por PCR y posterior secuenciación, y se han analizado también las dos secuencias con mayor probabilidad de presentar mutaciones no deseadas. Ningunas de las 4 líneas T1 objeto de este ensayo contiene mutaciones en estas secuencias. No es esperable por tanto que existan mutaciones no deseadas en secuencias con menor similitud que las analizadas. Dado que estas líneas no contienen la proteína Cas9 ni los gRNAs, no es posible la aparición de nuevas mutaciones derivadas de la edición genética mediante CRISPR-Cas en la siguiente generación T2.

b) Capacidad de transferencia del material genético

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. *Nicotiana tabacum* solo se encuentra como cultivo comercial y el cultivo de tabaco en rama en España se concentra principalmente en Extremadura, región donde se propone realizar la liberación de esta PMG. Dado que el tabaco es una especie que utiliza fundamentalmente la autofecundación, y que se va a proceder a eliminar las flores antes de que éstas maduren, con esta medida la probabilidad de diseminación se reduce significativamente.

El CBMCP indica que la localización en la que se prevé realizar el ensayo se encuentra a una distancia de al menos 2 km de las zonas de producción de tabaco comercial con el que podría ser compatible y por otra parte, que no están previstos otros ensayos de tabaco en la finca experimental del CTAEX, dado que no participa en ningún otro proyecto que requiera dichos ensayos. De todas formas, en el hipotético caso de que se necesitase realizar un ensayo no previsto, el notificador asegura que se respetaría una distancia de 400 m.

Para ensayos con tabaco modificado genéticamente, **la Comisión Nacional de Bioseguridad recomienda mantener una distancia de mínima de aislamiento de 100 m** entre los ensayos con plantas de tabaco modificadas genéticamente y los posibles cultivos de plantas de tabaco convencionales.

c) Estabilidad genética y fenotípica

En este caso no procede demostrar la estabilidad ya que las líneas de tabaco objeto de este estudio no contienen ningún fragmento de inserción.

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. Durante el ensayo 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 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

Las modificaciones introducidas consisten en mutaciones (pequeñas inserciones o deleciones) en genes endógenos de la familia de los SPL que resultan en la producción de formas truncadas de la proteína que codifican y, potencialmente, en su pérdida de función, y están dirigidas a retrasar la transición de fase juvenil a adulta y vegetativa a reproductiva. En base a los conocimientos actuales sobre la función de esos genes no se prevé que esta modificación confiera ninguna ventaja selectiva a la planta modificada.

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

f) Impacto potencial sobre los organismos diana y no diana

En relación con organismo diana no procede pues las modificaciones llevadas a cabo no están diseñadas contra ningún organismo vivo. Las modificaciones introducidas consisten en mutaciones (pequeñas inserciones o deleciones) en genes endógenos de la familia de los SPL que resultan en la producción de formas truncadas de la proteína que codifican y, potencialmente, en su pérdida de función, y están dirigidas a retrasar la transición de fase juvenil a adulta y vegetativa a reproductiva. No se conoce ninguna característica derivada de la modificación introducida que pueda producir ningún impacto sobre los niveles de población de competidores, herbívoros, simbioses, parásitos o patógenos.

No obstante, la CNB considera adecuado que se realice una observación detallada 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

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. Durante este ensayo se aplicarán las medidas de protección adecuadas.

En cuanto a efectos sobre la salud animal, no procede. Las líneas de tabaco objeto de este ensayo no están destinadas a la alimentación animal.



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

Se indica que las técnicas que se utilizarán no son diferentes a las del cultivo del tabaco convencional, por lo que no esperan impactos distintos.

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

No se prevé que el cultivo de las plantas editadas tenga ningún efecto sobre los procesos biogeoquímicos distinto al cultivo convencional del tabaco. *Cualquier efecto no esperado sobre los procesos biogeoquímicos que se puedan producir deberá, así mismo, comunicarse.*

Medidas de gestión: control del ensayo y tratamiento de residuos

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera adecuadas, en general, las medidas propuestas por el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, junto con el CTAEX, en donde se realizará el ensayo, así como las medidas de bioseguridad, antes, durante y después del ensayo, que se detallan a continuación. No obstante, se indican (en negrita) algunas medidas adicionales y relevantes que deberán ser tenidas en cuenta:

- El ensayo se ubicará en una explotación agrícola privada y los responsables del mismo se han comprometido a realizar inspecciones periódicas semanales. La parcela en la que se establecerá el ensayo se encuentra vallada con pared de alambre y vigilada las 24 horas del día (cámaras de la red de videovigilancia).
- Las semillas serán trasladadas desde el laboratorio al lugar de preparación del semillero en tubos debidamente sellados e identificados.
- Para evitar la posible dispersión de polen o semilla: se procederá 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.
- 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 raíces y tallos y los enterrará en el suelo. **Se realizará un seguimiento de la parcela durante el año siguiente a la liberación para controlar y eliminar potenciales rebrotes.**
- Las hojas de tabaco cosechadas se secarán en un secadero localizado en las instalaciones del CTAEX junto a la finca experimental. Tras su secado, las hojas **que son ya material no viable**, se envasarán en cajas debidamente selladas e identificadas para su traslado a los laboratorios de la empresa Idoasis. **Dichas cajas 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** (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 grada de discos.
- El siguiente año, cuando finalicen los ensayos, la parcela utilizada será sembrada con un cultivo diferente para **controlar y eliminar el posible rebrote de algunos restos de tabaco.**



- Durante el año posterior a la liberación personal del CTAEX realizará **inspecciones visuales semanales de la parcela** para detectar y eliminar posibles rebrotes.
- 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 de los ensayos. 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, se informa que ante cualquier incidencia se informará a la Autoridad Competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad y se tomaran las medidas adecuadas, incluida la destrucción del ensayo 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 o animal y el medio ambiente.

Una vez concluido el ensayo se **remitirá un informe final 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.

La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 20 de diciembre de 2019