



## **EVALUACIÓN DEL RIESGO DE UN ENSAYO DE LIBERACIÓN EN CAMPO CON CHOPOS MODIFICADOS GENETICAMENTE (NOTIFICACIÓN B/ES/11/26)**

### **Características, objetivo y duración del ensayo:**

El proyecto propuesto consiste en la generación de árboles transgénicos obtenidos por transformación con un gen quimérico que al ser transferido al genoma de chopos híbridos (*Populus tremula X P. alba*) permite la sobre-expresión de un gen de un factor de transcripción (Dof 5) de pino. Este factor de transcripción regula la expresión de los genes de Glutamina Sintetasa en pino que parecen estar implicados en el control de la expresión de genes del metabolismo carbonado en el árbol.

Se plantea la posibilidad de controlar los procesos de fijación de carbono y asimilación de nitrógeno que son claves en la producción de biomasa. Con este ensayo se contempla, así mismo, la evaluación de impacto ecológico por su liberación al medio ambiente.

Con la solicitud de liberación que se presenta se pretenden conseguir los siguientes objetivos:

- Realizar un proyecto de I+D en colaboración con la empresa ENHOL S.L, que permitirá evaluar en condiciones de campo el impacto de la modificación genética en la biología de los árboles. Se han diseñado ensayos dirigidos a comprender los efectos de la sobre-expresión del transgén en el crecimiento de los árboles, y su relación con variaciones estacionales del contenido en carbono y nitrógeno.
- Evaluación de los efectos y riesgos potenciales que el cultivo de los árboles modificados genéticamente puedan tener en el medio ambiente.

El ensayo se llevará a cabo en el municipio de Buñuel (Navarra), en una parcela de 6.335 m<sup>2</sup> en una zona de cultivo de regadío (aproximadamente unos 1000 árboles).

La primera liberación se realizaría tentativamente a partir de la primavera-verano de 2012 con objeto de aprovechar la etapa de mayor crecimiento de las plantas y la duración prevista será de tres años.

### **Antecedentes:**

Es la primera vez que se propone llevar a cabo en España ensayos de campo con estos chopos modificados genéticamente.



## **Identificación y caracterización de riesgos potenciales:**

### a) Capacidad de transferencia del material genético:

Los híbridos *P. tremula X P. alba* son híbridos homógamos que se corresponden en número de cromosomas con sus progenitores; estos híbridos son generalmente estériles debido al apareamiento imperfecto (heterogénico) y recombinación de los cromosomas durante la meiosis. Ocasionalmente se han detectado cruzamientos retrógrados y generación de individuos F2. Existe una posible compatibilidad con sus especies progenitoras, pero muy atenuada por sus características de híbrido monógamo.

Uno de los aspectos más importantes en ensayos con árboles modificados genéticamente a tener en cuenta es la transferencia genética potencial a especies compatibles. Teniendo en cuenta que la floración de estos chopos se produce a los 4-5 años y las semillas tienen muy poca viabilidad (homógamo), la CNB considera que las medidas que se tomarán para gestionar esta cuestión son adecuadas. El notificador propone la tala de los chopos a los 3 años, por lo que será antes de la floración y además se compromete a notificar a las autoridades competentes el día y la hora de la tala para que testifiquen la eliminación efectiva de los árboles.

**Además, la CNB opina que debe aprovecharse la realización de este ensayo para comprobar que no se produce una floración precoz, y si no fuera éste el caso, se informaría de inmediato a la CNB y a la Autoridad competente con el objeto de decidir las medidas a tomar sobre el mismo.**

### b) Estabilidad genética y fenotípica:

El notificador señala que la región T-DNA transferida a las plantas está integrada en el material cromosómico nuclear y de acuerdo con los estudios en otras plantas modificadas genéticamente su estabilidad es elevada y su comportamiento similar al de cualquier carácter con segregación mendeliana.

No se ha presentado en concreto ningún dato sobre la estabilidad de esta planta modificada genéticamente, sin embargo, el notificador señala que las plantas serán objeto de diversos estudios para evaluar la estabilidad de los genes introducidos. Se analizará la presencia del transgén en el genoma de chopo utilizando, por un lado, ampliación por PCR con cebadores específicos de DNA que codifica el marco de lectura de Dof 5 de pino, y por otro, se harán ensayos de Southern blot con objeto de confirmar la presencia del transgén en el genoma del chopo y del número de copias insertadas en cada línea.

**La CNB solicita que se vayan aportando los resultados de dichos estudios de estabilidad cuando estén disponibles, coincidiendo con algún informe anual o el informe final (ver conclusiones finales de este informe).**



### c) Caracterización molecular:

En el árbol modificado genéticamente se han incluido dos genes:

- Gen quimérico que contiene la secuencia de cDNA de Dof 5 aislada de *Pinus pinaster* (pino), que es un factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de los genes de glutamina sintetasa en pino y probablemente también esté implicado en el control de la expresión de genes del metabolismo carbonado en el árbol.
- Gen *npt-II*, marcador que confiere resistencia a la kanamicina y que ha permitido la selección de las células/explantos modificados genéticamente.

La construcción génica se ha realizado empleando métodos de la tecnología del DNA recombinante y la transferencia del gen quimérico a la planta se ha realizado mediante infección con *Agrobacterium tumefaciens*. La detección de la región introducida se ha realizado mediante análisis Southern blot, empleando como sonda la secuencia de cDNA de Dof5 de pino contenida en el gen quimérico.

Para la selección de los transformantes se ha utilizado en gen *npt-II*. Este gen marcador que confiere resistencia a la kanamicina está clasificado por EFSA en el Grupo I, es decir el riesgo para la salud y/o el medio ambiente se considera muy bajo (son genes que confieren resistencia a antibióticos poco utilizados ya en terapias contra enfermedades humanas o animales y además, estas resistencias ya están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en el tracto digestivos de los animales. Por otro lado, la probabilidad de transferencia genética horizontal planta-bacteria, se considera muy baja). **No obstante, la CNB recomienda la futura eliminación de los genes de resistencia a los antibióticos (GMRA) clasificados en el Grupo I de EFSA de cara a una futura comercialización**, aunque no ve problema en la utilización de éstos durante estas fases preliminares de investigación y desarrollo.

### d) Toxicidad y alergenicidad:

Dadas las características de los genes introducidos y el posible uso de los árboles en actividades comerciales (obtención de pasta para papel y de madera para diversos usos), el notificador no prevé peligro potencial o efecto nocivo sobre la salud humana ni sobre el medio ambiente.

No obstante, **la Comisión Nacional de Bioseguridad se reserva el derecho de solicitar información adicional sobre estudios toxicológicos en un futuro, si se continúa con este proyecto con vistas a un posible cultivo comercial de estos árboles.**

### e) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

De un análisis de varias líneas de chopo realizado previamente en confinamiento, se ha comprobado que, en comparación con los controles no transformados, estos árboles transgénicos contienen mayor contenido en clorofila total, mayor contenido en azúcares solubles y una disminución del contenido de aminoácidos fotorrespiratorios: glicina y serina.

Los estudios de crecimiento y desarrollo indicaron que los árboles transgénicos presentan mayor crecimiento en altura y mayor número de hojas por planta así como un considerable aumento del área foliar (comparados a los controles sin transformar).

Sin embargo, la tasa de reproducción sexual así como la diseminación de la planta están muy restringidas por su carácter de híbrido homogámico. Durante los estudios previos realizados con estos chopos se ha observado que la capacidad de supervivencia es similar a las plantas progenitoras.

f) Efectos sobre organismos no diana:

El notificador indica que no se esperan efectos adversos sobre organismos no diana derivados del cultivo de estos chopos modificados genéticamente. No obstante, se han planteado por parte del notificador, estudios adicionales para la caracterización de los chopos modificados genéticamente. Para ello se realizarán:

- a) Estudios comparativos sobre la biodiversidad y capacidad de crecimiento de especies vegetales en el entorno en las distintas etapas anuales de crecimiento utilizando material vegetal de parcelas de chopos situados en el mismo área geográfica y que carecen del transgén.
- b) Se tomarán muestras de suelo en áreas colindantes a la zona de ensayo y se investigará la presencia del transgén en muestras de microorganismos del suelo.
- c) Se realizará en la medida de lo posible un seguimiento de impacto sobre la población de la fauna autóctona de la zona.

**La Comisión Nacional de Bioseguridad considera que el posible impacto sobre estos organismos es un factor importante a tener en cuenta ya en las primeras fases experimentales y valora muy positivamente que se planteen estos estudios. Sin embargo en primer lugar, sugiere que se incluya siempre un control, y además recomienda las siguientes mejoras en los criterios seleccionados en los protocolos para llevar a cabo estos estudios adicionales:**

En relación con el punto b) sobre la determinación de la presencia del transgén en el suelo, la CNB considera que el protocolo propuesto no aporta una cantidad de muestras estadísticamente significativa, ya que sólo se toman tres y además se agrupan después de recogida, con lo que en términos prácticos se está tomando una sola muestra. En este sentido la CNB recomienda que:

- 1) La toma de muestras se debería hacer de forma circular y no de forma lineal, teniendo en cuenta que la posible propagación del transgén ocurrirá de forma circular o de la forma en que los exudados radiculares (las raíces) se dispongan.
- 2) Se debe determinar con antelación los límites de detección de la técnica propuesta.

En cualquier caso, se valora positivamente este primer estudio propuesto que se limita a la detección de la presencia del transgén, y basándose en los resultados obtenidos se considerará en un futuro, la posibilidad de contemplar el daño acumulativo que la expresión de ese gen pudiera tener en los microorganismos de la rizosfera de los chopos a través de los exudados radiculares, para lo cual no es preciso que el transgén esté presente en el suelo.

Por lo que respecta al punto c) seguimiento de impacto sobre la población de la fauna de suelo, se solicita se tengan en cuenta las siguientes recomendaciones:



- 1) Realizar muestreos durante los tres años del ensayo de liberación.
- 2) Realizar la toma de muestras al menos 5 veces al año para tener una mejor representación de la fauna de suelo (ésta puede variar a lo largo del año).
- 3) Incrementar el número de muestras con el *core* en, al menos, 5 muestras por parcela y fecha de muestreo.
- 4) Sería recomendable mandar un informe de resultados cada año para poder, en su caso, ir optimizando el protocolo.

g) Posibles interacciones con el entorno abiótico:

Teniendo en cuenta que entre los objetivos de este ensayo con chopos transgénicos está la determinación de los niveles de enzimas que van a participar en el aporte de esqueletos carbonados y en el proceso de incorporación de amonio a los mismos, se considera muy apropiado hacer un seguimiento del contenido de nitrógeno mineral en suelo, tal y como propone el notificador.

h) Medidas propuestas de preparación y gestión del lugar de liberación:

El notificador propone un aislamiento de seguridad de la parcela experimental con una distancia mínima 10-15 metros en todos sus puntos con respecto a otros cultivos de especies compatibles.

**No obstante, y dado que, tal y como se ha descrito anteriormente, el híbrido *P. tremula X P. alba* suele florecer entre el cuarto y el quinto año de crecimiento, la CNB considera que las medidas que ha propuesto el notificador más efectivas y que habrán de implementarse para garantizar que no se dispersen ni polen o semillas, será la tala de los árboles al tercer año con anterioridad a la aparición de las flores. Además, después de la tala se procederá al destocoado en una profundidad de 50 cm. y al posterior tratamiento con un herbicida de pre-emergencia para evitar posibles rebrotes.**

**Adicionalmente, para aislar el experimento de campo de otros cultivos o poblaciones silvestres de chopos de la zona se bordeará la parcela experimental con una malla cinegética enterrada y anclada a 20 cm. de profundidad, y lo suficientemente alta (unos 2 m.) para evitar igualmente el acceso de personas no autorizadas y que puedan llevarse material del ensayo. En ese sentido, el acceso al lugar deberá estar controlado y restringido únicamente al personal autorizado.**

i) Control y tratamiento de residuos:

Las medidas propuestas por el notificador y otras sugeridas por la CNB que serán puestas en práctica serán:

- Durante la liberación se eliminarán y destruirán, cada 15 días, las plantas herbáceas que hayan crecido en la parcela experimental mediante eliminación mecánica y en ocasiones aplicación de herbicidas en las filas de plantación.



- Se comunicará a la Autoridad competente el día y hora de la tala de los árboles para la destrucción del ensayo con la suficiente antelación para que ésta pueda acudir.
- Una vez destruido el ensayo, todo el material procedente de los árboles será almacenado en bolsas para su posterior incineración. La recogida de material se realizará con anterioridad al riego de la parcela por inundación.
- La eliminación de los fustes de los árboles después de su aprovechamiento, medición y análisis para su estudio, se astillarán y se incinerarán para su total destrucción.
- La eliminación de los tocones, se realiza mediante una trituradora hasta una profundidad de 50 cm, que hace imposible su regeneración con la posterior eliminación de los residuos restantes por incineración.
- No se realizará ninguna otra plantación (comercial o no) de chopos en la parcela durante los tres años siguientes a la finalización del ensayo y se hará un seguimiento de la ausencia de rebrotes en la misma y durante el mismo periodo, principalmente durante la primavera, época de mayor crecimiento.
- Finalmente, así mismo se comunicará a la Autoridad competente el final de dicho seguimiento.

La Autoridad Competente, en su caso, realizará las visitas de inspección que considere oportunas, antes, durante y tras la finalización de los ensayos.

#### CONCLUSIONES:

**Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de control y uso propuestas, este proyecto de liberación al medio ambiente de 3 años de duración no supone un riesgo significativo para la salud humana y/o el medio ambiente.**

No obstante la CNB considera que, para este ensayo de liberación trianual, se remitirá un **Informe Anual de Resultados**, 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, **incluyendo así mismo, los resultados obtenidos para cada uno de los estudios propuestos sobre interacciones sobre organismos no diana en este informe.**

Así mismo, se remitirá un **Informe de Resultados Final** comprendiendo los tres años de ensayo conforme, igualmente, con el modelo antes indicado. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Por último, cualquier modificación que se proponga realizar antes, durante o tras la finalización del ensayo deberá comunicarse previamente a la Autoridad competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad, para que éstos sean evaluados y aceptados, si fuera el caso.

Madrid, a 5 de marzo de 2012