



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN EN CAMPO DE PLANTAS DE ARROZ MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (B/ES/19/07)

Antecedentes

El Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente solicita el informe de evaluación del riesgo de la Comisión Nacional de Bioseguridad en relación con la notificación **B/ES/19/07**, correspondiente a un ensayo de campo con plantas de arroz modificadas genéticamente, que acumulan moléculas microbidas en el endospermo, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria (ETSEA) de la Universidad de Lleida. Esta notificación se recibió en el registro de la Sede electrónica con fecha 5 de abril de 2019. Esta actividad de liberación voluntaria al medio ambiente está financiada por el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación.

Es la primera vez que se ensaya este arroz modificado genéticamente en España.

Características del OMG, objetivo y duración de los ensayos:

Se trata de un ensayo de campo de uso farmacéutico en plantas o “molecular pharming”, para la evaluación de una línea transgénica de arroz que acumula en su endospermo tres moléculas capaces de neutralizar el virus del sida, el anticuerpo 2G12 y las lectinas grifitsina (GRFT) y cianovirina (CV-N).

El objetivo principal de esta liberación en campo en una parcela limitada por redes en su totalidad, es la producción de las 3 moléculas microbidas que se acumulan en el endospermo de la línea de arroz transgénica homocigótica H-136 (generación T3).

El notificador indica que en experimentos previos realizados han demostrado que estas moléculas producidas en plantas, tanto por separado (Vamvaka *et al.*, 2016a, b y c) como en combinación (Vamvaka *et al.*, 2018) son capaces de neutralizar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Con la obtención de la línea H-136 han demostrado que el endospermo de arroz es una plataforma funcional para la producción de una combinación de los microbidas 2G12, GRFT y CV-N. Además, pruebas preliminares *in vitro* mostraron que la co-expresión de las tres moléculas tiene una acción sinérgica potenciando el efecto neutralizante del virus del VIH. Esta es la primera vez que más de una proteína que neutraliza el virus del sida es producida de forma estable en el endospermo de un cereal, abriendo un nuevo camino hacia la producción de un cóctel microbida para evitar la transmisión de este virus (Vamvaka *et al.*, 2018). Los niveles de estas tres moléculas permanecen estables hasta la generación homocigótica T4 que es la última que han analizado. Esta sería la primera evaluación de campo de una planta microbida de tercera generación.

El lugar propuesto para la liberación está situado en los campos de prácticas de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria (ETSEA), de la Universidad de Lleida. Se proporcionan las coordenadas geográficas. La finca tiene alrededor de 6 ha y está situada a 3 km del centro de la ciudad. Actualmente está completamente rodeada de zonas urbanas.



Para el campo experimental serán utilizadas 50 plantas progenie T3 de la línea T2 5-5 y 50 plantas control EYI 105.

La fecha propuesta para la liberación es del 1 de junio al 31 octubre de 2019.

Los objetivos que se quieren conseguir con esta liberación son:

- a) Multiplicación del material para estudios posteriores de neutralización del virus *in vitro*.
- b) Evaluación de la línea respecto a su línea original en la caracterización agronómica de la planta o efectos de las plagas/fenómenos meteorológicos sobre las moléculas producidas.

Con respecto a los objetivos enumerados en la parte b), **la Comisión Nacional de Bioseguridad considera que son poco realistas teniendo en cuenta la extensión del ensayo, así como el número de plantas propuestas.**

Caracterización molecular de la planta modificada genéticamente (PMG)

La incorporación simultánea de las tres moléculas ha sido posible gracias a la utilización del método de biobalística o bombardeo de micro partículas de oro (Christou *et al.*, 1991). Actualmente la transferencia directa de genes o biobalística es la más eficiente para introducir simultáneamente varios genes en un germoplasma comercial.

Descripción y características que se han introducido o modificado

La línea H136 que acumula en su endospermo el anticuerpo 2G12 y las lectinas grifitsina y cianovirina, ha sido obtenida a partir de la línea asiática de arroz EYI105 (Japonica) a la que se han incorporado 5 genes que codifican para moléculas microbicidas.

Las construcciones introducidas han sido:

- El gen de selección *hpt*.
- 4 cDNAs que codifican para la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de 2G12, la lectina grifitsina (GRFT) y la lectina cianovirina (CV-N) insertados en los siguientes plásmidos: pTRAgTiGH, pTRAgTiGL, pgZ63-Griff y pRPS-CV-N.

El evento seleccionado se expresa en la planta H136 (triple microbicida) que contiene y expresa niveles elevados para los 4 genes. Esta línea H136 se auto polinizó produciendo semillas T1. Las generaciones T2 y T3 se han obtenido a partir de la línea madre mediante autofecundaciones sucesivas.

Las construcciones del anticuerpo 2G12 para la transformación están basadas en el vector binario pTRA, un derivado de pPAM. El vector contiene dos regiones de unión RB7 de tabaco que flanquean la casete de expresión. Las regiones que codifican para la cadena pesada y ligera de 2G12 incluyen las secuencias señales en la región N-terminal dirigiendo las cadenas polipeptídicas a la ruta secretora. La casete de expresión consta del promotor específico del endospermo del arroz de la glutelina-1, el primer intron-1 del gen de la ubiquitina del maíz, la secuencia 5' leader del virus etch del tabaco (*Tobacco etchvirus*), que actúa como un potenciador de la traducción, la región que codifica para el



anticuerpo y el terminador de 35S del Cauliflower mosaic virus (CaMV), resultando las construcciones finales pTRAgTiGH y pTRAgTiGL.

Producción del anticuerpo 2G12 y funciones: 2G12 es un anticuerpo monoclonal de origen humano y se ha producido de forma sintética por la empresa Polymun. El anticuerpo 2G12 reconoce el epítopo gp120 y lo neutraliza *in vitro*.

Producción de la lectina GRIFITSINA y funciones: GRFT es una lectina de 12.7-kDa aislada de la alga roja *Griffithsia* spp. Es una proteína dimérica ácida de 121 aminoácidos, con una estructura de dominios intercambiables. Inhibe selectivamente la unión de HIV-1 a glicanos ricos en manosas que se encuentran en la glicoproteína de la envoltura del virus, y ha demostrado un amplio espectro de actividad antiviral contra coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y otros coronavirus, Hepatitis C virus, Japanese encephalitis virus, y Herpes simplex virus. GRFT no tiene actividad mitogénica en las células mononucleares de la sangre periférica, pero demuestra actividad completa en la presencia de secreciones vaginales de macaco y tiene un buen perfil de seguridad en el modelo de irritación vaginal de ratón.

GRFT también puede inhibir la unión de HIV-1 a las células dendríticas que expresan el receptor DC-SIGN y evita la transferencia del virus mediada por éste a las células diana. Solo se pueden aislar cantidades muy pequeñas de GRFT de la alga por lo que el desarrollo de microbicidas basados en lectinas requiere de la expresión de lectinas recombinantes en grandes cantidades.

Producción la lectina CIANOVIRINA y funciones: CV-N es una lectina de 11-kDa procedente de la cianobacteria *Nostoc ellipsosporum*. Es una proteína de 101 aminoácidos que puede existir en forma de un monómero de dos dominios casi simétricos o como un dímero de dominios cambiantes. Se une a los residuos de manosa de la superficie de diferentes virus incluyendo la glicoproteína gp120 de la envoltura del virus HIV. CV-N actúa *in vitro* como un inhibidor de la entrada de todos los tipos de HIV mediante el bloqueo de la fusión de la membrana. CV-N también bloquea la transmisión vaginal de HIV en primates no humanos, pero se necesita una concentración relativamente elevada porque la proteína tiene una vida media reducida. También inhibe la unión de HIV-1 al receptor DC-SIGN y la transferencia mediante DC-SIGN del virus a las células diana que es la primera vía de infección en mujeres expuestas al HIV-1 debido a las relaciones sexuales.

Las semillas transgénicas de la H136 T0 contienen: 17.2 µg/g de 2G12; 1.2 µg/g de GRFT y 6.4 µg/g de CV-N cuando se compara con la línea control EYI105.

La CNB considera que la información sobre la modificación genética es adecuada, incluyendo cebadores para la detección de los insertos, pero se solicita que se avance en la caracterización molecular en relación al conocimiento del nº de copias de los fragmentos insertados y su localización, así como a la estabilidad de los fragmentos (no se aportan datos, Pág. 19). Será además necesario conocer la expresión de los insertos (niveles de 2G12, GRFT y CV-N en las semillas), de la que se dice cómo se caracterizará pero que de momento no se proporciona información.



Identificación y caracterización de riesgos potenciales:

e) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

Las variedades de arroz están seleccionadas para germinar el siguiente ciclo de cultivo cuando se den las condiciones ambientales adecuadas, sobretodo de humedad, ya que la planta no sobrevive si no se encuentra sumergida en agua. Su supervivencia asilvestrada es difícil por estar adaptada a las condiciones de cultivo intensivo. En la zona de ensayo, las plantas estarán sumergidas en un contenedor lleno de agua durante todo el ciclo de cultivo. Si algún grano cae al suelo y logra germinar después de la cosecha lo más probable es que muera por los fríos otoñales e invernales. Si no se diese el suficiente frío y germinara, la plántula no sobreviviría ya que carecería de su inmersión en agua.

Estas plantas de arroz modificadas genéticamente parecen no diferir de las no modificadas genéticamente es su capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación. Por otro lado, no se espera que este arroz se comporte como una mala hierba en hábitats agrícolas ni como invasor de hábitats naturales.

Según el notificador, dada la naturaleza de la modificación genética introducida, no existe ninguna diferencia morfológica, fisiológica o agronómica de la línea H136 respecto a la línea originaria EY1105 en relación a capacidad de propagación por lo que la probabilidad de que se convierta en más invasora en hábitats naturales o agrícolas es nula. La única diferencia es su resistencia al antibiótico higromicina conferida por la integración del gen *hpt*. No se aplica antibiótico en los campos de ensayo, por lo que no se ejerce la presión del antibiótico en ningún momento. **La Comisión Nacional de Bioseguridad recuerda que el gen de resistencia a antibióticos debe ser eliminado previamente a un posible uso comercial.**

Con la finalidad de evitar en la mayor medida de lo posible la diseminación de semilla madura y que no caiga al suelo, **la Comisión Nacional de Bioseguridad insta a embolsar las espigas de las plantas de arroz antes de su maduración (bolsas de celofán o papel) y a colocar las bandejas del ensayo sobre una malla anti-hierba o similar de superficie mayor (p. ej., en el centro de un cuadrado de malla de 2 x 2), con la finalidad de que si cae alguna semilla madura, no lo haga sobre el suelo y tras el ensayo sea recogida y eliminada.**

a) Capacidad de transferencia del material genético:

El arroz es una especie originaria de Asia, que no tenía especies antecesoras en Europa. Se introdujo en España en la Edad media. Las áreas más próximas a la parcela experimental donde se cultiva arroz son en Pals (Girona) y en el Delta del Ebro (Tarragona).

En campos experimentales desarrollados en Europa (Messeguer *et al.*, 2001, 2004), el flujo de genes mediante polen de plantas de arroz modificadas genéticamente a convencionales, mostró valores que siempre eran de 0.2 % para las plantas más próximas y de 0.0125 % para las plantas situadas a una distancia de 10 m, pero estos resultados se veían influenciados por la presencia de los vientos predominantes. En campos experimentales realizados por otros investigadores, el flujo de genes detectado era generalmente del 1% para cultivos GM y non-GM separados por una cierta distancia



(Rong *et al.*, 2007) e incluso cuando las PMG y las convencionales estaban mezcladas en el mismo campo (Rong *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta que indican que no habrá ningún otro ensayo de arroz en la finca experimental del ETSEA, consideran que en este ensayo se mantendrá un aislamiento total por lo que no se liberará polen fuera del recinto del ensayo y en consecuencia no se espera ninguna transferencia de genes.

Aunque la distancia exigida en programas de obtención de semillas híbridas de arroz para evitar la polinización cruzada es de 10 m, la utilización de plantas para la producción de proteínas terapéuticas exige potenciar las medidas de aislamiento para mitigar al máximo el riesgo de transferencia genética. Por ello, la Comisión Nacional de Bioseguridad considera adecuado en este caso que no haya cultivos de arroz no modificados genéticamente en la ETSEA ni en varios km a la redonda, por lo que se considera asegurada la **distancia de aislamiento** con respecto a otros cultivos.

El notificador señala que no existen parientes compatibles, como el arroz salvaje, en el área elegida para la experimentación, pero en cualquier **caso se realizará un seguimiento periódico del campo**.

b) Estabilidad genética y fenotípica:

Los 4 cDNAs introducidos están todos bajo el control de promotores específicos del endospermo, por lo cual su expresión solo será detectada en las semillas. El notificador informa que salvo los nuevos caracteres expresados no se aprecia ninguna diferencia respecto a la planta original respecto a las características morfológicas, fisiológicas o agronómicas en las sucesivas generaciones.

No obstante, y aunque los análisis Southern para cada transgen han confirmado su integración en un solo *locus*, se desconoce por el momento el número de copias del fragmento insertado y no se ha hecho una secuenciación del genoma de esta planta, por lo que desconocen la localización de los fragmentos.

Conforme a los requerimientos establecidos por la Comisión Nacional de Bioseguridad, se tendrá que ir avanzando en la caracterización molecular si se realizan ensayos sucesivos con estas plantas modificadas genéticamente, presentándose en la siguiente notificación la información complementaria que corrobore dicha estabilidad.

d) Toxicidad y alergenidad:

No se han descritos efectos nocivos para este tipo de elementos microbicidas. Se ha realizado estudios bioinformáticos previos que han demostrado que no presentan homología con la secuencia aminoacídica de alérgenos y toxinas conocidas.

Las semillas de la planta solo serán destinadas a ser analizadas en el laboratorio. No van a ser destinadas, en ningún caso, a alimentación animal o humana.

En cualquier caso, **la Comisión Nacional de Bioseguridad considera que el notificador debe tomar las correspondientes medidas de precaución para evitar en todo momento cualquier posible uso accidental para consumo humano o animal.**



f) Efectos sobre organismos no diana:

El notificador indica que no se esperan impactos sobre los niveles de población de competidores, herbívoros, simbioses, parásitos o patógenos pues no se conoce ningún efecto adverso del anticuerpo 2G12 y de las lectinas Grifitsina y Cianovirina sobre la biodiversidad del ecosistema agrícola.

Tampoco se espera efecto negativo alguno sobre los trabajadores implicados en el ensayo.

Posibles efectos sobre la salud animal y humana derivados del consumo del OMG: Se desconoce el efecto de ingerir el anticuerpo 2G12 y las lectinas grifitsina y cianovirina. La ingestión de arroz se realiza después de haber sido cocinado por lo que es difícil que se produzca una ingestión de las semillas durante su cosecha. **Se evitará cualquier consumo accidental.**

Posible impacto de las técnicas de cultivo, gestión y cosecha empleadas: Dado el tamaño de la prueba, no se prevé ningún efecto negativo sobre las técnicas de cultivo que se apliquen al resto de los campos experimentales de ETSEA.

Posible efecto sobre los procesos biogeoquímicos: Dada la naturaleza de la modificación genética introducida, no se prevé ningún efecto negativo relevante ya que la única diferencia respecto a la planta no modificada es un mayor contenido en tres compuestos orgánicos que se mineralizarán en el suelo de la misma manera que los demás compuestos orgánicos.

g) Control y tratamiento de residuos:

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera en general adecuadas las medidas propuestas para llevar a cabo el control antes y durante el ensayo y post-liberación de la zona. En especial:

- La parcela principal de la ETSEA se localizará en una zona urbana donde no se cultiva arroz, dentro del recinto de la Escuela. La parcela donde se plantará el arroz está aislada del resto de campo por una malla que la recubre.
- Únicamente entrará en la parcela del ensayo (zona mallada) el personal autorizado y se contemplará la posibilidad de colocación de un aviso (cartel) de acceso restringido.
- El transporte del material biológico entre el laboratorio, campo y almacén autorizado para guardar las semillas se realizará cuidadosamente dentro de cajas herméticas de plástico para evitar la posible pérdida de semillas.
- El grano de arroz será recogido a mano y embolsado.
- Las bolsas se manipularán, transportarán y conservarán en envases cerrados por personal cualificado.
- Después de cortar las semillas, se recogerán los restos vegetales, se embolsarán y autoclavarán. El transporte hasta el autoclave también se hará en cajas de plástico herméticas. Una vez autoclavados serán desechados en el contenedor de residuos biológicos.
- Se recogerá el agua que pueda quedar en las bandejas en contenedores cerrados y será filtrada para ver si contiene alguna semilla. El agua también será autoclavada y desechada.



- El siguiente año, la parcela utilizada será sembrada por un cultivo diferente para controlar el posible rebrote de algunos restos de semilla.
- El ensayo será vigilado periódicamente, con una periodicidad mínima obligada para la vigilancia (p. ej. 1 vez/semana). Lo mismo para la vigilancia de los posibles rebrotes en el año siguiente (p. ej. 1 vez/mes).
- El ensayo será revisado periódicamente para registrar cualquier información relacionada con algún efecto adverso para el medio ambiente y la seguridad alimentaria que será notificada a la autoridad competente.
- En el caso de que surja una situación de emergencia, el grupo de trabajo que está previsto constituirse (formado por la responsable de la solicitud, el investigador obtentor del evento, un profesor especialista en Mejora Genética y un miembro del comité de bioseguridad de la UdL), . hará una evaluación de la situación, tomará las decisiones más apropiadas y realizará el seguimiento posterior. La situación será notificada inmediatamente a la responsable de Bioseguridad del Servei de Producció Agrícola de la Generalitat de Catalunya y al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG).
- El servicio de vigilancia del centro realizará continuamente itinerarios de inspección que se complementarán con el control de la zona mediante el sistema de cámaras de seguridad del que disponen.
- Se llevará a cabo un seguimiento de la parcela del ensayo durante **el año siguiente** a la realización del mismo, y se eliminarán todos los posibles rebrotes que puedan aparecer.

Cualquier incidencia o efecto adverso que pudiera ocurrir durante la realización de dicho ensayo o el transporte de las semillas se comunicará inmediatamente a la Autoridad competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad.

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

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

Una vez concluido los ensayos de campo de cada campaña, se remitirá un **informe 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, así como la información adicional solicita por la CNB en este informe. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 7 de junio de 2019



Referencias

Christou P, Ford T, Kofron M (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technol.* 9: 957-962

Messeguer, J., Fogher, C., Guiderdoni, E., Marfà, V. (2001). Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance gene as tracer marker. *Theoretical and Applied Genetics* 103(8):1151-1159.

Messeguer, J., Marfà, M. Català, Guiderdoni, E. Melé, E. (2004). A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. *Molecular Breeding*, January 2004, Volume 13, Issue 1, pp 103–112.

Jun Rong Zhiping Song Jun Su Hui Xia Bao-Rong Lu Feng Wang. (2005). Low frequency of transgene flow from Bt/CpTI rice to its nontransgenic counterparts planted at close spacing. *New Phytologist*, 168: 559–566.

Rong J, Lu B-R, Song ZP, Su J, Snow AA, Zhang XS, et al. (2007). Dramatic reduction of crop-to-crop gene flow within a short distance from transgenic rice fields. *New Phytol* 2007;173: 346–53

Vamvaka E, Twyman RM, Murad A, Melnik S, Teh A, Arcalis E, Altmann F, Stoger E, Rech E, Ma J, Christou P, Capell T.(2016a) A recombinant HIV-neutralizing antibody produced in rice endosperm accumulates predominantly as an aglycosylated derivative with enhanced neutralizing activity. *Plant Biotechnology Journal* 14: 97-108

Vamvaka, E; Arcalis E, Ramessar, K; Evans, A; O'Keefe, B; Shattock, R; Piles, V; Stoger E, Christou, P; Capell, T (2016b) Rice endosperm is cost effective for the production of recombinant griffithsin with potent activity against HIV . *Plant Biotechnology Journal* 14: 1427-1437

Vamvaka, E; Arcalis E, Ramessar, K; Evans, A; O'Keefe, B; Shattock, R; Piles, V; Stoger E, Christou, P; Capell, T (2016c) Cyanovirin-N produced in rice endosperm offers effective pre-exposure prophylaxis against HIV-1BaL infection in vitro *Plant Cell Reports* 35: 1309-1319

Vamvaka E, Farré G, Molinos-Albert LM, Evans A, Canela-Xandri A, Twyman RM, Carrillo J, ordoñez RA, Shattock R, O'Keefe BR, Clotet B, Blanco J, Khush GS, Christou P, Capell T (2018) Unexpected synergistic HIV neutralization by a trile microbicide produced in rice endosperm. *Proc Natl Acad Sci of USA* 115: E7854-E7862.