



agrofactory

GRUPO OPERATIVO SUPRAAUTONÓMICO

DOCUMENTO FINAL

PROYECTO INNOVADOR

**Nuevas oportunidades de desarrollo agrícola
basadas en el aprovechamiento integral de
variedades de tabaco biofactoría**



Cofinanciado por
la Unión Europea



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN

Importe de ayuda 590.381,88€ cofinanciado al 80% por la Unión Europea a través del Plan Estratégico de la PAC FEADER.

índice

1. INTRODUCCIÓN	04
2. OBJETIVOS	05
3. ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN DE PARTIDA	05
4. RESULTADOS	07
• R1: Anotación mejorada del genoma de <i>Nicotiana tabacum</i> IBMCP....	07
• R2: Guía de prácticas de cultivo de tabaco con alto contenido en taumatina. Olivos de Badajoz	15
• R3: Guía de requerimientos de bioseguridad de cultivo OMG Madeinplant.....	18
• R4: Guía de procesamiento y extracción de taumatina. CTAEX	19
• R5: Guía de prácticas de cultivo de tabaco con alto contenido en anatabina. CTAEX y Madeinplant.....	22
• R6: Guía de procesamiento y extracción de anatabina IDOASIS	33
• R7: Maximización del proceso de biorrefinería (residuo cero) IDOASIS...	34
• R8: Manual de trazabilidad de NGTs. Madeinplant, IBMCP	35

Introducción

La **pérdida de competitividad** de una buena parte de los cultivos herbáceos tradicionales afecta gravemente la viabilidad de las explotaciones y aboca a la **despoblación a distintas zonas rurales** afectadas, distribuidas por todo nuestro territorio nacional. Entre otros ejemplos, un caso paradigmático de esta situación lo constituye el cultivo tradicional del tabaco, el cual, además de los problemas de rentabilidad compartidos con otros cultivos, está afectado por la estigmatización asociada a sus usos finales y que aconseja su progresiva sustitución por otros cultivos con una percepción social más positiva.

En los últimos años, fruto de los esfuerzos de investigación y desarrollo en nuevas tecnologías de mejora genética, están surgiendo nuevos cultivos industriales altamente innovadores que prometen ofrecer alternativas viables a la crisis de los cultivos tradicionales. Estos cultivos, conocidos genéricamente como **plantas biofactoría**, basan su viabilidad en su alto contenido en uno o más compuestos de alto valor añadido. Además de la extracción del (los) compuesto(s) diana, la rentabilidad del cultivo se ve aumentada mediante estrategias de aprovechamiento integral de la biomasa en procesos de biorrefinería.

En el ámbito europeo, nuestro país está siendo pionero en el desarrollo de este tipo de cultivos, ya que contamos, de manera excepcional en Europa, con dos ejemplos avanzados de plantas biofactoría, ambos basados en la planta de tabaco. El primero es una variedad de tabaco que acumula anatabina, un alcaloide natural con propiedades antiinflamatorias. Esta variedad fue obtenida por investigadores del CSIC mediante técnicas de edición genética CRISPR en el contexto del proyecto europeo Newcotiana (newcotiana.org). El segundo es una variedad de tabaco obtenida por la empresa Nambawan, mediante ingeniería genética, que acumula taumatina, un edulcorante no calórico de origen vegetal. Ambas variedades de tabaco biofactoría se han venido cultivando con éxito en nuestro país durante **dos campañas consecutivas en ensayos de campo** en las que ha quedado establecida la seguridad de ambos cultivos y la productividad de los compuestos diana en las condiciones ensayadas.

Llegados a este punto, llega el momento de emprender los pasos siguientes para el **desarrollo comercial de estas líneas**, para lo que es necesario avanzar en el escalado de producción, el ensayo de nuevas localizaciones, y el establecimiento de los procedimientos óptimos de cultivo, procesamiento y trazabilidad. El objetivo de este proyecto es por tanto avanzar decisivamente en el desarrollo comercial de estas nuevas variedades, para lo cual se plantea la realización de dos campañas sucesivas encaminadas a dar el empuje decisivo para la implementación definitiva de los primeros cultivos biofactoría en Europa.



Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Optimizar las prácticas de cultivo y el procesamiento de nuevas variedades de tabaco biofactoría para su aprovechamiento integral y escalado a nivel comercial.

Específicos:

- Mejorar la calidad de datos relativos a la anotación del genoma de *Nicotiana tabacum* para permitir una adecuada trazabilidad de las plantas cultivadas.
- Aprovechar de manera integral el tabaco como productor de taumatina.
- Aprovechar de manera integral el tabaco como productor de variedad alta en anatabina.
- Establecer sistemas de trazabilidad de tabacos NGTs.

Análisis de la situación de partida

Uno de los mayores retos que afronta el sistema agrícola español es la progresiva pérdida de población en zonas rurales, motivada entre otras razones por la reducción en la viabilidad económica en las explotaciones agrícolas tradicionales, la escasa implantación tecnológica, el envejecimiento de la población activa, la falta de atractivo empresarial y la escasez de oferta de empleo cualificado bien remunerado. Este problema se repite a lo largo geografía peninsular, afectando a zonas tan separadas geográfica y estructuralmente como la Comunidad Valenciana (CV) y Extremadura. En la CV la progresiva pérdida de competitividad de los cítricos y otros cultivos tradicionales hortícolas de regadío está llevando en algunas zonas a un abandono de tierras de cultivo que alcanza niveles realmente preocupantes. Según los datos aportados por AVA-Asaja, el regadío abandonado alcanza, por provincias, un 14% en Castellón, un 8% en Valencia y un 4% en Alicante. Mientras, en Extremadura, posiblemente el caso más paradigmático en este sentido lo constituye la crisis que amenaza al cultivo de tabaco tradicional. Este cultivo ha constituido durante décadas uno de los principales sustentos económicos de comarcas enteras como La Vera. Sin embargo, en la actualidad esta actividad agraria está amenazada por la menor demanda y la pérdida de ayudas en el marco de la Política Agraria Común (PAC), lo que condena al abandono amplias zonas de cultivo.

Cítricos y tabaco son dos ejemplos de un problema más general de pérdida de interés por cultivos tradicionales que afecta a otros muchos cultivos y zonas geográficas. Este problema es especialmente relevante en el contexto del cambio climático, cuya mitigación pasa necesariamente por favorecer el uso de materias primas e ingredientes de origen vegetal, así como el uso de fuentes de energía renovables en la producción de alimentos. La producción "verde" de todo tipo de compuestos, desde proteínas alimentarias hasta nutracéuticos o medicamentos está ganando terreno como alternativa sostenible a sistemas con mayor huella de carbono como los basados en producción animal o los fermentadores microbianos.

Este proyecto apuesta por los cultivos industriales de alta tecnología, en particular aquellos que emplean la planta del tabaco, como oportunidad para generar (i) **mayor rentabilidad a los productores** (ii) **un empleo de más alta cualificación** y (iii) **un sistema de producción “verde” más sostenible para materias primas de valor añadido.**

Como punta de lanza de este tipo de cultivos, este grupo operativo abordará el aprovechamiento integral de dos variedades de tabaco biofactoría. La variedad **Anatabine**, obtenida mediante edición genética, produce anatabina en lugar de nicotina. La anatabina es un alcaloide que se encuentra de forma natural en la planta de tabaco, aunque a concentraciones muy bajas. Este alcaloide tiene probadas propiedades antiinflamatorias y se investiga su empleo en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, lo que genera una demanda apreciable con perspectivas de crecimiento. El establecimiento de un cultivo de la variedad de tabaco Anatabine proporciona la oportunidad no sólo de aprovechar la demanda de anatabina, sino también de explorar la implantación de un primer cultivo editado genéticamente en España.

La variedad **Thaumatococcus II**, obtenida mediante tecnología del DNA recombinante, produce una proteína 10000 veces más dulce que el azúcar. Esta proteína se produce de forma natural en los frutos de la planta tropical *Thaumatococcus daniellii*. En la actualidad, y en contexto de la epidemia de obesidad que afecta a los países desarrollados, existe una enorme demanda de este tipo de proteínas edulcorantes, especialmente por parte de las multinacionales de bebidas azucaradas. Sin embargo, la falta de un cultivo que garantice un suministro estable impide la adopción de esta alternativa saludable. El establecimiento de un cultivo de esta variedad biofactoría en España supone la oportunidad única de establecer a nuestro país como pionero en este nuevo mercado.



Resultados

R1: ANOTACIÓN MEJORADA DEL GENOMA DE NICOTIANA TABACUM. IBMCP

El primero de los objetivos específicos del proyecto ha sido mejorar la calidad de los datos de anotación del genoma de *Nicotiana tabacum*, de manera que las variedades biofactoría cultivadas puedan caracterizarse y trazarse con el nivel de detalle que exigen los nuevos marcos regulatorios. Este resultado ha sido desarrollado por el IBMCP (CSIC-UPV).

La trazabilidad de una planta obtenida mediante nuevas técnicas genómicas (NGT) se apoya, en su vertiente analítica, en la comparación de la secuencia de la planta cultivada frente a una secuencia de referencia de la variedad de partida. La calidad de esa referencia condiciona directamente lo que puede demostrarse: si la referencia está fragmentada o su anotación es incompleta, resulta difícil describir con precisión el locus editado, distinguir la edición introducida de la variación natural propia de la variedad, o acreditar la ausencia de secuencias ajenas al acervo génico de la especie. Este último punto es especialmente relevante para la variedad Anatabina, candidata a ser verificada como vegetal NGT de categoría 1 al amparo del Reglamento (UE) 2026/1388 (véase R8).

El tabaco presenta además una dificultad añadida. *N. tabacum* es un alotetraploide ($2n = 48$) originado por hibridación de dos especies progenitoras, *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis*, cuyos genomas se conservan en la planta actual como dos subgenomas diferenciados (Nisyl y Nitom). Su genoma es grande (~4,2 Gb) y está compuesto en su mayor parte por elementos repetidos, y la mayoría de los genes están presentes en dos copias homeólogas muy parecidas entre sí. Esta arquitectura hace que ensamblar y anotar el genoma sea técnicamente exigente, y que un ensamblaje poco contiguo confunda con facilidad copias homeólogas con alelos de un mismo gen, algo inaceptable cuando lo que se pretende es documentar una edición concreta en un locus concreto.

Por este motivo, en el marco del proyecto se ha generado un ensamblaje de referencia propio, a nivel de cromosoma y con anotación completa, de la variedad *Nicotiana tabacum* cv. K326, que es el fondo genético del que derivan las variedades biofactoría objeto del proyecto. El ensamblaje resultante se ha denominado NtK326IBMCPv1. A continuación se resumen el procedimiento seguido y los resultados obtenidos en cada etapa: secuenciación, ensamblaje, anclaje a cromosomas y anotación de elementos repetidos y de genes.

SECUENCIACIÓN DEL GENOMA

Se extrajo ADN genómico de alto peso molecular de hoja de *N. tabacum* cv. K326 y se preparó una librería SMRTbell siguiendo el protocolo estándar del fabricante. La secuenciación se realizó en la plataforma PacBio Revio mediante secuenciación por consenso circular, que produce lecturas largas y de alta exactitud (lecturas HiFi). Esta combinación de longitud y exactitud es la que permite atravesar las regiones repetidas del genoma del tabaco y separar las dos copias homeólogas de cada región.

Una primera ronda de secuenciación proporcionó una cobertura de 14,8×, insuficiente para el ensamblaje, por lo que se realizó una segunda ronda de refuerzo. En conjunto se obtuvieron 7.987.137 lecturas HiFi con un total de 146,98 Gb de secuencia, equivalentes a una cobertura aproximada de 34,8× del genoma final, por encima del umbral de 30× fijado como objetivo. La longitud media de lectura fue de 17,0-19,6 kb y entre el 87,7 % y el 93,5 % de las lecturas alcanzaron una calidad Phred igual o superior a Q20 (Tabla R1.1).

Tabla R1.1. Estadísticas de las dos carreras de secuenciación HIFI (NanoPlot v1.43.0)

Carrera	Fecha	Lecturas	Base (Gb)	Longitud media (bp)	N50 de lectura (bp)	Calidad media (Phred)	Lecturas ≥ Q20 (%)	Cobertura aprox
N. tabacum (carrera)	17/10/24	3.661.009	62,35	17.030	17.171	25,5	93,5	14,8 ^x
Refuerzo (carrera 2)	11/12/24	4.326.128	84,63	19,564	19.637	23,1	87,7	20,1 ^x
Conjunto	-	7.987.137	146,98	18,404 ¹	-	-	-	34,8 ^x

¹ Media ponderada por número de lecturas. La cobertura se ha calculado frente a la longitud del ensamblaje final (4,22 Gb)

ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL GENOMA

Antes del ensamblaje se estimaron el tamaño del genoma y su grado de heterocigosidad a partir de la frecuencia de fragmentos de secuencia de 21 nucleótidos (k-mers) en las lecturas, utilizando GenomeScope v2.0. El perfil obtenido (Ilustración R1.1) muestra un pico principal a ~35× de cobertura, coincidente con la cobertura de secuenciación, y un pico secundario a ~70×.

El modelo de GenomeScope, diseñado para genomas diploides, interpreta este perfil como un genoma haploide de solo ~1,73 Gb con una heterocigosidad anormalmente alta (8,15 %; Tabla R1.2). Se trata del resultado esperado en un alotetraploide: los dos subgenomas del tabaco divergieron antes de la poliploidización, de modo que la mayoría de sus k-mers son específicos de uno de ellos; el modelo diploide los lee como heterocigosidad y colapsa ambos subgenomas en una única estimación que equivale, aproximadamente, al tamaño de un solo subgenoma. Esta estimación se documenta aquí por completitud, pero no se ha utilizado como referencia de tamaño del genoma en el resto del trabajo, donde se emplea la longitud del ensamblaje final (4,22 Gb).

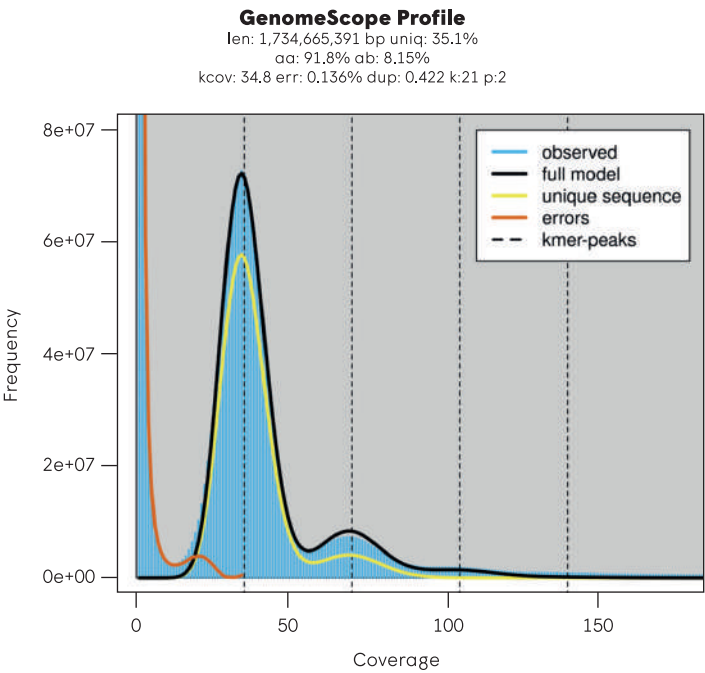


Ilustración 1. Perfil de k-mers (k = 21) del conjunto de lecturas HiFi de K326 obtenido con GenomeScope v2.0. El pico principal (~35×) y el secundario (~70×) reproducen la firma típica de un genoma diploide heterocigoto, aquí generada en realidad por los dos subgenomas divergentes Nisyl y Nitom.

Tabla R1.2. Resultados del perfilado de k-mers con GenomeScope v2.0 (k=21, modelo p=2; intervalo mínimo - máximo del modelo ajustado)

Parámetro	Mínimo	Máximo
Fracción homocigota (aa)	90,2487 %	93,4492 %
Fracción heterocigota (ab)	6,5508 %	9,75127 %
Tamaño haploide estimado	1.728.081.183 bp	1.734.665.391 bp
Fracción repetida	1.121.964.998 bp	1.126.239.826 bp
Fracción única	606.116.185 bp	608.425.564 bp
Ajuste del modelo	42,6613 %	85,802 %
Tasa del error de lectura	0,135558 %	0,135558 %

ENSAMBLAJE DEL GENOMA

El conjunto de lecturas HiFi se ensambló con tres programas distintos —Flye v2.9.2, hifiasm v0.19.9 y HiCanu (Canu v2.2)— con el fin de seleccionar el ensamblaje de partida sobre datos objetivos y no sobre una única ejecución. Cada ensamblaje se evaluó con QUAST (continuidad y tamaño), BUSCO (proporción de genes conservados de referencia que aparecen completos) y Merquy (exactitud a nivel de base y completitud frente a los k-mers de las lecturas). Los resultados se recogen en la Tabla R1.3.

Tabla R1.3. Comparación de los tres ensamblajes obtenidos.

Ensamblador	Longitud total (bp)	Nº contigs	N50 (bp)	GC(%)	Busco embryophyta C (%)	BUSCO solanales C (%)	Merquy QV ¹	Completitud k-mer (%)
Flye	4.136.584.247	806	22.979.810	39,08	99,7	99,2	70,00	99,33
Hifiasm	4.225.359.855	1.036	133.873.260	39,16	99,5	99,2	65,20	99,36
HiCannu	4.303.372.344	3.771	62.400.424	39,22	99,2	99,2	67,41	99,36

¹ Valor reconstruido a partir de las tablas de calidad por contig de Merquy.

Los tres ensamblajes resultaron prácticamente equivalentes en completitud del espacio génico (99,2-99,7 % de genes de referencia completos) y en completitud de k-mers (99,3-99,4 %), y en los tres casos alrededor del 91 % de los genes de referencia aparecieron duplicados, tal como cabe esperar de un alotetraploide que conserva las dos copias homeólogas de la mayoría de sus genes. Las diferencias importantes estuvieron en la continuidad y en el tamaño total. El N50 de hifiasm (134 Mb) fue unas seis veces mayor que el de Flye (23 Mb) y el doble que el de HiCanu (62 Mb), con una longitud total muy próxima a la del ensamblaje final. HiCanu, en cambio, fue el más fragmentado en número de contigs y unas 80 Mb más grande que hifiasm, lo que indica que no llegó a colapsar parte de la duplicación haplotípica y homeóloga. Sobre esta base se seleccionó el ensamblaje de hifiasm como punto de partida para el anclaje a cromosomas.

ANCLAJE A CROMOSOMAS

Un ensamblaje de contigs, por contiguo que sea, no informa de cómo se ordenan esos fragmentos a lo largo de cada cromosoma. Para resolverlo se utilizaron datos públicos de PoreC (accesión SRA SRR25685393), una técnica que registra qué regiones del genoma están físicamente próximas en el núcleo: los contactos son mucho más frecuentes entre regiones del mismo cromosoma que entre cromosomas distintos, lo que permite agrupar y ordenar los contigs. Los datos se procesaron con el flujo de trabajo wf-pore-c y el anclaje se realizó con YaHS.

El mapa de contactos resultante (Ilustración R1.2) muestra el patrón esperado de bloques bien definidos en la diagonal, correspondientes a 24 secuencias de tamaño cromosómico, en coincidencia con el cariotipo de *N. tabacum* ($2n = 48$, 24 pares de cromosomas). Queda un conjunto residual de secuencias pequeñas y poco conectadas que no ha podido anclarse. El ensamblaje anclado se comprobó además frente a posibles contaminaciones y se validó por comparación de genoma completo con un ensamblaje de K326 publicado de forma independiente.

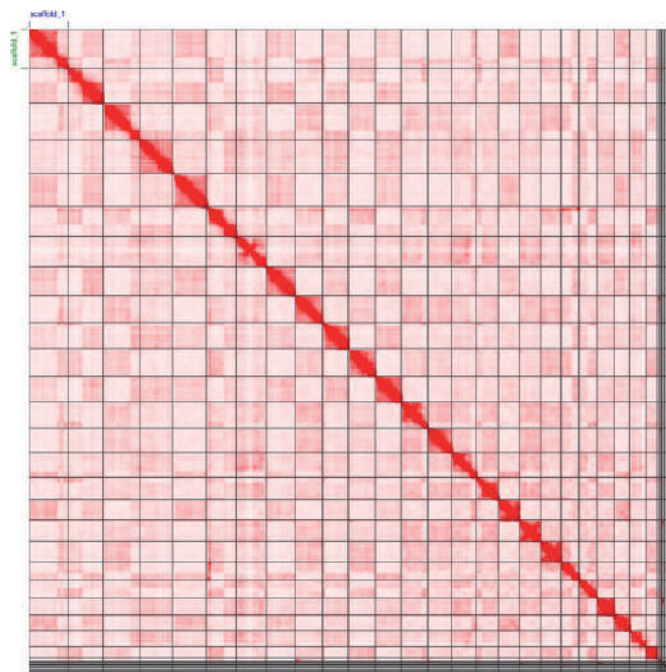


Ilustración 2. Mapa de contactos PoreC del ensamblaje anclado de K326. La señal en bloques a lo largo de la diagonal resuelve 24 secuencias de tamaño cromosómico, conformes al cariotipo esperado; en los márgenes inferior y derecho permanece un grupo residual de secuencias pequeñas sin anclar.

El anclaje unió los 1.036 contigs de partida en 988 contigs distribuidos en 915 secuencias, elevó el N50 de 133,9 Mb a 176,9 Mb e introdujo muy pocos huecos (0,17 bases indeterminadas por cada 100 kb). La completitud génica mejoró ligeramente respecto al ensamblaje previo (Tabla R1.4). El resultado es el ensamblaje final del proyecto, NtK326IBMCPv1.

Tabla R1.4. Métricas del ensamblaje antes y después del anclaje a cromosomas.

Métrica	Antes del anclaje (hifiasm)	Ensamblaje final (NtK326IBMCPv1)
Longitud total (bp)	4.225.359.855	4.222.474.009
Nº de secuencias (scaffolds)	-	915
Nº de contigs	1.036	988
N50 (bp)	133.873.260	176.893.550
L50	13	11
Secuencia más larga (bp)	218.324.812	258.279.684
GC (%)	39,16	39,16
Huecos (bases N/100 kb)	0,00	0,17
BUSCO embryophyta C (%)	99,5	99,8

Los genomas de los orgánulos se ensamblaron e identificaron por separado y se distribuyen como ficheros independientes: un genoma mitocondrial de 430.597 pb y un genoma plastidial de 155.943 pb.

ANOTACIÓN DE ELEMENTOS REPETIDOS

Los elementos transponibles y otras secuencias repetidas se anotaron sobre el ensamblaje final con EarlGrey. Los elementos repetidos ocupan el 86,9 % del genoma, de modo que solo 554,9 Mb (13,1 %) corresponden a secuencia no repetida. El componente dominante son los retrotransposones de tipo LTR, con un 64,3 % del genoma (Tabla R1.5), una proporción característica de los genomas grandes de solanáceas. Esta anotación es relevante para la caracterización de las variedades editadas por dos razones: delimita las regiones del genoma en las que el diseño de cebadores y sondas de identificación resulta poco fiable, y proporciona el mapa de repetidos que debe consultarse al interpretar cualquier variante estructural detectada en una planta cultivada.

Tabla R1.5. Paisaje de elementos repetidos del ensamblaje NtK326IBMCPv1 (EarlGrey), por clases principales.

Clase	Cobertura (bp)	Nº de copias	% del genoma
LTR	2.715.413.818	1.558.618	1.558.618
Sin clasificar	732.408.774	1.349.532	1.349.532
DNA (transposones de ADN)	95.733.720	153.921	153.921
LINE	83.808.751	117.961	117.961
Rolling circle (helitrones)	13.863.060	17.727	17.727
Penelope	12.963.283	24.935	24.935
Otros (repetidos simples, microsatélites, ARN)	12.763.710	29.235	29.235
SINE	631.262	2.622	2.622
Secuencia no repetida	554.887.631	-	-

ANOTACIÓN DE GENES

La anotación de genes es la capa de información que convierte una secuencia de ADN en un catálogo de genes utilizable: es la que permite indicar en qué gen se localiza una edición, qué consecuencia tiene sobre la proteína codificada y qué otros genes de la ruta metabólica pueden verse afectados. Dado que ninguna herramienta de predicción es óptima en todos los genomas, se ensayaron nueve estrategias distintas sobre el ensamblaje final, cubriendo las tres familias de aproximaciones disponibles:

- Predicción basada en evidencia de transcritos, es decir, en datos de expresión del propio tabaco (StringTie+TransDecoder, BRAKER1).
- Predicción basada en evidencia de proteínas de especies relacionadas (GeMoMa, BRAKER2).
- Predicción combinada de ambos tipos de evidencia (BRAKER3, MAKER, EviAnn) y predicción ab initio mediante aprendizaje profundo, que reconoce la estructura de los genes directamente en la secuencia (Helixer, ANNEVO).

Las nueve anotaciones se compararon entre sí, y frente a la anotación pública de referencia de *N. tabacum* (NCBI RefSeq, Sierro et al. 2024), con la herramienta de evaluación GAQET2. Los criterios empleados fueron la completitud génica (BUSCO), la verosimilitud de los modelos de proteína (PSAURON), la coherencia del proteoma predicho frente a familias de genes conocidas (OMark) y la proporción de proteínas predichas con homología en las bases de datos TrEMBL y SwissProt (Tabla R1.6 e Ilustración R1.3).

Tabla R1.6. Comparación con GAQET2 de las nueve estrategias de anotación ensayadas y de la anotación pública de referencia. EvT: evidencia de transcritos; EvP: evidencia de proteínas.

Anotación	Modelos génicos (N)	Espacio génico (MB)	BUSCO viridiplantae C (%)	PSA URON	Coherencia OMark (%)	Homología TrEMBL (%)	Homología SwissPro (%)
StringTie+TransDecoder (EvT)	50.263	362,9	99,1	91,5	94,36	85,78	54,21
GeMoMa (EvP)	102.773	337,1	99,8	92,8	88,12	93,23	49,07
Helixer (ab initio)	75.818	326,1	99,8	95,0	90,10	95,00	69,77
BRAKER1 (solo EvT)	101.386	341,8	98,6	92,0	77,60	81,59	46,49
BRAKER2 (solo EvP)	91.037	182,5	55,5	92,2	80,59	85,11	39,78
BRAKER3 (EvT+EvP)	66.832	261,6	100,0	96,0	90,94	94,92	60,29
MAKER (EvT+EvP)	52.969	273,7	93,9	95,7	92,91	60,49	42,46
EviAnn (EvT+EvP)	72.317	354,1	99,5	97,5	95,13	98,06	61,29
ANNEVO (ab initio) — seleccionada	58.405	245,8	99,5	98,1	97,03	98,73	74,05
NCBI RefSeq (Sierro 2024, referencia)	60.382	316,3	99,8	98,2	98,13	99,19	64,74

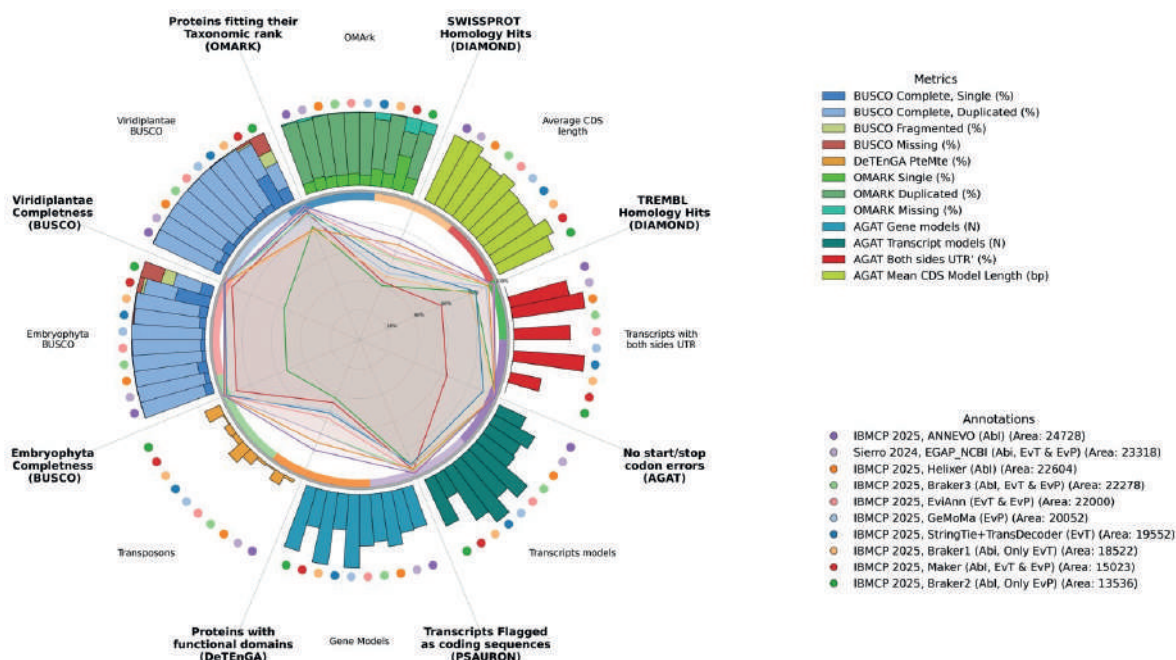


Ilustración 3. Comparación multiparamétrica con GAQET2 de las nueve estrategias de anotación ensayadas sobre el ensamblaje de K326, junto con la anotación pública de referencia. Los mismos datos se presentan en forma de tabla en la Tabla R1.6.

Se seleccionó ANNEVO como anotación definitiva. Es la estrategia con mejor puntuación en verosimilitud de los modelos de proteína y en coherencia del proteoma, y la que presenta mayor proporción de proteínas con homología en TrEMBL y SwissProt de todas las ensayadas; en el caso de SwissProt (74,05 %) supera de forma clara a todas las demás, incluida la anotación pública de referencia. Todo ello con un catálogo de genes más compacto (58.405 modelos) que la mayoría de las alternativas y con una completitud génica equivalente o superior a la de la referencia. Al tratarse de un predictor ab initio, ANNEVO no predice las regiones no traducidas de los genes (UTR), que se añadieron a los modelos seleccionados en un paso posterior de procesamiento. La anotación de telómeros, ADN ribosómico y ARN de transferencia se encuentra en curso y se incorporará a la versión definitiva del conjunto de datos.

VISIÓN CONJUNTA DEL GENOMA ANOTADO

Las anotaciones de genes y de elementos repetidos se integraron en una vista circular del conjunto de los 24 cromosomas (Ilustración R1.4), calculada en ventanas de 5 Mb. Cada cromosoma aparece coloreado según su subgenoma de origen, Nisyl o Nitom, lo que permite comparar directamente el contenido en genes y en elementos repetidos de los dos subgenomas del tabaco. Los cromosomas 21 y 22, en los que se ha detectado intercambio apreciable entre subgenomas, se han coloreado según el subgenoma mayoritario.

La densidad de retrotransposones LTR es elevada y bastante uniforme en todo el genoma, en coherencia con el 64,3 % de cobertura de la Tabla R1.5, mientras que la densidad de genes es comparativamente baja e irregular. A esta resolución no se aprecian diferencias visuales consistentes entre los cromosomas de uno y otro subgenoma; establecer si existen tales diferencias requeriría un análisis cuantitativo específico por subgenoma, más allá de esta vista general.

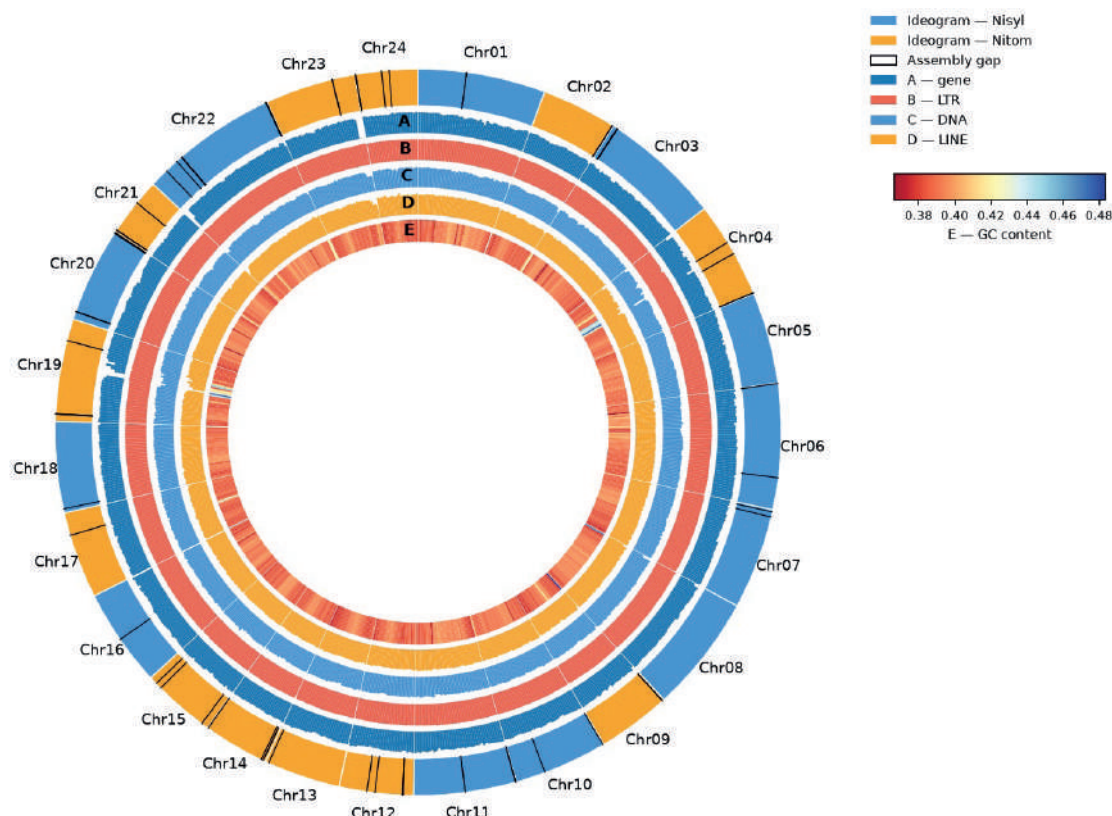


Ilustración 4. Vista circular del ensamblaje anotado NtK326IBMCPv1. Anillo exterior: cromosomas coloreados por subgenoma de origen (Nisyl en azul, Nitom en ámbar), con los huecos de ensamblaje marcados en negro. Anillo A: densidad de genes. Anillos B, C y D: densidad de elementos repetidos LTR, DNA y LINE, respectivamente. Anillo E (interior): contenido en G+C. Ventanas de 5 Mb y escala logarítmica de densidad.

APLICACIÓN A LA TRAZABILIDAD DE LAS VARIEDADES BIOFACTORÍA

El conjunto de datos generado en este resultado: ensamblaje a nivel de cromosoma, anotación de elementos repetidos y catálogo de genes con regiones no traducidas, constituye la referencia sobre la que se apoyan las actuaciones de caracterización y trazabilidad del proyecto. En términos prácticos, aporta:

- Una referencia de la variedad de partida, K326, que es el fondo genético real de las dos variedades biofactoría, y no una variedad distinta de la especie, lo que elimina una fuente importante de diferencias de secuencia ajenas a la modificación introducida.
- Coordenadas estables de gen y de cromosoma con las que describir de forma inequívoca el locus editado y su contexto, tal como requiere la información de identificación genética del sistema de trazabilidad propuesto en R8.
- La capacidad de distinguir entre copias homeólogas de un mismo gen, condición necesaria para documentar correctamente una edición en un genoma tetraploide.
- El mapa de elementos repetidos necesario para diseñar métodos analíticos de identificación en regiones específicas y para interpretar las variantes detectadas en las plantas cultivadas.

- Un catálogo de genes con evidencia funcional que permite analizar la expresión de los genes de las rutas de interés (biosíntesis de alcaloides en el caso de la variedad Anatabina) sobre la referencia correcta.

Con ello se da por cubierto el objetivo específico de mejorar la calidad de los datos de anotación del genoma de *Nicotiana tabacum* para permitir una adecuada trazabilidad de las plantas cultivadas.

R2: Guía de prácticas de cultivo de tabaco con alto contenido en taumatina. Olivos de Badajoz

Durante el primer periodo de estudio, el cultivo se desarrolló dentro de un invernadero situado en el término municipal de Pueblonuevo del Guadiana (Badajoz), con el fin de reducir las variables externas que pudieran influir en el estudio (climatología, daños por pájaros, etc.).

En cuanto al estudio agronómico del cultivo, se estudiaron distintas estrategias de riego, ajuste de necesidades nutricionales y el establecimiento del marco de plantación.

SECTOR	RIEGO	NUTRICIÓN	MARCO PLANTACIÓN
S.8	100% necesidades	100% Nitrógeno	1.20 m * 0.2 m
S.9	100% necesidades	REDUCCIÓN 50% Nitrógeno	1.20 m * 0.3 m
S.10	100% necesidades	REDUCCIÓN 25% Nitrógeno	1.20 m * 0.5 m
S.11	REDUCCIÓN 50% necesidades	100% Nitrógeno	
S.12	REDUCCIÓN 25% necesidades	100% Nitrógeno	

A lo largo del ciclo de cultivo se realizó un seguimiento del mismo, observando la evolución fenológica y el desarrollo de las plantas, de cara a la floración y producción de capsulas y semillas, que es la parte de la que se obtiene la thaumatina. Estas capsulas se cosecharon, se dejaron secar y se extrajeron las semillas (granos) para determinar rendimientos en cada uno de los tratamientos.

Los mejores resultados se extrapolaron al año siguiente a campo abierto en una parcela también situada en el término municipal de Pueblonuevo del Guadiana (Badajoz), con una superficie de 1 ha de cultivo. Demostrando que el cultivo de tabaco productor de taumatina-2 en la región, es totalmente viable.

El desarrollo del cultivo de tabaco como productor de thaumatina-II, tiene como objetivo la producción de inflorescencias para obtener semillas (granos) que posteriormente se procesarán para la extracción de los distintos compuestos finales. Por lo tanto, debemos modificar el manejo del cultivo tradicional de tabaco (producción de hojas) a una producción destinada a inflorescencias (granos).

Este cambio pasa por identificar cuáles son las mejores estrategias tanto de riego como de nutrición para maximizar esa producción de granos.

Como resumen de los resultados obtenidos durante los años de investigación, debemos destacar que no hay una diferencia significativa entre las distintas estrategias, pero sí se observa mejor comportamiento general en las indicadas a continuación:

LÍNEAS DE ESTUDIO	RESULTADOS ÓPTIMOS
• ESTRATEGIAS RIEGO	• 100 % DE NECESIDADES
• NECESIDADES NUTRICION (N)	• REDUCIR 50% NECESIDADES
• MARCO PLANTACIÓN	• 1.30 m * 0.30 m
• VARIEDAD	• SAMSUM
• FECHA SIEMBRA	• FEBRERO
• FECHA TRASPLANTE	• ABRIL-MAYO
• FECHA COSECHA	• AGOSTO-SEPTIEMBRE
• PRODUCCIÓN ESTIMADA	• 600-800 kg/ha grano limpio



Ilustración 1. Cultivo tabaco (thaumatococina-II) en interior de invernadero



Ilustración 2. Tabaco en plena floración en cultivo a campo abierto



Ilustración 3. Inicio de maduración de las capsulas de tabaco (thaumatina-II)

R3: Guía de requerimientos de bioseguridad de cultivo OMG Madeinplant

Para la realización de los ensayos de campo de este proyecto se solicitaron tres autorizaciones de liberación voluntaria de plantas modificadas genéticamente (PMG). A partir de la información recopilada durante la preparación y tramitación de estas solicitudes, se ha elaborado, a modo de ejercicio exploratorio desarrollado en el marco del proyecto, una guía orientada a traducir los requisitos de bioseguridad del cultivo de PMG en indicaciones prácticas para la planificación, ejecución y seguimiento de este tipo de ensayos.

En España, la liberación voluntaria de PMG en el medio ambiente está regulada por la Ley 9/2003 y el Real Decreto 178/2004. Estas normas establecen el marco jurídico para la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente (OMG), con el objetivo de minimizar los posibles riesgos y prevenir eventuales daños para la salud humana o el medio ambiente.

La documentación presentada debe permitir caracterizar adecuadamente el OMG, las condiciones en las que se realizará la liberación y las medidas previstas para evitar o minimizar posibles efectos adversos. Entre la información requerida se incluye:

- Una descripción técnica del organismo modificado genéticamente, incluyendo la especie receptora, la modificación genética introducida, el procedimiento empleado para su obtención y los elementos necesarios para garantizar su identificación y trazabilidad.
- Una descripción de la liberación propuesta, incluyendo localización, superficie, duración, condiciones de cultivo y procedimientos de manejo.
- Una evaluación del riesgo medioambiental, destinada a identificar y valorar los posibles efectos adversos asociados a la liberación: la posible persistencia e invasividad de la planta modificada, las ventajas o desventajas selectivas adquiridas, la transferencia de material genético a otras plantas, las interacciones con organismos objetivo y no objetivo, los posibles efectos sobre la salud humana y animal, las consecuencias sobre las cadenas alimentaria y de piensos y los posibles impactos sobre los procesos biogeoquímicos.

REQUISITOS DE SEGURIDAD Y MANEJO DEL CULTIVO

El traslado de semillas o material vegetal modificado genéticamente debe realizarse en recipientes cerrados y adecuadamente identificados, de forma que se evite cualquier pérdida o dispersión accidental durante el transporte. El material debe ir acompañado de la información necesaria para su correcta identificación, incluyendo la naturaleza modificada genéticamente del material y los datos del remitente y del destinatario.

Cuando las semillas tengan que germinarse fuera de la zona de liberación, esta actividad deberá desarrollarse en instalaciones autorizadas para la utilización confinada de OMG, aplicando las condiciones de bioseguridad establecidas para dichas instalaciones.

Durante el cultivo en la zona de liberación deberán mantenerse medidas destinadas a evitar la dispersión de polen y semillas. Dependiendo de las características de la especie y de la modificación genética, estas medidas pueden incluir distancias de aislamiento,

eliminación de inflorescencias, embolsado de estructuras reproductivas, barreras físicas u otras estrategias.

El acceso a la zona de liberación debe estar restringido al personal autorizado. Las personas que participen en las actividades deberán haber recibido formación adecuada sobre las características del OMG, los procedimientos establecidos para el ensayo y las medidas de actuación en caso de incidencia.

Los residuos vegetales generados durante el cultivo, incluyendo restos de poda o despunte, plantas eliminadas, semillas y biomasa obtenida en la cosecha que no vaya a utilizarse posteriormente, deberán gestionarse mediante procedimientos que garanticen su inactivación y eviten su propagación, como la incineración u otros procedimientos autorizados. Del mismo modo, la maquinaria, herramientas, recipientes y demás equipos utilizados en contacto con el cultivo deberán someterse a procedimientos de limpieza que impidan el transporte accidental de semillas o material vegetal modificado fuera de la zona autorizada.

REQUISITOS DE LA PARCELA DE ENSAYO

La parcela destinada a la liberación debe seleccionarse teniendo en cuenta la presencia de especies cultivadas o silvestres sexualmente compatibles y el posible riesgo de transferencia de polen. Cuando sea necesario, se establecerá una distancia de aislamiento suficiente respecto a plantas compatibles, complementada con otras medidas de contención cuando las características de la especie o del ensayo así lo requieran.

SEGUIMIENTO DURANTE Y DESPUÉS DEL ENSAYO

Durante todo el periodo de cultivo debe realizarse un seguimiento periódico de la parcela para comprobar el correcto desarrollo del ensayo, el cumplimiento de las medidas de bioseguridad y la ausencia de acontecimientos inesperados. Cualquier incidencia que pueda implicar un riesgo de dispersión o un incumplimiento de las condiciones autorizadas deberá documentarse y gestionarse conforme al protocolo establecido.

Una vez finalizada la liberación, deberá realizarse un seguimiento post-liberación de la parcela durante el periodo establecido en la autorización, destinado principalmente a detectar y eliminar plantas voluntarias o rebrotes procedentes del cultivo modificado genéticamente. Durante este periodo deberán mantenerse las condiciones necesarias para facilitar la detección de posibles plantas remanentes. Cuando no se realice una nueva liberación autorizada en la misma parcela, podrá ser necesario mantener el terreno en barbecho o cultivar especies sexualmente incompatibles con el OMG utilizado en el ensayo.

R4: Guía de procesamiento y extracción de taumatina. CTAEX

La identificación y cuantificación de la taumatina se ha realizado haciendo uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La detección se ha llevado a cabo mediante un detector DAD a la longitud de onda que ha presentado mejor resolución y menor interferencias. Se ha utilizado una fase móvil basada en agua y acetonitrilo en condiciones de gradiente optimizadas para favorecer la separación de la taumatina.

La identificación de esta proteína presente en las semillas de tabaco se ha realizado mediante la comparación del tiempo de retención de las muestras con el correspondiente

patrón externo. Asimismo, la cuantificación se realizó mediante una recta de calibrado elaborada a partir de diferentes concentraciones del patrón de taumatina, expresando los resultados en mg/kg.

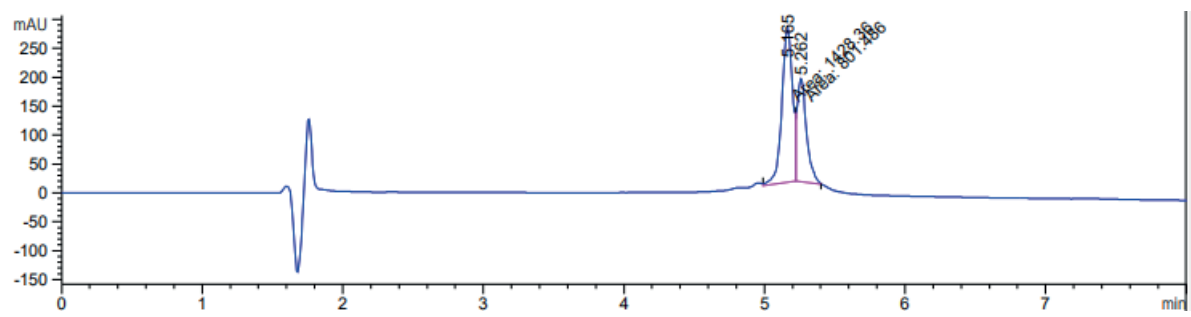


Ilustración 1: Cromatograma cuantificación patrón taumatina 300 ppm

Las variedades que se han analizado son las provenientes de las cosechadas por Olivos de Badajoz en las dos campañas de duración del proyecto.

MUESTRA	
S-7	100% necesidades de riego y 0% necesidades nutricionales
S-8	100% necesidades de riego y 100% de necesidades nutricionales en invernadero
S-9	100% necesidades de riego y reducción del 50% de nitrógeno
S-10	100% necesidades de riego y reducción del 25% de nitrógeno
S-11	Reducción del 50% necesidades de riego y 100% de nitrógeno
S-12	Reducción del 25 % necesidades de riego y 100% de nitrógeno
V-1	NtS 13-9/6 Variedad Samsun
V-2	NtS 137-20/8 Variedad Samsun
V-4	Burley B5

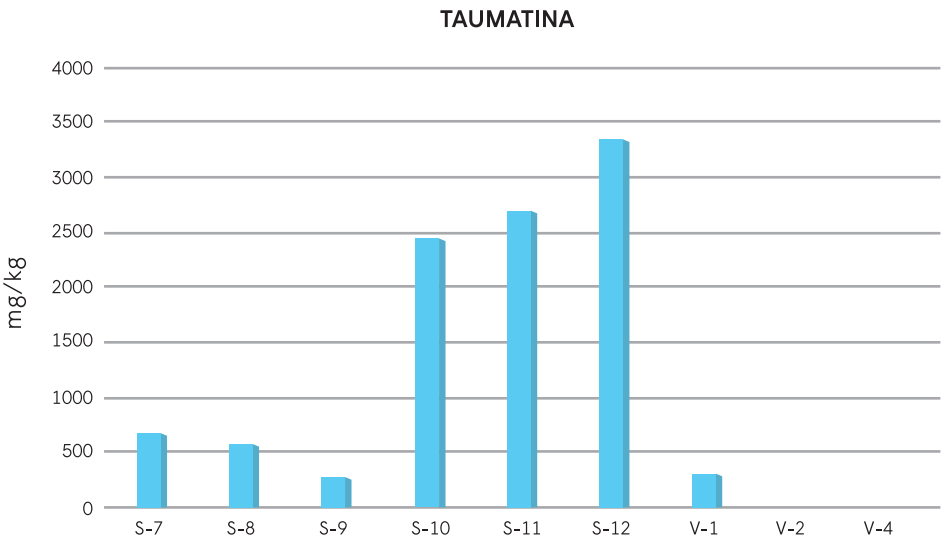
En la siguiente foto se muestran las semillas de tabaco obtenidas:



Ilustración 2. Semillas ensayo S-8

La identificación de esta proteína presente en las semillas de tabaco se ha realizado mediante la comparación del tiempo de retención de las muestras con el correspondiente patrón externo. Asimismo, la cuantificación se realizó mediante una recta de calibrado elaborada a partir de diferentes concentraciones del patrón de taumatina, expresando los resultados en mg/kg.

Los resultados de cuantificación de taumatina se representan en la siguiente gráfica:



Los resultados obtenidos muestran una elevada variabilidad en el contenido de taumatina entre los diferentes tratamientos estudiados. Las concentraciones oscilaron entre valores no detectables en las variedades V2 y V4 y un máximo de 3345,64 mg/kg en determinadas condiciones de cultivo.

Entre las muestras sometidas a distintos tratamientos agronómicos, la S-12 (reducción del 25 % de las necesidades de riego y aporte del 100 % de nitrógeno) presentó la mayor concentración de taumatina.

Estos resultados sugieren que la restricción moderada del riego, especialmente cuando se mantiene una adecuada disponibilidad de nitrógeno, favorece significativamente la acumulación de taumatina en las semillas. Este comportamiento podría estar relacionado con mecanismos fisiológicos de respuesta al estrés hídrico, los cuales inducen la expresión de proteínas relacionadas con la defensa vegetal, entre las que se encuentran las proteínas tipo taumatina (Thaumatococin-Like Proteins, TLPs).

Cabe destacar que el porcentaje total de proteína de las semillas fue relativamente constante en todas las muestras, (entre 23 % y 26 %) por lo que las diferencias observadas en el contenido de taumatina no parecen estar asociadas a variaciones globales en la cantidad de proteína acumulada en la semilla, sino a cambios específicos en la expresión y acumulación de esta proteína concreta.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que tanto las condiciones de cultivo como el material vegetal empleado influyen de forma decisiva en la producción de taumatina. Los tratamientos que combinaron una disponibilidad adecuada de fertilización

con el aporte de nitrógeno con una reducción moderada de las necesidades hídricas mostraron el mayor potencial para incrementar la acumulación de taumatina en semillas de tabaco, lo que resulta una información de interés para el desarrollo de estrategias de producción encaminadas a maximizar el rendimiento en el contenido de esta proteína con poder edulcorante.

R5: Guía de prácticas de cultivo de tabaco con alto contenido en anatabina. CTAEX y Madeinplant

Los ensayos de campo se plantearon en dos zonas geográficas con condiciones edafoclimáticas diferentes, Badajoz y Valencia, para optimizar el cultivo en distintas localizaciones.

ENSAYO DE CAMPO EN BADAJOZ. CTAEX.

El objetivo del ensayo fue analizar el efecto de diferentes estrategias de fertilización, riego, fechas de siembra y marcos de plantación sobre el desarrollo vegetativo de dos variedades de cultivo, Anatabina y Wildtype, midiendo altura y número de hojas en dos fechas clave del ciclo. En el momento de la recolección se cosecharon 6 plantas, de cada parcela experimental, representativas enteras, cortando cada planta por abajo. De cada planta se deshojaron las 6 hojas inferiores, que se pesaron, y se desecharon. Se deshojaron el resto de las hojas de la parte superior de la planta, que fueron pesadas, y se llevaron al invernadero para el secado.



Ilustración 3. Estado general de las parcelas del ensayo

ENSAYO FECHAS DE SIEMBRA

En los siguientes gráficos se muestran los resultados de peso medio de las hojas superiores por planta y peso medio de la planta entera para cada uno de los tratamientos evaluados en el ensayo de Fechas de Siembra.

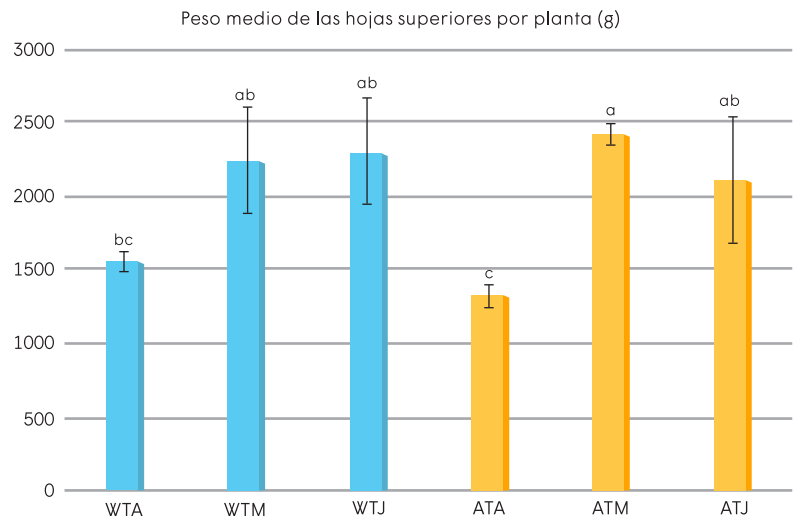


Ilustración 4. Peso medio de las hojas superiores por planta (g).

La variedad Anatabina mostró el valor más alto de peso medio de las hojas superiores por planta, siendo superior de forma significativa a las parcelas WTA y ATA. Esta misma tendencia se observa para el peso medio de la planta entera, destacando el tratamiento ATM. En este caso se observa que para la variedad Anatabina, la fecha de siembra influye en la cantidad de biomasa generada de forma significativa, mientras que para la variedad WT esta influencia no es tan acusada.

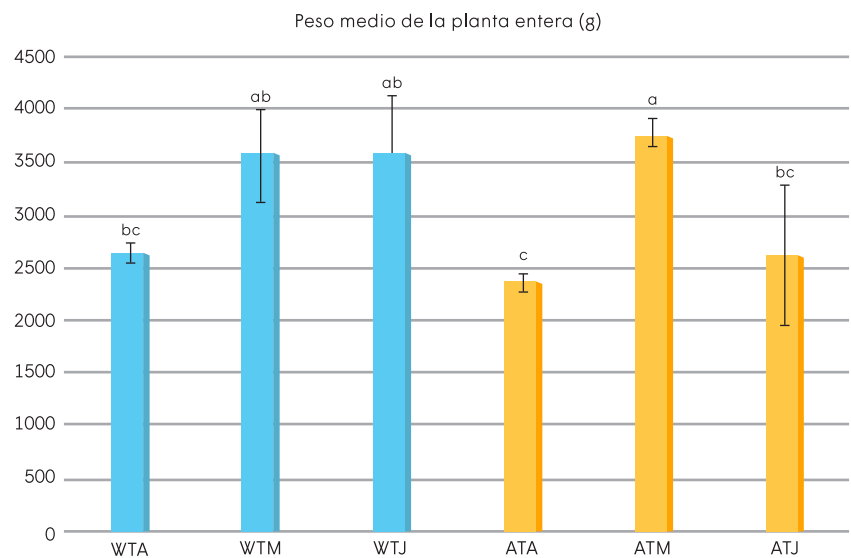


Ilustración 5. Peso medio de la planta entera (g)

De estos resultados se deduce que la fecha de siembra influye en la biomasa obtenida.

ENSAYO MARCOS DE PLANTACIÓN

Las variedades Wild Type y Anatabina plantadas con marco de plantación de 17.793 pl/ha mostraron el mayor peso medio de hojas superiores y peso medio de planta entera. Estos valores fueron superiores de forma significativa a las variedades plantadas con marcos de plantación de 20.000 y 26.666 pl/ha.

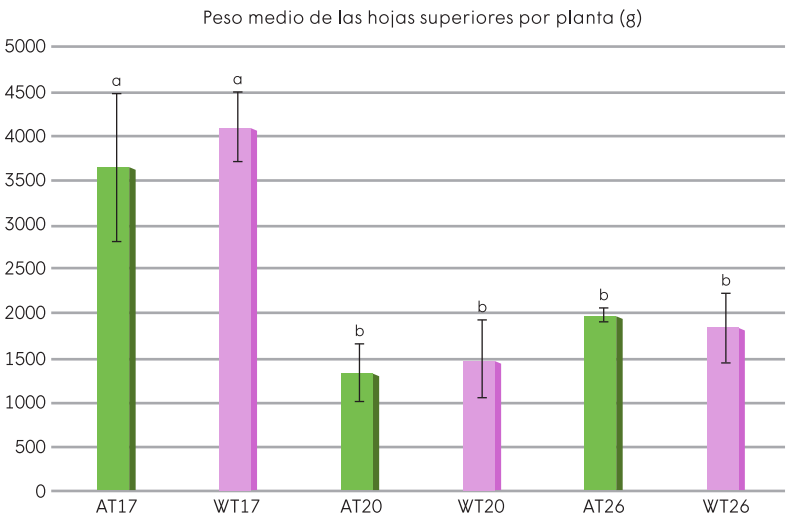


Ilustración 6. Peso medio de las hojas superiores por planta (g).

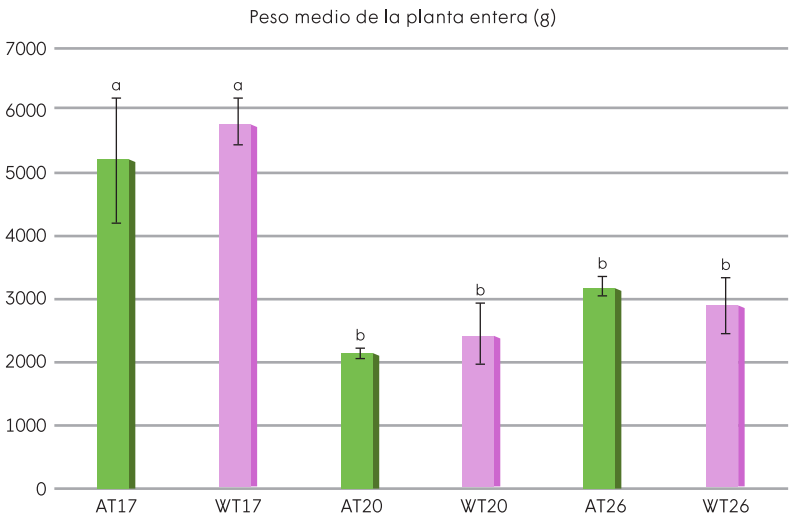


Ilustración 7. Peso medio de la planta entera (g).

El marco de plantación tuvo una influencia decisiva en la obtención de biomasa.

ENSAYO DE FERTILIZACIÓN

Los resultados de biomasa obtenidos de las parcelas con diferentes tratamientos fertilizantes, regadas al 100 % de las necesidades del cultivo, no se aprecian diferencias significativas para el peso medio de las hojas superiores. En cambio, para el peso medio por planta se observa que las plantas de la parcela A12 mostraron valores significativamente inferiores a las parcelas W13 y W14.

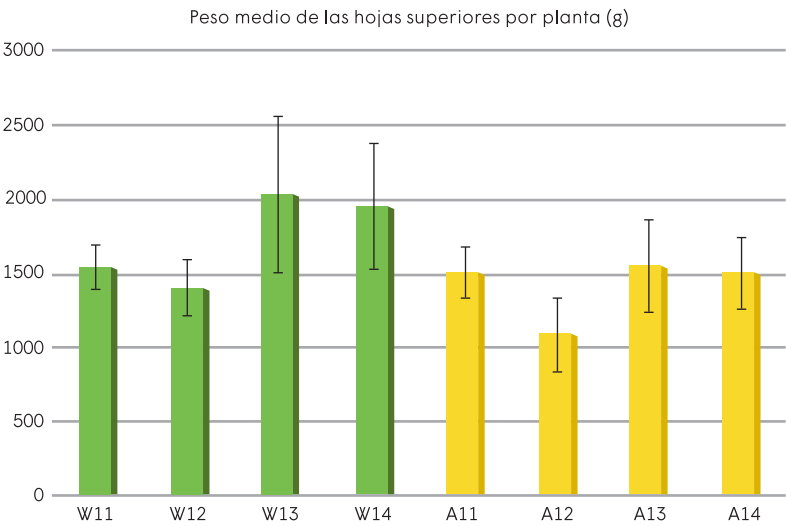


Ilustración 8. Peso medio de las hojas superiores por planta (g) de las parcelas regadas al 100 %.

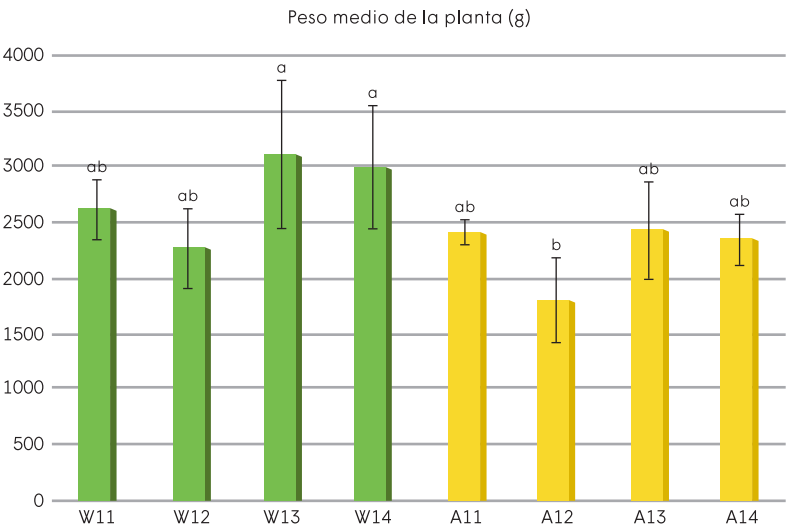


Ilustración 9. Peso medio de planta (g) de las parcelas regadas al 100 %.

Las parcelas de la variedad Wild Type mostraron mayores valores respecto a las parcelas de la variedad Anatabina. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos fertilizantes aportados, en ninguna de las dos variedades. Esta misma tendencia es la que se observa para el peso medio de la planta entera.

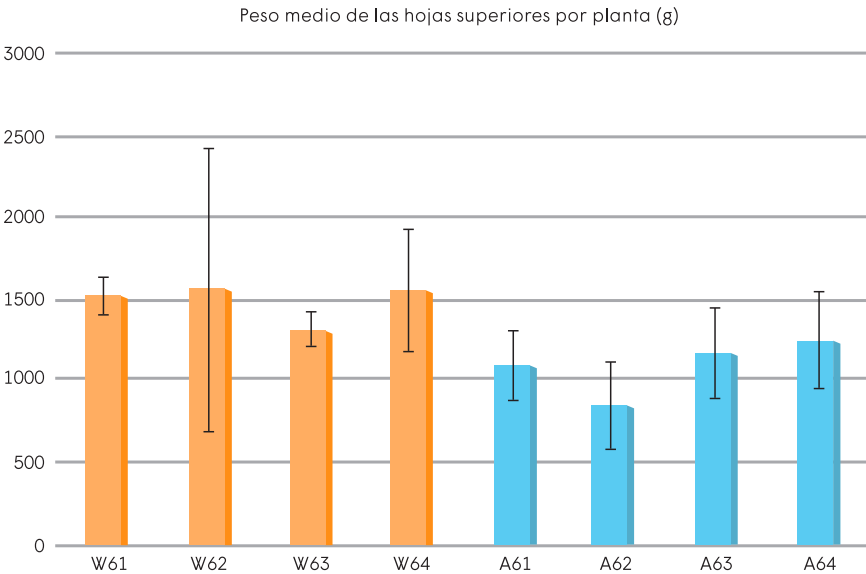


Ilustración 10. Peso medio de las hojas superiores de las parcelas regadas al 67 %.

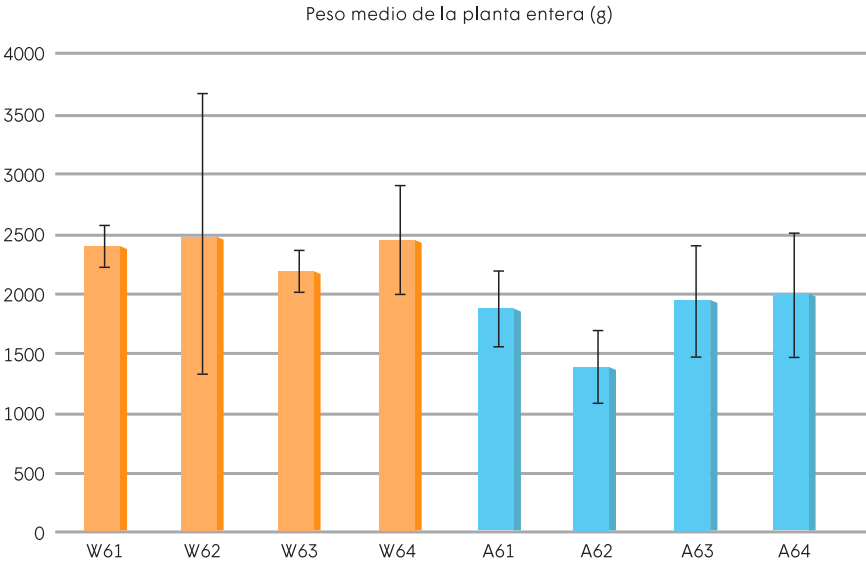


Ilustración 11. Peso medio de la planta entera de las parcelas regadas al 67 %.

ENSAYO DE ESTRATEGIAS DE RIEGO

La variedad Anatabina presentó los mejores resultados de producción de biomasa regada al 100 % de las necesidades del cultivo, y con una dotación de Nitrógeno de 120 N. A pesar de que no se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos de este ensayo, las parcelas regadas al 100 % mostraron mejores valores de biomasa que las que se regaron al 67 %.

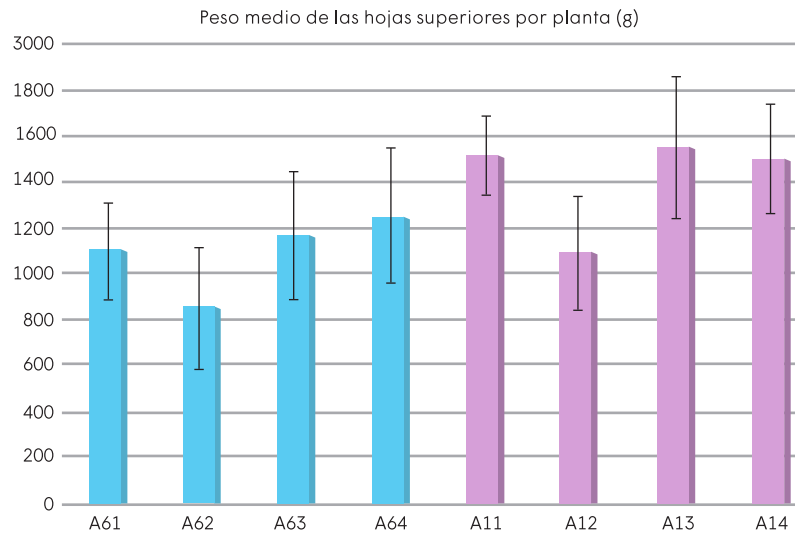


Ilustración 12. Peso medio de las hojas superiores de las parcelas

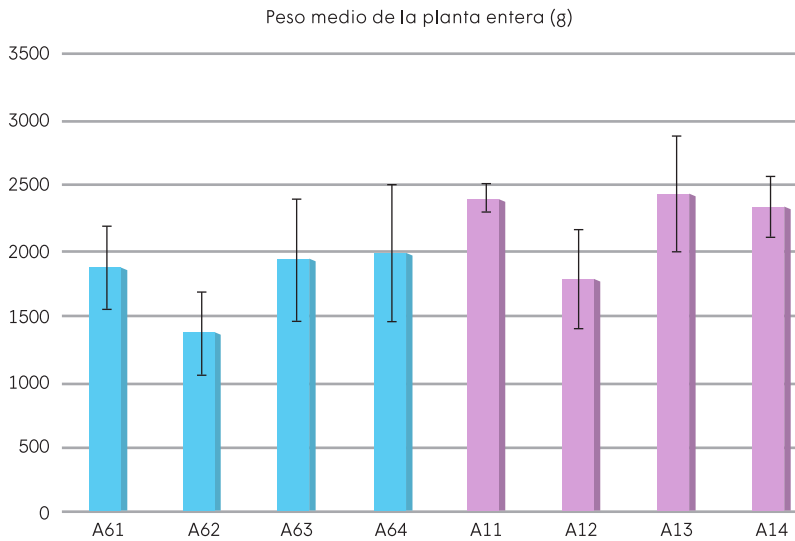


Ilustración 13. Peso medio de la planta entera de las parcelas de la variedad Anatabina.

Analizando la respuesta de la variedad Wild Type a las dos estrategias de riego establecidas en este ensayo se observa el mismo patrón que para la variedad Anatabina, aunque las diferencias entre los dos sistemas de riego son menores, y tampoco se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos ensayados.

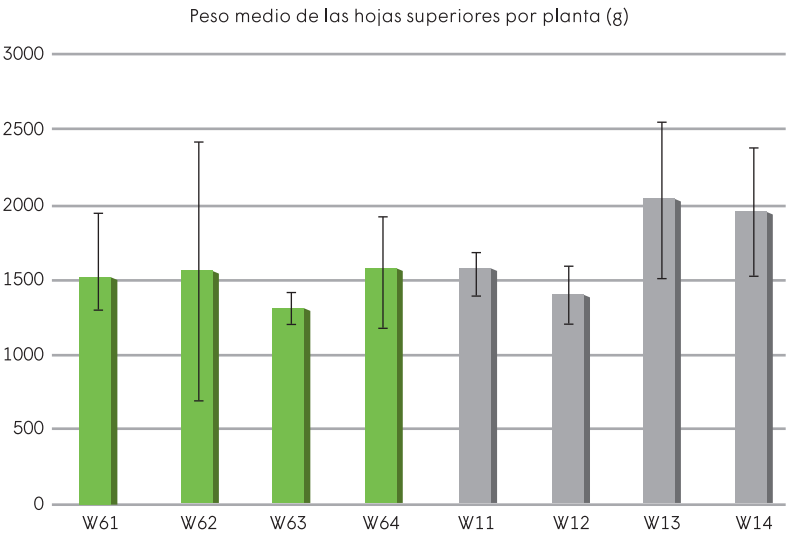


Ilustración 14. Peso medio de las hojas superiores de las parcelas de la variedad Wild Type.

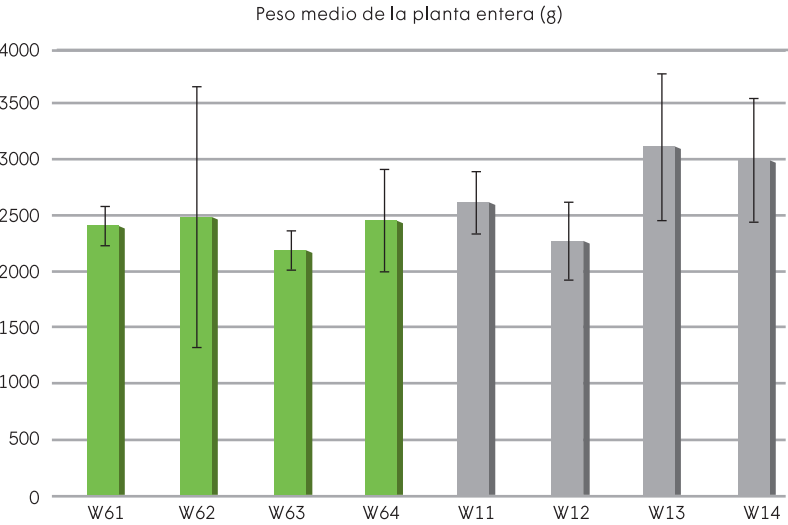


Ilustración 15. Peso medio de la planta entera de las parcelas de la variedad Wild Type.

ENSAYO DE CAMPO EN VALENCIA. MADEINPLANT.

Madeinplant llevó a cabo en 2025 un ensayo de campo en Valencia con la misma variedad productora de anatabina (MPO) y la variedad wild type (WT). El objetivo fue evaluar la influencia de diferentes prácticas de cultivo sobre el desarrollo agronómico de las plantas y sobre la acumulación de anatabina, estudiando tres marcos de plantación, dos estrategias de riego, cuatro niveles de fertilización nitrogenada y tres fechas de siembra.



Ilustración 14. Ensayo realizado por Madeinplant en Valencia

En el momento de la cosecha se tomaron muestras foliares de las distintas parcelas para su secado en condiciones controladas y determinación de su contenido en alcaloides. Para evaluar el efecto de los tratamientos agronómicos, se cosecharon tres plantas representativas por parcela experimental, con tres parcelas réplica por tratamiento. En cada planta se determinaron la altura, el peso fresco de la planta completa y el peso fresco de las hojas aprovechables, excluyendo el tallo y las hojas inferiores. Tras el secado de la biomasa en invernadero, se determinó también el peso seco de las plantas cosechadas.

Ensayo de marcos de plantación

Se evaluaron tres marcos de plantación: $1,5 \times 0,5$ m, $1 \times 0,75$ m y $1,5 \times 0,33$ m. Los resultados no mostraron un efecto claro del marco de plantación sobre la altura o la biomasa de las plantas. En términos generales, las plantas WT presentaron mayor biomasa que las plantas MPO en los diferentes marcos evaluados. Las plantas MPO cultivadas con el marco más denso mostraron un valor inferior de peso fresco de las hojas. No obstante, estas plantas fueron recolectadas más tarde durante la jornada y habían sufrido una mayor pérdida de humedad antes de efectuar la pesada.

Con los datos disponibles no puede establecerse un efecto concluyente del marco de plantación sobre la producción de biomasa.

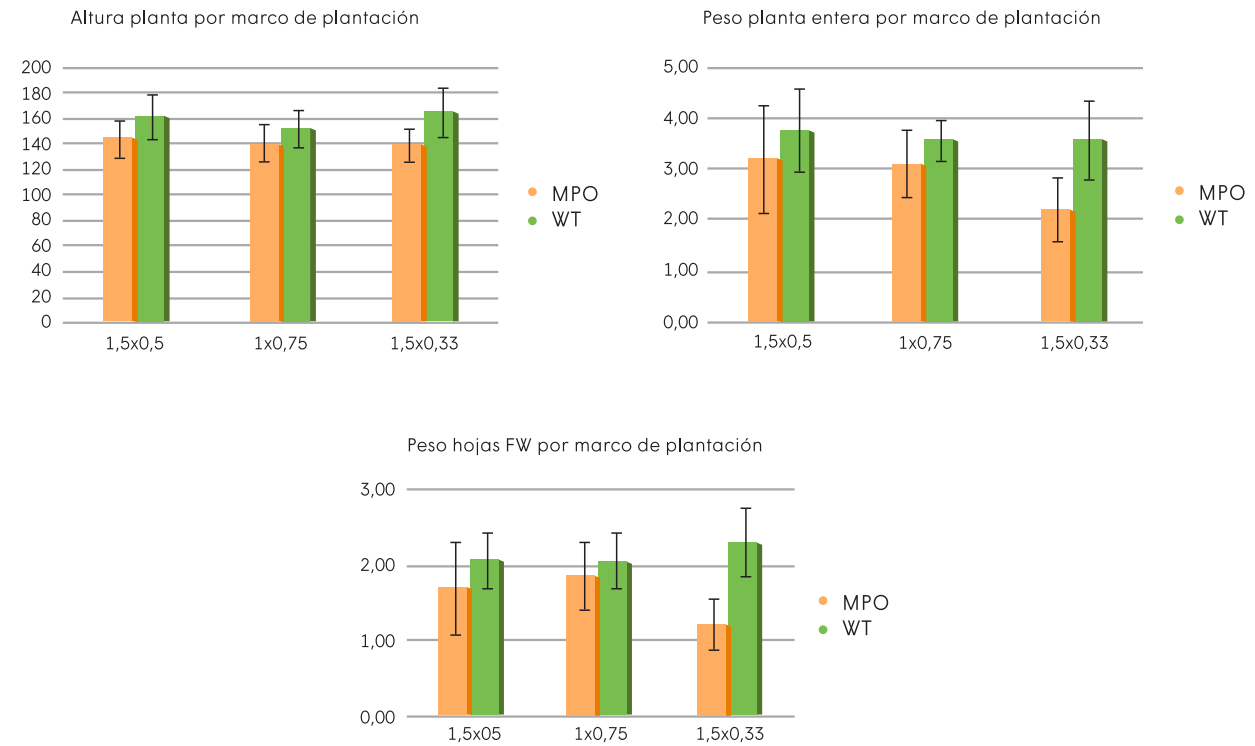


Ilustración 15. Altura, peso medio de la planta entera y peso fresco de hojas para los diferentes marcos de plantación evaluados en el ensayo de Valencia.

Ensayo de fertilización y riego

Se estudiaron cuatro niveles de fertilización nitrogenada, correspondientes a 90, 120, 150 y 180 N, manteniendo constantes los aportes de fósforo y potasio. No se observó una respuesta progresiva o consistente de la altura, el peso de la planta completa o la biomasa foliar al incremento de la fertilización nitrogenada. La variabilidad entre plantas fue elevada y ninguno de los niveles de fertilización evaluados mostró una ventaja clara para la producción de biomasa de la variedad MPO. Para cada nivel de fertilización se compararon dos aportes de agua correspondientes al 100 % y al 67 % de las necesidades estimadas del cultivo.

En términos generales, las parcelas regadas al 100 % mostraron una tendencia a mayor biomasa que las sometidas a riego reducido, aunque la elevada variabilidad observada impidió identificar una respuesta uniforme para todos los niveles de fertilización.

De forma general, las plantas WT presentaron valores superiores de altura y biomasa respecto a las plantas MPO en la mayoría de las condiciones evaluadas.

En las condiciones del ensayo de Valencia no pudo identificarse una combinación específica de riego y fertilización que produjera una mejora clara del desarrollo agronómico de las plantas de tabaco.

Con los datos disponibles no puede establecerse un efecto concluyente del marco de plantación sobre la producción de biomasa.

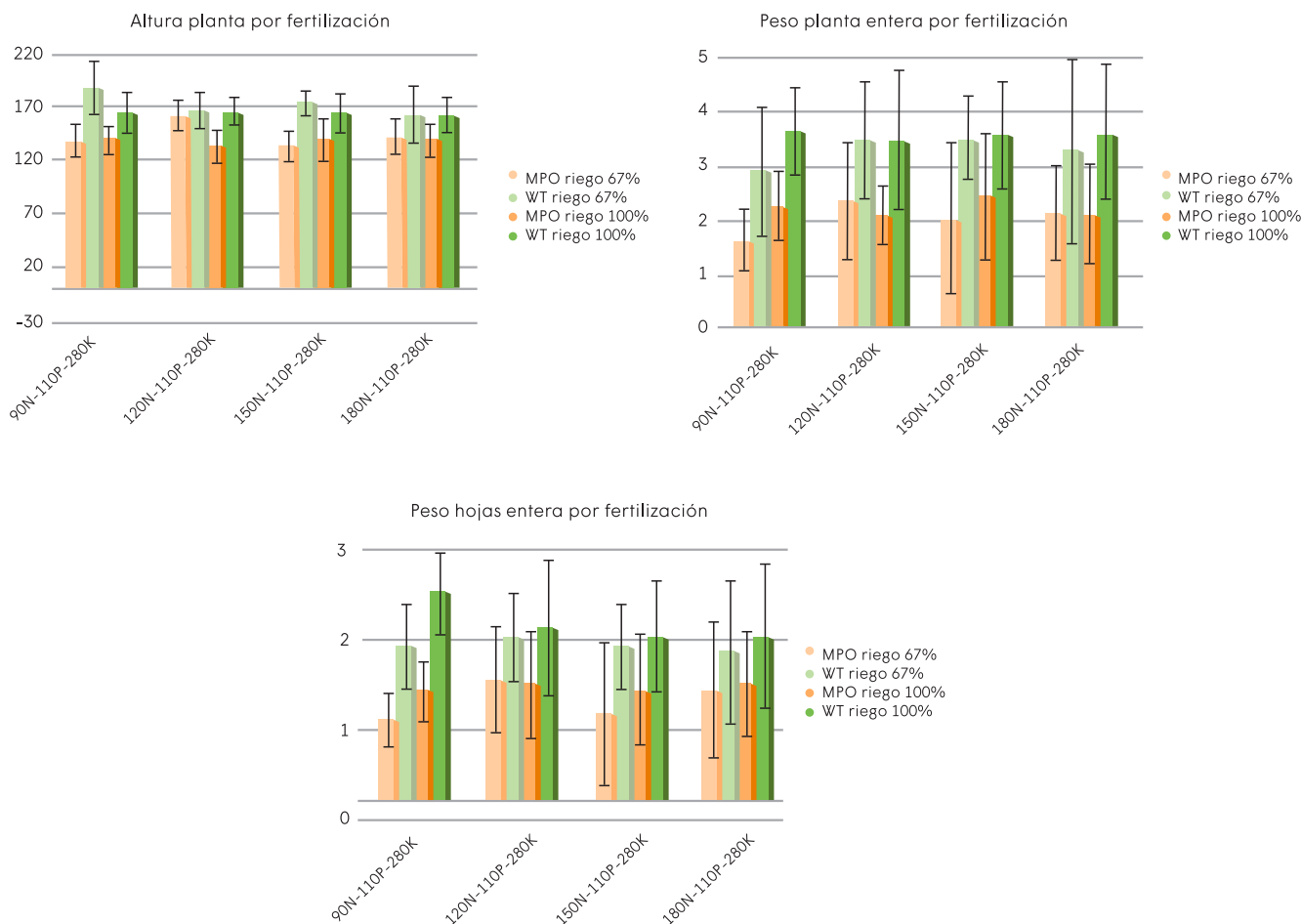


Ilustración 16. Altura, peso medio de la planta entera y peso fresco de hojas para los diferentes tratamientos de fertilización y riego.

Ensayo de fechas de siembra

Se establecieron tres fechas de siembra. La tercera siembra, tuvo que repetirse debido a la mortalidad de las plantas causada por las elevadas temperaturas en el invernadero. Las plantas correspondientes a las dos primeras fechas presentaron un desarrollo agronómico relativamente similar en términos de altura. En la línea MPO, la segunda fecha presentó una tendencia a una mayor producción de biomasa que la primera. Por el contrario, las plantas correspondientes a la tercera fecha mostraron una reducción marcada de la altura, el peso de la planta completa y el peso fresco de las hojas.

Por lo tanto, se puede concluir que, en las condiciones climáticas de Valencia, es recomendable evitar fechas de siembra que desplacen la producción de planta a los meses de mayor temperatura.

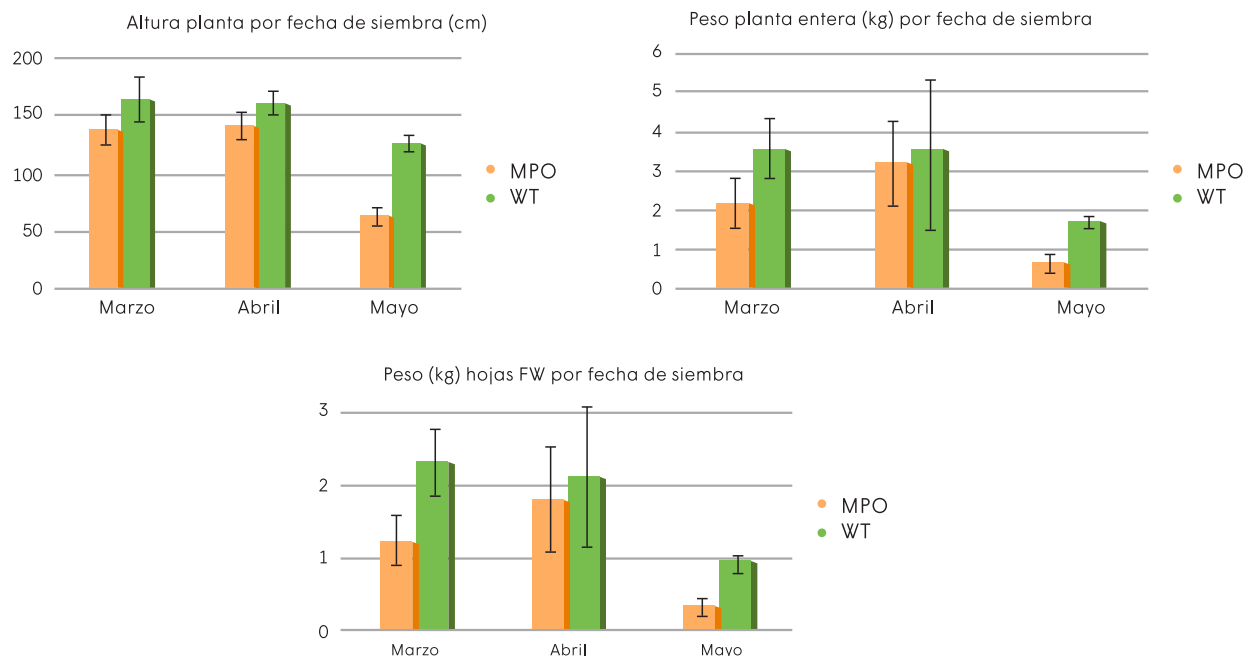


Ilustración 17. Altura, peso medio de la planta entera y peso fresco de hojas para las tres fechas de siembra.

Determinación del contenido en alcaloides

Las muestras obtenidas en los diferentes tratamientos fueron analizadas para determinar su contenido en nicotina y anatabina. En todas las condiciones evaluadas, las plantas MPO presentaron niveles de nicotina muy bajos o no detectables, en concordancia con el fenotipo esperado para esta línea.

En el caso de la anatabina, la mayoría de las muestras MPO presentaron concentraciones inferiores a las obtenidas en ensayos anteriores. Excepto en una muestra, correspondiente a la tercera fecha de siembra, que alcanzó un contenido de 0,244 % de anatabina (2,44 mg/g), comparable a valores obtenidos previamente para esta línea.

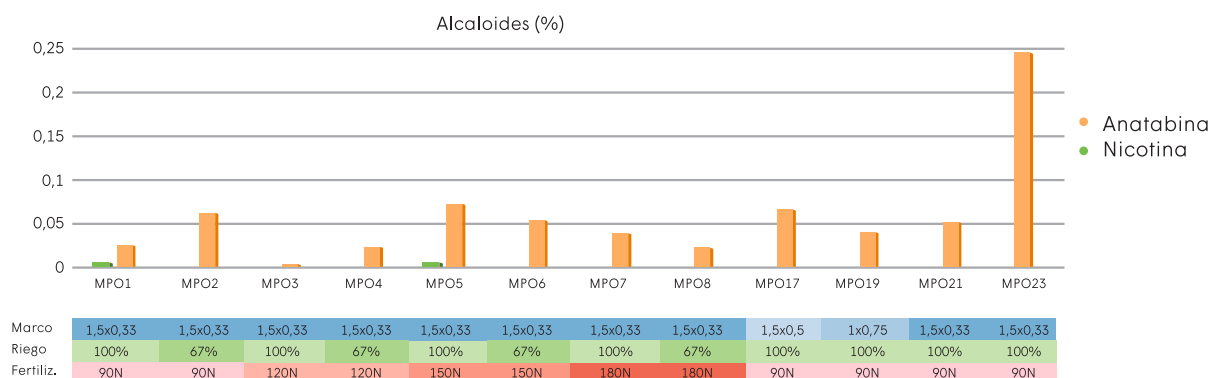


Ilustración 18. Contenido de nicotina y anatabina en la variedad MPO en las diferentes condiciones analizadas.

R6: Guía de procesamiento y extracción de anatabina IDOASIS

IDOASIS ha abordado esta fase desde el acondicionamiento de la biomasa hasta la obtención de una fracción enriquecida en anatabina. El objetivo ha sido definir un procedimiento reproducible que preserve los compuestos de interés tras la cosecha y que permita posteriormente su extracción, separación y purificación.

ACONDICIONAMIENTO DE LA BIOMASA

En el primer periodo se estudió el efecto del secado y de la molienda sobre el contenido de alcaloides. El secado al aire y el secado en horno a 70 °C durante 12 horas dieron contenidos comparables de nicotina y anatabina. En concreto, la anatabina se situó en $0,183 \pm 0,012$ mg/g tras secado al aire y en $0,159 \pm 0,011$ mg/g tras secado en horno. Estos resultados muestran que el alcaloide tolera estas condiciones de secado; no obstante, para el desarrollo posterior del proceso se priorizaron condiciones suaves, con secado al aire y evitando temperaturas superiores a 40 °C, con objeto de preservar también otras fracciones fitoquímicas de interés.

La reducción excesiva del tamaño de partícula sí mostró un efecto desfavorable. El corte de extracción, alrededor de 5 mm, mantuvo valores de nicotina y anatabina similares a los de la hoja entera, mientras que la micronización redujo aproximadamente a la mitad el contenido de ambos alcaloides. Por este motivo, el procedimiento propuesto evita la micronización previa y utiliza un corte grueso de la biomasa.

CONTROL ANALÍTICO Y SELECCIÓN DE MUESTRAS

Para el seguimiento del proceso se optimizó un método de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) a partir del método CORESTA nº 62. El método de referencia resultaba adecuado para nicotina, pero presentaba sensibilidad y resolución insuficientes para los alcaloides minoritarios. La modificación del modo de inyección, el aumento del volumen de muestra y la optimización del gradiente de temperatura permitieron separar y cuantificar en un único análisis de 17 minutos nicotina, nornicotina, miosmina, anabasina, anatabina y cotinina.

Los resultados analíticos se utilizaron para seleccionar la materia prima más adecuada para las etapas posteriores. En el primer periodo, las muestras de la línea productora de anatabina mostraron una marcada reducción de nicotina respecto a la línea wild type y, en varias condiciones, una relación anatabina/nicotina muy favorable. Las muestras A11, A12 y A13 destacaron por combinar contenidos elevados de anatabina con una baja presencia de nicotina, circunstancia especialmente relevante para facilitar la separación posterior de ambos alcaloides.

En el segundo periodo se analizaron las muestras procedentes de los ensayos de CTAEX, IBMCP y Madeinplant. Los resultados agronómicos y de contenido en alcaloides se describen en el apartado R5. Desde el punto de vista del procesamiento, estos ensayos confirmaron la importancia de controlar tanto la composición inicial de la biomasa como el tratamiento postcosecha. En los ensayos de secado de Madeinplant se descartó el tratamiento a 60 °C por no mejorar la concentración de nicotina ni anatabina y, tras comparar las alternativas estudiadas, se seleccionó el mantenimiento de la biomasa durante un mes a temperatura ambiente como el pretratamiento más favorable para concentrar los principios activos.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANATABINA

Sobre la biomasa seleccionada se desarrolló una ruta de extracción hidroalcohólica seguida de etapas de fraccionamiento líquido-líquido basadas en el comportamiento ácido-base de los alcaloides. El cambio controlado de pH permite desplazar los alcaloides entre las fases acuosa y orgánica y separar progresivamente la fracción alcaloidea del resto de componentes de la planta.

La aplicación de este procedimiento permitió obtener una fracción de anatabina con una pureza superior al 90 % y una recuperación aproximada del 55 % del contenido inicial. En conjunto, los resultados permiten proponer como guía de procesamiento una secuencia basada en secado suave, corte grueso de la hoja, control analítico de la biomasa, extracción hidroalcohólica y fraccionamiento selectivo por cambio de pH hasta la obtención de la fracción enriquecida en anatabina.

R7: Maximización del proceso de biorrefinería (residuo cero) IDOASIS

El segundo objetivo de IDOASIS ha sido integrar la obtención de anatabina en un esquema de aprovechamiento más amplio de la biomasa de tabaco. El planteamiento seguido es el de una biorrefinería en cascada: el compuesto diana se recupera en las primeras etapas y las corrientes restantes se mantienen separadas para conservar su posible valor como coproductos. Este enfoque da continuidad al concepto de valorización integral de *Nicotiana* explorado en trabajos previos y lo adapta a las materias primas y condiciones ensayadas en AGROFACTORY.

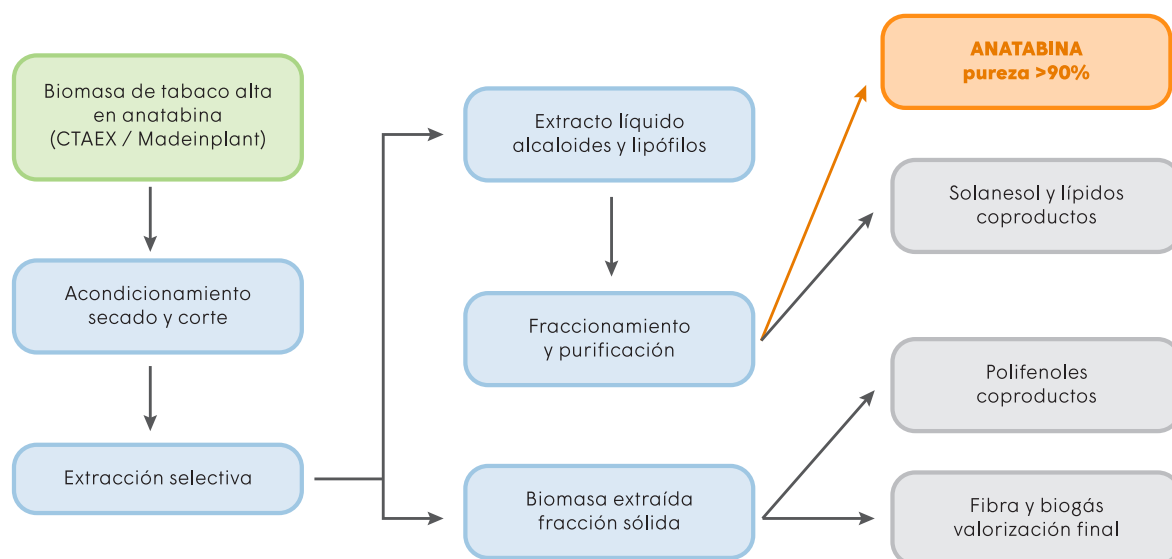
CARACTERIZACIÓN Y CRITERIO DE FRACCIONAMIENTO

La biomasa de tabaco constituye una matriz compleja en la que, además de los alcaloides, están presentes compuestos fenólicos, carotenoides, solanesol y otros componentes lipofílicos, junto con una fracción sólida rica en fibra y otros constituyentes estructurales. Por ello, las decisiones de acondicionamiento y extracción se tomaron considerando no sólo el rendimiento en anatabina, sino también la conservación de estas fracciones para evitar pérdidas de valor en las etapas iniciales del proceso.

El proceso se diseñó para generar dos corrientes principales tras la extracción selectiva: un extracto líquido que concentra alcaloides y compuestos lipofílicos y una biomasa extraída que conserva la fracción sólida. A partir del extracto líquido se realiza el fraccionamiento y la purificación de la anatabina, manteniendo separadas otras fracciones con interés potencial, principalmente solanesol y lípidos. La biomasa extraída puede, a su vez, servir de punto de partida para la recuperación de polifenoles y para otras vías de valorización de la fracción fibrosa.

MODELO PROPUESTO DE BIORREFINERÍA

El esquema final prioriza la obtención de anatabina como producto de mayor valor añadido, pero evita plantear el resto de la planta como un residuo. Tras el acondicionamiento y la extracción, las diferentes corrientes se orientan hacia productos o coproductos diferenciados. En el caso de la fracción sólida, la fibra y su posible valorización energética mediante biogás se consideran vías finales de aprovechamiento, siguiendo el principio de maximizar el uso de la biomasa disponible.



CONCLUSIONES DEL PROCESO DE BIORREFINERÍA

Los resultados obtenidos permiten definir una ruta integrada para el aprovechamiento de la variedad de tabaco con alto contenido en anatabina. La modificación del perfil de alcaloides de la línea MPO, caracterizada por una fuerte reducción de nicotina, facilita el posterior enriquecimiento en anatabina y reduce la complejidad de la separación. A su vez, el control del secado y del tamaño de partícula resulta determinante para mantener el rendimiento de extracción y conservar otras fracciones de interés.

El resultado final es un modelo de biorrefinería en el que la obtención de anatabina con pureza superior al 90 % se integra con la separación de corrientes potencialmente valorizables de solanesol y lípidos, polifenoles y biomasa fibrosa. De esta forma, el proceso desarrollado en AGROFACTORY no se limita a la recuperación de un único compuesto, sino que establece una base técnica para el aprovechamiento integral de la biomasa de tabaco biofactoría y para su futura adaptación a una escala de producción superior.

R8: Manual de trazabilidad de NGTs. Madeinplant, IBMCP

El Reglamento (UE) 2026/1388, en vigor desde el 16 de julio de 2026 y aplicable a partir del 17 de julio de 2028, establece un marco específico para plantas obtenidas mediante mutagénesis dirigida o cisgénesis —incluida la intragénesis— que no contengan material genético procedente de fuera del acervo genético utilizable en mejora convencional. El reglamento distingue dos categorías de plantas NGT. Las plantas NGT de categoría 1 son aquellas que cumplen los criterios de equivalencia a plantas que podrían aparecer de forma natural o mediante mejora convencional y no incorporan determinados rasgos excluidos, expresamente. Las plantas NGT de categoría 2 son aquellas que no cumplen los criterios de categoría 1 y quedan sometidas a requisitos regulatorios más próximos al régimen OMG.

Las dos variedades de tabaco biofactoría objeto de este proyecto, productoras de anatabina y de taumatina, estarán sujetas, por tanto, a regímenes jurídicos distintos una vez resulte aplicable el nuevo Reglamento.

Variedad	Origen	Régimen aplicable durante el proyecto	Régimen aplicable tras la aplicación del Reglamento 2026/1388	Implicación
Anatabina	Edición génica CRISPR (proyecto Newcotiana, IBMCP-CSIC). Seis mutaciones dirigidas en genes MPO	OMG. Ley 9/2003, Directiva 2001/18/CE y Reglamento 1829/2003	Candidata a vegetal NTG de categoría 1	Requiere procedimiento de verificación y etiquetado NGT-1
Thaumatina II	ADN recombinante (Nambawan)	OMG. Ley 9/2003, Directiva 2001/18/CE y Reglamento 1829/2003	OMG. Fuera del ámbito del Reglamento NTG	Permanece bajo Ley 9/2003, Directiva 2001/18/CE y Reglamento 1829/2003

Para el procedimiento de verificación de NGT categoría 1 es fundamental la trazabilidad. Sin embargo, los trabajos desarrollados por la European Network of GMO Laboratories (ENGL) y el Joint Research Centre (JRC) han puesto de manifiesto que en determinadas plantas NTG es posible detectar una modificación pero no es posible determinar exclusivamente mediante el análisis molecular si dicha modificación se originó mediante una técnica NGT, mediante mejora convencional o de forma espontánea.

Por ello, la trazabilidad de una planta NGT debe combinar trazabilidad documental y trazabilidad analítica, estableciendo genealogía del material, registro de la edición, evidencia molecular, identificadores únicos, control de lotes, información regulatoria y, cuando sea técnicamente posible y pertinente, métodos analíticos de identificación.

En el marco del proyecto se ha elaborado, a modo de ejercicio exploratorio, un manual de trazabilidad de plantas NGTs que identifica qué información sería conveniente registrar desde las primeras etapas de desarrollo de una planta NGT para facilitar su trazabilidad y, en su caso, la preparación de una futura solicitud de verificación como planta NGT de categoría 1. El manual tiene carácter orientativo y no vinculante.

INFORMACIÓN PROPUESTA PARA EL SISTEMA DE TRAZABILIDAD:

BLOQUE	INFORMACIÓN A REGISTRAR
A. Identificación genética	Región o locus editado; versión del genoma de referencia; coordenadas genómicas, secuencia de referencia y secuencia editada, tipo y tamaño de modificación, zigosidad, copias o alelos afectados, primers y sondas utilizados, método de confirmación.
B. Proceso de edición	Técnica NGT utilizada, secuencia de guía, constructos, reactivos o complejos empleados, método de introducción en la célula, protocolo o referencia interna, regenerante o evento de origen, información sobre el material genético utilizado de forma transitoria durante el proceso
C. Genealogía	Material parental, generación, cruces o autofecundaciones realizadas, segregación observada, código inequívoco de cada línea, fechas, responsable de cada etapa, criterios utilizados para la selección de plantas
D. Validación molecular	Resultados de Sanger, NGS o WGS; archivos de datos brutos; controles parentales; evidencia de ausencia de material genético exógeno procedente del proceso de edición; evaluación de modificaciones no previstas cuando proceda
E. Rasgo	Rasgo pretendido; relación entre modificación genética y fenotipo; métodos utilizados para su caracterización; resultados fenotípicos y evaluación de su situación respecto de los rasgos excluidos o criterios establecidos en el Reglamento
F. Cultivo y producción	Origen del material utilizado; instalación o localización de cultivo; identificación de lotes; cosechas; cantidades producidas; stocks disponibles; condiciones de almacenamiento y mantenimiento de la identidad varietal
G. Cadena de custodia	Movimientos internos, transferencias entre entidades, identidad del remitente y receptor, fecha, cantidad transferida, documentación asociada, incluidos MTA cuando proceda, condiciones de transporte y confirmación de recepción
H. Estado regulatorio	Categoría NGT prevista, fecha y contenido de la solicitud, autoridad competente, decisión adoptada, número o identificador regulatorio asignado, fecha de la decisión y posibles condiciones asociadas
I. Transparencia y etiquetado	Información relativa a la condición NGT-1 del material reproductivo cuando resulte aplicable, documentación que acompaña al material, información incorporada a catálogos, registros o bases de datos y requisitos adicionales aplicables a plantas NGT de categoría 2
J. IP y confidencialidad	Patentes identificadas o declaradas; fecha de la búsqueda o revisión; información para la que se solicite tratamiento confidencial y justificación correspondiente
K. Calidad del dato	Autor y fecha del registro; versión de los documentos; software y versiones utilizadas; versión del genoma de referencia; localización de los datos primarios; control de versiones y, cuando resulte pertinente, checksum u otros mecanismos para verificar la integridad de los archivos

Conclusiones

- El cultivo de tabaco biofactoría es técnicamente viable y tiene potencial comercial.
- Se ha generado una referencia genómica de altísima calidad para *Nicotiana tabacum*.
- La variedad Anatabina es la más cercana a una futura autorización como NGT categoría 1 gracias a la entrada en vigor Reglamento (UE) 2026/1388.
- La línea Thaumatina II seguirá considerándose OMG.
- La producción de taumatina es viable en las condiciones de cultivo de Extremadura.
- El riego y el nitrógeno influyen decisivamente en la acumulación de taumatina. Un estrés hídrico moderado parece estimular la producción de taumatina sin comprometer gravemente el cultivo.
- Las condiciones recomendadas para el cultivo de taumatina son:
 - Variedad: Samsun.
 - Siembra: febrero.
 - Trasplante: abril-mayo.
 - Cosecha: agosto-septiembre.
 - Marco: 1,30 × 0,30 m.
- La fecha de siembra es el factor agronómico más importante en la producción de anatabina tanto en Badajoz como en Valencia.
- El marco de plantación influye en la producción de biomasa de hojas de tabaco.
- La línea Anatabina presenta menos vigor que la línea silvestre: menor biomasa, menor altura y menor peso foliar.
- Se ha establecido una ruta integrada para la valorización de biomasa de tabaco enriquecida en anatabina, desde su acondicionamiento postcosecha hasta la obtención de una fracción con una pureza superior al 90%.
- La trazabilidad es un elemento crítico para la comercialización.





**Cofinanciado por
la Unión Europea**



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN

Importe de ayuda 590.381,88€ cofinanciado al 80% por la Unión Europea a través del Plan Estratégico de la PAC FEADER.