

# RESUMEN DE LA NOTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE PLANTAS SUPERIORES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (ANGIOSPERMAS Y GIMNOSPERMAS)

## A. Información de carácter general

### 1. Detalles de la notificación

a) Numero de notificación: B/ES/21/02
b) Fecha de acuse de recibo de la notificación
c) Título del proyecto: Evaluación de una línea intragénica de tabaco (T33SQL49) enriquecida en escualeno. Campaña 2021.
d) Período propuesto para la liberación: 1 de Marzo de 2021 - 31 de Octubre de 2021

### 2. Notificador

(a) Nombre de la institución o empresa: <b>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas</b>
--

### 3. ¿Tiene previsto el mismo notificador la liberación de esa misma PSMG en algún otro lugar dentro o fuera la Comunidad (de acuerdo con el apartado 1 del artículo 6)?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
-----------------------------	--

En caso afirmativo, indique el código o códigos del país:

### 4. ¿Ha notificado el mismo notificador la liberación de esa misma PSMG en algún otro lugar dentro o fuera de la Comunidad?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
-----------------------------	--

En caso afirmativo, indique el número de notificación:

## B. Información sobre la planta modificada genéticamente

### 1. Identidad de la planta receptor o parental.

a) Familia: <i>Solanaceae</i>
e) Género: <i>Nicotiana</i>
f) Especie: <i>Nicotiana tabacum</i>
g) Subespecie (si procede):
Cultivar/línea de reproducción (si procede): K326
h) Nombre vulgar: tabaco

### 2. Descripción de los rasgos y características que se han introducido o modificado, incluidos los genes marcadores y las modificaciones anteriores.

La línea T33SQL49 de tabaco cv K326 se caracteriza por un aumento en el contenido de escualeno. Este aumento se ha obtenido mediante la sobre-expresión de dos de las enzimas
---

responsables de la producción de este compuesto, farnesil pirofosfato sintasa y escualeno sintasa, dirigidas a cloroplasto. Se trata de una línea intragénica en la que todas las secuencias empleadas en la modificación genética provienen del propio parental (tabaco cv K326) o de la especie sexualmente compatible *N. benthamiana*.

3. Tipo de modificación genética.

a) Inserción de material genético: si

b) Eliminación de material genético: no

c) Sustitución de una base: no

d) Fusión celular: no

e) Otro (especifíquese):

4. En caso de inserción de material genético, indique la fuente y la función prevista de cada fragmento componente de la región que se inserte.

La línea T33SQL49 es una línea intragénica.

Con el fin de aumentar los niveles de escualeno en la planta de tabaco se ha introducido la secuencia codificante de la farnesil pirofosfato sintasa y escualeno sintasa de *N. benthamiana* dirigidas por el promotor Ubi4 y el terminador Ubc de tabaco y fusionadas a la señal de tránsito a cloroplasto de la subunidad pequeña de rubisco de tabaco. La farnesil pirofosfato sintasa (fpps) y escualeno sintasa (sqs) son dos de las enzimas responsables de la síntesis de escualeno en citoplasma donde el escualeno es convertido a esteroides. El direccionamiento de estas proteínas a cloroplasto, que carece de los enzimas necesarios para catalizar la conversión de escualeno en esteroides, permite su acumulación en este compartimento celular.

Para facilitar la selección de transformantes en el proceso de transformación se ha introducido, dirigida por el promotor Ubi4 y el terminador Ubc de tabaco, la secuencia codificante de la fitoeno desaturasa (pds) de *N. benthamiana* con una mutación puntual que confiere a la planta resistencia a bajas concentraciones de norflurazon en cultivo *in vitro*.

5. En caso de eliminación u otra modificación del material genético, indique la función de las secuencias eliminadas o modificadas.

No procede

6. Descripción resumida de los métodos utilizados en la modificación genética.

**Transformación de tabaco. Generación de líneas transgénicas T0.** Las líneas de tabaco objeto de este ensayo han sido generadas mediante transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA4404). Para la transformación genética se utilizaron discos de hoja plántulas de tabaco de 6 a 8 semanas de edad germinadas en cultivo *in vitro*. Los discos se incubaron con un cultivo de agrobacterium con el plásmido de transformación durante 30 min tras lo cual se transfirieron a medio MS30B5 suplementado con las hormonas BAP y NAA. Tras cuatro días de incubación los discos fueron transferidos a medio de selección (MS30B5 suplementado con las hormonas BAP y NAA, timentina y con el herbicida norflurazon) hasta la aparición de brotes. Los brotes se desarrollaron en medio de elongación (sin hormonas). Cuando alcanzaron un desarrollo radicular adecuado se transfirieron a macetas con sustrato y se llevaron al invernadero.

**Análisis moleculares.** La presencia de los transgenes se confirmó por PCR utilizando pares de

cebadores específicos para el péptido de tránsito a cloroplasto y el gen de interés, pds, fpps o sqs. Las plantas que resultaron positivas se examinaron adicionalmente mediante Southern blot para confirmar el número de copias del inserto utilizando una sonda específica para una región de secuencia que abarca el péptido de tránsito a cloroplasto y sqs seleccionándose una línea que presenta una única inserción. El análisis de GC-MS confirmó la acumulación de escualeno en la línea intragénica.

**Generación de líneas T1.** La línea T33SQL49 se obtuvo mediante autofecundación a partir de una línea T0.

7. *Si la planta receptor o parental pertenece a una especie de árboles forestales, describa las vías y la extensión de la diseminación, así como los factores que afectan a esta.*

No procede

### C. Información sobre la liberación experimental

1. *Finalidad de la liberación (incluida toda información pertinente disponible en esta fase) como, por ejemplo: fines agronómicos, ensayo de hibridación, capacidad de supervivencia o diseminación modificada, ensayo de los efectos en los organismos diana y en los que no lo son.*

El objetivo de la presente liberación es evaluar el comportamiento agronómico de la línea intragénica T33SQL49, enriquecida en escualeno, en condiciones de cultivo estándar y su potencial como fuente de este compuesto.

2. *Localización geográfica del lugar de la liberación.*

Finca experimental de CTAEX, Villafranco del Gadiana, Badajoz.

3. *Área del lugar (m<sup>2</sup>).*

550 m<sup>2</sup>

4. *Datos pertinentes sobre liberaciones anteriores de esa misma PSMG, si los hubiera, específicamente relacionados con las repercusiones potenciales de su liberación en el medio ambiente y la salud.*

No procede

### D. Resumen del impacto ambiental potencial de la liberación de la PSMG de conformidad con el apartado D.2 del anexo II de la Directiva 2001/18/EC

*Indique, en especial, si los rasgos introducidos podrían conferir directa o indirectamente una ventaja selectiva mayor en medios ambientes naturales; explique también todo beneficio ambiental significativo esperado.*

Las modificaciones introducidas en las plantas de tabaco objeto de este ensayo no afectan a la capacidad de supervivencia de las plantas modificadas ni le confieren ninguna otra ventaja selectiva. La tolerancia al herbicida norflurazón solo se ha demostrado a concentraciones muy bajas (2µM) en cultivo *in vitro*. Este herbicida no se emplea en cultivos agrícolas en la Unión Europea. Tampoco se deriva de la modificación genética ningún riesgo para la salud humana distinto de los que presentan las plantas de tabaco convencional.

Con respecto al potencial de transferencia de genes a otras plantas, el tabaco no tiene especies silvestres compatibles en Europa. Es posible, sin embargo, la polinización cruzada de las plantas modificadas con cultivos comerciales de tabaco. Las medidas de control de riesgo descritas en la

sección siguiente sin embargo, eliminan el riesgo de transferencia.

En este ensayo se utilizarán las mismas técnicas de cultivo, gestión y cosecha que en la producción de tabaco con fines comerciales, por lo que su impacto ambiental no diferirá del de este.

**E. Descripción resumida de todas las medidas tomadas por el notificador para controlar el riesgo, incluido el aislamiento para limitar la dispersión, como, por ejemplo, propuesta de seguimiento incluido el seguimiento después de la cosecha.**

Se adoptarán las siguientes medidas:

- El traslado de las semillas desde el laboratorio al lugar de liberación se realizará en tubos debidamente sellados e identificados.
- Las plantas de tabaco modificadas se despuntarán antes de la apertura del botón floral de la inflorescencia apical y se realizará un tratamiento de control de brotes para evitar la aparición de nuevas inflorescencias, removiéndose manualmente los brotes que resistan al tratamiento. De esta forma se impide la formación tanto de polen como de semillas lo que evita el riesgo de dispersión de las plantas modificadas.
- Se mantendrá una distancia de aislamiento de 100 km entre el lugar de liberación y otras plantaciones de tabaco comercial cultivado. Esta distancia asegura que, aun en el hipotético caso de producción de polen, no exista riesgo de polinización cruzada.  
Está prevista la realización de un segundo ensayo de liberación de plantas de tabaco en las instalaciones de CTAEX por parte del mismo notificador. En este segundo ensayo se seguirán las mismas medidas de control de riesgo descritas en este apartado. Además, se mantendrá una distancia de 100 m entre los dos ensayos. Esta distancia asegura que, aun en el hipotético caso de producción de polen, no exista riesgo de polinización cruzada.
- El ensayo será monitorizado regularmente (con una frecuencia mínima semanal) por personal de CTAEX para registrar cualquier efecto adverso inesperado sobre el medio ambiente que será notificado a la autoridad competente.
- Para evitar el posible rebrote de restos vegetales que permanezcan en el terreno tras la cosecha, se realizarán pases de grada de discos que triturará los restos de raíces y tallos y los enterrará en el suelo. Se realizará además un seguimiento de la parcela durante el año siguiente a la liberación para controlar y, en su caso eliminar, potenciales rebrotes. Para facilitar esta tarea la parcela será dejada en barbecho o bien cultivada con otras especies sexualmente incompatibles.

**F. Resumen de los ensayos de campo previstos para obtener nuevos datos sobre las repercusiones de la liberación en el medio ambiente y la salud humana (si procede)**

No procede