

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/22/01
b) Fecha de acuse de recibo de la notificación
c) Título del proyecto: Evaluación del comportamiento agronómico y de la producción de taumatina-2 en plantas de tabaco cv Burley B5 derivadas (por autopolinización) de la línea transgénica estable NtB538061T0#1(T1#1T2#1T3#1), modificada genéticamente para la expresión inducible por etanol de taumatina-2.
d) Período propuesto para la liberación: 1 de Marzo de 2022 - 31 de Diciembre de 2022

2. Notificador

(a) Nombre de la institución o empresa: Nomad Bioscience GmbH

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): Burley B5
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 de tabaco objeto de este ensayo contiene en su genoma una inserción de T-DNA para la expresión inducible por etanol de la proteína edulcorante taumatina-2 de *Thaumatococcus daniellii* mediante un sistema de expresión viral. Las plantas contienen también el gen de resistencia a kanamicina, utilizado como marcador de selección.

3. Tipo de modificación genética.

a) Inserción de material genético: Si

b) Eliminación de material genético:

c) Sustitución de una base:

d) Fusión celular:

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.

El T-DNA integrado en el genoma está compuesto de los bordes derecho e izquierdo del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* y de cuatro casetes de expresión con las siguientes funciones: 1) expresión constitutiva del marcador de selección de resistencia a kanamicina en planta, 2) expresión constitutiva del activador transcripcional alcR, 3) la expresión de la proteína taumatina-2 mediante un sistema viral basado en el virus del mosaico del tabaco e inducible por etanol, y 4) la expresión inducible por etanol de la proteína del movimiento del virus del mosaico de tabaco.

El casete de expresión 1) está formado por el promotor de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, el gen de la neomicina fosfotransferasa, y el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. El casete de expresión 2) está formado por el promotor del gen *ST-LS1* de patata, la secuencia codificante de la proteína alcR de *Aspergillus nidulans* y el terminador del gen actina 2 de *Arabidopsis thaliana*. El casete de expresión 3) está formado por el promotor de la alcohol deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*, la RNA-polimerasa RNA-dependiente del virus del aclaramiento de las venas del nabo (TVCV), la secuencia codificante del péptido maduro de taumatina-2 de *Thaumatococcus daniellii* fusionada a una secuencia de direccionamiento al apoplasto de *Oryza sativa* (UniProtKB/Swiss-Prot: P02884.1), la región 3' no traducida del virus del mosaico del tabaco, y el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor. El casete de expresión 4) está formado por el promotor de la alcohol deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans*, la secuencia codificante de la proteína del movimiento del virus del mosaico de tabaco, y el terminador del gen de la octopina sintasa de *Agrobacterium*.

Todos los elementos genéticos presentes en el T-DNA han sido descritos previamente^{1, 2, 3}. Con el fin de asegurar un control preciso de la activación del replicón viral, el vector viral se ha deconstruido en dos componentes: el replicón y la proteína del movimiento (casetes de expresión 3 y 4)³; El esquema de un T-DNA análogo al utilizado en la línea transgénica objeto de esta liberación diseñado para la expresión inducible por etanol de otra proteína recombinante puede consultarse en Schulz et al. (2015)⁴.

¹ Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V & Gleba Y (2004) *In planta* engineering of viral RNA replicons : Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(18):6852-6857.

² Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V & Gleba Y (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* 23(6):718-723.

³ Werner S, Breus O, Symonenko Y, Marillonnet S & Gleba Y (2011) High-level recombinant protein expression in

transgenic plants by using a double-inducible viral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(34):14061-14066.

⁴Schulz, S. et al. (2015) Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 112(40): E5454-E5460.

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

La inserción de T-DNA presente en la línea T4 NtB538061T0#1T1#1T2#1T3#1T4 objeto de esta liberación está localizada en el locus Nitab4.5_0006396. Debido a la inserción del T-DNA se ha producido una delección de 12 nucleótidos (Nitab4.5_0006396, residuos 154189-154201) en el genoma de la planta que han sido sustituidos por el T-DNA (Nitab v4.5 Genome Scaffolds Edwards2017 » BLAST dataset ; <https://solgenomics.net/>). En el análisis de la secuencia genómica adyacente al punto de inserción (Nitab4.5_0006396, residuos 1530001-1547000) no se ha identificado ningún gen endógeno cuya función pudiese verse afectada por la inserción del T-DNA (<https://solgenomics.net/>; Nitabv4.5 cDNA Edwards2017 and Nitabv4.5 protein Edwards 2017 datasets). La secuencia genómica modificada por la inserción del T-DNA no posee ninguna función conocida.

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

La línea transgénica objeto de esta liberación se ha generado mediante transformación genética estable mediada por *Agrobacterim tumefaciens* (cepa GV3101) de discos de hoja de plantas de *N. tabacum* cv Burley B5 utilizando un protocolo estándar con algunas modificaciones⁵. Como vector de transformación se utilizó el plásmido pNMD38061. Este plásmido lleva el T-DNA descrito anteriormente, la unidad transcripcional de la neomicina fosfotransferasa (como marcador de selección de kanamicina en bacteria) y orígenes de replicación. Las plantas T0 obtenidas se analizaron mediante PCR y secuenciación para identificar las secuencias genómicas flanqueantes al punto de inserción y determinar el número de copias del T-DNA, seleccionándose plantas de copia única. Las líneas T1 se obtuvieron por autopolinización de las líneas T0 seleccionadas verificándose la presencia de una copia única del T-DNA mediante un análisis de segregación de la resistencia a kanamicina. Estas plantas T1 se analizaron mediante PCR para la identificación de plantas homocigotas. Las líneas T2 se obtuvieron por autopolinización de plantas T1 homocigotas para el T-DNA. Las líneas T3 se obtuvieron por autopolinización de plantas T2 y de ellas se obtuvieron, también por autopolinización, las líneas T4. La presencia de una única copia del T-DNA en homocigosis fue verificada en las generaciones T2, T3 y T4 mediante análisis de segregación de la resistencia a kanamicina. Las plantas objeto de esta liberación, NtB538061T0#1T1#1T2#1T3#1T4, corresponden a plantas T4 homocigotas con una única copia del T-DNA.

⁵ Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.

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 la optimización de la producción de taumatina-2 en condiciones de campo en relación a parámetros tales como la edad de la planta en el momento de la

inducción, la concentración de etanol y su forma de aplicación, o el tratamiento del material vegetal tras la cosecha.

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

Finca experimental de CTAEX, Villafranco del Gadiana, Badajoz.

3. Área del lugar (m²).

1256 m²

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.*

La línea NtB538061T0#1(T1#1T2#1T3#1) ha sido previamente objeto de otro ensayo de liberación (B/ES/21/03). En este ensayo no se observó ninguna diferencia entre la línea transgénica y el tabaco convencional con respecto a su efecto sobre el medio ambiente o la salud humana.

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.

La modificación genética introducida en las plantas objeto de esta liberación no afecta su supervivencia ni confiere ninguna ventaja selectiva en campo (el marcador de selección utilizado, la kanamicina, no confiere ventajas a las plantas como podría ocurrir con el uso de resistencias a herbicidas). La modificación introducida no supone riesgo para la salud humana ni ningún otro riesgo 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. La inducción de la producción de la proteína recombinante se realizará mediante la aplicación en spray de una solución de etanol a no más del 15% (v/v). La aplicación de este tratamiento no supone un riesgo debido a la ausencia de toxicidad y rápida evaporación.

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 (en el caso de que dicho botón floral aparezca antes del momento de la recolección) 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.

Podrían realizarse ensayos adicionales de liberación de plantas de tabaco modificadas genéticamente en las instalaciones de CTAEX. En caso de realizarse, en estos ensayos se seguirán las mismas medidas de control de riesgo descritas en este apartado. Además, se mantendrá una distancia mínima de 100 m entre los ensayos.

- 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