

# 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/20/01   |
| b) Fecha de acuse de recibo de la notificación 30/08/2019   |
| c) Título del proyecto: Ensayo en campo del desarrollo de plantas de tabaco cv K326 derivadas (por autopolinización) de las líneas L157-5, L192-6, L226-2 y L259-1, con mutaciones en la secuencia de factores de transcripción SPL generadas mediante CRISPR/Cas9. Campaña 2020. |
| d) Período propuesto para la liberación: 1 de Marzo de 2020 - 31 de Octubre de 2020   |

### 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.

|   |
|---|
| Las plantas de tabaco objeto de este ensayo presentan mutaciones (pequeñas deleciones e |
|---|

inserciones) en los siguientes genes endógenos de la familia de los SPL: [Nitab4.5\\_0003348g0050.1](#), [Nitab4.5\\_0003942g0050.1](#), [Nitab4.5\\_0007487g0020.1](#), [Nitab4.5\\_0002219g0060.1](#), [Nitab4.5\\_0000638g0040.1](#), [Nitab4.5\\_0001752g0040.1](#), [Nitab4.5\\_0003572g0010.1](#), [Nitab4.5\\_0000016g0300.1](#) ((Nitab4.5 Scaffolds Edwards 2017; <https://solgenomics.net/>). Las mutaciones han sido generadas mediante el sistema CRISPR/Cas9. Estas plantas no contienen ningún fragmento de DNA exógeno.

### 3. Tipo de modificación genética.

a) Inserción de material genético:

b) Eliminación de material genético:

c) Sustitución de una base:

d) Fusión celular:

e) Otro (especifíquese): editado genómico mediante CRISPR/Cas9

### 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.

No procede

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

Las líneas de tabaco objeto de ensayo presentan modificaciones en genes de la familia de los SPL pertenecientes a los grupos VI y VIII. Estos genes desempeñan un papel importante en la regulación de la transición de la fase juvenil a adulta y vegetativa a reproductiva<sup>1,2,3,4,5</sup>. Durante las fases tempranas del desarrollo, los niveles elevados de miR156 reprimen la expresión de los genes SPL diana. A medida que la planta se desarrolla, se produce un descenso en los niveles de miR156 con el concomitante aumento en los niveles de los SPLs, lo que permite la transición a la fase adulta y a la fase reproductiva, con la adquisición de la competencia para florecer. Las mutaciones presentes en las plantas de tabaco de este ensayo consisten en inserciones de un nucleótido o deleciones de entre 1 y 24 nucleótidos en la secuencia codificante del gen que resultan en la producción de proteínas truncadas y potencialmente en su pérdida de función. Basándose en la función descrita para estos genes, se espera que esta pérdida de función resulte en una prolongación de la fase vegetativa y un retraso del tiempo de floración.

### 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 a partir de plantas de tabaco del cultivar comercial K326 mediante la técnica CRISPR/Cas9. Para ello, se procedió a la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de las plantas de tabaco con el vector GB2138, que contiene las

<sup>1</sup> Spanudakis, E; Jackson, S. (2014) The role of microRNAs in the control of flowering time. *J Exp Bot*, **65** (2) pp:365-380

<sup>2</sup> Wang, H., Wang, H. (2015) The miR156/SPL Module, a Regulatory Hub and Versatile Toolbox, Gears up Crops for Enhanced Agronomic Traits. *Molecular Plant* **8** (5) pp: 677-688

<sup>3</sup> Xu, M. *et al* (2016) Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics*, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006263>

<sup>4</sup> Jung, JH. *et al* (2016) SPL3/4/5 Integrate Developmental Aging and Photoperiodic Signals into the FT-FD Module in *Arabidopsis* Flowering. *Molecular Plant*, **9** (12) pp: 1647-1659

<sup>5</sup> Schwarz, S. *et al.* (2008) The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*. **67**(1-2) pp: 183-195

unidades transcripcionales de las proteínas DsRed y NptII (marcadores de selección), la unidad transcripcional de la proteína Cas9, y las unidades transcripcionales para la expresión de los gRNAs complementarios a los genes diana (factores de transcripción de la familia de los SPLs) siguiendo el protocolo de Horsch et al.<sup>6</sup>

**Generación de líneas T1.** La generación T1 se obtuvo mediante autofecundación de líneas T0.

**Selección de líneas T1 libres de T-DNA.** El análisis de la presencia de T-DNA y de fragmentos del esqueleto del vector en las plantas T1 seleccionadas se realizó mediante PCR con cinco parejas de cebadores específicos que amplifican, respectivamente, un fragmento del promotor 35S, un fragmento del terminador Tnos, y tres regiones del vector adyacentes a los bordes derecho e izquierdo del T-DNA.

**Generación de líneas T2.** La generación T2 para la que se solicita esta autorización se ha obtenido a partir de las líneas T1 seleccionadas (libres de T-DNA) por autofecundación de las mismas.

**Identificación de las mutaciones presentes en las líneas objeto de la liberación.** La caracterización de las mutaciones presentes en las líneas T1 se ha realizado mediante amplificación por PCR de las regiones diana de los gRNAs y la posterior secuenciación del amplicón obtenido.

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 analizar el comportamiento, en condiciones de cultivo estándar, de plantas de tabaco cv K326 descendientes de las líneas T1 L157-5, L192-6, L226-2 y L259-1, todas ellas portadoras de mutaciones en genes endógenos de la familia de los SPLs, y su comparación con la línea original en los siguientes aspectos:

- evaluación del efecto de las mutaciones introducidas en la duración de la fase vegetativa y en la producción de biomasa.
- evaluación del potencial de las plantas modificadas en procesos de biorrefinería

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

Finca experimental de CTAEX, Villafranco del Guadiana, Badajoz.

3. *Área del lugar (m<sup>2</sup>).*

500 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

<sup>6</sup> Horsch, R. et al. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, **227**, pp: 1229–1232

**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 mutaciones 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. Tampoco se deriva de ellas 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 2000 m 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.
- 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.
- 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.
- Se realizará un seguimiento de la parcela durante el año siguiente a la liberación para controlar y eliminar potenciales rebrotes.

**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