

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/22/28
b) Fecha de acuse de recibo de la notificación
c) Título del proyecto: Estudio comparativo de dos líneas transgénicas de tabaco cv Burley B5 con expresión de la proteína taumatina-2 en semilla en relación a su tasa de crecimiento, producción de semillas y rendimiento de proteína recombinante en semillas.
d) Período propuesto para la liberación: 1 de Marzo de 2023 - 31 de Diciembre de 2023

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 en semillas de la proteína edulcorante taumatina-2 de *Thaumatococcus daniellii*. Las plantas contienen también el gen de resistencia a fosfotricina, utilizado como marcador de selección en el proceso de transformación genética.

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 dos casetes de expresión con las siguientes funciones: 1) expresión constitutiva del marcador de selección de resistencia a la fosfotricina en planta, 2) la expresión de la proteína taumatina-2 en semillas.

El casete de expresión 1) está formado por el promotor de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, el gen de la fosfotricina N-acetiltransferasa de *Streptomyces hygrosopicus*, y el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. El casete de expresión 2) está formado por el promotor del gen de la beta-faseolina de *Phaseolus vulgaris*, 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), el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor, y el terminador del gen de la octopina sintasa de *Agrobacterium*.

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 las plantas T2 derivadas de la línea NtB100-5 está localizada en el locus Nitab4.5_0004944. Debido a la inserción del T-DNA se ha producido una delección de 814 nucleótidos (Nitab4.5_0004944, residuos 176681-177494) 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_0004944, residuos 176329-177718) 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.

La línea transgénica NtB10-14/13 presenta más de una copia del T-DNA habiéndose identificado el lugar de inserción de una de ellas. Esta inserción se encuentra en el locus Nitab4.5_0000305. Debido a la inserción del T-DNA se ha producido una delección de 176 nucleótidos (Nitab4.5_0000305, residuos 842441-842616) 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_0000305, residuos 842101-843600) solo se ha identificado una secuencia predicha con homología a un ARNm de tabaco que codifica una

proteína POB1-like con un dominio BTB/POZ. Esta secuencia se encuentra situada aguas arriba del sitio de inserción. Es por tanto poco probable que algún gen de tabaco endógeno se vea afectado por la inserción de T-DNA en esta posición (conjunto de datos BLAST «Nitab v4.5 cDNA Edwards2017», conjunto de datos BLAST «Nitab v4.5 protein Edwards2017»; <https://solgenomics.net/>). La secuencia genómica modificada por la inserción del T-DNA no posee ninguna función conocida. No se ha podido identificar el sitio de inserción de las otras copias del T-DNA presentes en esta línea por lo que no se tiene información sobre otras potenciales deleciones. No se ha observado ninguna diferencia fenotípica entre esta línea y las plantas de tabaco convencional (no transgénico).

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

Las líneas transgénicas objeto de esta liberación se han generado mediante transformación genética estable mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101) de discos de hoja de plantas de *N. tabacum* cv Burley B5 utilizando un protocolo estándar con algunas modificaciones¹. Como vector de transformación se utilizó el plásmido pNMD52711. 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 que pudiese ser de copia única. Las líneas T1 se obtuvieron por autopolinización de las líneas T0 seleccionadas y el número de copias del T-DNA fue evaluado mediante el análisis de segregación de la resistencia a fosfotricina. Estas plantas se analizaron mediante PCR identificándose plantas T1 portadoras de una copia única del transgén en homocigosis o bien plantas con más de una copia del T-DNA de las que al menos una se encontraba en homocigosis. Las líneas T2 se obtuvieron por autopolinización de plantas T1 seleccionadas. Las líneas T3 se obtuvieron por autopolinización de las plantas T2. Las plantas objeto de este ensayo derivan de una línea T2 con una copia única del T-DNA en homocigosis (línea NtB100-5) y de una línea T3 con múltiples copias del T-DNA de las cuales una se encuentra en homocigosis (línea NtB10-14/13).

¹ 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 liberación es la evaluación de la producción de taumatina-2 en semilla en condiciones de campo en relación a parámetros tales como el análisis del crecimiento y producción de semillas en función de la densidad de plantación, la evaluación del tiempo de maduración de las semillas, las condiciones de cultivo (momento del trasplante al campo y cosecha, temperatura durante el cultivo, régimen de riego, etc.), así como el análisis de los niveles de proteína recombinante en semilla obtenidos en dichas condiciones. El ensayo permitirá la comparación de 2 líneas transgénicas generadas en la misma transformación, pero con diferente número de copias de T-DNA. Las semillas cosechadas se utilizarán para determinar el rendimiento de taumatina-2 así como para la purificación de la proteína.

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

Finca experimental de CTAEX, Villafranco del Gadiana, Badajoz.

3. Área del lugar (m²).

1780 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.*

No existen liberaciones anteriores. Durante su crecimiento en invernadero en condiciones confinadas, no se observaron diferencias entre las plantas transgénicas y el tabaco convencional en relación a sus efectos sobre el medio ambiente o la salud.

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. EL marcador de selección utilizado, la resistencia a la fosfotricina, puede conferir una ventaja selectiva en campo en caso de aplicación del herbicida. No se realizarán tratamientos con este herbicida durante el ensayo. 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.

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.
- Se procederá a embolsar en bolsas de polinización o a eliminar las inflorescencias de todas las plantas transgénicas antes de la apertura de las flores evitándose así la dispersión de polen y de semillas.
- Como medida adicional, se incluirá un borde de dos filas de tabaco convencional alrededor del área de liberación a modo de trampa de polen.
- Se mantendrá una distancia de aislamiento de 100 km entre el lugar de liberación y otras plantaciones de tabaco comercial cultivado.
- El ensayo será monitorizado regularmente 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 triturarán los restos de raíces y tallos y los enterrarán 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 el área de liberación será dejada en barbecho o bien cultivada con otras especies sexualmente incompatibles con el tabaco durante el año siguiente a la liberación.
- Con el fin de obtener información adicional sobre la capacidad de dispersión de las semillas procedentes de las plantas de tabaco convencional (no transgénico) cuyas inflorescencias no se embolsarán, el área de seguimiento posterior a la liberación se extenderá a un área adyacente de 10 metros de ancho rodeando toda el área del ensayo. Esta se distancia se ampliará a 100 m en uno de lados del área de liberación. Se documentará la aparición de plantas de tabaco en las áreas adyacentes inspeccionadas y su distancia al lugar de liberación y se procederá a su eliminación. Para facilitar esta tarea el área a inspeccionar será dejada en barbecho o bien cultivada con otras especies sexualmente incompatibles con el tabaco durante el año siguiente a la liberación.

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