

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/21/01
b) Fecha de acuse de recibo de la notificación
c) Título del proyecto: Caracterización de plantas de tabaco cv K326 derivadas por autopolinización de los eventos FT3-4, FT15-5, SPL2-3, SPL10-5, SPL11-3, SPL15-1, SPL22-2, FT-SPL3-7, FT-SPL4-7, FT-SPL5-1, FT-SPL7-4 y FT-SPL9-8 (con mutaciones en la secuencia de genes SPL y/o FT endógenos generadas mediante CRISPR/Cas9 que generan fenotipos de no floración y/o juvenilidad); y eventos MPO24-1-4-2, MPO24-1-7-1, BBL133 y BBL135 (con mutaciones en la secuencia de genes MPO1 o BBLs endógenos generadas mediante CRISPR/Cas9 que generan fenotipos con distinta composición de alcaloides). 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: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas
--

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 (deleciones e inserciones) en distintas combinaciones de genes endógenos de la familia de los SPL (líneas SPL y FT-SPL), genes FT5 endógenos (líneas FT y FT-SPL), genes MPO1 endógenos (líneas MPO) o genes BBL endógenos (líneas BBL). 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 FT presentan mutaciones en el gen FT5 (flowering locus T) de tabaco, un activador de la floración independiente de fotoperiodo¹. Las mutaciones introducidas consisten en inserciones o deleciones en la secuencia del gen que en su mayoría resultan en la producción de proteínas truncadas y potencialmente en su pérdida de función. En condiciones de invernadero estas líneas han presentado un fenotipo de no floración.

Las líneas SPL presentan mutaciones en distintas combinaciones de genes de la familia de los SPLs (SQUAMOSA promoter binding protein like) pertenecientes a los grupos V, VI, VII, y VIII. Estos genes desempeñan un papel importante en la regulación de la transición de la fase juvenil a adulta y vegetativa a reproductiva^{2,3,4,5,6,7}. 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

¹ Schmidt FJ, et al. The Major Floral Promoter NtFT5 in Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Is a Promising Target for Crop Improvement. *Front Plant Sci* **10**:1666, doi:10.3389/fpls.2019.01666 (2020)

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

³ 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

⁴ 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>

⁵ 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

⁶ 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

⁷ Preston, J.C; Hileman, L.C. (2013) Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Front Plant Sci*, **4**:80

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 o deleciones en la secuencia del gen que en su mayoría resultan en la producción de proteínas truncadas y potencialmente en su pérdida de función. En condiciones de invernadero estas líneas han presentado una prolongación de la fase juvenil, mayor desarrollo de ramas laterales y, algunas de ellas, un retraso en el tiempo de floración.

Las líneas FT-SPL combinan mutaciones en genes SPL y genes FT5 (descritas en los párrafos anteriores). Estas líneas presentan un fenotipo de no floración. Alguna de estas líneas presenta además una prolongación de la fase juvenil y/o mayor desarrollo de ramas laterales.

Las líneas MPO presentan mutaciones en genes MPO1 (N-metilputrescina oxidasa 1) de tabaco, un enzima que cataliza el segundo paso de la ruta de biosíntesis de alcaloides en tabaco. Las mutaciones introducidas consisten en inserciones o deleciones en la secuencia del gen que resultan en la producción de proteínas truncadas y potencialmente en su pérdida de función. En condiciones de invernadero estas líneas presentan una reducción en los niveles de nicotina y un aumento en los niveles de anatabina.

Las líneas BBL presentan mutaciones en genes BBL (Berberine Bridge Enzyme-Like). Los BBL intervienen en las últimas etapas de la biosíntesis de alcaloides en la planta de tabaco⁸. Las mutaciones introducidas consisten en inserciones o deleciones en la secuencia del gen que resultan en la producción de proteínas truncadas y potencialmente en su pérdida de función. En condiciones de invernadero estas líneas presentan una reducción en los niveles de nicotina y anatabina.

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 la técnica CRISPR/Cas9 a partir de plantas de tabaco del cultivar comercial K326 (líneas FT, MPO y BBL) o de la línea de tabaco cv K326 L157-5 (con mutaciones en siete genes SPL generadas a su vez mediante CRISPR/Cas9; líneas SPL y FT-SPL). Para ello, se procedió a la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*⁹ (líneas FT, SPL y FT-SPL) o *Agrobacterium rhizogenes* (líneas MOP y BBL) de las plantas de tabaco con los vectores de transformación correspondientes, que contienen las unidades transcripcionales de las proteínas DsRed y/o 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.

Generación de líneas T1. La generación T1 se obtuvo mediante autofecundación a partir de las líneas T0.

Selección de líneas T1 libres de T-DNA. El análisis de la presencia de T-DNA en las plantas T1 seleccionadas se realizó mediante PCR con dos parejas de cebadores específicos que amplifican un fragmento del promotor 35S y un fragmento del terminador Tnos (líneas FT, SPL, FT-SPL y MPO) o una pareja de cebadores específicos que amplifican un fragmento de la proteína Cas9 (líneas BBL). El análisis de la presencia de fragmentos del esqueleto del vector se realizó mediante PCR con dos parejas de cebadores específicos que amplifican dos 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

⁸ Lewis RS, Drake-Stowe KE, Heim C, Steede T, Smith W, Dewey RE. (2020) Genetic and Agronomic Analysis of Tobacco Genotypes Exhibiting Reduced Nicotine Accumulation Due to Induced Mutations in Berberine Bridge Like (BBL) Genes. *Front Plant Sci.* 11:368. doi:10.3389/fpls.2020.00368

⁹ Horsch, R. *et al.* (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227, pp: 1229–1232

caracterización de las mutaciones presentes en las líneas T1 y T2 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 editadas genéticamente en genes relacionados con la transición de la fase juvenil a adulta y vegetativa a reproductiva y genes reguladores de la floración (líneas SPL, FT, y FT-SPL), así como genes de la ruta biosintética de alcaloides (líneas MPO y BBL) y su comparación con la línea silvestre en los siguientes aspectos:

- Líneas SPL, FT, y FT-SPL; evaluación del efecto de las mutaciones introducidas en la duración de la fase juvenil/vegetativa y la floración; evaluación de la biomasa en el momento de la cosecha.
- Líneas MPO y BBL; evaluación del contenido en alcaloides; evaluación de la biomasa en el momento de la cosecha; evaluación a escala piloto del rendimiento en anatabina de la línea MPO24-1-7-1.

2. Localización geográfica del lugar de la liberación.

Finca experimental de CTAEX, Villafranco del Gadiana, Badajoz.

3. Área del lugar (m²).

950 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 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 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 (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. En las plantas con fenotipo de no-floración no se espera que este tratamiento sea necesario.
- 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