

Ingeniería Genética en Plantas y las "Nuevas Técnicas de Mejoramiento"

Riesgos inherentes y necesidad de regulación

Dra. Ricarda A. Steinbrecher

Resumen y conclusiones

Las técnicas de ingeniería genética (modificación genética) han evolucionado rápidamente en los últimos cinco a diez años, y junto con ellas la cada vez mayor capacidad de realizar cambios más profundos y complejos en la composición genética y las rutas metabólicas de los organismos vivos. Esto ha originado la emergencia de dos nuevos campos de la ingeniería genética que se solapan entre sí: la biología sintética y las llamadas Nuevas Técnicas de Mejoramiento (en inglés, *New Breeding Techniques* o *NBTs*).

En lo que respecta a las NBTs, resulta preocupante constatar que buena parte de las iniciativas parecen tener como objetivo principal el evitar tener que pasar el proceso regulatorio obligatorio para los Organismos Genéticamente Modificados (OGM), eligiendo nombres que hacen difícil que el público vea que se está utilizando ingeniería genética (modificación genética). Paralelamente se dirigen los esfuerzos a debilitar el principio de precaución, que sirve para protegernos contra la adopción de tecnologías que puedan dar lugar a impactos negativos sobre la salud humana o ambiental en el futuro.

En la actualidad existe una lista de siete "nuevas" técnicas de ingeniería genética que han sido presentadas a la Comisión Europea (CE), que en la actualidad está decidiendo si los productos de estas técnicas, al ser aplicados en plantas, deben ser cubiertos por la legislación europea sobre OGM. Entre las afirmaciones realizadas por la industria están la de que no son OGM según la definición legal actual de OGM, que se han obtenido mediante técnicas exentas de esta legislación o que el producto final, aunque haya sido obtenido utilizando ingeniería genética en algún momento de su desarrollo, no contiene material modificado genéticamente y por tanto ya no es un OGM. La CE, así como muchos abogados de la industria y la sociedad civil, está trabajando en estos momentos en una interpretación legal. Es importante ser consciente - tanto en términos de interpretación legal como de riesgos - de que algunas de estas técnicas pueden combinarse también entre sí, o que la misma técnica puede utilizarse varias veces en el mismo organismo para conseguir el efecto deseado.

Este documento examina estas siete técnicas desde un punto de vista científico, no legal, y busca ayudar a los lectores a comprender mejor las técnicas y los riesgos inherentes asociados con ellas. Al examinar los probables efectos imprevistos se ha hecho evidente que todas estas técnicas, supuestamente muy precisas, tienen en realidad efectos en sitios no diana cuyas consecuencias son impredecibles. De hecho, la llamada precisión es en realidad un concepto muy impreciso, que no puede equipararse con la predictibilidad.

En conclusión, cada una de estas siete nuevas técnicas de ingeniería genética conocidas como NBTs tiene sus propios riesgos e incertidumbres. Mientras que muchas siguen siendo las mismas que con las técnicas de ingeniería genética previas, existen algunas preocupaciones adicionales graves, como los posibles impactos para el medio ambiente y la salud de la metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM). De igual modo, la utilización de técnicas de edición génica (como las ZFN y la ODM, así como CRISPR y TALENs) añade un nuevo grado de incertidumbre. Este documento concluye que existen razones científicas para clasificar todas estas técnicas como modificación genética, así como para regular su uso con el mismo rigor que las técnicas de modificación genética anteriores.

Las siete técnicas a ser discutidas aquí son (según los títulos de la propia CE)¹:

- 1) Tecnología de Nucleasas de Dedos de Zinc (ZFN-1/2/3)
- 2) Mutagénesis Dirigida por Oligonucleótidos (ODM)
- 3) Cisgénesis/Intragénesis
- 4) Metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM);
- 5) Injerto (sobre un patrón modificado genéticamente);
- 6) Mejoramiento Inverso (RB);
- 7) Agro-infiltración (tanto Agro-infiltración "sensu stricto" como Agro-inoculación)

El grupo de trabajo de la CE consideró una octava técnica: *Genómica sintética*. Sin embargo, esta es considerada en general como un campo dentro de la biología sintética. Además, no se conoce ningún programa de mejoramiento vegetal que la esté utilizando en la actualidad, aunque se está investigando su aplicación, por ejemplo, en microorganismos.

1) Nucleasas de Dedos de Zinc (ZFN) de tipo -1, -2 y -3 (Técnicas de edición de genes)

Las técnicas que utilizan ZFN son técnicas de ingeniería genética que buscan realizar cambios deliberados en la composición genética y rasgos de un organismo. También se conocen como técnicas de edición de genes. En la actualidad existen otras técnicas de edición génica que están adquiriendo relevancia, pero en la lista de la UE sólo se mencionan las ZFN.

El objetivo es ser capaces de modificar la secuencia de ADN para eliminar, sustituir o insertar secuencias de ADN en lugares predeterminados del genoma. En este aspecto, sus objetivos no son diferentes de los de cualquier otra técnica de ingeniería genética. En el caso de las técnicas "de edición", esto puede significar la realización de pequeños cambios, de uno a diez nucleótidos² (ZFN-1

¹ http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation/plant_breeding/index_en.htm

² Los nucleótidos son los bloques con los que se construye el ADN y el ARN, el material genético al que también se denomina *ácidos nucleicos*. Los nucleótidos que forman el ADN se denominan A, C, G y T (Adenina, Citosina, Guanina y Timina); y los del ARN se denominan A, C, G y U (Adenina, Citosina, Guanina y Uracilo). La secuencia de estas "letras" es la que determina qué proteína se produce o qué instrucción es la que se da.

y 2) o grandes inserciones de genes completos, incluyendo transgenes (ZFN-3).

Para esto es necesario "cortar" en primer lugar la molécula de ADN en un sitio específico. Las ZFN son proteínas diseñadas específicamente y utilizadas con este propósito. El componente de "dedo de zinc" (ZF) puede reconocer una pequeña secuencia específica de ADN (de 9 a 12 bases), donde el componente nucleasa (N)³ realizará el corte. Hacen falta dos ZFNs - que se colocan diagonalmente en torno a la doble cadena de ADN - para cortar las dos hebras. Este corte del ADN pondrá en marcha uno de los dos mecanismos de reparación del ADN, para así volver a unir los dos extremos, con distintos posibles resultados.

Existen tres categorías de ZFNs:

- 1• ZFN-1: pequeños cambios aleatorios en un sitio específico del ADN, ya sean pequeñas delecciones, sustituciones o inserciones de nucleótidos. En este caso, la célula "reparará" la rotura de forma aleatoria, utilizando un mecanismo de reparación llamado "NHEJ" (unión de extremos no homólogos).
- 2• ZFN-2: pequeños cambios en un sitio específico del ADN, como "mutaciones puntuales" (cambio de un nucleótido). En este caso la reparación seguirá las instrucciones de un "molde" de ADN que se añade (una secuencia de ADN con la misma secuencia que el sitio diana excepto por una o dos pequeñas alteraciones o una inserción corta). En este caso el mecanismo de reparación utilizado se denomina "HR" (recombinación homóloga)
- 3• ZFN-3: grandes inserciones de genes o secuencias reguladoras en un sitio específico. En el proceso de ingeniería genética se añadirá un molde de ADN, al igual que en ZFN-2, pero el molde contendrá además una secuencia larga de ADN (por ejemplo uno o más genes) para su integración.

El gen que da lugar a las ZFNs diseñadas específicamente se introducirá en la planta, generalmente mediante ingeniería genética (utilizando técnicas de transformación estándar), por lo que en esta etapa el organismo sería un OGM. Una vez que las proteínas ZFN se han expresado y han hecho su trabajo, se seleccionarán las líneas vegetales que no contengan el transgén para la síntesis de ZFN. De forma alternativa, en un intento declarado de evitar ser designados como OGM, se han desarrollado sistemas de expresión en virus vegetales, en los que se pretende que el gen ZFN permanezca dentro del sistema de expresión viral. La idea es que el transgén ZFN no se integre en el ADN de la planta - y por tanto no se transmita a las generaciones futuras.

Aplicaciones Comerciales de las ZFN-1, 2: La eliminación, cambio o inserción de un solo nucleótido (mutación puntual) puede bastar para modificar rasgos de la planta, como: tolerancia a herbicidas, esterilidad masculina o femenina, color de la flor, maduración retrasada del fruto.

Cambios imprevistos y riesgos:

- 1• Efectos fuera del sitio diana: La tecnología ZFN es conocida por su unión no específica a ADN no-diana, que provoca un nivel significativo de mutaciones fuera del sitio diana en el genoma. Estas mutaciones pueden a) suponer cambios en la función de algunas proteínas, si se dan en secuencias

³ Nucleasa: enzima capaz de cortar el ADN.

codificantes, o b) si se dan en secuencias reguladoras, alterar la expresión génica, pudiendo producir el aumento de la presencia de toxinas vegetales, la ausencia de proteínas importantes para la nutrición, alteraciones en los sistemas de defensa vegetal o en los de resistencia a enfermedades, etc.

- 2• El ADN molde (en el caso de las ZFN-2 y 3) podría integrarse en lugares aleatorios del genoma, como hacen las inserciones transgénicas, ya sea de forma completa o parcial, alterando genes y secuencias reguladoras o, potencialmente, alterando proteínas. Esto podría conducir a una disminución del rendimiento, mayor susceptibilidad ante las plagas, acumulación de toxinas y residuos, aumento de la alergenicidad, etc.
- 3• Procesos de transformación y transfección⁴, así como el cultivo celular⁵ que se utilizan para la producción de plantas modificadas genéticamente mediante ZFN. Se sabe que estos procesos provocan mutaciones adicionales (con riesgos como los descritos anteriormente).⁶

Conclusión: Las tres técnicas de ZFN son técnicas de ingeniería genética, cuyo objetivo es la realización de cambios deliberados a la composición genética y rasgos de un organismo. Las tres son propensas a ocasionar mutaciones en sitios no-diana debido a la actividad ZFN y al proceso de ingeniería genética (que por sí solo ocasiona cientos de mutaciones con los consiguientes efectos imprevistos). Además, en la actualidad no se comprenden completamente los mecanismos de reparación de la planta, lo que genera incertidumbres adicionales. Debido a este proceso, las modificaciones y los riesgos, los organismos obtenidos mediante ZFNs son OGM y requieren un análisis de riesgos completo.

Otras técnicas de edición génica:

Existen otra serie de técnicas de edición génica, como TALENs, las meganucleasas o CRISPR/Cas.⁷

Aunque los detalles varían, todas consisten en nucleasas dirigidas a secuencias específicas de ADN, donde cortan la hebra de ADN y provocan/ponen en marcha un sistema natural de reparación dentro de la célula, como los descritos anteriormente.

Las mismas consideraciones que llevan a clasificar las técnicas de ZFN como productoras de OGM son a su vez aplicables a estas técnicas de edición génica. Es decir, buscan cambios deliberados de la composición génica y rasgos de un organismo; son técnicas de laboratorio y son propensas a la aparición de efectos en

⁴ La *transformación* de las células vegetales es el proceso mediante el que se introduce el ADN externo en la célula y este se incorpora en el ADN de la planta. El término *transfección* de plantas es más común cuando se utilizan virus en el proceso o cuando no se pretende que el ADN externo se integre.

⁵ El *cultivo celular* es la utilización de medios de crecimiento para el cultivo de células vegetales fuera de la planta. Mediante la utilización de nutrientes, compuestos especiales, enzimas y varias hormonas de crecimiento, las células pueden 1) alcanzar el estado correcto para su transformación (inserción de la nueva secuencia génica) y 2) ser inducidas a formar de nuevo una planta comple. Se sabe que el cultivo celular - especialmente el tipo utilizado para la transformación de plantas - provoca mutaciones en todo el genoma.

⁶ Ver Wilson et al. (2006), en las referencias al final de este documento.

⁷ TALENs (nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción), MN (meganucleasas) y CRISPR/CAS (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) – ver también Agapito-Tenfen (2015) en las referencias al final de este documento.

sitios no-diana, así como efectos imprevistos del proceso de ingeniería genética.

2) Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODM):

El objetivo es crear cambios pequeños y predefinidos en sitios muy específicos de los genes, ya sea para cambiar la función del producto génico o para parar su producción. Para llevar a cabo la ODM se sintetiza un oligonucleótido⁸, una secuencia corta de un ácido nucleico de cadena simple, compuesto por un pequeño número de nucleótidos.

Se diseña para ser prácticamente idéntico a la secuencia de ADN del gen diana, excepto por 1-4 nucleótidos. Esto crea una no-coincidencia en la secuencia, cuando el oligonucleótido se une al gen diana, lo cual induce un cambio del ADN (mutación) en un sitio específico una vez que se pone en marcha el propio mecanismo de reparación de ADN de la célula, provocando que se conserve la secuencia del oligonucleótido en lugar de la secuencia original.

Cambios imprevistos y riesgos:

- 1• Efectos en sitios no-diana: el oligonucleótido puede unirse a otros sitios del ADN con los que tenga una coincidencia suficiente, donde es probable que produzca mutaciones imprevistas. Esto puede ocasionar a su vez cambios o pérdida de función de las proteínas, o cambios en la expresión génica, lo que conduce a problemas como el aumento de la presencia de toxinas vegetales.
- 2• El oligonucleótido puede integrarse también en el ADN vegetal, de forma similar a las inserciones transgénicas, alterando genes y secuencias reguladoras o, potencialmente, dando lugar a proteínas alteradas.
- 3• Se sabe que la utilización del cultivo de tejidos y de métodos de transformación o transfección similares a los de la transgénesis⁹ provocan mutaciones no intencionadas en todo el genoma.
- 4• En organismos modificados genéticamente mediante ODM se han observado mutaciones cerca del sitio diana.
- 5• Dependiendo del oligonucleótido utilizado, existe el riesgo de que los oligonucleótidos interfieran con la regulación o expresión génica de la célula, mediante la activación de mecanismos de ARNi¹⁰ que pueden conducir al silenciamiento de genes. Esto puede dar lugar a cambios heredables, que se mantengan durante varias generaciones, y que dependen de varios factores que aún no se comprenden por completo.

⁸ Los nucleótidos son los bloques que forman el ADN y ARN, el material genético al que también se denomina *ácidos nucleicos*. Los nucleótidos de ADN se designan por las letras A, C, G y T (Adenina, Citosina, Guanina, Timina); los de ARN por A, C, G y U (Adenina, Citosina, Guanina, Uracilo). Un *oligonucleótido* es una secuencia de material genético (ácido nucleico) normalmente de entre 20 y 200 nucleótidos de largo; pueden estar formados por ADN, ARN o nucleótidos análogos, así como por cualquier combinación de estos. Suelen ser de cadena simple, aunque no siempre.

⁹ ver notas al pie 5 y 6

¹⁰ Ruta del ARNi. La ruta del ARN de interferencia (ARNi) es un proceso interno de la célula mediante el que moléculas de ARN de varias formas pueden, a través de un número de pasos, conducir al silenciamiento de genes.

Esto podría ser más probable en oligonucleótidos que contengan nucleótidos de ARN.

Conclusión: La ODM es una técnica de ingeniería genética que puede dar lugar a los mismos o similares impactos negativos directos e indirectos que los OGM actuales, tanto a través de los rasgos previstos (por ejemplo tolerancia a herbicidas, como la que consiguió CIBUS en su colza tolerante a herbicidas basados en sulfonilurea)¹¹, de los procesos o métodos utilizados y de la posible integración de los oligonucleótidos. Es necesaria, por tanto, una evaluación completa de riesgos.

3) Cisgénesis e intragénesis

La cisgénesis y la intragénesis son básicamente lo mismo que la transgénesis, pero en lugar de obtener la secuencia de ADN de una especie totalmente diferente o de inventar una secuencia nueva de ADN sintético, la secuencia de ADN insertada se obtiene de la misma especie o de una especie emparentada, con las que la planta debería, al menos en teoría, ser capaz de cruzarse. En la "cisgénesis", el ADN insertado tendrá la secuencia exacta de un gen hallado en un organismo donante emparentado.¹² En la "intragénesis", la secuencia del gen insertado es un constructo, compuesto de secuencias y elementos de distintos genes de una o más especies emparentadas (ver nota al pie para más detalles)¹³

Cambios imprevistos y riesgos:

- 1• El que la secuencia de ADN venga o no de especies emparentadas resulta irrelevante, dado que el proceso de ingeniería genética es el mismo, con los mismos riesgos e incertidumbres que la transgénesis. Se darán:
 - integraciones aleatorias del ADN transferido, capaz de alterar otro gen o interferir con la regulación de genes vecinos (*efectos de posición*).
 - mutaciones en el sitio de inserción y a lo largo de todo el genoma como consecuencia del proceso de transformación, incluyendo los efectos del cultivo celular¹⁴. Esto puede suponer deleciones, reordenaciones y multiplicaciones de secuencias de ADN.
 - posible silenciamiento génico del gen introducido o de los propios genes de la planta si las secuencias promotoras presentan una alta similitud (homología).
- 2• En relación a la cisgénesis: el hecho de que el gen insertado venga de una especie emparentada no es garantía de que no vaya a haber efectos imprevistos o impredecibles, dado que este gen en concreto y su producto no han estado presentes en este contexto genético o en esta posición. Por tanto, podría expresarse de forma diferente a como se expresaba en la planta de la que se ha obtenido, y/o interactuar (por ejemplo interfiriendo) con rutas metabólicas o de regulación génica más amplias. Esto puede dar lugar a

¹¹ CIBUS está utilizando la ODM bajo el nombre de Sistema Rápido de Desarrollo de Rasgos (RTDS™)

¹² El ADN insertado no se obtiene directamente del organismo donante, sino que se sintetiza in vitro o se amplifica en la bacteria *E. coli*.

¹³ por ejemplo el promotor, la secuencia codificante y la secuencia terminal pueden obtenerse de diferentes genes y especies.

¹⁴ Cultivo celular: ver nota al pie 5

alteraciones en el comportamiento y rendimiento, mayor susceptibilidad a enfermedades, mayor capacidad de reproducirse o de resultar invasiva, alteración de la composición de moléculas de señalización¹⁵, nutrientes, toxinas o alérgenos.

- 3• En relación a la intragénesis: las secuencias de ADN combinadas en un gen de este tipo no habrán existido nunca en este contexto de regulación. Su comportamiento e interacciones no pueden predecirse simplemente por conocer la secuencia de ADN o por saber que estas secuencias se han obtenido de organismos emparentados. Sólo un análisis exhaustivo y estricto de los efectos e impactos reales puede ofrecer respuestas adecuadas.

Conclusión: en relación a los riesgos y a los posibles efectos negativos, estas técnicas no se distinguen en mucho de la transgénesis, por lo que se requiere una caracterización molecular completa y un análisis de riesgos exhaustivo, incluyendo ensayos de alimentación.

4) Metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM):

Un objetivo es el de obtener un rasgo nuevo para una serie de generaciones de semillas sin modificar las secuencias de ADN (es decir, la secuencia de nucleótidos) en el organismo, con la esperanza de evitar ser clasificado como OGM. Para esto se puede utilizar un proceso de RdDM¹⁶ dentro de la célula para silenciar un gen específico, de forma que este no dé lugar a ningún producto génico. Esto, a su vez, puede dar lugar a rasgos de interés, como un retraso en la maduración del fruto, flores de un color diferente, aumento del contenido de una determinada sustancia o de un nutriente específico, esterilidad masculina.

La metilación de ADN dirigida por ARN (RdDM) es un proceso en el que las moléculas de ARN hacen que la célula añada grupos metilo (grupos -CH₃)¹⁷ a ciertos nucleótidos en determinada secuencia de ADN para así silenciar un gen (para más información ver la nota al pie).¹⁸

La metilación de la región promotora de un gen hace que se detenga la expresión de este. Aunque este silenciamiento no es una alteración permanente, se hereda durante varias generaciones. Se cree que en plantas llega un momento en el que se pierde, pero esto no ocurre en todos los organismos, por ejemplo en el nematodo *C. elegans*. En cualquier caso, no se sabe ni se comprende qué es lo que desencadena esta reversión de la metilación.

Cómo funciona:

Un ARN de doble cadena cuya secuencia coincida con una secuencia de ADN iniciará la metilación de esta, silenciando por tanto el gen asociado. Hay distintas

¹⁵ Las moléculas de señalización transmiten información entre las células y los tejidos en organismo multicelulares. Pueden ser moléculas simples o proteínas complejas, como las hormonas del crecimiento. Otra categoría son los llamados *semioquímicos*, que transportan mensajes entre distintos individuos de la misma especie o de especies diferentes.

¹⁶ La RdDM es una forma de interferencia por ARN (ARNi).

¹⁷ Un grupo metilo (-CH₃) está formado por un carbono unido a tres átomos de hidrógeno.

¹⁸ En el caso de organismos superiores, como plantas y animales, sólo puede metilarse uno de los cuatro nucleótidos del ADN, la citosina. En bacterias también puede metilarse la adenosina.

formas de introducir secuencias específicas de ARN de doble cadena en una célula, por ejemplo.

- 1) modificar genéticamente la planta, introduciendo un gen que dé lugar a un ARN de este tipo (con una secuencia "invertida") - para un silenciamiento génico permanente o temporal.
- 2) Si lo que se quiere es un silenciamiento génico temporal, por ejemplo durante unas cuantas generaciones, puede eliminarse (de-seleccionarse) el gen insertado mediante cruzamientos durante el proceso de mejoramiento.
- 3) Infectando las plantas con virus vegetales modificados genéticamente (que contengan la secuencia promotora diana), lo que conduce a la metilación y silenciamiento del gen diana. ("Silenciamiento Génico Inducido por Virus" (VIGS) - RdDM)
- 4) Pulverización de la planta con ARNdc (ARN de doble cadena).

Cambios imprevistos y riesgos:

- 1• Efectos en sitios no diana: silenciamiento de otros genes, que puede conducir a rasgos alterados, con posibles impactos negativos como la producción y acumulación de toxinas y alérgenos, disminución del contenido nutricional, susceptibilidad a enfermedades.
- 2• El silenciamiento del gen diana puede no sólo detener la síntesis del producto génico (una proteína), sino que dependiendo de la posible función de esta proteína en otras rutas metabólicas se pueden producir otros efectos imprevistos (conocidos generalmente como efectos pleiotrópicos). Las consecuencias podrían afectar a cualquier elemento relacionado con estas rutas metabólicas, por ejemplo factores de crecimiento, mecanismos de defensa y señalización, acumulación de compuestos, etc.
- 3• Específico del ARNdc: Dependiendo de la metodología utilizada, la presencia de moléculas de ARNdc en la cadena alimentaria y el medio ambiente podría provocar efectos adversos sobre otros organismos expuestos mediante la ingestión o el contacto, por ejemplo en el caso de las pulverizaciones. Pueden transmitirse a través de la cadena trófica, y podrían amplificarse y conducir a la inactivación de genes vitales, lo que podría tener importantes consecuencias ecológicas y sanitarias. Este es el resultado previsto, por ejemplo, de los ARNdc insecticidas producidos por plantas modificadas genéticamente. Esto supone una dimensión de riesgo nueva y muy grave en comparación con los OGM producidos hasta la fecha.

Conclusión: La cuestión primordial no es si el producto final (la planta) contiene o no secuencias de ADN insertadas mediante ingeniería genética, sino más bien que la RdDM es una tecnología muy nueva y poco estudiada, con posibles impactos perjudiciales graves tanto para los consumidores como para el medio ambiente. Es una tecnología de ingeniería genética que, dados los riesgos, requiere una regulación y evaluación de riesgos exhaustiva.

5) Injerto: de púa o yema no modificada genéticamente¹⁹ en patrón modificado genéticamente (y vice versa)

El injerto (por ejemplo en árboles frutales, viñas, tomates)²⁰ es una forma de combinar el vigor u otros rasgos de interés de dos organismos en uno, sin tener que cruzarlos, por ejemplo un patrón con resistencia a una enfermedad y una púa o yema con un determinado sabor del fruto. Aunque en combinación son una quimera (un organismo compuesto por células genéticamente distintas), el injerto y el patrón en sí mismos mantienen sus identidades genéticas propias en lo que se refiere a la secuencia básica de su ADN.

El objetivo de utilizar un patrón modificado genéticamente es obtener injertos que puedan beneficiarse de las características conferidas por la ingeniería genética sin ser definidas como OGM o compartir el ADN modificado genéticamente aunque, en su conjunto, las plantas sean OGM.

Por tanto, estrictamente, el tejido del injerto no habría sido modificado genéticamente, mientras que el patrón sí. Aun así, muchas de las moléculas producidas por el patrón modificado genéticamente, ya fueran proteínas, ciertos tipos de ARN (por ejemplo ARN de doble cadena), hormonas o moléculas de señalización o defensa podrían difundirse por la planta quimérica en su conjunto.²¹

Cambios imprevistos y riesgos:

- 1• Impactos del patrón modificado genéticamente sobre el medio: se sabe que los procesos de ingeniería genética, como la transformación y el cultivo celular asociado (ver nota al pie 1) inducen mutaciones por todo el genoma, así como en el sitio de inserción. Estos pueden conducir a la aparición de rasgos imprevistos o a la alteración de rasgos existentes, con posibles impactos negativos para el suelo y el medio ambiente. Los efectos posicionales de los genes introducidos (por ejemplo: que afecten a la expresión de genes vecinos) pueden a su vez provocar impactos negativos.
- 2• Los compuestos y metabolitos producidos por el patrón modificado genéticamente estarán presentes en el injerto y sus productos (por ejemplo en el fruto) y podrían alterar la composición del fruto/producto, lo que a su vez podría alterar su composición nutricional, su alergenicidad o producción de toxinas.
- 3• Si se utilizan técnicas basadas en ARNi (ARN de interferencia) en el patrón modificado genéticamente, el silenciamiento génico activo en el ADN del patrón podría transferirse al ADN del injerto mediante el movimiento de pequeñas moléculas de ADN de uno a otro. Esto podría silenciar genes del injerto y alterar sus rasgos, y vice versa.

¹⁹ *Injerto*: Parte joven de una planta (brote, rama o yema) que se corta para ser injertada. NdelT: en castellano, a veces se denomina "injerto" únicamente injertados a la rama, yema, etc, y a veces al conjunto de la planta (patrón + púa/yema).

²⁰ *El injerto* es una técnica habitualmente utilizada en plantas leñosas desde hace más de 2000 años, que se utiliza habitualmente en árboles frutales, rosales y viñas. El injerto de vegetal es más reciente y se utiliza fundamentalmente en tomates y sandía, pero también en pepino y berenjena

²¹ el transporte se produce a través del *floema*, un tipo de tejido vascular que transporta agua, alimento y nutrientes hacia arriba y hacia abajo (en ambas direcciones) a las partes de la planta en crecimiento.

Conclusión: Obtener la planta quimérica modificada genéticamente, por definición, requiere ingeniería genética, y los riesgos asociados se deben a la ingeniería genética (la secuencia insertada, su localización y los procesos de transformación). El hecho de que el injerto no contenga ADN modificado genéticamente no reduce necesariamente los riesgos para el medio, los ecosistemas y/o la salud humana y animal. Dado que las moléculas/compuestos pueden viajar entre el patrón y el injerto, afectando al comportamiento y la composición molecular de este último, tanto la planta en su conjunto como el injerto y sus productos deberían definirse como OGM y ser sometidos a una evaluación y regulación completas. Esto resulta especialmente importante dado que la comprensión de los procesos e interacción entre patrón e injerto resulta aún muy pobre.

6) Mejoramiento inverso (RB)

La RB es una tecnología de ingeniería genética que permite reconstituir líneas parentales uniformes y puras (homocigóticas) a partir de un híbrido existente cuyas líneas parentales ya no están disponibles o no existen. El principal obstáculo para conseguir esto es que, cada vez que se producen gametos (células reproductoras) los cromosomas previamente adquiridos de las líneas parentales intercambian información, durante la fase de recombinación genética²², mezclando por tanto su ADN. Para evitar esto, la semilla híbrida seleccionada se modifica genéticamente para evitar la recombinación genética (mediante ARNi). Con ayuda del cultivo celular, los gametos individuales resultantes se utilizan para reconstituir plantas con dos juegos de los mismos cromosomas (denominadas "dobles haploides"). En una etapa más tardía se disecciona el transgén y se seleccionan líneas parentales que, combinadas, darán lugar al híbrido previsto.

Cambios imprevistos y riesgos:

- 1• Dado que se utilizan los mismos procesos de ingeniería genética, tanto para insertar como para reconstituir plantas mediante el cultivo celular, existe el mismo potencial para la aparición de resultados imprevistos que con otros métodos. Por lo general, habrá mutaciones en el sitio de inserción y por todo el genoma (por ejemplo deleciones, reordenaciones, multiplicaciones) a raíz de los procesos de transformación, incluyendo el cultivo celular, con consecuencias impredecibles que podrían provocar alteraciones en el rendimiento y susceptibilidad a enfermedades, acumulación de toxinas, aumento de la producción de alérgenos, cambios en la composición nutricional, etc. La gran mayoría de estas mutaciones seguirían presentes en las líneas parentales reconstituidas, aunque el transgén en sí se diseccione y, con él, las mutaciones más directamente relacionadas con el sitio de inserción en sí.
- 2• El método de silenciamiento génico mediante ARNi podría provocar el silenciamiento de genes no diana, efectos que se mantendrán durante varias

²² La *meiosis* es un proceso de división celular que da lugar a los gametos, es decir, las células reproductoras, cada una de las cuales contiene la mitad de cromosomas (es decir, son haploides) que las células vegetales normales (diploides), con dos juegos de cromosomas, uno de cada parental.

generaciones. Por tanto deben realizarse análisis que evalúen el rendimiento y la composición de estos organismos, además de evaluaciones de riesgos completas. Estas evaluaciones deberán tener lugar antes del cultivo inicial, pero también durante varias generaciones, una vez que se haya eliminado el silenciamiento génico previsto y los imprevistos, y debería incluir ensayos de alimentación.

- 3• Además, podrían haberse integrado componentes funcionales o secuencias completas del transgén en otros lugares, además de la inserción primaria. Estos podrían, por tanto, no ser eliminados durante el proceso de de-selección, lo que haría que pudieran seguir originando el silenciamiento génico de la región diana y de otras regiones no diana.

Conclusión: Deberán analizarse las líneas parentales, así como los nuevos híbridos, para determinar la presencia de secuencias transgénicas así como de efectos imprevistos debidos al silenciamiento génico en sitios no diana y las mutaciones inducidas por la transformación, que tienen el potencial de, por ejemplo, originar alteraciones del rendimiento y susceptibilidad a enfermedades, acumulación de toxinas, aumento de la producción de alérgenos, cambios en la composición nutricional, etc. Se requieren evaluaciones de riesgos completas.

7) Agro-infiltración: Agro-infiltración "sensu stricto" y Agro-infección

Este método implica dos tecnologías diferentes. No se pretende que el transgén específico se inserte de forma estable y se integre en el genoma de la planta, sino que estos genes estén presentes en la planta de forma temporal, durante un máximo de una generación.

Para esto, se introducen en un plásmido²³ de *Agrobacterium tumefaciens*²⁴ genes de proteínas concretas o de ARNs que interfieran con los genes de la planta (por ejemplo mediante ARNi). A continuación se tratan tejidos específicos de plantas vivas (por ejemplo, hojas) con estos microorganismos para introducir los genes modificados en las células de ese tejido, donde se expresarán.

Los objetivos pueden ser: evaluar posibles transgenes; estudiar la función de los propios genes de la planta (por ejemplo mediante silenciamiento génico vía ARNi); expresar y producir proteínas vegetales de alto valor (por ejemplo fármacos); producir plantas, semillas o híbridos con rasgos alterados mediante RdDM (Metilación de ADN dependiente de ARN - ver sección 4); o utilizar como sistema de introducción de otras herramientas NBT como las nucleasas sitio-dirigidas.

Dos tecnologías distintas:

Agro-infiltración "sensu stricto": se pretende que la expresión génica y el efecto del gen se mantengan localizados, por lo que no se pretende que el constructo genético preparado y utilizado se replique en la célula receptora.

²³ Un *plásmido* es un anillo circular de ADN en una célula bacteriana que puede replicarse de forma independiente del cromosoma y puede ser traspasado a otras bacterias. Aquí es donde contiene los transgenes.

²⁴ La utilización de *Agrobacterium* es uno de los principales métodos de modificación genética).

Agro-infección: la intención es dispersar el transgén por toda la planta, hacia casi todos los tejidos, pero sin que se integre en el ADN vegetal. Para esto, además del gen de interés, el constructo contiene una secuencia viral que permite su replicación en todas las células infectadas. Se pretende que el gen para el ARN se exprese a partir del vector, no del ADN de la planta.

Cambios imprevistos y riesgos:

- 1• Aunque se aplique de forma local, el constructo génico puede dispersarse por la planta, debido a las secuencias de *Agrobacterium* o virales utilizadas. Aunque se supone que serán temporales, el material genético podría integrarse en el ADN vegetal, incluyendo los tejidos reproductores, dando lugar de forma no intencionada a OGM y descendientes transgénicos.
- 2• La integración podría ocurrir en lugares aleatorios del genoma, y podría implicar a su vez a cualquiera de las secuencias de ADN introducidas, incluyendo el vector de ADN. La alteración de genes debido a efectos de posición o a secuencias presentes en el constructo génico podría ocasionar efectos negativos sobre el rendimiento de la planta, sobre el medio y sobre la biodiversidad, así como sobre su seguridad como alimento.
- 3• La liberación accidental de *Agrobacterium* modificadas genéticamente al medio también podría darse (ya sea por la dispersión o por la contaminación con material vegetal infiltrado que ha sido descartado o eliminado, o simplemente por vertidos procedentes del laboratorio, invernaderos o parcelas experimentales). Esto podría a su vez dar lugar a efectos adversos si este constructo génico se transfiere a otras plantas o microorganismos.
- 4• La replicación podría darse a niveles demasiado bajos para ser detectados durante largos períodos de tiempo, lo que aumenta la probabilidad de que o bien se integre o bien sufra mutaciones que hagan al ADN heredable de forma estable.

Conclusión: las plantas sujetas Agro-infiltración (incluyendo agro-infección), junto con cualquiera de sus partes o productos así como su progenie deben ser analizadas en busca de secuencias de ADN del vector y/o del constructo génico, así como de la presencia y efectos del silenciamiento génico, si ese era el propósito inicial de la agro-infiltración.

Para más información, cuatro de las referencias más importantes:

Eckerstorfer M, Miklau M and Gaugitsch H. (2014). New plant breeding techniques and risks associated with their application. Technical Report. REP-0477. Environmental Agency Austria. ISBN: 978-3-99004-282-3

<http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/REP0477.pdf>

Heinemann JA, Agapito-Tenfen SZ, and Carman JA. (2013). A comparative evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessment. *Environment International* 55: 43–55 <http://gmojudycarman.org/wp-content/uploads/2013/06/comparative-evaluation-of-the-regulation-of-GM-crops-or-products-containing-dsRNA-and-suggested-improvements-to-risk-assessments.pdf>

Wilson AK, Latham JR and Steinbrecher RA. (2006). Transformation-induced mutations in transgenic plants: analysis and biosafety implications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 23:209–237 <http://econexus.info/publication/transformation-induced-mutations-transgenic-plants>

Agapito-Tenfen, SZ and Wikmark, O-G (2015). Current status of emerging technologies for plant breeding: Biosafety and knowledge gaps of site directed nucleases and oligonucleotide-directed mutagenesis. GenØk Biosafety Report 02/15.

<http://genok.com/arkiv/4288/>