



NOTA DEL GRUPO DE TRABAJO DE LA CNB SOBRE NUEVAS TÉCNICAS GENÓMICAS

Antecedentes

El 5 de julio de 2023 la Comisión Europea publicó su propuesta legislativa sobre plantas obtenidas mediante nuevas técnicas genómicas y sus alimentos y piensos.

Durante las reuniones de los Grupos de Trabajo del Consejo para abordar la propuesta regulatoria, desde la secretaría del Consejo Interministerial se dio traslado de varias cuestiones para su consideración por el grupo de trabajo *Ad hoc* de la Comisión Nacional de Bioseguridad.

Se resumen a continuación:

1. Equivalencia entre las modificaciones obtenidas por mutagénesis dirigida y cisgénesis y las resultantes de la mutación espontánea o técnicas clásicas de mejora

Se mantienen las conclusiones contempladas del anterior informe de la Comisión Nacional de Bioseguridad.

Informe de la Comisión Nacional de Bioseguridad sobre la mutagénesis dirigida ¹

“La mutagénesis dirigida en este aspecto se sitúa dentro de las técnicas con mínimo riesgo por su especificidad y selección.

Con anterioridad a las técnicas de edición genética, la introducción de rasgos novedosos en los organismos por ingeniería genética se basaba principalmente en el uso de técnicas de introducción estable, pero aleatoria, de la modificación genética (por ejemplo, mutagénesis convencional) o de material genético extraño (transgénesis). Debido a la aleatoriedad, se pueden producir alteraciones no deseadas en el genoma, como la interrupción (no deseada) de genes y/o elementos reguladores, o la creación de nuevos marcos de lectura abiertos (por ejemplo, con una secuencia similar a toxinas o alérgenos conocidos), lo que explica por qué los procesos de selección de OMG con rasgos deseables a menudo son complicados y requieren mucho tiempo.

El uso de la edición genética ofrece la posibilidad de reducir la probabilidad de estos efectos adversos no deseados, ya que proporciona una manera de dirigirse a un locus predefinido del genoma, junto con una rápida selección posterior para conseguir la alteración genética deseada, desechando todas las demás que pudieran haber sido generadas. En el caso de las plantas, la edición genética puede dar lugar a variedades que no se distinguen genéticamente de aquellas que portan la misma modificación generada de forma espontánea, desarrolladas por introgresión del gen deseado mediante sucesivos cruzamientos o inducida mediante mutagénesis tradicional y, sin embargo, los requisitos reglamentarios para cada una de estas variedades serían diferentes, lo cual es de difícil comprensión desde el punto de vista científico”.

¹https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/informefinalmutagenesisdirigida_tcm30-489610.pdf



2. Posibilidad de combinación de varios tipos de modificaciones (contempladas en los criterios 1 a 5 del Anexo I) en una misma planta.

Las plantas pueden sufrir mutaciones espontáneas que pueden resultar en una combinación de modificaciones independientes en un mismo individuo. Por ejemplo, el número de mutaciones espontáneas por generación en plantas es, aproximadamente, de una cada 10^8 nucleótidos, es decir que, en el caso del maíz, aparecerían más de 20 modificaciones en cada generación. Las tecnologías de mutagénesis aleatoria por agentes químicos e ionizantes, consideradas como técnica de mejora tradicional, incrementan estas tasas de mutación y por tanto el número de modificaciones independientes que pueden aparecer combinadas en un individuo. Este incremento es muy significativo, de 1.000 a 10.000 veces, dependiendo de la concentración del mutágeno o de la dosis de irradiación.

Las técnicas de cruzamiento convencional en mejora vegetal también permiten combinar mutaciones alélicas presentes en los parentales (por ejemplo, cruzamiento de variedades élite) para obtener determinadas características fenotípicas.

Las tecnologías de edición genética también permitirían la combinación de varias modificaciones independientes como en los casos anteriores; la principal diferencia es que estos cambios se introducen de manera dirigida y seleccionada.

3. Implicaciones de los conceptos “DNA sequence sharing sequence similarity with the targeted site” e “informatic tools” del anexo I.

En un enfoque CRISPR, el *target site* se refiere a la secuencia de nucleótidos diana del ARNg, que tiene un tamaño limitado que va desde 23 hasta aproximadamente 50 nucleótidos, dependiendo del enfoque empleado.

Con el concepto “*DNA sharing sequence similarity with the targeted site*”, cabría pensar que el objetivo es el análisis de las conocidas como las potenciales mutaciones no objetivo, también conocidas como “*off-targets*”, más probables (que se pueden predecir por métodos bioinformáticos). Así se garantiza que estas posibles mutaciones también tengan que cumplir los criterios 1 a 5 (por ejemplo, el límite de 20 nucleótidos del criterio 1). Esta medida se considera proporcionada y más adecuada que secuenciar todo el genoma, dado que hay suficientes opiniones, incluyendo la de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, para considerar, como de hecho lo dice la propuesta en los textos introductorios, que las mutaciones *off-target* inducidas por técnicas de mutagénesis dirigida mediante endonucleasas son del mismo tipo que las resultantes de la aplicación de métodos convencionales y, por otro lado, no son más frecuentes en plantas resultantes de estas nuevas tecnologías con respecto a las plantas convencionales; pudiéndose eliminar siempre por retro-cruzamientos².

Secuenciar todo el genoma tiene además dos problemas. El primero es que, como se ha dicho más arriba, cada individuo tiene un número de mutaciones que son espontáneas y no se pueden diferenciar de las inducidas por lo que el número de mutaciones espontáneas puede superar para algunas especies el número de mutaciones dirigidas permitidas en la propuesta. Por otra parte, no es posible técnicamente secuenciar “completamente” un genoma. Todos los genomas, incluso los que se

² Mark H. J. Sturme, Jan Pieter van der Berg, Lianne M. S. Bouwman, Adinda De Schrijver, Ruud A. de Maagd, Gijs A. Kleter, and Evy Battaglia-de Wilde. Occurrence and Nature of Off-Target Modifications by CRISPR-Cas Genome Editing in Plants. ACS Agricultural Science & Technology 2022 2 (2), 192-201. DOI: 10.1021/acsagst.1c00270.



consideran completos, tienen indeterminaciones (Ns) y en la gran mayoría de los casos regiones no ensambladas.

Por tanto, se coincide con las conclusiones del Panel de OMG de EFSA³ sobre el limitado valor para la evaluación de riesgo que supone el análisis de los potenciales *off-target* en estos casos.

En cuanto al término "herramienta bioinformática" se considera adecuado no especificar un software o parámetros de análisis concretos para poder ajustarse al principio caso por caso, recomendando la valoración de estas cuestiones en la legislación secundaria o en notas técnicas (por ejemplo, preparadas por la EFSA), que podrían actualizarse con los avances científicos de una manera más eficiente.

4. Criterio 1. Propuesta para considerar que las inserciones se definan como un múltiplo de tres para incluir los codones sin sentido (*non sense codons*), considerando que un codón es la unidad de modificación genética.

Se considera que no es un cambio muy pertinente ya que la edición génica puede dirigirse, no sólo a secuencias codificantes, también a secuencias reguladoras. Incluso la inserción de un solo nucleótido en una secuencia codificante podría conducir a una interrupción total de la expresión de la proteína al crear un codón stop.

Con respecto al límite de los 20 nucleótidos, no está basado en datos biológicos o en estudios sobre el tamaño de las mutaciones espontáneas o resultantes de mejora convencional. No obstante, se trata de un valor basado en el análisis estadístico sobre la longitud que debería tener una secuencia para que sea muy improbable que aparezca por azar, teniendo en cuenta que hay 4 nucleótidos y el tamaño del genoma (en este caso el del maíz).⁴

5. Criterio 2. Propuesta para establecer una limitación en el tamaño de las deleciones

La edición genética permite realizar modificaciones pequeñas, que afectan a un reducido número de pares de bases, pero también modificaciones estructurales de mayor tamaño como deleciones, inserciones o incluso reestructuraciones cromosómicas.

En este sentido, las nuevas técnicas de secuenciación de lecturas largas están poniendo de manifiesto la ubicuidad de este tipo de variaciones estructurales en la variabilidad natural de las especies cultivadas y su enorme impacto en los procesos tradicionales de domesticación y mejora. Por otra parte, este tipo de variaciones estructurales, con diferentes tamaños y alcance, también pueden obtenerse mediante mutagénesis convencional.

³ [Applicability of the EFSA Opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide-directed mutagenesis \(wiley.com\)](#)

⁴ (<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC63971>)



Se cita como ejemplo el caso del arroz con deleciones de gran tamaño asociadas a su domesticación⁵; o del tomate⁶ en el que la catalogación de las variantes estructurales al secuenciar con lecturas largas permite comprobar la existencia de deleciones de tamaño significativo.

6. Criterio 5. Propuesta para establecer una limitación en el tamaño de las inversiones.

Al igual que en el caso de las deleciones, estas variaciones estructurales son más difíciles de detectar con los sistemas tradicionales de secuenciación, pero no por eso se debe descartar que ocurran de forma espontánea o como resultado de mutaciones con agentes químicos o ionizantes. Este tipo de modificaciones también se han estado utilizando en mejora genética⁷, como por ejemplo en el arroz^{8,9}, la avena¹⁰, la cebada, en la que las accesiones de cebada domesticadas en el norte de Europa contienen una inversión de 10 Mb asociado con floración tardía y la adaptación al clima del noreste de Europa¹¹, o el tomate en el que se han encontrado 28 inversiones (entre 483 pb y 13,9 Mb) entre dos genomas de tomate cultivado, estando funcionalmente asociados con resistencia a estrés más de la mitad de los genes ubicados dentro de las inversiones¹².

7. Mecanismos moleculares que intervienen en el rasgo de tolerancia a herbicidas.

Hay un número significativo de casos en los que la resistencia a herbicidas está asociada a la inhibición de un único enzima por lo que mutaciones puntuales, como las descritas en el anexo I, incluso de un único aminoácido podrían dar lugar a estos rasgos¹³.

Madrid, a 26 de enero de 2024

⁵ Shang, L., Li, X., He, H. *et al.* A super pan-genomic landscape of rice. *Cell Res* **32**, 878–896 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00685-z>.

⁶ Michael Alonge, Xingang Wang, Matthias Benoit, Sebastian Soyk, Lara Pereira, Lei Zhang, Hamsini Suresh, Srividya Ramakrishnan, Florian Maumus, Danielle Ciren, Yuval Levy, Tom Hai Harel, Gili Shalev-Schlosser, Ziva Amsellem, Hamid Razifard, Ana L. Caicedo, Denise M. Tieman, Harry Klee, Melanie Kirsche, Sergey Aganezov, T. Rhyker Ranallo-Benavidez, Zachary H. Lemmon, Jennifer Kim, Gina Robitaille, Melissa Kramer, Sara Goodwin, W. Richard McCombie, Samuel Hutton, Joyce Van Eck, Jesse Gillis, Yuval Eshed, Fritz J. Sedlazeck, Esther van der Knaap, Michael C. Schatz, Zachary B. Lippman, Major Impacts of Widespread Structural Variation on Gene Expression and Crop Improvement in Tomato. *Cell* **182**, 141–161. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.021>.

⁷ Hu, H., Scheben, A., Wang, J., Li, F., Li, C., Edwards, D. and Zhao, J. (2023), Unravelling inversions: Technological advances, challenges, and potential impact on crop breeding. *Plant Biotechnol. J.* <https://doi.org/10.1111/pbi.14224>.

⁸ Wu, Y. *et al.* Deletions linked to PROG1 gene participate in plant architecture domestication in Asian and African rice. *Nat. Commun.* **9**, 4157 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06509-2>

⁹ [https://www.cell.com/molecular-plant/pdf/S1674-2052\(16\)30004-1.pdf](https://www.cell.com/molecular-plant/pdf/S1674-2052(16)30004-1.pdf)

[Pan-genome inversion index reveals evolutionary insights into the subpopulation structure of Asian rice.](#)

¹⁰ Tinker NA, Wight CP, Bekele WA, Yan W, Jellen EN, Renhuldt NT, Sirijovski N, Lux T, Spannagl M, Mascher M. Genome analysis in *Avena sativa* reveals hidden breeding barriers and opportunities for oat improvement. *Commun Biol.* **2022 May** 18;5(1):474. doi: 10.1038/s42003-022-03256-5.

¹¹ Jayakodi, M., Padmarasu, S., Haberer, G. *et al.* The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Nature* **588**, 284–289 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2947-8>.

¹² Wang, X., Gao, L., Jiao, C. *et al.* Genome of *Solanum pimpinellifolium* provides insights into structural variants during tomato breeding. *Nat Commun* **11**, 5817 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19682-0>.

¹³ Todd A. Gaines, Stephen O. Duke², Sarah Morran, Carlos A. G. Rigon, Patrick J. Tranel, Anita Küpper, and Franck E. Dayan. Mechanisms of evolved herbicide resistance. *From the Agricultural Biology J. Biol. Chem.* (2020) 295(30) 10307–10330.