

## **“Nuevas técnicas de mejoramiento de plantas (NPBTs):**

**Elementos de análisis y recomendaciones  
sobre su enfoque regulatorio”**

Documento elaborado por el Grupo de Trabajo  
de Reguladores y Evaluadores Técnicos en Bioseguridad

CIBIOGEM, 2018

## PREFACIO

La domesticación de diversas plantas silvestres iniciada por el hombre hace más de diez mil años, ha resultado en los cultivos modernos que actualmente explotamos a través de la agricultura moderna para satisfacer nuestras necesidades básicas de alimentación. A lo largo de esta línea de tiempo, diversos métodos de mejoramiento se han empleado en la modificación y selección de las características de cada variedad agrícola y, a partir de las últimas cuatro décadas, las técnicas de la ingeniería genética se han sumado a las prácticas convencionales de mejoramiento de cultivos vegetales. Así, los cultivos de trigo, cebada, avena, arroz, y soya, entre otros, que han sido mejorados por mutagénesis inducida, actualmente cubren alrededor del 70% del área de cultivo a nivel mundial; mientras que los cultivos OGMs de primera y segunda generación han demostrado su aporte impulsando la productividad y aumentando la calidad nutricional de los alimentos.

El propósito del presente documento, elaborado por los miembros del Grupo de Trabajo de Reguladores Técnicos en Bioseguridad de la CIBIOGEM y titulado “Nuevas técnicas de mejoramiento de plantas (NPBTs): Elementos de análisis y recomendaciones sobre su enfoque regulatorio”, consiste en proporcionar información relevante sobre los elementos conceptuales y metodológicos de algunas NPBTs que han sido empleadas exitosamente desde hace casi una década para el mejoramiento de diversos cultivos vegetales que hoy día han alcanzado la madurez comercial, así como de su relación con el marco jurídico nacional sobre bioseguridad y otras normativas vinculantes. Al respecto, se incluye un documento guía que ilustra, mediante el seguimiento de algunos ejemplos, cómo pueden abordarse distintos casos para identificar en ellos diversos criterios técnicos y legales que permitan la apertura de nuevos escenarios de gestión y de ajuste regulatorio.

Aunque este documento es de carácter científico y está estrictamente apegado al estado normativo actual sobre bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs), muchas de las técnicas aquí descritas continúan adaptándose y actualizándose para alcanzar los nuevos retos que la sociedad demanda, por lo que su alcance técnico está limitado a una ventana de tiempo. Por otro lado, el monitoreo de productos generados a partir de algunas NPBTs que modifican tan solo unos cuantos nucleótidos del ADN de la especie vegetal de interés, aunque están considerados dentro del marco jurídico de bioseguridad nacional como OGMs y deben ser regulados, son indistinguibles de las mutaciones que ocurren de manera natural en las variedades vegetales no modificadas por estas técnicas. Considerando este hecho, invitamos a los legisladores a considerar estos hechos que repercuten directamente en el monitoreo y la regulación de estos productos a nivel nacional, y a que impulsen su desarrollo y comercialización en beneficio de nuestro país.

El contenido de este documento ha sido avalado por el pleno del Consejo Consultivo Científico de la CIBIOGEM.

## I. Antecedentes

La Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM)<sup>1</sup> cuenta con un Comité Técnico<sup>2</sup> el cuál, de conformidad al artículo 19 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y el artículo 41 de las Reglas de Operación de la CIBIOGEM, puede acordar la conformación de Subcomités Especializados, así como solicitar a la Secretaría Ejecutiva la coordinación de Grupos de Trabajo. Lo anterior para la atención y el desarrollo de temas que se consideren necesarios para el cumplimiento del objeto de la Comisión.

Debido al creciente desarrollo y aplicación de nuevas técnicas para el mejoramiento de plantas (NPBT por sus siglas en inglés), en la Primera Sesión Ordinaria del Comité Técnico del 2014 se tomó el siguiente acuerdo:

*CT/ORD/01/2014-10, Los miembros del Comité Técnico de la CIBIOGEM acuerdan que el tema de Nuevas Técnicas de Mejoramiento de Plantas y su regulación en México, sea analizado dentro del GT-RET para que emitan sus recomendaciones, con la asesoría, en su caso de las áreas jurídicas de las instancias que lo conforman y científicos especializados.*

En atención a este acuerdo, se convocó al GT-RET y a las áreas jurídicas de las instancias que conforman a la Comisión. - En respuesta a los trabajos desarrollados en el marco de la OECD sobre el documento de presencia en bajos niveles (LLP por sus siglas en inglés) el GT-LLP/AP se sumó a este ejercicio y tomó el siguiente acuerdo durante su tercera reunión de 2014:

*GT-LLP/AP/03/2014-03: Los integrantes del Grupo de Trabajo acuerdan que se debe iniciar la discusión entre las instancias que conforman a la CIBIOGEM, sobre si se van a regular y cómo se van a regular, las diferentes técnicas aplicadas al mejoramiento de cultivos, que incluyen entre otras: cisgénesis, intragénesis, mutación dirigida, segregantes negativos, etc, durante el primer cuatrimestre de 2014.*

Para dar cumplimiento a estos acuerdos, se llevó a cabo una serie de nueve seminarios técnicos y reuniones de discusión para analizar el tema de NPBT y su regulación en México. Estas reuniones que se realizaron de julio a diciembre de 2014, tuvieron el objetivo de sustentar, con elementos técnicos y legales, la discusión sobre las NPBT que pudieran ser reguladas conforme la legislación nacional<sup>3</sup> y cómo implementar esta regulación, con relación a los productos obtenidos a partir de estas nuevas técnicas de mejoramiento de plantas.

La Secretaría Ejecutiva retomó los trabajos iniciados y compiló un primer borrador en 2017 que se presentó al GT-RET en su primera reunión de 2018, en dónde se acordó continuar la elaboración del documento e involucrar a los Consejos Consultivos.

---

<sup>1</sup> Todas las siglas y acrónimos se encuentran en la sección 7

<sup>2</sup> <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/comite-tecnico>

<sup>3</sup> Conforme a los artículos 3 y 6 de la LBOGM

El Consejo Consultivo Científico (CCC) de la CIBIOGEM en su Primera Sesión Ordinaria de 2018, acordó revisar el documento y creó una Comisión especial para dar seguimiento a esta actividad, la cual está integrada por las especialistas en las disciplinas de Biología Molecular de Plantas, Sanidad Vegetal y Ecología (acuerdo CCC/ORD/01/18-6). Esta comisión revisó los avances del documento conforme los acuerdos CCC/ORD/02/18-5 y CCC/ORD/03/18-5.

Adicionalmente durante su Primera Sesión Ordinaria de 2018 el pleno de la CIBIOGEM instruyó a la Secretaría Ejecutiva coordinar con las instancias que conforman la Comisión, la elaboración de un documento de posición Nacional respecto a consideraciones sobre el proceso regulatorio de las nuevas tecnologías de edición genómica (acuerdo CIBIOGEM/ORD/01/2018-05). Lo anterior, tomando en cuenta las discusiones y los enfoques que se están llevando a cabo en el ámbito internacional. El Pleno de la CIBIOGEM revisó los avances del documento durante su Segunda Sesión Ordinaria de 2018 y dio por cumplidos los Acuerdos asociados a su elaboración.

La revisión final del documento se realizó durante la Cuarta Sesión Ordinaria de 2018 del CCC de la CIBIOGEM, donde el Consejo en Pleno mediante el acuerdo CCC/ORD/04/18-6 aprobó el documento y recomendó que sea considerado como un instrumento técnico que guíe la definición de los aspectos regulatorios en bioseguridad y otras normativas relacionadas con estas nuevas herramientas de biotecnología.

En su Décimo Séptima reunión de trabajo de 2018, los miembros del GT-RET revisaron las actividades de cierre asociadas con la revisión final del documento y tomaron el siguiente acuerdo que complementa los anteriores:

*GT-RET/17/18-3. Los miembros del Grupo de Trabajo de Reguladores y Evaluadores Técnicos, han revisado la última versión del documento “Nuevas técnicas de mejoramiento de plantas: Elementos de análisis y recomendaciones sobre su enfoque regulatorio”, y aprueban que sea considerado como un instrumento técnico base para la definición de los aspectos regulatorios en bioseguridad y otras normativas relacionadas con estas nuevas herramientas de biotecnología, conforme a las atribuciones de cada Secretaría.*

En seguimiento a estas acciones el Comité Técnico de la CIBIOGEM, en su Primera sesión extraordinaria de 2018, revisó el documento concluido, y en atención a las actividades de cierre asociadas a este, tomó el siguiente acuerdo:

*CT/EXT/01/2018-04 Los miembros del Comité Técnico de la CIBIOGEM, se dan por enterados del documento final “Nuevas técnicas de mejoramiento de plantas: elementos de análisis y recomendaciones sobre su enfoque regulatorio” y recomienda que sea considerado como base para la definición de los aspectos regulatorios en bioseguridad y otras normativas relacionadas con estas nuevas herramientas de biotecnología, conforme a las atribuciones de cada Secretaría.*

## **II. Introducción**

A nivel global se enfrentan grandes desafíos en la alimentación en un momento de creciente presión poblacional, de cambio climático y de pérdida de diversidad biológica. La seguridad alimentaria tiene diferentes componentes, dentro de los que se encuentra la productividad, la equidad social y la

sustentabilidad ambiental. Una forma eficiente de incrementar la productividad en los cultivos, es por medio del uso de variedades con mejor rendimiento, mayor eficiencia en el uso de insumos agrícolas, y capaces de resistir los efectos del estrés biótico y abiótico generado por las condiciones climáticas y amigable con el ambiente.

En particular las condiciones necesarias para el mejoramiento de plantas, parten de la existencia de diversidad fenotípica y genotípica presente en la naturaleza o generada por diferentes procedimientos, que pueda ser aprovechada para obtener nuevas variedades y productos.

Derivado de los avances de la investigación genómica de los últimos años, se han desarrollado o ajustado, un conjunto de nuevas técnicas que permiten estrategias más eficientes de mejoramiento genético para los cultivos y que pueden ser fundamentales para la adaptación y el desarrollo exitoso de especies vegetales. Estas técnicas, también conocidas como NPBT<sup>4</sup>, que incluyen a las técnicas de edición de genomas, o bioingeniería de precisión, permiten establecer cambios dirigidos, predecibles, planeados y permanentes en sitios específicos del genoma de células vivas y organismos, en particular cultivos.

Cabe destacar que estas técnicas de edición genómica tienen un amplio rango de aplicación que va más allá de la agricultura y que inciden notablemente en la salud humana, la sanidad vegetal y la sanidad animal, así como en procesos de generación de bioenergía y biomateriales. Por lo tanto, estas nuevas técnicas proveen diferentes oportunidades para atender desafíos globales y locales ayudando a alcanzar el desarrollo sostenible.

En este sentido, la regulación aplicada a los organismos genéticamente modificados (OGMs), tiene diferentes enfoques, como los establecidos por Japón y Brasil que difieren del enfoque de la Unión Europea, y que contrastan también con enfoques como los de los EEUU, Canadá, Australia, Chile y Argentina.

Los aspectos regulatorios asociados a las NPBT están siendo ampliamente discutidos en el ámbito internacional. La regulación actual, aplicada en México a los OGMs podría o no ser pertinente para los productos de estas nuevas tecnologías de mejoramiento de plantas. Por lo tanto, es importante analizar caso por caso, dichas técnicas y productos para identificar criterios y acciones para la aplicación adecuada del marco regulatorio nacional. Las decisiones de cómo se regulen las NPBT en México tendrán implicaciones importantes para la investigación y desarrollo tecnológico nacionales, la seguridad alimentaria, el ambiente y la biodiversidad, la salud humana, el sector agropecuario y el desarrollo rural.

Entendiendo la importancia de las nuevas biotecnologías como una alternativa de la bioeconomía mundial y el papel de México como un país megadiverso y al mismo tiempo como una potencia de exportación de productos agroalimentarios, es clave que las políticas regulatorias de bioseguridad sean desarrolladas con coherencia técnica y equidad social que beneficie a todos los sectores de la sociedad, bajo una base científica sólida, que cumpla con la legislación nacional vigente y tratados internacionales de los que México es Parte.

---

<sup>4</sup> Existen otros nombres y nomenclaturas relacionadas con NPBTs

Este documento contiene la información y descripción de las principales NPBT y desarrolla un enfoque metodológico para orientar a los actores involucrados respecto a la naturaleza de estas técnicas y sus productos, así como los criterios para, en su momento, definir su estatus regulatorio. Consecuentemente las recomendaciones aquí planteadas, pretenden brindar orientación a los investigadores nacionales y a los desarrolladores.

### **III. Objetivo**

#### Objetivo general

Aportar elementos conceptuales y metodológicos que fundamentan los desarrollos y aplicaciones en el mejoramiento genético por NPBT y su relación con los supuestos jurídicos y legales que sustentan la regulación en bioseguridad y otras normativas, para definir escenarios de gestión y ajuste regulatorio.

#### Objetivos específicos

Explicar las bases científicas y metodológicas de procedimientos experimentales o tecnológicos incluidos en las NPBT para la producción primaria.

Elaborar una clasificación de procesos o productos derivados de las NPBT, para relacionarlos con los elementos normativos contenidos en la legislación mexicana en bioseguridad y otras normativas aplicables.

Analizar casos o proyectos en desarrollo de NPBT en México o de relevancia global, para identificar criterios con claridad técnica y legal que permitan recomendar escenarios de gestión y/o ajuste regulatorio.

#### **Consideraciones**

Para analizar y dar claridad conceptual al enfoque regulatorio de las NPBT, es necesario tener en consideración las definiciones del Protocolo de Cartagena incluidas en la LBOGM. Según la legislación un organismo genéticamente modificado se define como “cualquier organismo vivo que ha adquirido una combinación genética novedosa generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna”<sup>5</sup>.

Por lo tanto y de acuerdo con esta definición, es importante identificar que existen dos elementos indicativos para que un organismo sea considerado como genéticamente modificado (GM), el primero es que haya adquirido una combinación novedosa de material genético y la segunda es que ésta se haya generado mediante procedimientos de la biotecnología moderna. Es así que un OGM se entiende como un producto obtenido de un proceso —biotecnología moderna—, en el que se puede identificar un elemento de novedad adquirido.

---

<sup>5</sup> Artículo 3, fracción XXI de la LBOGM y artículo 3, inciso g) del Protocolo de Cartagena Sobre Seguridad de la Biotecnología.

De acuerdo al Protocolo de Cartagena se entiende por biotecnología moderna la aplicación de:

- a. Técnicas *in vitro* del ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN y ARN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u organelos, o
  - b. La fusión de células más allá de la familia taxonómica,
- que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional.<sup>6</sup>

Es necesario analizar si las NPBT y sus productos, encuadran en los supuestos contenidos en la definición de técnicas de biotecnología moderna y si corresponden a los dos elementos indicativos que definen a un OGM.

La LBOGM en su artículo 6 fracción I excluye de su ámbito de aplicación a los OGMs "... cuando la modificación genética de dichos organismos se obtenga por técnicas de mutagénesis tradicional o de fusión celular incluida la de protoplastos de células vegetales, en que los organismos resultantes puedan producirse también mediante métodos tradicionales de multiplicación o de cultivo *in vivo* o *in vitro*, siempre que estas técnicas no supongan la utilización de OGMs como organismos receptores o parentales".

Esto significa que aquellos OGMs obtenidos por técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional, cruza convencional, así como por, mutagénesis química y mutagénesis por radiación, están excluidos del ámbito de aplicación de la LBOGM.

Algunas modificaciones como deleciones, inserciones, sustituciones, introducción de secuencias de parientes sexualmente compatibles y productos de segregación, deberán analizarse con base en estas consideraciones.

#### **IV. Bases científicas y metodológicas**

En esta sección se describirá en qué consiste cada una de las siete técnicas que abarca el documento, explicando sus respectivas bases científicas y metodológicas y los procedimientos experimentales o tecnológicos incluidos. La clasificación de los procesos y productos desarrollados mediante las diversas NPBTs, se hará una vez que se concluya con la descripción de todas las técnicas, y se detallará en la sección de Análisis de características de los productos.

Las NPBTs se presentan en orden alfabético para realizar esta primera aproximación:

1. Agro-infiltración
2. Cisgénesis / Intragénesis
3. Injerto sobre patrón GM
4. Hibridación reversa
5. Metilación de ADN dirigida por ARN

---

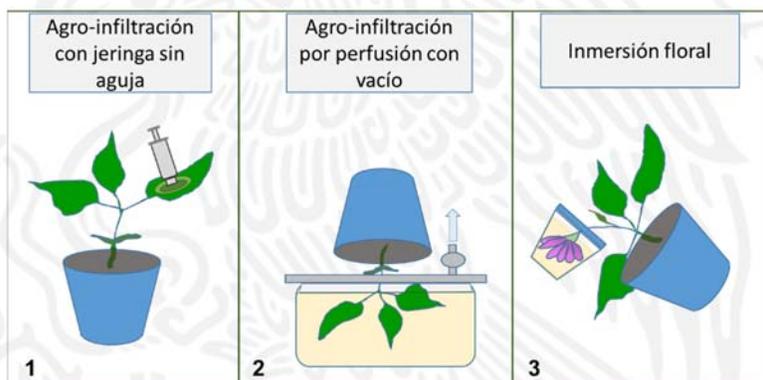
<sup>6</sup> Artículo 3, inciso i) del Protocolo de Cartagena Sobre Seguridad de la Biotecnología.

6. Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos
7. Nucleasas dirigidas a sitios específicos

## V. Descripción de las Técnicas

### 1. Agro-infiltración

La agro-infiltración es una técnica que usa *Agrobacterium* recombinante para lograr la expresión transitoria de construcciones genéticas en tejidos de plantas. Generalmente, no se pretende la integración de las construcciones genéticas en células germinales (Vogel, 2012), aunque es posible infiltrar órganos florales. Los tejidos de la planta, son infiltrados con una suspensión líquida de *Agrobacterium*, que contiene los genes que se desean expresar en la planta. Existen dos procedimientos para infiltrar los tejidos de la planta, uno utiliza la inyección con jeringas sin agujas y el otro utiliza cámaras de vacío para perfundir la suspensión líquida. Dependiendo del tipo de construcción genética usada para la agro-infiltración, los genes son expresados de manera local y transitoria, de manera sistémica o, de forma heredable (Lusser et al. 2012; Schaart et al. 2016) figura 1.1.



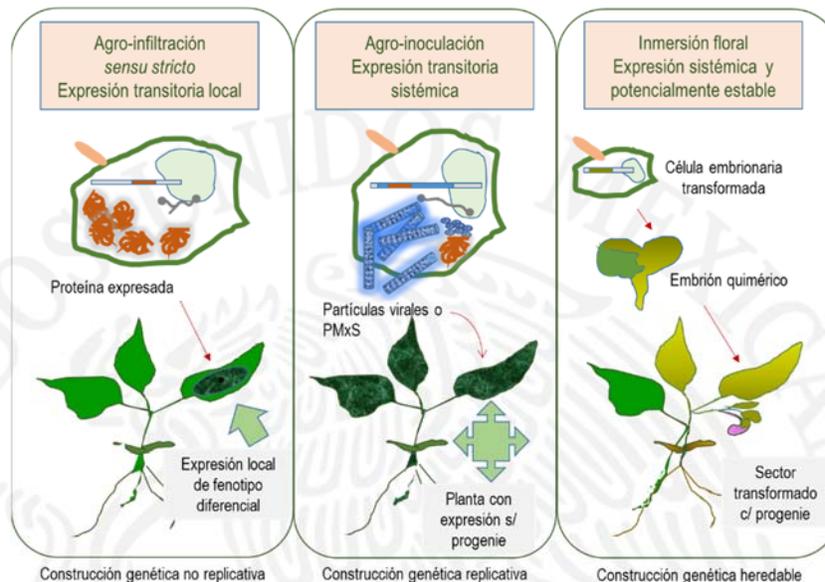
**Figura 1.1.** Procedimientos de agro-infiltración (Elaboración propia)

Considerando los procedimientos anteriores, se pueden presentar tres diferentes tipos de resultados de la agro-infiltración (figura 1.2):

1."Agro-infiltración *sensu stricto*": se infiltra el tejido somático, típicamente el foliar, con el *Agrobacterium* que contiene una construcción genética no replicativa; la expresión de los genes introducidos ocurre localmente y queda confinada en la sección de la planta que ha sido infiltrada. Cómo se busca una expresión transitoria abundante, no se utiliza tejido germinal.

2."Agro-inoculación" o "agro-infección": el tejido somático, típicamente el foliar se infiltra con el *Agrobacterium* que contiene una construcción genética replicativa. Esto significa que los genes que se insertan, primero fueron incorporados en un vector viral que después se integra al T-DNA. Debido a que el vector viral se replica y se disemina dentro de las células, la expresión genética tiene lugar en toda la planta (Schaart et al. 2016). Dependiendo del diseño de la construcción genética replicativa, ésta puede llevar a la producción de una proteína, o al silenciamiento de un gen endógeno (Vogel, 2012), ambos de forma transitoria.

3. "Inmersión Floral": Esta agro-infiltración se realiza en el tejido de la línea germinal, generalmente flores, el cual se sumerge en una suspensión de *Agrobacterium* que alberga a la construcción de ADN, buscando la transformación de algunos embriones que pueden ser seleccionados en la etapa de germinación (Schaart et al. 2016). El objetivo es generar plantas transformadas de manera estable que contengan la modificación genética y no requieran el procedimiento de regeneración in vitro a partir de tejido indiferenciado. Como resultado, en función de la construcción genética, podrían obtenerse semillas transformadas similares a las obtenidas por otros métodos.



**Figura 1.2.** Patrones de expresión que se pueden obtener por agro-infiltración (Elaboración propia)

## Usos y Aplicaciones

La técnica de agro-infiltración *sensu stricto* se desarrolla como una plataforma de producción para proteínas recombinantes de alto valor, debido a la flexibilidad del sistema y a los altos rendimientos obtenidos en la producción de las proteínas recombinantes (Chen & Lai. 2015). En este caso, el producto de interés es la sección de la planta agro-infiltrada y no la progenie, debido a que la transformación es local y transitoria (Leuzinger et al. 2013). La progenie resultante no es GM ya que no se insertaron genes en el genoma de las células germinales de la planta agro-infiltrada (Lusser et al. 2012; Schaart et al. 2016). La agro-infiltración también puede utilizarse para seleccionar plantas con fenotipos que pueden ser aprovechados en el mejoramiento genético (Zeinipour et al. 2018). Por ejemplo, para identificar transformantes con fenotipo de resistencia a patógenos (Ma et al. 2012).

Por otra parte, la técnica de Inmersión Floral, permite utilizar aquellas semillas obtenidas a partir de las plantas tratadas como parentales, posterior a la selección de los fenotipos deseados.

Los métodos de agro-inoculación se han utilizado desde hace mucho tiempo para estudiar procesos de silenciamiento de genes endógenos (Schöb et al. 1997), con virus que inducen el silenciamiento de genes (VIGS) o para inducir la expresión de genes (VAGE) (Vogel, 2012)

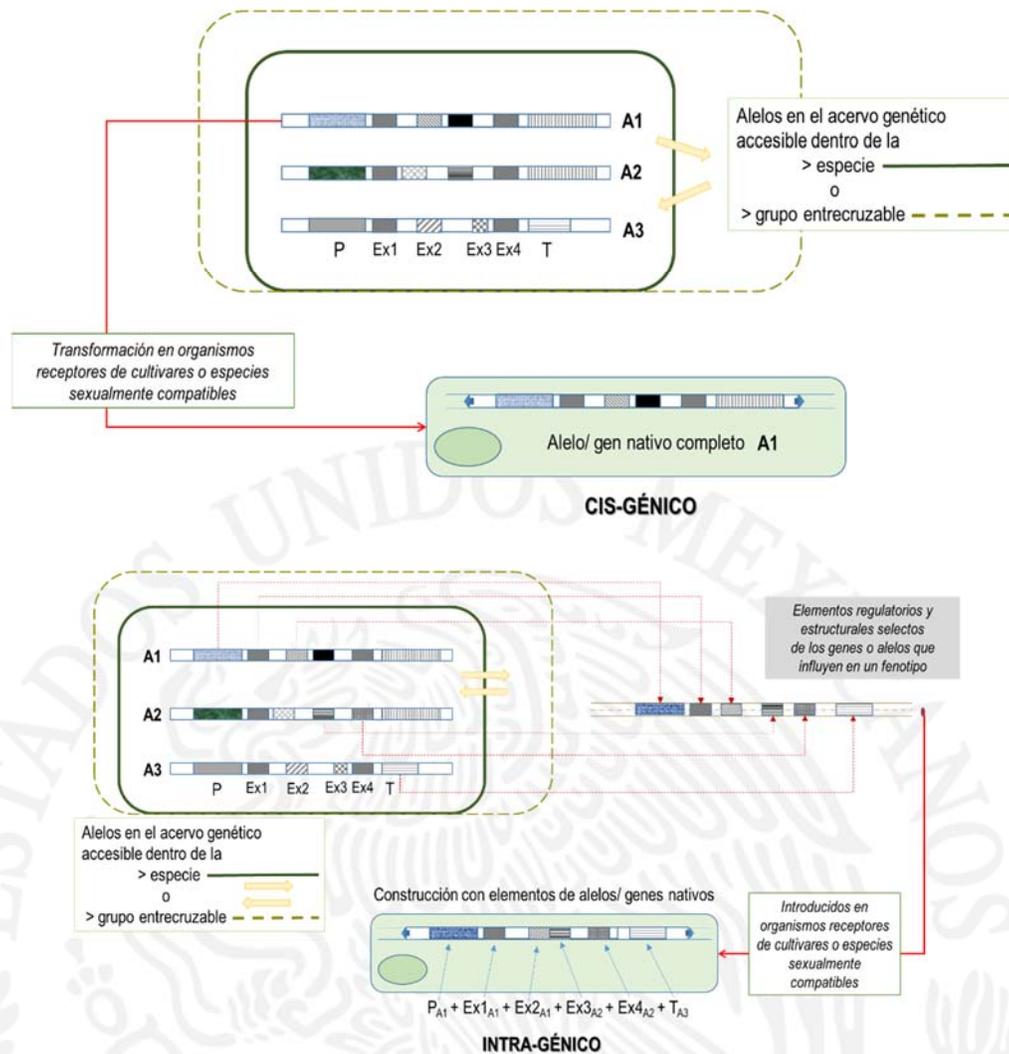
## 2. Cisgénesis e Intragénesis

La cisgénesis es un concepto relativamente nuevo en la modificación de plantas, concerniente al origen del DNA insertado (Schouten et al. 2006). A diferencia de la transgénesis, la cisgénesis implica la utilización de genes completos o alelos de especies sexualmente compatibles, o de la misma especie. En esta estrategia la secuencia insertada, es una copia del gen natural, dónde se conserva la organización de intrones, exones, y demás elementos reguladores de la expresión, sin cambios y en su orientación original (Schaart. 2015). Es decir, se introducen secuencias compartidas, presentes en el acervo genético común, accesible mediante cruza convencionales, incluyendo todos sus elementos estructurales y regulatorios, es posible prescindir del uso de marcadores de selección externos (all-native DNA transformation).

La intragénesis también utiliza secuencias de genes o alelos de especies sexualmente compatibles o de la misma especie, en dónde, a diferencia de la cisgénesis, las construcciones obtenidas se originan a partir de diferentes elementos funcionales y pueden ser insertadas en orientaciones sentido o anti-sentido respecto a las posiciones en el gen original (Espinoza et al. 2013).

La cisgénesis y la intragénesis aprovechan el mismo acervo genético que está disponible para el mejoramiento convencional (Holme et al. 2013). Si bien ambas utilizan las mismas técnicas de biotecnología moderna que la transgénesis, la diferencia es que, en aquellas, tanto genes foráneos, como marcadores de selección y fragmentos de vectores, deben estar ausentes o ser eliminados desde los transformantes primarios o en su progenie para ser considerados como tales (Singh A., et al. 2015, Lusser and Davies 2013) figura 2.1.

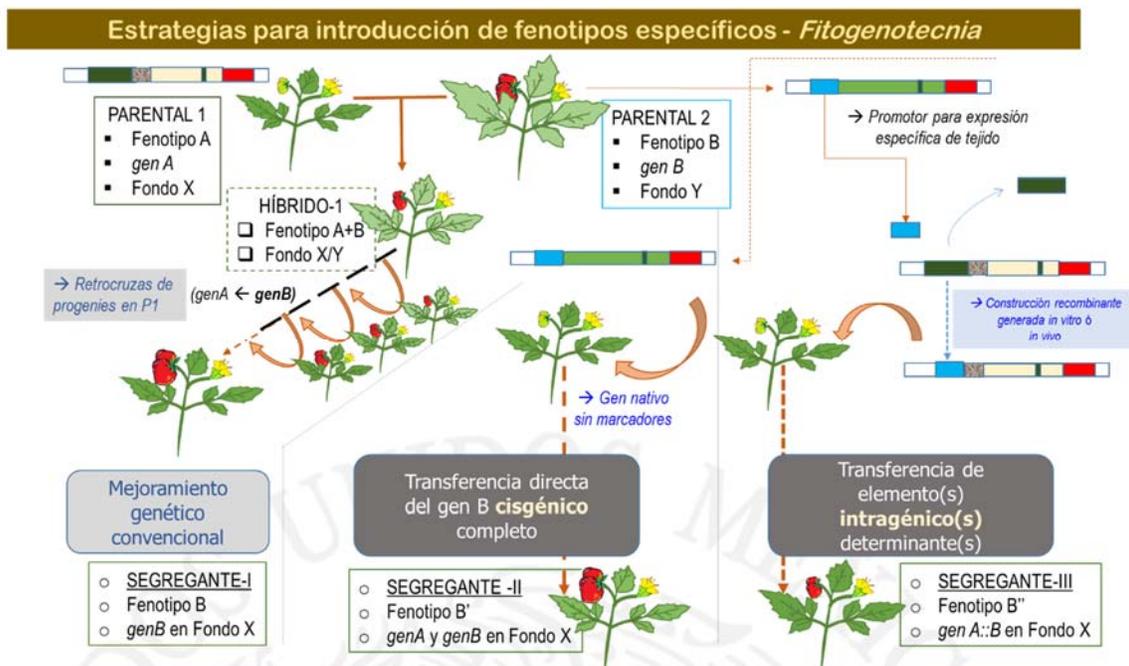
Los métodos de transformación genética más utilizados son el bombardeo con micropartículas (biobalística) y los mediados por *A. tumefaciens* (Schaart, van de Wiel et al. 2016), lo que implica que el cisgen o el intragen se inserta en un locus al azar, por lo que puede quedar ubicado en un entorno genómico distinto del cual se encuentra en el donador.



**Figura 2.1.** Diferencias estructurales y funcionales entre Cisgénesis e Intragénesis

## 2.1. Usos y Aplicaciones de cisgénesis e intragénesis

Ambas estrategias pretenden conferir fenotipos a la planta modificada que podrían ser obtenidos por mejoramiento convencional y en un menor tiempo. En la práctica, solo en el caso de los organismos cisgénicos, se podrían obtener modificaciones genéticas similares a las obtenidas por métodos de mejoramiento convencionales. En cambio, la intragénesis ofrece más opciones para modificar la expresión de genes y el desarrollo de rasgos en la planta, ya que permite generar combinaciones de genes con diferentes promotores y elementos regulatorios provenientes de la propia especie o de especies compatibles (Lusser et al. 2012) figura 2.2.



**Figura 2.2.** Estrategias para introducción de fenotipos específicos

La cisgénesis facilita la incorporación de alelos de interés, evitando el acarreo por ligamiento asociado a múltiples retrocruzamientos, que requiere el mejoramiento convencional. Entre las aplicaciones de esta estrategia se han generado productos con características como resistencia a patógenos y calidad comercial (Belfanti et al. 2004, de Vetten et al. 2003, Haverkort et al. 2009). Las aplicaciones de la intragénesis además pueden incluir el silenciamiento de genes mediante ARN de interferencia (ARNi) por la introducción de repeticiones invertidas del ADN (Lusser et al. 2012) o la modificación de la expresión específica de genes endógenos. La resistencia a enfermedades, la reducción del contenido de alérgenos y de lignina, el incremento de vitaminas y la alteración en la composición de almidones (Romens, 2007), son otros ejemplos de aplicaciones. La comparación de las características de variedades que contienen inserciones en el genoma se indican a continuación (Tabla 1).

**Tabla V.1.** Cuadro comparativo entre tipos de inserciones en el genoma.

| Característica                          | <u>TRANS</u> GÉNESIS           | <u>CIS</u> GÉNESIS                                     | <u>INTR</u> GÉNESIS                                    | Contrastación  |
|---|--------------------------------|--|--|--|
| Fuente de secuencias de ADN codificante | De cualquier tipo de organismo | De la misma especie o del grupo sexualmente compatible | De la misma especie o del grupo sexualmente compatible | Los fenotipos de cisgénicos y algunos de intragénicos podrían ser obtenidos por métodos convencionales                 |
| Fuente de secuencias reguladoras        | De cualquier tipo de organismo | De la misma especie o del grupo sexualmente compatible | De la misma especie o del grupo sexualmente compatible | Las secuencias reguladoras están presentes en el acervo genético que está disponible para el mejoramiento convencional |

| Característica  | <u>TRANS</u> GÉNESIS   | <u>CIS</u> GÉNESIS  | <u>INTR</u> GÉNESIS  | Contrastación   |
|---|--|---|--|---|
| Tipo de construcción genética                         | Nueva combinación de secuencias codificantes y regulatorias                          | Copia idéntica/completa del gene original   | Nuevo arreglo de secuencias codificantes y regulatorias existentes                   | Los cisgénicos no contienen arreglos novedosos, excepto en sitios de inserción    |
| Orientación de la secuencia expresada (transcripción) | Orientación 'en-sentido' y antisentido; estructuras 'tallo y asa' ( <i>hairpin</i> ) | Orientación 'en-sentido'  | Orientación 'en-sentido' y antisentido; estructuras 'tallo y asa' ( <i>hairpin</i> ) | Las construcciones antisentido se generan con fines de supresión específica       |
| Secuencias de extremos del T-DNA                      | Extremos L (izquierda) y R (derecha) de <i>A. tumefaciens</i>                        | Debe estar ausente, preferentemente   | Los extremos Der. e Izq. son de ADN derivado de la planta donadora (concepto P-DNA)  | Se ha aplicado métodos de transformación que precinden de inserciones de vectores |
| Gen de marcador de selección                          | Presencia de marcadores  | Ausencia de marcadores exógenos u otras secuencias <i>cis</i> . Debe verificarse que hayan sido segregadas                              | Marcadores derivados de la planta donadora pueden o no estar presentes               | Depende del método de transformación y de selección primaria                      |
| Ejemplos reales                                       | Algodón Bt y TH-Glf  | Manzanas resistentes a la roña o sarna ( <i>scab apple disease</i> ), cebada con incremento de actividad de fitasa (Holme et al., 2012) | Papas con varias mejoras de calidad y agronómicas (Chawla, 2012)                     | Requieren prueba de concepto y fenotipificación en utilización confinada.         |

### 3. Injertos sobre patrón GM

El injerto es la unión física de dos secciones de plantas diferentes, normalmente de especies cercanas. La que proporciona la raíz se llama patrón, portainjerto o pie (root-stock) y la segunda, es el vástago o injerto (scion). Ambas pueden continuar creciendo como un solo individuo o integradas histológicamente como quimeras. El método convencional de injertos se utiliza en plantas ornamentales, frutales, hortalizas y flores y como tal, no representa una técnica novedosa, sino como estrategia complementaria a otras NPBTs. En la agricultura, esta técnica se emplea para proveer al injerto de resistencia a estrés biótico y abiótico, mejorar la nutrición, realizar propagación vegetativa, aceleración de la madurez fisiológica e incluso, para limitar su crecimiento (método conocido como enanización).

Es importante resaltar que en la naturaleza se manifiestan asociaciones de partes aéreas (ramas cercanas) como radicales en árboles que crecen cercanamente, sin la intervención humana, por lo que se consideran el origen de los injertos (Mudge et al. 2009).

Existen diversos procedimientos para lograr los injertos: por aproximación de dos variedades compatibles o para propagación de yemas en hendiduras o parches, entre otros (Fig. 3.1). En todos los casos, lo importante es crear un continuo entre los tejidos vasculares de las plantas, es decir, entre el

xilema y el floema de ambos individuos. Con este método se busca modificar el fenotipo de los injertos por influencia de rasgos del portainjerto, que ocurre mediante la expresión y movilización de moléculas informativas (Martínez-Navarro, 2013).

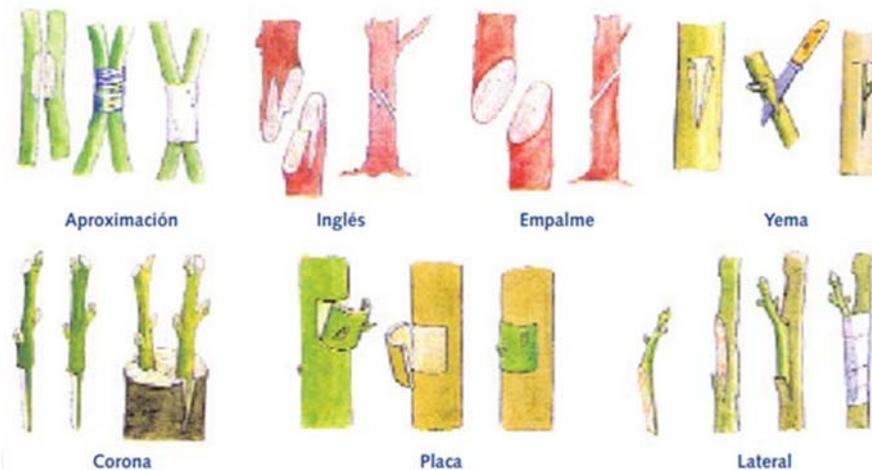


Figura 3.1. Esquema de tipos de injerto. (Recuperado de <http://www.forestmaderero.com/wp-content/uploads/2017/07/tecnicas-de-injertos-y-portainjertos-2017-07-04.jpg>)

Existen tres posibles combinaciones de injertos como se ilustra en la fig. (3.2); los casos en los que se utiliza un vástago no-GM sobre un patrón GM, resultan los más comunes y de relevancia técnica y regulatoria, ya que las células del injerto (hojas, tallos, semillas y frutos) no adquieren ADN recombinante. (Vogel 2015, Schaart et al. 2016). No obstante, células derivadas de callos formados en la región de unión portainjerto-injerto, con formación de tejidos quiméricos, puedan haberlo integrado (Schaart et al. 2016).

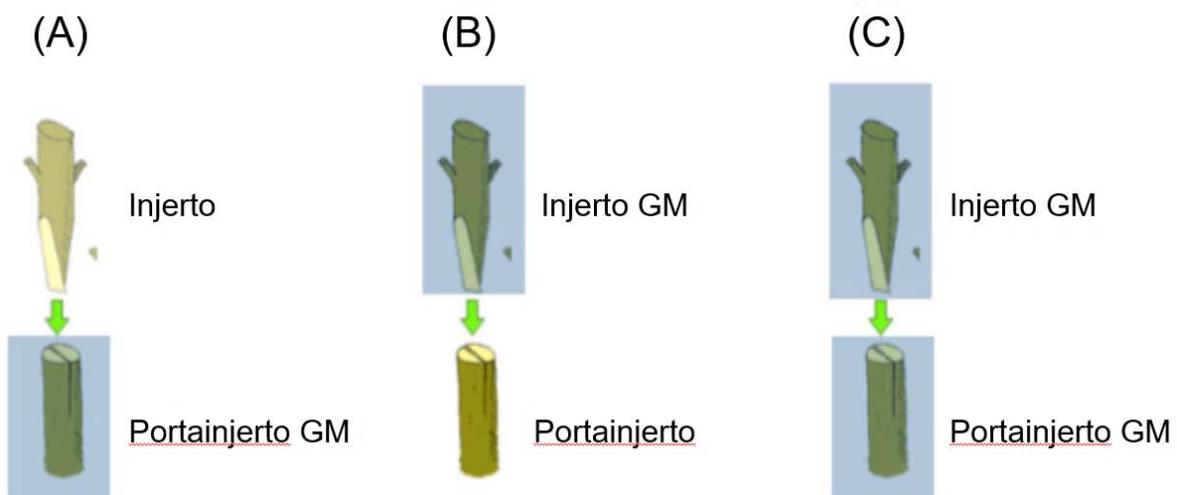


Figura 3.2. Los tres posibles tipos de interacciones que pueden resultar de la combinación de injertos no-GM y secciones GM. El documento discute el caso (A). Adaptado de Eckerstorfer et al. 2014.

### 3.1. Usos y aplicaciones de injertos sobre patrón GM

Con este método se han logrado movilizar actividades catalíticas (Agüero et al., 2005), o factores para el silenciamiento de genes por ARN de interferencia (ARNi), desde un patrón GM a vástagos de plantas de cereza (Kalantidis 2004; Zhao et al. 2014). Asimismo, puede ser usado para obtener cambios en la metilación del ADN dirigido por RNA (RdDM por sus siglas en inglés), con un portainjerto GM cuyas señales sean sistémicamente transportadas, lo cual haría posible, cambios de expresión genética, mediados por alteraciones en los patrones epigenéticos de los vástagos (Lusser and Davies 2013).

Otros fenotipos resultantes han sido: inducción floral, resistencia sistémica adquirida para respuesta a patógenos, respuesta a déficit hídrico, dominancia apical, enraizamiento y tuberización, entre otras. (Geier et al. 2008, Martin et al. 2009, Nagel et al. 2010, Haroldsen et al. 2012a 2012b, Schaart et al. 2016). Adicionalmente a estas aplicaciones, el uso del portainjereto con plástidos transformados se discute actualmente (Thyssen et al. 2012, Stegemann et al. 2012).

Debido a que los cloroplastos pueden ser transferidos del patrón al vástago, es posible utilizar portainjertos ‘transplastómicos’ para introducir estos organelos GM en diferentes variedades o para el fitomejoramiento de variedades transplantómicas en aquellas especies vegetales cuyos plástidos no pueden ser transformados.

## 4. Hibridación reversa

La hibridación reversa (*Reverse breeding*), es una nueva técnica de mejoramiento, que utiliza un paso de modificación genética, diseñada para producir líneas parentales no GM, directamente de cualquier planta heteróciga (híbrido con el genotipo de interés). Es decir, permite recuperar los genotipos necesarios para generar las plantas de las que no se cuenta con los parentales originales. Esta técnica genera líneas parentales homócigas perfectamente complementarias a través de una meiosis modificada. El método se basa en reducir la recombinación genética en los heterocigotos producidos en una cruce de líneas endogámicas, eliminando el entrecruzamiento meiótico, lo cual permite tener progenie libre de secuencias modificadas genéticamente.

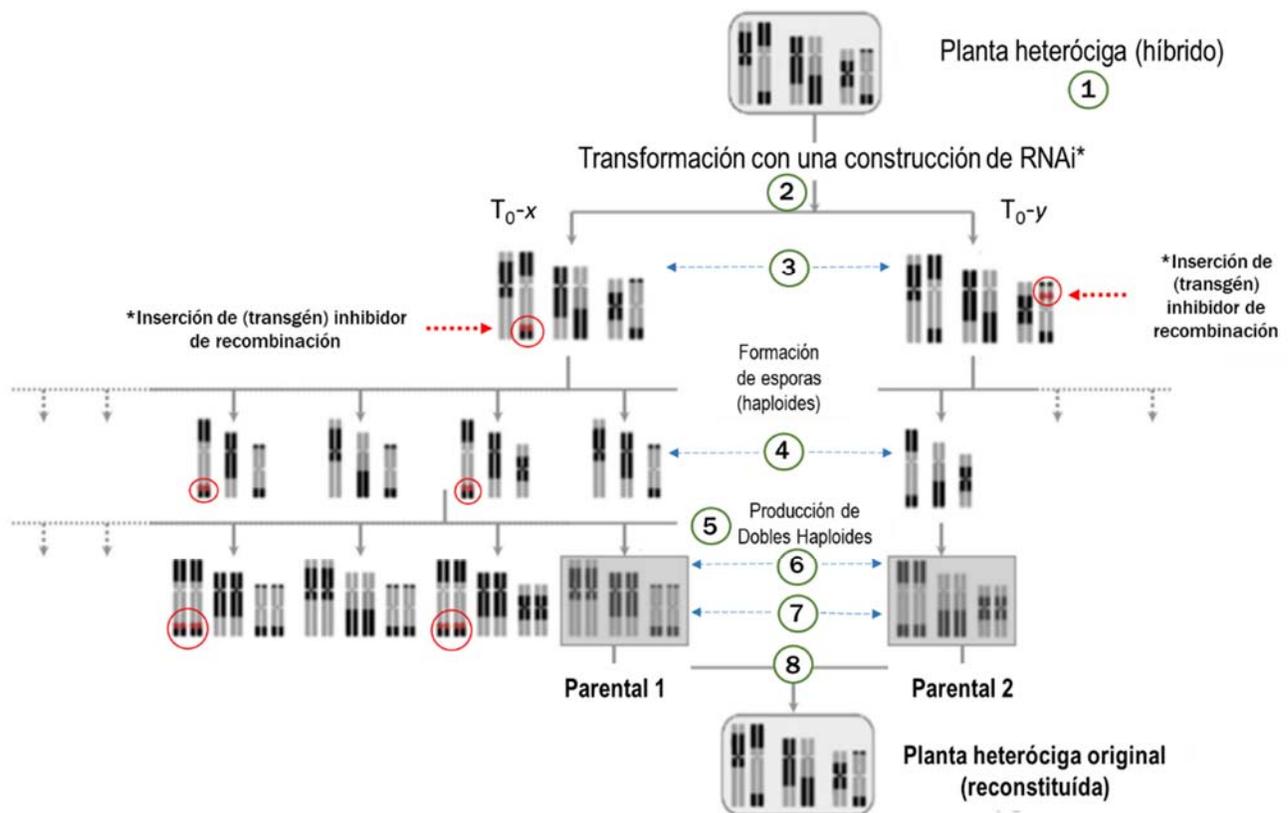
En las transformantes el tejido reproductivo femenino o masculino (esporogénico) contiene las combinaciones de cromosomas parentales no recombinantes (debido a la interrupción de la meiosis), el cual puede ser cultivado in vitro para generar dobles haploides homócigos. Esto facilita la replicación del genotipo de las líneas parentales endogámicas, reconstituyendo la composición genética de la planta heteróciga de interés. (Fig. 4.1) (Dirks et al. 2009, Schaart et al. 2016).

Este método incluye los siguientes pasos (ver Figura 4.1):

1. Selección de una línea heteróciga de interés cuyo genotipo desea ser replicado.
2. Transformación de la planta seleccionada con una construcción de RNAi.
3. En este proceso se generan varios transformantes primarios que contienen la construcción de RNAi en diferentes cromosomas.
4. Regeneración de los transformantes resultantes a plantas que produzcan microesporas haploides (granos de polen inmaduros) a partir de las flores de la línea transgénica heteróciga de interés;
5. Supresión de la recombinación meiótica en la línea heteróciga de interés a través del silenciamiento de genes como *dmc1* y *spo11* en el tejido transformado.

6. Producción de células homocigas, resultante de la duplicación del genoma haploide de las microesporas, utilizando la técnica de dobles haploides.
7. Cultivo de las microesporas con el fin de regenerar plantas diploides homocigas que no contengan la construcción de RNAi.
8. Selección de pares de plantas (denominadas líneas parentales) con el genotipo deseado y libre de modificaciones genéticas y cuyo cruzamiento podría reconstituir la línea heterociga de interés.

La hibridación reversa aplica la transgénesis con el fin de suprimir la recombinación meiótica, para obtener las líneas parentales y replicar los híbridos de interés. Se ha reportado su aplicación en plantas modelo y se discute su viabilidad en plantas con bajo número de cromosomas (Wijnker et al. 2012).



**Figura 4.1.** Representación esquemática de la técnica de hibridación reversa (RB).

La planta de inicio es un híbrido F1 hipotético de parentales no identificados (1), con tres pares de cromosomas ( $2n=2x=6$ ). Las zonas oscuras y claras en los cromosomas mitóticos, representan los componentes paterno y materno presentes en ese híbrido. Después de la transformación con una construcción específica de RNAi (2), se regeneran plantas que tendrían inserciones ubicadas en distintos sitios. (marcas rojas dentro de círculos abiertos, 3). En el tejido reproductivo de los eventos T<sub>0-x</sub> & T<sub>0-y</sub>, se suprime la recombinación meiótica (entrecruzamiento e intercambio de segmentos de cromátidas) por las secuencias que producen el silenciamiento de genes responsables de la formación de los 'quiasmas' (lugares de corte y pegado), pero que no impiden la formación de esporas haploides (4). En el lado izquierdo se muestran cuatro de las ocho posibles combinaciones cromosómicas; en el lado derecho solo se ilustra solo una. La mayoría de las esporas resultantes no estarían balanceadas (aneuploides); en cambio, algunas esporas conservarán una ploidía balanceada y la combinación cromosómica de interés (que se muestra). Las plantas dobles haploides son producidas con las esporas balanceadas y entre éstas habrán los genotipos recíprocos que darán lugar a los parentales 1 y 2, que ya no contienen la construcción de RNAi y replicarán el híbrido F1 original después de la selección de cruza. Como se ilustra, el parental 1 y el parental 2 serían derivados de dos transformates primarias diferentes, que tengan la construcción de RNAi en diferentes cromosomas (Adaptado de Wijnker & de Jong, 2008).

#### 4.1. Usos y aplicaciones de la hibridación reversa

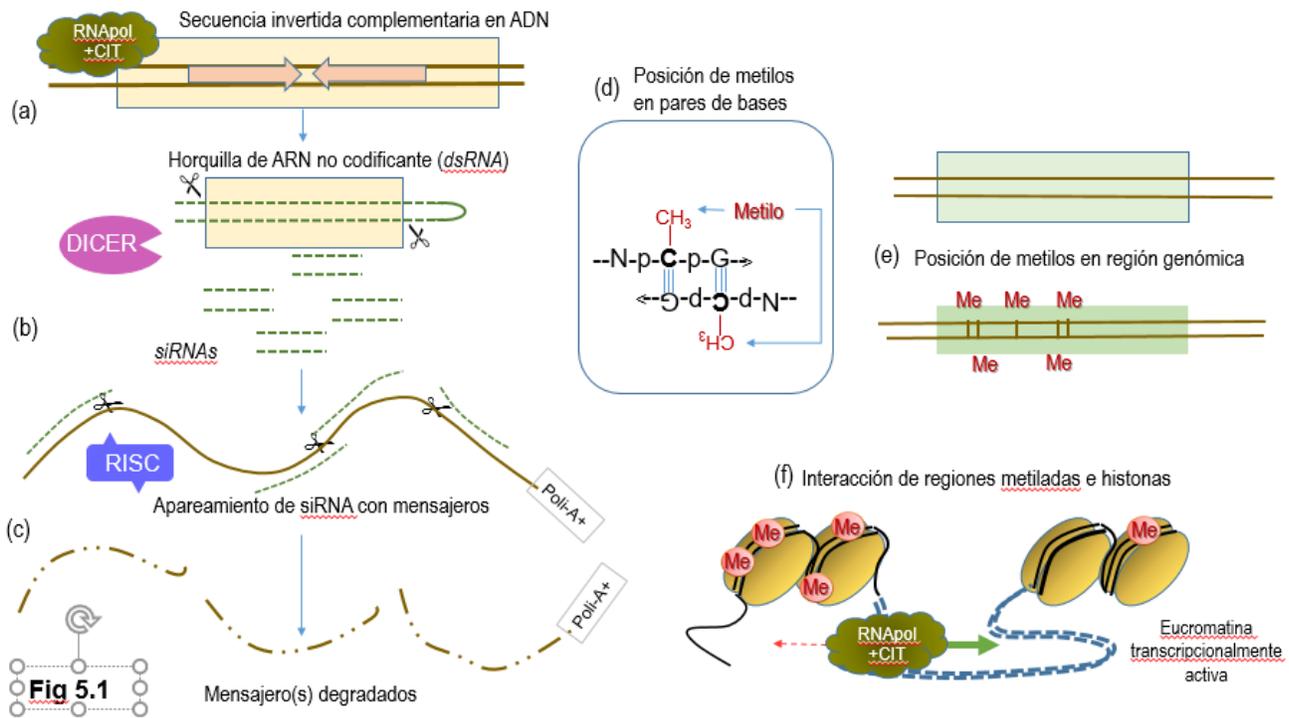
Obtención de líneas híbridas con genotipos caracterizados con parentales reconstituidos (híbridos a perpetuidad, Dirks et al. 2009), que no podrían resultar del mejoramiento convencional. Se puede utilizar para generar líneas de sustitución cromosómica. Estas líneas contienen uno o más cromosomas en un parental en el fondo genético de otro parental. Las retrocruzas por ejemplo, pueden resultar en híbridos que son heterocígonos en todos menos en un cromosoma o son homocígonos en todos menos en un cromosoma. Las líneas de sustitución cromosómica pueden ser utilizadas para estudios genéticos, así como para mejorar las líneas parentales. (Lusser and Davies 2013)

### 5. Metilación de ADN dirigida por ARN

#### 5.1. Contexto biológico

La metilación del ADN dirigido por ARN de interferencia (*RNA-directed DNA-methylation* o RdDM, por sus siglas en inglés), es una técnica que permite metilar —unir grupos metilo (-CH<sub>3</sub>)— en las bases de ciertas regiones genómicas específicas, modificando por tanto la expresión de genes endógenos. Sin embargo, la metilación del ADN es una modificación epigenética existente en varios organismos, basada en RNA pequeños de interferencia (siRNA) que inducen el silenciamiento de los genes, haciendo inaccesible las regiones de promotores a los complejos de iniciación de la transcripción. Esto reprime la expresión de transposones y retroelementos debido a la formación de heterocromatina en loci repetitivos del genoma de plantas (Lorkovic et al, 2012, Castel & Martienssen, 2013).

La metilación dirigida por RNA es un proceso que ocurre en plantas y que ha sido descrita como un mecanismo epigenético de regulación transcripcional o postranscripcional. En este proceso se producen los llamados RNA pequeños de interferencia (siRNA) derivados de secuencias presentes que, al transcribirse, forman RNA bicatenario (de doble cadena complementaria, dsRNA). Al final, estos RNA participan en la metilación de novo de residuos de citosina, principalmente en regiones que son homólogas a los mismos dsRNA o a los siRNA (silenciamiento transcripcional) (Kuhlmann et al. 2014). La presencia de grupos metilo unidos a ciertas regiones regulatorias del genoma, afectan su conformación y afinidad por complejos relacionados con la transcripción, modificando su expresión. El silenciamiento post-transcripcional ocurre por la inhibición de la traducción al eliminar RNA mensajeros homólogos a siRNA de 21-22 nucleótidos, que guían un mecanismo donde varios complejos enzimáticos participan en la edición y degradación de los fragmentos de dsRNA complementarios. (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Metilación del ADN dirigida por ARN y procesos asociados de regulación postranscripcional (a, b, c) y epigenética (d, e, f).

Para la ocurrencia de RdDM, la transcripción activa es un requerimiento; las modificaciones en los patrones de metilación son heredables después de divisiones celulares y, si ocurren en células germinales son transmitidos a la nueva generación. En plantas, este fenómeno epigenético está involucrado en el silenciamiento de transgenes, supresión de transposones, la impronta maternal/paternal y la paramutación (Finke et al., 2012). El RNAi ha sido propuesto como un mecanismo natural de defensa de las plantas contra virus y transposones y también está involucrado en la regulación de los niveles de expresión de ciertos genes (Febres et al, 2008).

## 5.2. El RdDM como técnica de mejoramiento genético

Los métodos de biotecnología moderna se utilizan para inducir la metilación del ADN, pero no son estrictamente necesarios en el mantenimiento del patrón de metilación y el fenotipo resultante, por lo que es posible desarrollar variedades mejoradas a través de RdDM que estarían libres de secuencias exógenas.

Dependiendo del tipo de secuencia blanco, pueden existir dos efectos: el silenciamiento génico transcripcional (TGS) cuando se bloquea un promotor, o bien la activación de otros genes que se encontraban inhibidos por reguladores negativos (TGA). Asimismo, el mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), contribuye a la degradación de RNAm de genes con homología al siRNA, como se explica en la figura (Fig. 5.1). Las plantas pueden ser transformadas para obtener la degradación específica del RNA mensajero por medio de la expresión de los RNA de interferencia (RNAi), a los que se refieren como micro-RNAs artificiales (amiRNA), RNAs pequeños de interferencia (siRNA) o bien, horquillas de RNA (hairpin, hpRNAs) (Kusaba 2004; Guo et al. 2016).

Las secuencias para RdDM pueden ser introducidas por transformación genética clásica, o bien, por transfección directa, por transferencia asociada a agro-infección (VIGS), o bien por injertos con uno de los componentes conteniendo la construcción.

### 5.3. Usos y aplicaciones de RdDM

Existen diversos estudios donde se aprovecha esta técnica, donde se obtiene un silenciamiento génico transcripcional. Por mencionar algunos ejemplos, se reportan: el desarrollo de polen en maíz, para generar plantas androestériles (Cigan et al, 2005); cambios en el fenotipo de frutos en tomate y flores en petunia (Kanazawa et al, 2011). Otros desarrollos, vía PTGS, se han logrado para la obtención de fenotipos en presencia de diversas construcciones de RNAi. Los ejemplos son: las construcciones de hpRNA que confieren resistencia a *Phytophthora infestans* (Eschen-Lippold et al, 2012), al virus Y de la papa y al viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV, Schwind et al, 2009), así como suprimir la resistencia de *Helicoverpa armigera* al gossipol del algodón (Mao et al, 2010). Otra aplicación permite generar plantas sin semilla (partenocarpia), al inhibir algunos pasos particulares en la regulación hormonal por auxinas y giberilinas (Goetz et al, 2007); también se ha modificado el color y aroma de las flores como es el caso de petunias (Underwood et al, 2005). Existen otros ejemplos en desarrollo en varios cultivos revisados en Guo et al. 2016.

## 6. Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODM)

La mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (*Oligonucleotide-Directed Mutagenesis*, ODM) es una técnica de mejoramiento que utiliza oligos sintetizados químicamente para inducir mutaciones dirigidas en el genoma de las plantas (Lusser et al, 211). La técnica utiliza el mecanismo de reparación de ADN propio de la célula y requiere la introducción de oligos que tengan zonas de homología con el gen de interés y así mismo otras regiones no homólogas que son las que permiten la modificación mediante los procesos de corrección, síntesis y replicación del ADN (Fig. 6.1). Estas modificaciones pueden incluir, sustituciones, inserciones o deleciones, en sitios específicos (Sauer et al. 2016).

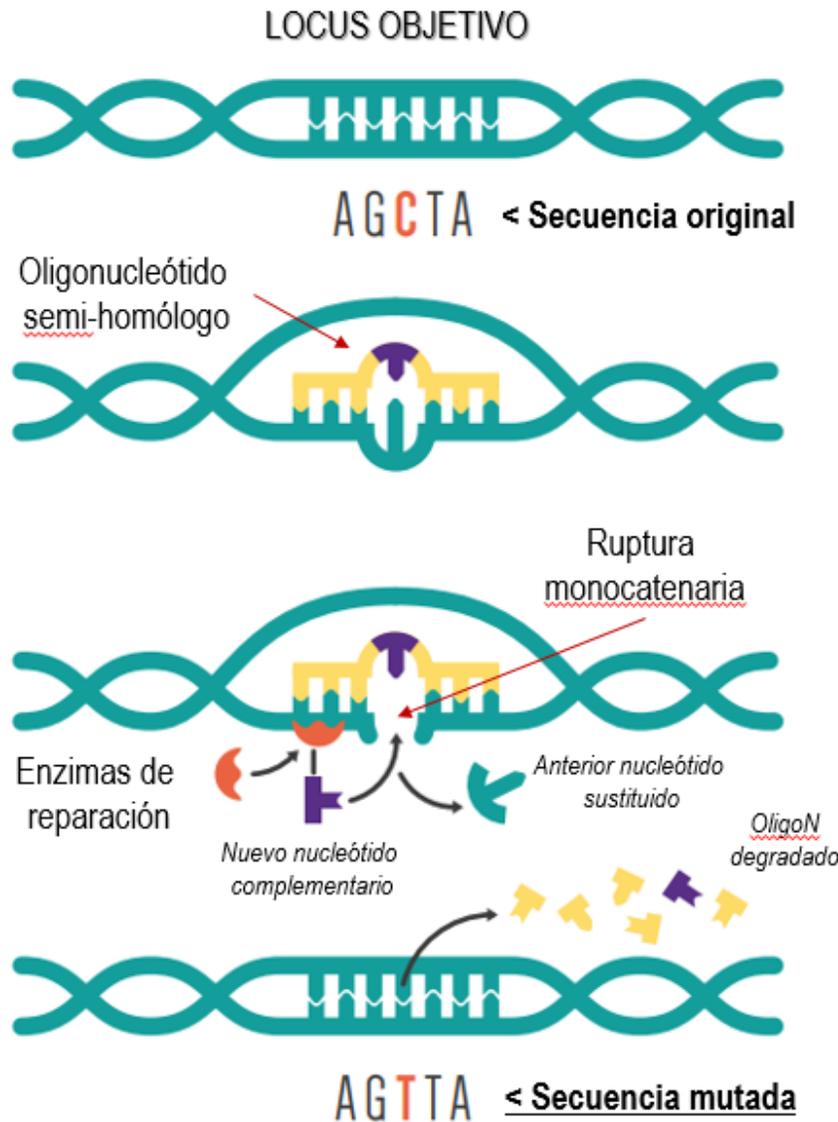
Los oligos utilizados son aproximadamente de 20 a 100 nucleótidos de longitud y son complementarios a la secuencia blanco en el genoma del hospedero y no homólogos en el o los nucleótidos que se desean modificar. Los cambios genéticos que se pueden obtener utilizando esta técnica incluyen la introducción de una nueva mutación por el remplazo de una o de varios pares de nucleótidos, la reversión de una mutación existente o la introducción de pequeñas deleciones (Schaart et al. 2016).

Existen dos tipos de oligos utilizados en las mutaciones de células vegetales: oligos RNA-DNA (RDO) (Figura 8), u oligos de DNA monocatenario. Existen otras variantes que utilizan elementos modificados químicamente para evitar que se integren al genoma. Los oligos se pueden introducir en las células vegetales por diferentes métodos como electroporación, transfección utilizando polietilenglicol (PEG), electroporación de protoplastos y biobalística, sin utilizar ningún vehículo molecular (Beetham et al, 1999; Lusser et al. 2011).

Para que se lleve a cabo la mutagénesis tipo ODM, los oligos reconocen y se unen a secuencias homólogas en el genoma de la planta. Los nucleótidos del oligo, que no son complementarios con la secuencia blanco, generan “burbujas” que se reconocen por las enzimas de reparación de ADN. Las

enzimas que se encargan de la replicación de la zona a reparar toman como molde la secuencia del oligo introducido, generando cambios puntuales en la secuencia; esto ocurre durante la replicación del ADN. Simultáneamente, los oligos son degradados y no se recombinan en el genoma. Las mutaciones

inducidas a través de su interacción con el ADN son estables y heredables (Lusser et al. 2012; Lusser and Davies 2013).



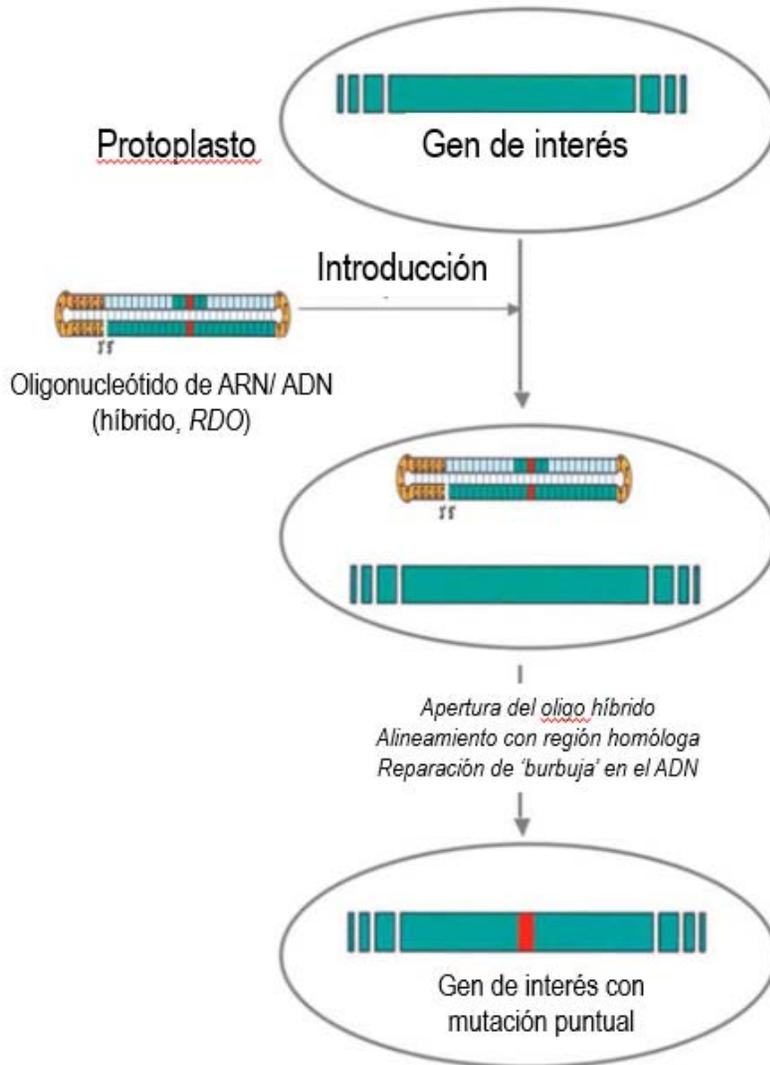
**Figura 6.1.-** Mecanismo de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.

1) El oligonucleótido se une a la secuencia blanco en el genoma hospedero. 2) En los nucleótidos "diferentes" del oligonucleótido se generan una "burbuja", cuando se hibrida con la secuencia del ADN de la planta. 3) La maquinaria de reparación celular reconoce a esta "burbuja" e induce su reparación, utilizando como templado del ADN la secuencia del oligonucleótido introducida. 4) Después de la reparación, el oligonucleótido es degradado por la célula, como un mecanismo natural de división celular y multiplicación. 5) El gen blanco se ha "reparado". Adaptado de: From plant to crop: The past, present and future of plant breeding, VIB

### 6.1. Usos y aplicaciones de ODM

El uso de ODM permite generar mutaciones nuevas o existentes, que producen por ejemplo los siguientes tipos de modificaciones: cambio en la secuencia primaria de una proteína; desactivación de genes por medio de la formación de codones de paro o por desplazamiento del marco de lectura abierto. También es posible modificar la expresión génica a través de mutaciones en las secuencias regulatorias que incrementan o reducen la actividad del gen. Entre las características que pueden ser modificadas en plantas a través de ODM se incluyen entre otras, tolerancia a herbicidas, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estrés abiótico, extensión de la vida de anaquel, así como modificaciones en la composición de almidón y aceite (Breyer et al. 2009). Algunos ejemplos actualmente en desarrollo son la producción de canola tolerantes a herbicidas del grupo de sulfonilurea, linaza tolerante a

glifosato, arroz y maíz tolerante a herbicidas y papa resistente a *Phytophthora infestans* (Schinkel et al. 2016; Svitashhev et al. 2016; Sauer et al. 2016).



**Figura 6.2.** Estructura de las secuencias híbridas de ARN/ADN (*RNA-DNA Oligonucleotide*, RDO). Estos elementos sintéticos adoptan una forma de horquilla doble debido a homologías internas por diseño que las protege mejor de la degradación. Las bases no apareadas de ARN (amarillo) están en las puntas; la región del RDO para la actividad contiene zonas de apareamiento con la zona a mutagenizar (blanco) con la base que se requiere modificar (rojo) y zonas homólogas verdes adyacentes. La modificación se realiza por el mecanismo descrito en la Fig. 6.1)

## 7. Nucleasas dirigidas a sitios específicos

### 7.1 Descripción de la técnica

Este conjunto de cuatro técnicas, se basan en un mecanismo básico de modificación genética donde se utilizan, en primera instancia, (endo)nucleasas (\*enzimas que cortan el ADN [‘desde dentro’] en una o ambas cadenas en determinadas secuencias), y que identifican sitios específicos del genoma, solas o en conjunto con otras macromoléculas —como proteínas o fragmentos especiales de RNA— que contribuyen al reconocimiento. Este grupo tiene actualmente distintas denominaciones, pero comprende cuatro tipos básicos de técnicas desarrolladas por diversos grupos de investigación, con nomenclatura sobre uso, aplicaciones y propiedad intelectual distintos.

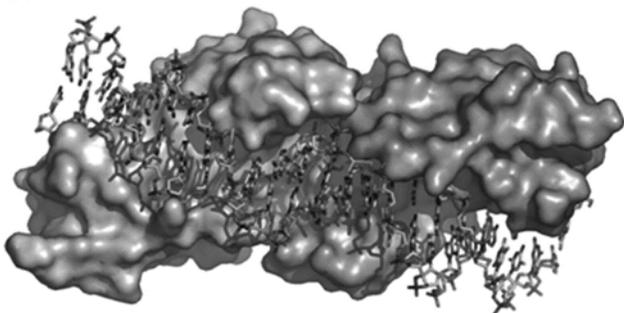
La modificación final en todas ellas, depende también del aprovechamiento de los mecanismos de reparación del ADN que permiten generar mutaciones puntuales (como los SNP), inserciones/excisiones pequeñas (indels) o extensas y, en otros casos, hacen posible la corrección [edición], el reemplazo o la inserción de secuencias a partir de los sitios de corte, mediante la introducción de fragmentos que al momento de la reparación sirven como moldes o templados. Se busca que estos cambios ocurran después de promover cortes bicatenarios (DSB por *Double Strand Breaks*), que pueden generar extremos romos o cohesivos. Éstos a su vez —después de la reparación y corrección— pueden derivar en una unión de extremos no homólogos (NHEJ, por *Non-Homologous End-Joining*), o bien, en el alineamiento y la inserción de otras secuencias, aprovechando la recombinación homóloga (HR, o HDR, por *Homology Repair/ -Directed Recombination*). Las plantas regeneradas y su progenie como productos finales de la modificación, heredarían los cambios estructurales y funcionales generados por el uso de estas técnicas, pero no los elementos utilizados para su obtención (Vogel 2016). Estas técnicas son:

**7.1.1. Meganucleasas.** (MN, *homing-endonucleases*) son endonucleasas que generalmente reconocen secuencias específicas del ADN de entre 12 y 40 pares de bases (pb). Las MN se asocian a procesos internos de inserción de elementos móviles y de maduración de RNAs en células eucarióticas. Las MN pueden ser modificadas para que reconozcan secuencias alternativas en el genoma (Rinaldo & Ayliffe 2015).]

(a)



(b)

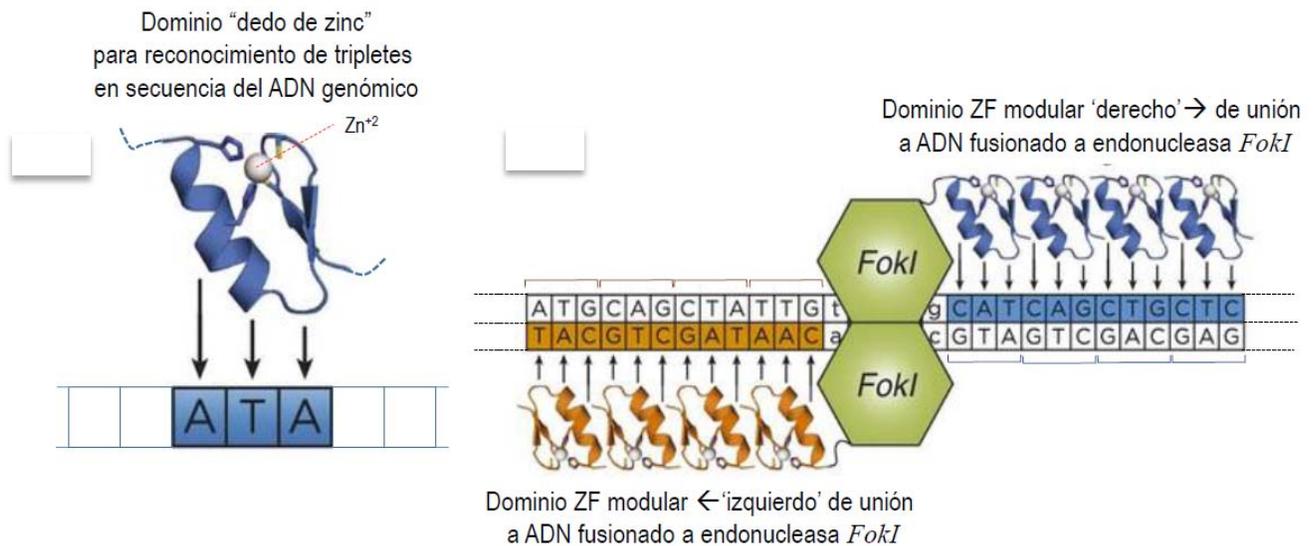


Estas enzimas, codificadas en intrones móviles de organismos como levaduras, algas verdes y arqueobacterias, en las que son nativas, se han utilizado para mutagenizar otros sistemas, incluyendo a modelos animales de patologías humanas y para terapia génica (Arnould et al. 2010, Redel & Prather 2016). Ha sido posible realizar cambios con una meganucleasa modificada tipo I-CreI, en loci caracterizados del maíz (Djukanovic, et al. 2013).

**Fig. 7.1.** Estructura del cristal de la meganucleasa modificada I Cre-I formando un complejo con la región balance del AND. (a) Vista lateral del tipo denominado LAGLIDAG; el motivo de dimerización se muestra por el óvalo punteado. (b) Representación sólida en interacción con la región reconocida.

**7.1.2. Nucleasas con “dedos de zinc” (Zinc-Finger Nucleases o ZFN)**, son endonucleasas sintéticas resultado de la fusión del dominio de corte de la enzima de restricción *FokI*<sup>7</sup> y un dominio protéico de unión al ADN que reconoce uno o varios ‘tripletes’ (tres nucleótidos). Estos dominios se forman a través de un conjunto de estructuras terciarias en el segmento protéico que adoptan forma de asas (dedos), y que son estabilizada por iones de zinc. Los aminoácidos que forman el asa son los que reconocen secuencias específicas en el ADN (Bogdanove et al. 2018; Fig. 7.2.).

### DOMINIOS DE LAS ZFNs



**Figura 7.2.** Dominios de las ZFNs.

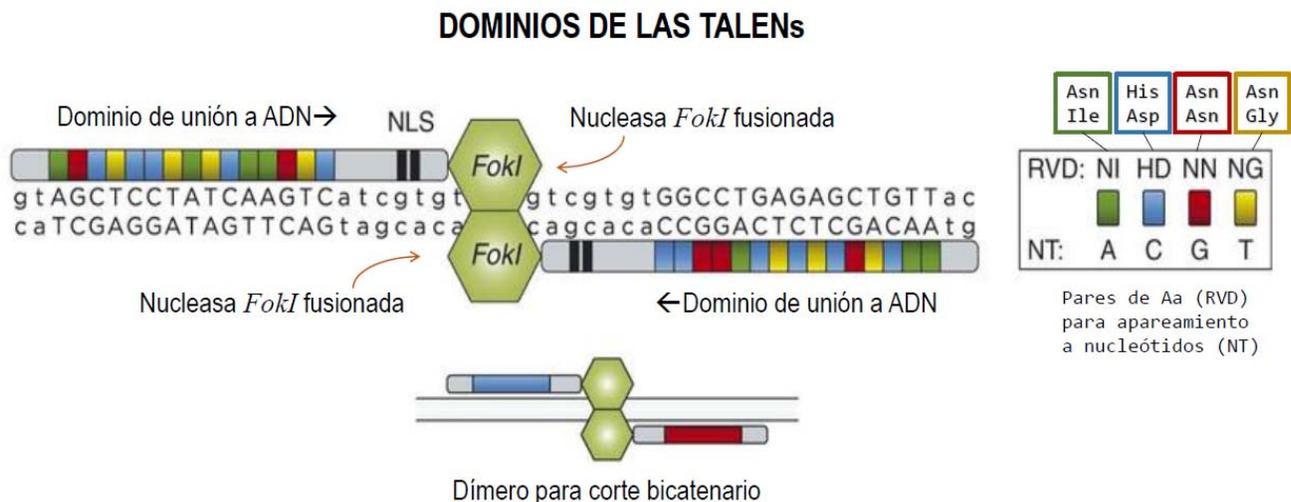
Las ZFN sintéticas son herramientas que han sido capaces de generar modificaciones dirigidas en varios genomas. Las ZFN funcionan como dímeros donde cada unidad monomérica se compone de un arreglo de dedos de zinc (ZFA), típicamente conteniendo 3-4 unidades fusionadas a un dominio no específico de corte de la endonucleasa *FokI*, por lo que para su utilización inicial se requiere de la introducción de dos tipos de ZFNs a las células para lograr el corte bicatenario del ADN en el sitio deseado. Los dominios de ZFA son diseñados para reconocer ciertas secuencias de ADN en el genoma de interés; es decir, se requiere información precisa sobre los genes o regiones que se quiere modificar. La unión del par de dominios de reconocimiento del complejo, normalmente de 18 a 24 pb, están separados por 5-7 pb y este espacio permite a los monómeros de *FokI* dimerizarse y crear el corte bicatenario (DSB) en la zona espaciadora entre ambas secuencias reconocidas. Este complejo puede reconocer secuencias en

<sup>7</sup> La enzima *Fok-I* es una endonucleasa de restricción nativa de la bacteria *Flavobacterium okeanokoites* y consiste en un dominio de unión al ADN en el extremo N-terminal de la enzima y un dominio de corte no específico en el extremo C-terminal. Una vez que la proteína se une al ADN dúplex a través de su dominio de unión en el sitio de reconocimiento 5'-GGATG-3' : 5'-CATCC-3', el dominio de corte del ADN se activa y corta de forma no específica entre nueve y trece nucleótidos hacia abajo del sitio de reconocimiento. El peso molecular de esta enzima es de 65,4 kDa y se compone de 587 aminoácidos.

múltiplos de 3pb; inicialmente se han utilizado tres tripletes no complementarios en cada cadena de manera similar a otras del tipo SDN, o también referidas como NRE (X; Vogel, 2016)

La introducción de un plásmido o vector puede ocurrir con o sin una secuencia de ADN adicional que participaría en el proceso de mutagénesis dirigida o edición del genoma. Existen varios métodos disponibles para introducir el plásmido que codifica para las ZFNs en las células de una planta, incluyendo transfección, electroporación, vectores virales y transferencia mediante elementos del genoma de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* incluyendo la agro-infiltración con inclusión floral, que puede prescindir del proceso de regeneración. Los genes de ZFNs pueden expresarse de manera transitoria a partir de un vector interiorizado en las células. Las proteínas ZFNs sintetizadas generan entonces una mutación específica en algún sitio del genoma receptor, que es estable y heredable, inclusive después de la degradación del plásmido que contiene a las secuencias de las nucleasas. Alternativamente, los genes que codifican para las ZFNs pueden integrarse en el genoma de la planta como transgenes.

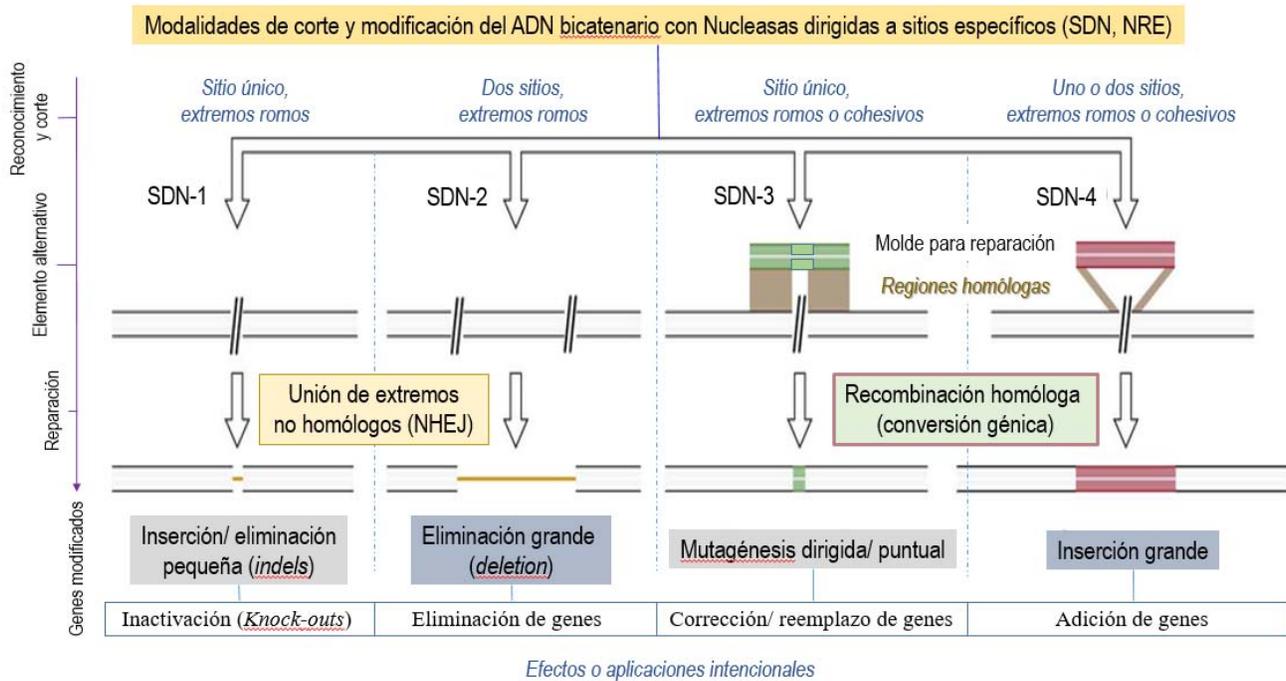
**7.1.3. Nucleasas TALE.** Son proteínas sintéticas resultantes de la fusión entre un dominio de una endonucleasa como *FokI*, a otro dominio de proteínas efectoras similares a activadores de la transcripción, las que son responsables de la unión al ADN. De allí las siglas TALEN por *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*. Ciertas regiones del dominio de unión, son diseñadas para exhibir pares particulares de aminoácidos que reconocen secuencias específicas del genoma, al aparearse cada par determinado, con alguno de los 4 posibles nucleótidos (A,T,G,C), lo que permite una alta especificidad y versatilidad (Lusser et al. 2012, van de Wiel et al. 2017, Bogdanove et al. 2018; Fig 7.3)



**Figura 7.3.** Dominios de las TALENs.

Las Nucleasas asociadas con efectores similares a activadores de transcripción (TALENs), funcionan como “tijeras moleculares” específicas al ser una fusión proteica de otro tipo de dominios de reconocimiento y la actividad de endonucleasa (usualmente *FokI*). Las TALEN son diseñadas para contener en el dominio de unión a ADN, múltiples repeticiones de 33-35 aminoácidos, donde en cada repetición quedan expuestos un par de residuos de aminoácidos que tienen una alta afinidad por algún nucleótido (ver Fig. 9.B). Cuando cada TALEN se acopla a secuencias cercanas a ambos lados de la

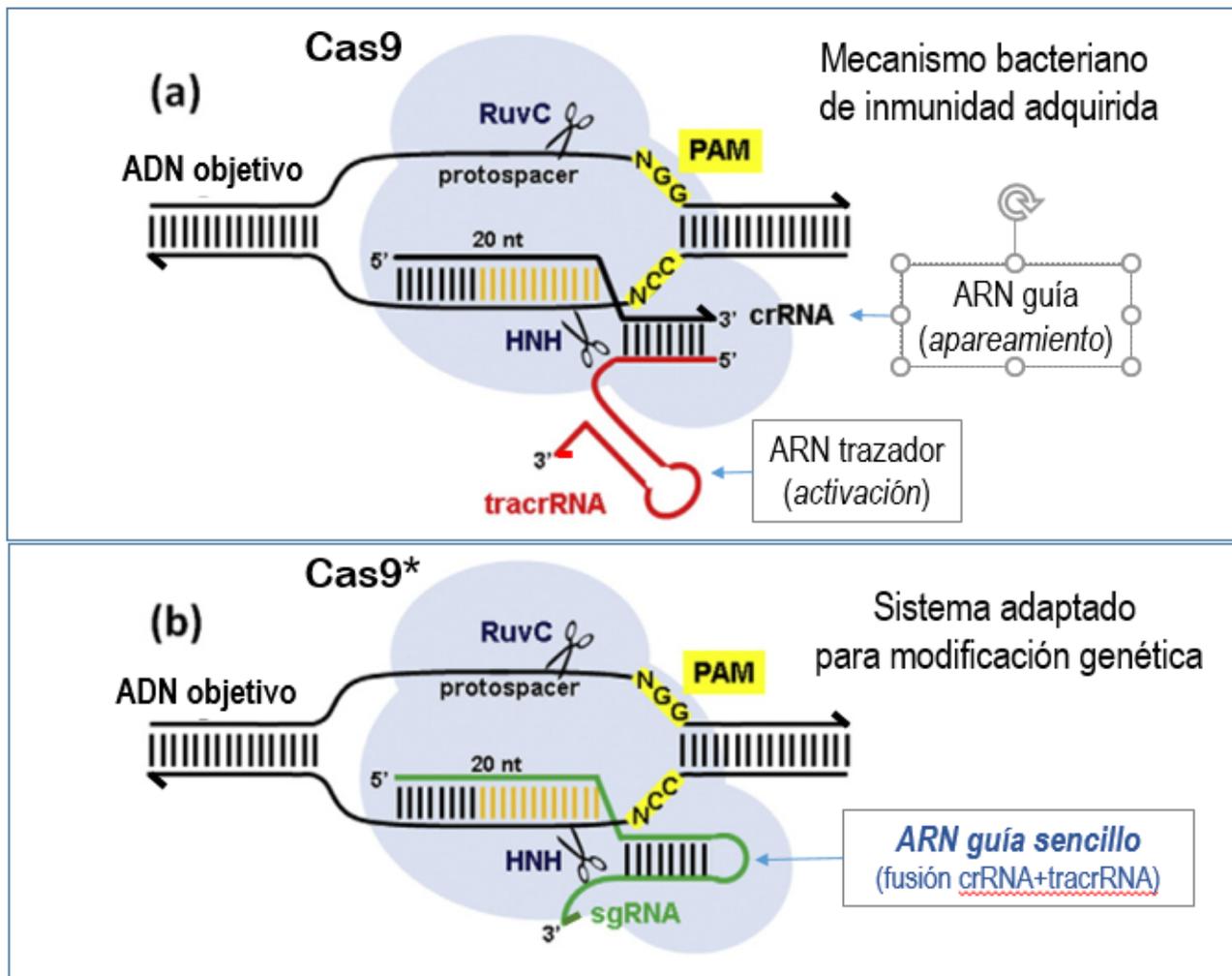
doble hélice, se generan cortes bicatenarios que activan los mecanismos de reparación celular. De manera similar a otros procedimientos SDN, cuando no se introduce un ADN templado, los cortes en el ADN pueden ser ‘reparados’ por el mecanismo de NHEJ; en este caso, la reparación puede dar lugar a mutaciones no específicas, como cambios de nucleótidos, deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos. Para poder incluir un cambio determinado en un sitio corto del genoma blanco, es posible introducir un fragmento que contenga una disparidad, pero esté flanqueado por regiones homólogas o complementarias contiguas al sitio de corte. Asimismo, es posible generar una deleción grande, o bien la sustitución de todo un gen, si se diseñan estrategias para hacer cortes no contiguos y se repara la zona usando o no un fragmento con regiones de homología (Fig. 7.4).



**Figura 7.4. Modalidades de corte y modificación.** Los efectos y aplicaciones de mutagénesis dirigida (SDN-1 y 3) y edición de genes (SDN-2 y 4) con endonucleasas modificadas. Se pueden generar cortes bicatenarios (//) en secuencias específicas de ADN genómico (a través de alguno de los dispositivos de reconocimiento de estos sistemas) y ser posteriormente re-ligados, tanto por el mecanismo de reparación no-homóloga (NHEJ; SDN-1 y 2), como por el de recombinación homóloga (HDR; SDN-3 y 4). Dependiendo del número de cortes (SDN-1 ó 2), y de la inclusión de secuencias de ADN que actúen como templado (SDN-3) o como fragmentos para inserción (SDN-4 y SDN-2 inclusive), se podrían obtener distintas modalidades de modificación genética para diferentes fines, experimentales o aplicados (ver texto, cuadro comparativo y referencias: Modificado de Vogel 2012 y 2016.).

Hay un número importante de aplicaciones de esta técnica, con tres de las ‘modalidades’ de uso actuales, para diferentes sistemas biológicos, incluyendo vegetales, donde se han analizado y usado para ‘prueba de concepto’ y para cambios incrementales (mayor expresión) o de especificidad funcional (receptores más sensibles), que sean estables y heredables. Existen varias revisiones donde se comparan aspectos técnicos, económicos y operativos de varios proyectos en desarrollo. (Vogel 2012, Vogel 2016; Bortesi & Fischer 2015, Hartung et al. 2014, Kanchiswamy 2016).

**7.1.4. El sistema para mutagénesis dirigida y de edición genética abreviado CRISPR/Cas** (siglas de *Clustered Regularly Inter-Spaced Palindromic Repeats*)<sup>8</sup>, es una técnica versátil, que requiere para su aplicación, dos componentes básicos: una proteína del tipo Cas con actividad de endonucleasa (corte bicatenario), y un fragmento sintético único de RNA asociado, que funciona como guía en el reconocimiento de una secuencia específica.



**Fig. 7.4. Corte del ADN con Cas9 dirigido por RNA.** (a) En el sistema nativo, la proteína Cas9 (azul claro) es guiada por una molécula formada por el ‘ARN de CRISPR’ (*crRNA* en negro), que contiene un segmento que determina la especificidad de reconocimiento y un ‘ARN trans-activador del CRISPR’ (*tracrRNA*, en rojo), que estabiliza el complejo y activa a Cas9 para cortar el ADN en una zona interna (*protospacer*), en ambas cadenas por la actividad tanto de la región RuvC, como de la HNH. La presencia de un motivo adyacente a esta región (*protospacer-adjacent motif*, PAM, en amarillo) de secuencia N-G-G (o menos frecuentemente N-A-G), directamente río abajo del ADN blanco, es un prerequisite para el corte por Cas9. Se considera que entre los 20 nucleótidos que determinan la especificidad por secuencia, la llamada *seed-sequence*

<sup>8</sup>Las siglas podrían traducirse como “Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente espaciadas” y se derivan de un sistema de defensa propio de bacterias y arqueas, que han conformado un ‘catálogo’ de secuencias reconocibles —de patógenos como los bacteriófagos o virus de bacterias—, que son reconocidas y cortadas de forma similar a como lo realiza la actividad específica de las enzimas de restricción.

(secuencia seminal) de aproximadamente 12 nucleótidos (en naranja), hacia arriba del PAM, es particularmente importante para el acoplamiento entre el ARN y el DNA objetivo. En el sistema adaptado (b), la actividad de Cas9 puede ser reprogramada para cortar ADN usando una sola cadena de ARN guía (*gRNA*, en verde) la cual se genera como una molécula recombinante fusionando el extremo-3' del *crRNA* con el extremo-5' del *tracrRNA* (Adaptado de Bortesi & Fischer, 2015).

El sistema de CRISPR/Cas9 funciona por la acción concertada de la endonucleasa Cas9 con moléculas de ARN, y tiene su origen en un mecanismo bacteriano de inmunidad adquirida, contra secuencias de ADN ‘extrañas’ y recurrentes, ya que se ha descrito como un complejo de una enzima de restricción inespecífica que reconoce ciertos motivos ‘memorizados’ y catalogados en el mismo genoma de bacterias como *Streptococcus pyogenes*. (Jinek et al. 2012, 2014; Fig. 7.4). Un par de ARNs de este sistema, se asocian con esta nucleasa para el reconocimiento de tales motivos (que se encuentran usualmente en genomas virales) a través del apareamiento de bases, con la subsecuente partición y degradación de tales secuencias, y la eventual eliminación de invasores.

En los sistemas adaptados para mutagénesis dirigida y edición de genes, se requiere integrar los RNA de reconocimiento y activación, y la presencia de la endonucleasa. Entonces sólo se realizan cortes específicos dentro el mismo genoma de un receptor (Fig. 7.4) y posteriormente, se activan los mecanismos de reparación aprovechados introducir cambios puntuales, pequeños o mayores de manera intencional, dependiendo de la secuencia y funciones objetivo (Tarfut & Marin, 2012, Vogel, 2016).

Dentro de las adaptaciones del sistema para su uso biotecnológico, se ha aprovechado básicamente que: a) la especificidad en el reconocimiento del ADN se logra mediante un ARN asociado, el cual, fusionado a otro que actúa como activador, guía o dirigen al complejo hacia una secuencia definida; b), que se ocasiona un corte bicatenario del genoma ‘blanco’ con un solo complejo RNA-enzima, y c) que se pueden producir otras situaciones artificiales como corte en una sola hebra, o bicatenario (múltiple) en sitios separados.

El ARN guía es diseñado para que, en conjunto con la endonucleasa Cas9, se empalme a una secuencia de reconocimiento de 16 a 20 nucleótidos, así como a otro motivo conservado en el ADN — comúnmente NGG o NAG— para cortar las cadenas unos 12 pb antes de este motivo (Bortesi & Fischer 2015; Fig. 6C). Como en otros procedimientos de los sistemas de SDN, después del o los cortes en el genoma, se activan los mecanismos naturales de reparación del ADN, los que —dependiendo de condiciones alternativas— pueden generar distintos tipos de modificaciones (ver siguiente sección y Fig. 9.D) (Tarfut & Marin 2012, Kanchiswamy 2016)

## 7.2 Usos y aplicaciones generales: condiciones y desarrollos tipo de la plataforma SDN

Se han descrito cuatro modalidades de estas tecnologías para el mejoramiento de plantas, considerando sus aplicaciones, así como el tipo de producto final y aprovechable de los procedimientos, que pueden ser realizados por Meganucleasas, ZFN, TALENs y CRISPR/Cas; que en conjunto forman el grupo de las Nucleasas dirigidas a sitios específicos (SDN), descritas anteriormente<sup>9</sup>. Estas modalidades van desde la obtención de mutaciones puntuales, la generación de pequeñas inserciones o deleciones (eliminaciones de segmentos internos), pasando por ‘correcciones’ o conversiones de genes in vivo,

---

<sup>9</sup> En este documento cuando se menciona la mutagénesis dirigida, se refiere a los efectos o productos de SDN-1 o SDN-3; en el caso de edición genómica, se refiere a los de SDN-2 o SDN-4 (ver texto y figura)

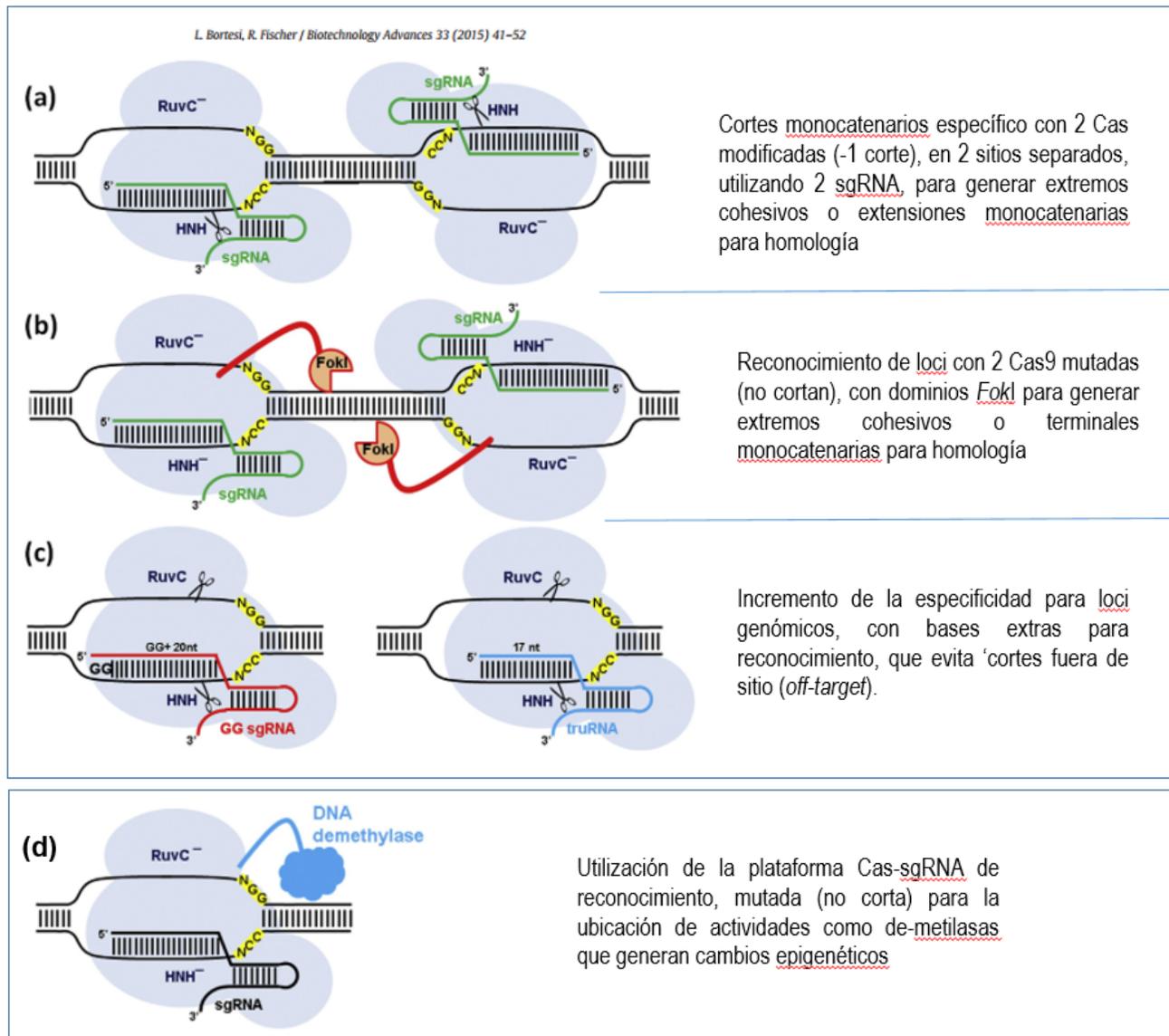
hasta la inserción de nuevas secuencias funcionales en el sitio de corte (Hartung and Schiemann 2014, Sprink et al. 2016). Para ello se describen las variantes en las condiciones de uso y aprovechamiento de las SDNs (ver Fig. 7.3)

SDN tipo-1: Los genes que codifican para las nucleasas y su(s) dominio(s) de reconocimiento, se introducen a las células de la planta sin ninguna secuencia adicional de ADN. Una vez expresados a nivel de proteína, las SDN-1 actúan como dímero (\*esto no aplica para Meganucleasas), uniéndose a las secuencias de reconocimiento propias y generando un único corte bicatenario en sitios específicos y muy cercanos dentro de la doble hélice del ADN. Como se ha mencionado, el corte en la doble hélice es una señal que provoca que se activen alguno de los mecanismos de reparación del ADN que existen normalmente en cada célula transformada. En este tipo de procedimiento, el corte generado por la SDN-1 es reparado por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés). En este proceso de reparación —que no es totalmente eficaz— se inducen mutaciones puntuales; es decir, cambios únicos o discretos de nucleótidos a cada lado del sitio de corte, equivalentes a los denominados *Single Nucleotide Polymorphisms* (polimorfismos de nucleótido único; abreviado SNP en inglés), o bien, otras modificaciones descritas como inserciones o deleciones pequeñas (indels). En un cierto número de casos esto conduce a efectos neutrales, o a la inactivación de genes funcionales (introducción de codones de paro, corrimiento del marco abierto de lectura o modificación de elementos cis-actuantes), mutaciones que han permitido generar y aplicar nuevos conocimientos en genómica funcional. Existen diversos ejemplos de ‘pruebas de concepto’, así como de aplicaciones concretas para lograr inactivación de genes de susceptibilidad a, (o activación de factores de resistencia contra) a patógenos. No obstante, hay ejemplos donde ciertas modificaciones en exones de proteínas bien caracterizadas, modulan de forma positiva y específica, su propia actividad o la de otros efectores (Haque et al, 2018)

SDN tipo-2. Bajo el mismo procedimiento, pero utilizando un par de sitios de corte, se generan modificaciones de distinta magnitud, donde pueden eliminarse secuencias discretas, genes completos o regiones particulares del genoma objetivo de la modificación; estos cambios son similares a otros casos de mutagénesis como los inducidos por estímulos físicos (radiación ionizante), químicos (compuestos alquilantes) o biológicos (virus lisogénicos, retrovirus e inserción/ excisión de transposones), que pueden tener efectos positivos, neutrales o negativos, únicos o múltiples, considerando los criterios o parámetros de selección (Lusser and Davies 2013, Sprink et al. 2016).

SDN tipo-3: En este caso, los genes que codifican para las nucleasas, van fusionados o acompañados de otra secuencia corta del ADN que es complementario a alguna región en la estructura lineal de la cadena de ADN que desea modificarse, incluyendo o no, cambios en algunas de las bases contiguas o al interior del sitio de corte. El vector molecular que contiene ambas construcciones moleculares se introduce en las células por los métodos convencionales; una vez expresados ambos dominios de la SDN, éstas primeramente reconocen y cortan el ADN genómico en sitios específicos. Luego los extremos pueden ser reparados a través de los mecanismos celulares de NHEJ (sin intervención de la secuencia adicional) o bien, por recombinación homóloga (HR). Durante esta modalidad de reparación, la secuencia adicional sirve como templado para integrar información específica en el genoma, por ejemplo, de alelos nativos, homólogos o polimórficos del acervo genético (Lusser and Davies 2013, Sprink et al. 2016, Ref.). Es importante mencionar que, en este caso, el ADN introducido como templado, después de copiarse, se degrada y no se integra al genoma.

**SDN tipo-4:** Con esta otra estrategia, los genes que codifican para el complejo de edición genómica respectivo, se introducen a la célula de la planta con una secuencia del ADN que puede constituir un gen completo (con modificaciones intra-génicas, un gen cis-génico (nativos), o cualquier versión recombinante y eventualmente, transgénica). Es preciso que los extremos del ADN que se desea incorporar al genoma, sean complementarios a las secuencias del ADN que flanquean el sitio de corte, y/o que posean extremos compatibles (cohesivos). Con la participación de mecanismos de reparación dirigida por homología (HR o HDR), el ADN introducido se inserta en el genoma de la planta en un sitio específico (Lusser and Davies 2013, Sprink et al. 2016); Fig. 7.4.



**Figura 7.3.** Otras aplicaciones y adecuaciones de la plataforma CRISPR/ Cas.

## VI. Aplicaciones y usos complementarios de las NPBT/ IMV

Se presentan a continuación tablas que resumen casos indicativos en el uso de varias de las técnicas alternativas de modificación genética (Tabla 2.1a y 2.1b), algunos de los cuales no estaban referenciados directamente en la sección correspondiente. Las informaciones de estos casos permiten elaborar más adelante, otro cuadro sinóptico que describe la relación de las técnicas con los criterios de inclusión o exclusión explícitas y también, las consideraciones casuísticas y condiciones que podrían o deberían presentarse conjuntamente en el diseño y análisis de algún proyecto de desarrollo de variedades.

**Tabla VI.A. Descripción y comparación de ejemplos aplicados y representativos de NPBT**

| Organismos                                 | Característica objetivo <sup>10</sup>                   | Gen blanco y/o gen introducido <sup>11</sup> | Descripción de la transformación <sup>12</sup> | Método de modificación empleado <sup>13</sup> | Estrategia experimental y/o aplicada <sup>14</sup>  | Referencia <sup>15</sup> |
|--|---|--|--|---|---|--------------------------|
| Uva para vino<br><i>Cabernet Sauvignon</i> | Resistencia a patógenos de viñedos.                     | Gene del péptido lítico Shiva-1              | Estable en portainjerto                        | Injerto sobre patrón GM.                      | Raíz transgénica de uva europea 'Thompson Seedless' expresando Shiva-1, detectado por ELISA en extracto de xilema del portainjerto  | Dutt et al., 2007        |
| <i>Papa</i>                                | Reducción de la formación de acrilamida en papas fritas | Asparagina sintetasa (papa) <i>StAs1/2</i>   | Estable  | Intragénesis                                  | Transformación por gen nativo modificado (intragénico) para promover silenciamiento de isoforma específica de tubérculo. Detectado por bajos niveles de Asn (precursor de acrilamida) sintetizada en tubérculo, sin afectar rendimiento ni calidad. | Chawla et al., 2012      |
| Cebada                                     | Aumentar la actividad de la                             | <i>HvPAPhy_a (FFasa)</i> con                 | Estable  | Cisgenesis                                    | Co-transformación por <i>Agrobacterium</i> de gen nativo propio (cisgenesis de FFasa), para   | Holme et al., 2012       |

<sup>10</sup> Fenotipos que se buscaban u obtuvieron + tipo de objetivo

<sup>11</sup> Descripción o Nomenclatura de la secuencia de interés

<sup>12</sup> Tipo y modalidad SDN, ODM o RDdM (reparación NHEJ ó HDR/ HR)

<sup>13</sup> Procedimiento de modificación- método de introducción – expresión transitoria o estable

<sup>14</sup> Criterios de eficacia, parámetros

<sup>15</sup> Ref. artículo (abrev.)

|                                  |  |  |  |                     |   |   |
|----------------------------------|--|--|--|---------------------|---|---|
|                                  | fitasa fosfatasa (FFasa) en el grano                             | bordes de ADN nativo   |  |                     | sobreexpresión. Marcador de Hyg <sup>R</sup> que se segrega en T <sub>2</sub> . Incremento en la actividad de FFasa, que aumenta la biodisponibilidad de fosfatos.  |   |
| Tabaco ( <i>N. benthamiana</i> ) | Producción de proteínas recombinantes por vectores virales (TMV) | Domínos activos de:<br>Somatotropina humana<br>Ag-Hepatitis B<br>IgG Anti-HIV<br>$\alpha$ -Interferón<br>Insulina humana | Replicativa (fusiones a CP del <i>Tobacco Mosaic Virus</i> )               | Agro-infiltración   | Agro-infiltración por vacío (~1.2 Ton biomasa vegetal/ día) para producción industrial (4-10 d) con rendimientos entre 0.5-5 mg/ gpf. <i>Kentucky Bioprocessing</i> .   | Gleba, et al, 2014, revisado en Chen & Lai, 2015. |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>      | Mejoramiento o hibridación reversa.                              | <i>Disrupted Meiosis cDNA1 (DMC1)</i> que participa en entrecruzamiento y recombinación                                  | Estable en generación heterótica inicial, sujeta a segregación y selección | Hibridación reversa | Disrupción meiótica para producir gametos no recombinantes y generar luego dobles haploides, para seleccionar líneas parentales con cromátidas homocigas y regenerar el híbrido original (o líneas de complementación cromosómica). | Wijnker et al. 2014.                              |

TABLA COMPARATIVA 2.1.b

| Organismos | Característica objetivo <sup>16</sup>                     | Gen blanco y/o gen introducido <sup>17</sup>  | Método de modificación empleado <sup>18</sup> | Estrategia experimental y/o aplicada <sup>19</sup>  | Referencia <sup>20</sup>  |
|------------|---|---|---|---|---------------------------|
| Maíz       | Tolerancia al herbicida sulfonil-urea, +E@faB             | Loci de <i>AHAS108</i> y <i>AHAS109</i> que codifica la aceto hidroxiacido-sintasa (AHAS) | ODM   | Introducción por biobalística de oligonucleótidos específicos con reparación homóloga que resulta en remplazo de una sola base.   | Zhu et al. 1999.          |
| Tabaco     | Tolerancia a herbicida y biofluorescencia +E@faB, PdC     | Sustitución en ALS y reactivación de GFP mutada   | ODM (oligos híbridos RNA/ DNA)                | Pruebas de concepto de ODM (sustitución e inserción de nucleótidos); introducción de oligos por biolística en protoplastos, selección por fenotipo  | Beetham et al. 1999.      |
| Arroz      | Tolerancia a herbicida +E@faB                             | Aceto-lactato-sintasa ( <i>ALS</i> ), nativa de arroz                                     | ODM   | Introducción por biobalística de oligonucleótidos de RNA/ DNA con reparación homóloga que resulta en el reemplazo de una sola base.   | Okuzaki & Toriyama, 2003. |
| Petunia    | Patron de color floral                                    | Promotor de la chalcona syntasa ( <i>CHSpro</i> )   | RdDM  | Infiltración de con secuencias dsRNA complementarias al promotor en vector viral (CMV), silenciamiento postranscripcional (TGS) y metilación heredable  | Kanazawa et al. 2011.     |
| Maíz       | Tolerancia a herbicidas y reducción de fitato +E@faB, MNt | <i>Exon-5 de IPK1</i> que codifica a la myo-inositol-1,3,4,5,6-pentakis-fosfato2-cinasa   | ZFN (SDN-1 y 4)                               | Introducción con fibras de SiC ('whiskers') en células embriogénicas, con expresión transitoria para: (1) reparación tipo NHEJ con indels y (2) inserción de transgene como casete de expresión para tolerancia a herbicida ( <i>PAT</i> ) dirigido a sitio que interrumpe el gen <i>IPK1</i> | Shukla et al.* 2009.      |

<sup>16</sup> Fenotipos que se buscaban u obtuvieron + tipo de objetivo

<sup>17</sup> Descripción o Nomenclatura de la secuencia de interés

<sup>18</sup> Procedimiento de modificación- método de introducción – expresión transitoria o estable

<sup>19</sup> Criterios de eficacia, parámetros

<sup>20</sup> Ref. artículo (abrev.)

|         |   |   |                                     |   |                        |
|---------|---|---|-------------------------------------|---|------------------------|
| Arroz   | Resistencia a la 'quemazón bacteriana' o 'bacteriosis vascular (BB - <i>X. oryzae</i> . pv. <i>o.</i> ) +E@fB | Gen de susceptibilidad al BB, <i>Os11N3</i> ( <i>OsSWEET14</i> )                                    | TALEN (SDN-1)                       | Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> , expresión de TALEN, reparación NHEJ que causo desde 9 adiciones a 55 deleciones de pb   | Li et a. 2012.         |
| Cebada  | Reducción de fitato en semilla + MNt  | Región promotora de un gene del grupo de la fosfatasa ácida púrpura ( <i>HvPAPha</i> )              | TALEN (SDN-1)                       | Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> , expresión de TALEN y reparación no homóloga que resulta deleciones entre 1 y 20 pb. Solo detectable con PCR y digestión con <i>DdrI</i> | Wendt et al. 2013      |
| Algodón | Tolerancia a herbicida y apilamiento de resistencia a insectos +E@fB  | Secuencia genómica que flanquea al locus del transgene <i>cry2Ae/bar</i> de un evento de algodón GM | MN                                  | Introducción por biolística de la E-Meganucleasas y de templado para la introducción homóloga de dos genes de tolerancia a herbicidas ( <i>epsps</i> y <i>hppd</i> )                      | D'Halluin et al. 2013. |
| Maíz    | Androesterilidad +MAg   | <i>MS26</i> , gene de fertilidad masculina  | MN                                  | Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> , introducción de genes que expresan EMN, reparación tipo NHEJ con indels que resultan en androesterilidad                                | Djukanovic et al. 2013 |
| Arroz   | Resistencia a la 'quemazón bacteriana' o 'bacteriosis vascular (BB - <i>X.o.o.</i> ) +E@fB                    | Genes de susceptibilidad al BB ( <i>OsSWEET14</i> y <i>OsSWEET11</i> )                              | CRISPR/ Cas9 (SDN-1)                | Transfección de protoplastos con expresión transitoria del Cas9 y el sgRNA. Selección por fenotipo  | Jiang et al. 2013.     |
| Lino    | Tolerancia a herbicidas con glifosato +E@faB  | Gen de la EPSPS   | CRISPR/Cas9 o TALEN + ssODM (SDN-3) | Transfección de plásmido y oligos con expresión transitoria de nucleasas. El oligo corrige 2 SNP separados que cambia 2 Aa generando plantas regeneradas con EPSPS Glf <sup>R</sup>       | Sauer et al.* 2016     |

|                   |   |  |  |   |                                     |
|-------------------|---|--|--|---|-------------------------------------|
| Canola            | Tolerancia al herbicida sulfonil-urea             | Aceto-hidroxiacido sintasa (AHAS=ALS)  | ODM  | Disponible en Canadá en 2017 comercialmente   | Beetham et al. 2014.                |
| Trigo             | Delección de alelos o mutagénesis múltiple        | Genes de la inositol oxidasa, <i>inox</i> y fitoeno desaturasa, <i>pds</i>           | CRISPR/ Cas9 y dos sgRNA en extremos del locus       | Transformación por <i>Agrobacterium</i> de células en suspensión, selección de callos, detección de clones con delección de la región intermedia de <i>inox</i> > 50 pb. Mutagénesis doble con sgRNAs complementarios a regiones de <i>inox</i> y <i>pds</i>          | Upadhyay et al. 2013.               |
| Canola            | Balance y saturación de ácidos grasos             | Activación transcripcional de un gene de la vía de síntesis de ácidos grasos (KASII) | Proteínas ZF fusionada con activador transcripcional | Inserción de una fusión de proteína ZF con reconocimiento de zona de inicio de transcripción que modifica positivamente la regulación en una vía que reduce la presencia de ac. palmítico, aumenta las C18 y disminuye el contenido total de ácidos grasos saturados. | Gupta et al.* 2013.                 |
| Varios organismos | Estres ambiental y biótico; mejoras nutrimentales | Desarrollos en agricultura de precisión  | Todos los tipos de SDN, principalmente CRISPR-Cas    | Cas con corte monocatenario, con mayor especificidad, acoplada a De-metilasa y otras aplicaciones de 'cargo-delivery' en loci específicos.  | Revisión en Bortesi & Fischer 2015. |

## VII. Referencias sobre los enfoques normativos internacionales.

En las tablas siguientes, se compila la información disponible de varios países que han considerado definiciones técnicas y enfoque regulatorio sobre las NPBT, manifestando alguna postura al respecto. Esta información permitirá documentar recomendaciones en el contexto de las precisiones técnicas y las consideraciones normativas, muchas de las cuales se han ido discutiendo, armonizando o elaborando previamente en otros países que poseen diferentes adscripciones en contextos del Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la Biotecnología y del comercio global.

Tabla VII. A. Categorías de productos de NPBTs en diversas Referencias internacionales (cf. Tabla VII.B)

| Tabla de referencia de enfoques normativos internacionales sobre NPBTs - Oct-2018 <sup>a</sup>  |  |   |                 |                |       |                              |   |   |
|---|--|---|-----------------|----------------|-------|------------------------------|---|---|
| <sup>a</sup> Información compilada y recuperada hasta el 31-Oct-2018, desde los reportes GAIN, del FAS (USDA) y de fuentes accesibles públicamente (hiper enlaces en Bibliografía)  |  |   |                 |                |       |                              |   |   |
| Disyuntivas que definen CATEGORÍAS  |  | CATEGORÍAS de Productos de NPBTs, utilizando: |                 |                |       |                              |   | Condiciones adicionales/ opciones   |
| Cuestiones diagnósticas genéricas   | Descripción o modalidades técnicas               | SDN-1 y 2                                     | SDN-3           | SDN-3          | SDN-4 | Mutagénesis por ODM o RdDM   | Hibridación inversa y segregantes nulos |   |
|   | ¿Podría obtenerse por mejoramiento convencional? | SI  | SI              | SI             | NO    | SI                           | SI                                      | SI: por mutagenesis Física, Química o Espontánea (incluye variación somaclonal y elementos transponibles) |
|   | ¿Templado de Ác. Nucleico?                       | NO  | Corto (<20 nt)  | Largo (>20 nt) | SI    | SI                           | NO                                      | En SDN-3: Monocatenario, bicatenario, híbrido ARN-ADN   |
|   | ¿novedosa en genoma (construcción)               | NO  | Alelo, intragen | Cisgen         | SI    | SNP, rearreglo o epigenética | Presencia transitoria                   | En SDN-3: Origen en especie sexualmente compatible dentro de la familia taxonómica                        |
|   | ADN externo, integrado                           | NO  | NO              | NO             | SI    | NO                           | Presencia transitoria                   | En SDN-4: transgénico (heterólogo), cisgénico (homólogo) o sintético (seq. consenso)                      |
| <p><b>Nomenclatura:</b> Site Directed Nucleases (SDN) utilizadas por la OGTR (Australia) - Nótese que no existe un estándar internacional para SDN-1, -2, o -3. El análisis que se ha adoptado en este documento</p> <p>SDN-1: SDN-1se utiliza en ausencia de templado para reparación de ADN. La posición de ruptura bicatenaria (DSB) se selecciona con precisión, pero la reparación es aleatoria y ocasiona</p> <p>SDN-2: Las SDN-tipo 2 puede utilizarse para hacer deleciones grandes (megadelis, knockouts o sustituciones específicas de locus)</p> <p>SDN-3: Las SDN-tipo3 se utilizan para generar una ruptura bicatenaria dirigida y reparación con templados corto (a. 1-5 nt) o largos (b. 10-20 nt). En otros países se considera como SDN-2</p> <p>SDN-4: Las SDN-tipo-4 se usan en conjunto con un fragmento largo para inserción, que puede ser homólogo o exógeno. En otros países se considera SDN-3</p> <p>ODM: Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos- Se usa un templado para reparación con cambio de un solo par de bases</p> <p>RdDM: Metilación del ADN dirigida por ARN; cambios epigenéticos que modifican la regulación de genes específicos sin modificar su secuencia primaria</p> <p>* FAS GAIN: <a href="https://gain.fas.usda.gov/Lists/Advanced%20Search/AllItems.aspx">https://gain.fas.usda.gov/Lists/Advanced%20Search/AllItems.aspx</a></p> |  |   |                 |                |       |                              |   |   |

Tabla VII. B. Estatus de enfoques normativos en referencias internacionales

| Tabla de referencia de enfoques normativos internacionales sobre NPBTs - Oct-2018 <sup>a</sup>  |   |   |                         |   |                     |  |               |            |                   |                        |  |
|---|---|---|-------------------------|---|---------------------|--|---------------|------------|-------------------|------------------------|--|
| <sup>a</sup> Información compilada y recuperada hasta el 31-Oct-2018, desde los reportes GAIN, del FAS (USDA) y de fuentes accesibles públicamente (hiperlances en Bibliografía)  |   |   |                         |   |                     |  |               |            |                   |                        |  |
| PAÍS  | Estatus del documento de referencia   | ¿Se considera una consulta previa caso-por caso?            | Plazo de decisión       | CATEGORÍAS de Productos de NPBTs, utilizando:   |                     |  |               |            |                   | Enfoque para animales  | Comentarios (Ref. de hiperlanca, -->)  |
|   |   |   |                         | SDN-1 y 2   | SDN-3a              | SDN-3b                                     | SDN-4         | ODM y RdDM | Segregantes nulos |                        |  |
| <b>South America</b>  |   |   |                         |   |                     |  |               |            |                   |                        |  |
| Argentina   | Final   | SI  | 60 d calendario         | NO es OGM   | NO es OGM           | Posiblemente no OGM (solo si hay remplazo) | OGM           | NO es OGM  | NO es OGM         | Mismo esquema          | Se requiere consulta, depende de si existe una nueva combinación de material genético (evento); el enfoque incluirá pronto a microorganismos. ( -->)   |
| Chile   | Final   | SI  | 20 d calendario         | NO es OGM   | NO es OGM           | Posiblemente no OGM                        | OGM           | No es OGM  | No es OGM         | Exclusivo para plantas | Se requiere consulta. Depende de si existe una nueva combinación de ADN (transgen). ( -->)   |
| Brasil  | Final   | SI  | 90 d (+90 d)            | NO es OGM/ OVM  | Posiblemente no OGM | Posiblemente no OGM                        | OGM           | NO es OGM  | NO es OGM         | Mismo esquema          | Se requiere consulta. Depende de si existe una nueva combinación de ADN (transgen). ( -->)   |
| Colombia  | Final   | SI  | 60 d calendario         | NO es OGM/ OVM  | NO es OGM           | Posiblemente no OGM                        | OGM           | No es OGM  | No es OGM         | Exclusivo para plantas | Se requiere consulta. Depende de si existe una nueva combinación de de material genético exógeno. ( -->)   |
| <b>North America</b>  |   |   |                         |   |                     |  |               |            |                   |                        |  |
| Canada  | Enfoque en producto (nuevo)   | SI  |                         | El método de modificación genética no determina si se requiere evaluación de bioseguridad. La 'novedad' del producto es lo que detona de la evaluación regulatoria. |                     |  |               |            |                   | Enfoque similar        | Canadá no posee Leyes de OGM específicas - Utiliza un marco regulatorio basado en la novedad (del producto) como detonador de la evaluación pre-comercial; no se regula según el método de obtención. Los 'nuevos' productos de la BIM tienen características que están dentro/ ausentes/ fuera del alcance del organismo regulador. ( -->)  |
| EEUU (USDA/ crops)  | En proceso  | SI (Am I regulated?)  |                         | No es OGM   | Caso-por-caso       | Caso-por-caso                              | Caso-por-caso | No es OGM  | No es OGM         | Esquema distinto       | Los EEUU no tienen leyes para OGM específicas. Utilizan un 'marco coordinado' (CFR) entre la regulación sanitaria (FDA), agrícola (USDA-APHIS) y ambiental (EPA), cada uno en el ámbito de sus metas de protección. La APHIS brinda respuestas en el contexto del cuestionario "Am I Regulated?" ubicado en el 7 CFR Part 340. ( -->)  |
| MÉXICO  |   |   |                         |   |                     |  |               |            |                   |                        |  |
| <b>OTROS</b>  |   |   |                         |   |                     |  |               |            |                   |                        |  |
| Australia (OGTR/ environmental release)   | Propuesta bajo revisión   |   |                         | Not GMO   | GMO                 | GMO  | GMO           | GMO        | Not GMO           | Mismo esquema          | No es definitiva. Se basa en los cambios propuestos a la legislación. (http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/amendment+proposals-1). La categorización de las NPBT puede cambiar en las enmiendas finales a la legislación. Los cambios pretenden dar una solución provisional mientras progresa una revisión amplia de las políticas asociadas con las nuevas tecnologías. (http://health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/gene-technology-review). ( -->) |
| Categorías usadas por el OTGR de Australia:   |   |   |                         | SDN1  | SDN2                | SDN3                                       | SDN3          |            |                   |                        |  |
| Australia/ NZ (FSANZ - food)  | Código bajo revisión  |   |                         |   |                     |  |               |            |                   | Mismo esquema          | cf. Food Safety agency for Australia and New Zealand . ( -->)  |
| Nueva Zelanda (EPA environmental release)   | Normativa actual (Hazardous Substances and New Organisms Act 1996)                            | SI - Cada solicitud se valora bajo el enfoque caso-por-caso | Depende de la solicitud | GMO   | GMO                 | GMO  | GMO           | GMO        | indeterminado     | Mismo esquema          | El enfoque de Nueva Zelanda se detona por la técnica usada en el proceso. Un organismo desarrollado a partir de técnicas in vitro que modifiquen los genes o el material genético de un organismo requiere una aprobación bajo el Acta de la HS&NO (a menos que este específicamente exenta por alguna regulación). Cuando existe incertidumbre el solicitante puede hacer una consulta sobre si la variedad es un 'nuevo organismo' (si es OGM). ( -->)                                     |
| Filipinas   | Resultados del Grupo de estudio de Riesgo Dietario (Results of DA study group), bajo revisión | Posiblemente SI   |                         | Not GMO   | Not GMO             | Not GMO                                    | GMO           | Not GMO    | Not GMO           | Bajo revisión          | Se requiere consulta. Depende de si existe una nueva combinación de ADN (transgen). ( -->)   |
| Japón   | Resumen   | s/ Info   | ?                       | No es OGM   | No es OGM           | No es OGM                                  | OGM           | No es OGM? | No es OGM         | s/Info                 | No hay información disponible sobre si existen consultas y sus procedimientos  |
| Israel  | Final   | SI  |                         | Not GMO   | Not GMO             | Not GMO                                    | GMO           | Depends    | GMO               | Exclusivo para plantas | Se requiere consulta. Depende de si existe una nueva combinación de ADN (transgen). ( -->)   |
| China   |   |   |                         |   |                     |  |               |            |                   |                        | No hay información disponible del proceso  |
| <b>Europe</b>   |   |   |                         |   |                     |  |               |            |                   |                        |  |
| Unión Europea (28 -GB)  | European Court of Justice (ECJ) decision  |   |                         | OGM   | OGM                 | OGM  | OGM           | OGM        | s/Info            | s/Info                 | Resolución de la ECJ - Directive 2001/18/EC Jul 25, 2018: aplica para organismos desarrollados con NPBT. La resolución aun debe ser implementadas por los países miembros de la Comisión. . ( -->)   |
| Noruega   | Propuesta   |   |                         | No es OGM   | Evaluación expedita | Evaluación expedita                        | OGM           | No es OGM  | s/ Info           | Mismo esquema          | El 'Norwegian Biotechnology Advisory Board' ha propuesto un sistema de 3 niveles: notificación, evaluación expedita e evaluación estándar . ( -->)   |
| <p><b>Nomenclatura:</b> Site Directed Nucleases (SDN) utilizadas por la OGTR (Australia) - Nótese que no existe un estándar internacional para SDN-1, -2, o -3. El análisis que se ha adoptado en este documento define provisionalmente cuatro categorías de edición dirigidas a sitios específicos: SDN-1 (indels); SDN-2-megadels; SDN-3, edición/ corrección y SDN-4, inserción</p> <p>SDN-1: SDN-1se utiliza en ausencia de templado para reparación de ADN. La posición de ruptura bicatenaria (DSB) se selecciona con precisión, pero la reparación es aleatoria y ocasiona deleciones, adiciones o sustituciones (SNP, indels).</p> <p>SDN-2: Las SDN-tipo 2 puede utilizarse para hacer deleciones grandes (megadels, knockouts o sustituciones específicas de locus)</p> <p>SDN-3: Las SDN-tipo3 se utilizan para generar una ruptura bicatenaria dirigida y reparación con templados corto (a. 1-5 nt) largos (b. 10-20 nt). En otros países se considera como SDN-2</p> <p>SDN-4: Las SDN tipo-4 se usan en conjunto con un fragmento largo para inserción, que puede ser homólogo o exógeno. En otros países se considera SDN-3</p> <p>ODM: Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos- Se usa un templado para reparación con cambio de un solo par de bases</p> <p>RdDM: Metilación del ADN dirigida por ARN; cambios epigenéticos que modifican la regulación de genes específicos sin modificar su secuencia primaria</p> <p>* FAS GAIN: <a href="https://gain.fas.usda.gov/lists/Advanced%20Search/AllItems.aspx">https://gain.fas.usda.gov/lists/Advanced%20Search/AllItems.aspx</a> Código de color <span style="background-color: #90EE90; padding: 2px;">Países Parte del PCSB</span> <span style="background-color: #D3D3D3; padding: 2px;">Países no Parte del PCSB</span></p> |   |   |                         |   |                     |  |               |            |                   |                        |  |

### VIII. Precisiones técnicas y consideraciones normativas

A fin de ampliar el análisis de las técnicas revisadas y de los productos (organismos) finales obtenidos, en la siguiente tabla se incluyen tres grupos de criterios que permiten distinguir o discriminar aspectos específicos de cada técnica o producto discutido dentro de éste documento, incluyendo aquellas condiciones que las colocarían potencialmente como casos excluidos o ambiguos, con respecto a las definiciones técnicas de la LBOGM y su aplicación.

**Tabla 4.a.** Aplicación de criterios a considerar para el análisis de las técnicas y sus productos.

| Técnica o caso (#Ref.)                | Inclusión en la definición de biotecnología moderna  | Exclusiones conforme el artículo 6 de la LBOGM<br>La variedad vegetal puede ser resultado de: |  |   | Criterios técnicos                     |  |   |                                 |                            |
|---------------------------------------|--|---|--|---|--|--|---|---------------------------------|----------------------------|
|                                       | El producto de la modificación:<br>a) supera las barreras fisiológicas de la reproducción o de la recombinación<br>b) es heredable | Técnicas de mutagénesis tradicional (MT)/ fusión celular incluida la de protoplastos (FCP)    | Métodos tradicionales de multiplicación/ cultivo <i>in vivo</i> -CVV/ <i>in vitro</i> -CVt | Fertilización <i>in vitro</i> / conjugación/ transducción/ transformación/ cualquier otro natural y la inducción poliploide | Metodología para la prueba de concepto | El efecto de la modificación se puede obtener por métodos de la reproducción y selección tradicional | El efecto de la modificación se puede encontrar en la variabilidad natural del organismo convencional | Trazabilidad del producto final |                            |
|                                       |  | Sin OGM como parental o receptor  | siempre que no se empleen moléculas de rDNA ni de OGM                                      |   |  |  |   | Es detectable                   | Es identificable           |
| Agro-infiltración tópica (71, 85, 86) | a) Si<br>b) No   | No  | Si   | No  | Fenotipo experimental transitorio      | No (es transitorio).   | No (es transitorio).  | Si                              | Si                         |
| Agro-infiltración sistémica (14, 30)  | a) Si<br>b) No   | No  | No   | No  | ELISA, GUS, GFP, otros                 | No (es transitorio).   | No (es transitorio).  | Si                              | Si                         |
| Inclusión floral (85, 86)             | a) Si<br>b) Si   | Depende del producto final  | Depende del producto final   | No  | Southern blot, o PCR                   | Depende del producto final.<br>Puede usarse solo como método de introducción del ácido nucleico      | Depende del producto final<br>Puede usarse solo como método de introducción del ácido nucleico        | Depende del producto final      | Depende del producto final |

|                              |  |                       |                 |  |                                  |                            |                            |    |                            |
|------------------------------|--|-----------------------|-----------------|--|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----|----------------------------|
| Cis-genésis (41)             | a) No<br>b) Si                         | No                    | No              | Si   | PCR alelo-específico             | Si                         | Si                         | Si | No                         |
| Intra-genésis (13)           | a) No<br>b) Si                         | No                    | No              | Si   | PCR alelo-específico             | No                         | Si                         | Si | Si                         |
| Injerto en patrón GM (20)    | a) No<br>b) Depende del producto final | No (el porta injerto) | Si (el injerto) | Si. La migración de iRNAs o péptidos no genera combinaciones novedosas | RT-PCR/ NB o ELISA en el injerto | Depende del producto final | Depende del producto final | Si | Depende del producto final |
| ODM (4,62, 91)               | a) No<br>b) Si                         | Si                    | Si              | No   | PCR                              | Si                         | Si                         | Si | No                         |
| RDdM (44)                    | a) No<br>b) Depende del producto final | Si                    | Si              | Si   | RT-PCR/ Nb                       | Depende del producto final | Depende del producto final | No | No                         |
| Hibridación reversa (87, 88) | a) No<br>b) Si                         | No                    | Si              | No   | Marcadores Moleculares           | Si                         | Si                         | No | No                         |

Tabla 4. b. Aplicación de criterios a considerar para el análisis de las técnicas y sus productos.

| Técnica o caso (#Ref.)             | Inclusión en la definición de la biotecnología moderna   | Exclusiones conforme el artículo 6 de la LBOGM<br>La variedad vegetal puede ser resultado de: |  |   | Criterios técnicos                     |  |   |                                 |                            |
|------------------------------------|--|---|--|---|--|--|---|---------------------------------|----------------------------|
|                                    | El producto de la modificación:<br>b) supera las barreras fisiológicas de la reproducción o de la recombinación<br>b) es heredable | Técnicas de mutagénesis tradicional (MT)/ fusión celular incluida la de protoplastos (FCP)    | Métodos tradicionales de multiplicación/ cultivo <i>in vivo</i> -CVV/ <i>in vitro</i> -CVt | Fertilización <i>in vitro</i> / conjugación/ transducción/ transformación/ cualquier otro natural y la inducción poliploide | Metodología para la prueba de concepto | El efecto de la modificación se puede obtener por métodos de la reproducción y selección tradicional | El efecto de la modificación se puede encontrar en la variabilidad natural del organismo convencional | Trazabilidad del producto final |                            |
|                                    |  | Sin OGM como parental o receptor  | siempre que no se empleen moléculas de rDNA ni OGM   | Es detectable   |  |  |   | Es identificable                |                            |
| Meganucleasas (17, 19)             | a) No<br>b) Si   | Si, cuando se segrega el inserto con MN   | No   | Solo aplica si se usa una MN nativa del cultivo.  | PCR                                    | Si   | Si  | Si                              | No                         |
| SDN-1 (indels, 43, 50, 75, 83, 86) | a) No<br>b) Si   | Si, cuando se segrega el inserto con SDN-1  | No   | Si, cuando se segrega el inserto con SDN-1  | PCR detección de SNP                   | Si   | Si  | Si                              | No                         |
| SDN-2 (megadeals, 83, 86)          | a) No<br>b) Si   | Si, cuando se segrega el inserto con SDN-2  | No   | Si, cuando se segrega el inserto con SDN-2  | PCR o RFLP's                           | Depende del producto final   | Si  | Si                              | Depende del producto final |
| SDN-3 (edición, 67, 68)            | a) No<br>b) Si   | Si, cuando se segrega el inserto con SDN-3  | No   | Si, cuando se segrega el inserto con SDN-3  | PCR                                    | Si   | Depende del producto final  | Si                              | Depende del producto final |
| SDN-4 (inserción 10, 36)           | a) Depende del producto final<br>b) Si   | No  | No   | No  | PCR                                    | Depende del producto final   | Depende del producto final  | Si                              | Depende del producto final |



9. Esta característica de la variedad vegetal indica que es un OGM que está dentro del ámbito de todas actividades reguladas por la LBOGM y de las normativas para cultivos y semillas que sean aplicables. En caso de dudas, referirse el glosario y consultar el No. 12
10. Este producto de la utilización de NPBT es un OGM, cuyos procedimientos para la obtención y la caracterización definitiva de su modificación genética, podrían estar excluidos conforme al artículo 6 de la LBOGM. Por tanto, las actividades objeto de la regulación en el ámbito de la LBOGM, quedarían excluidas para el producto final. En caso de dudas, referirse el glosario y consultar el No. 12
11. La variedad vegetal podría estar solo sujeta, para los procedimientos de registro y certificación, bajo la regulación aplicable de la LFVV y la de la LFPCCS, respectivamente. Consultar lo indicado en el No. 12
12. El resultado de la aplicación de este procedimiento diagnóstico, deberá ser revisado y avalado formalmente, a solicitud de los interesados, por las autoridades competentes. Cuando existan casos límite o eventuales refinamientos de las técnicas involucradas o nuevos fenotipos no caracterizados, podrán revisarse los criterios y el instrumento diagnóstico, con base en criterios adicionales de bioseguridad (familiaridad, riesgo potencial) u operativos (trazabilidad).

#### **GLOSARIO** (asociado al INSTRUMENTO DIAGNÓSTICO)

cf. Refs de consulta 15, 24, 25, 28, **31, 32**, 60, 64, 73, 90 y contexto.

**Acervo genético** – Conjunto de genotipos o ‘poza de genes’ (*gene pool*) que comparte una especie o un grupo de organismos emparentados, los cuales, en virtud de su compatibilidad sexual pueden intercambiar los alelos contenidos en ese acervo. Alt [en inglés *gene pool*; también llamado patrimonio genético] de una especie o población es el grupo completo de alelos únicos presentes en el material genético de la totalidad de los individuos existentes en dicha población.<sup>2</sup>Un acervo genético amplio se asocia a una variabilidad genética amplia, que se asocia con poblaciones robustas, o sea con mayor adaptabilidad a diversas circunstancias, capaces de sobrevivir a intensos eventos de selección. Por el contrario, una baja variabilidad genética (cuello de botella o consanguinidad) conlleva una superior especialización al medio y una menor adaptabilidad a circunstancias no previstas, lo cual aumenta la posibilidad de extinción en contextos novedosos. Cuando existen varios alelos para un gen o locus dado, se dice que la población es polimórfica con respecto a ese gen o locus.<sup>3</sup> Cuando dicha variación no existe se dice que es monomórfica.]

**ADN recombinante** – Convencionalmente, se refiere a secuencias de ácido-desoxiribo-nucleico (ADN), de origen diverso, que ha sido sometido a un ensamblado lineal específico, in vitro o in vivo, por efecto de procedimientos y componentes para la modificación de estas moléculas.

**Combinación genética novedosa** - corresponde a una inserción en el genoma —en este caso, en alguna especie vegetal—, de forma intencional, estable y conjunta, de uno o más genes o de secuencias de ADN que forman parte de una **construcción genética** definida; es decir, un arreglo lineal en el genoma de tal organismo, que no podría obtenerse mediante la reproducción o selección convencionales, y que muy difícilmente se formaría de forma espontánea [natural].

**Componentes tipo SDN** – Se refiere a los sistemas de mutagénesis constituidos por endonucleasas, asociadas con dominios de reconocimiento de secuencias de ADN (de naturaleza protéica o

polinucleotídica), que generan cortes mono- o bicatenarios dirigidos a loci específicos del genoma. Dependiendo del sistema de reparación natural de ADN reclutado, se pueden generar cuatro tipos generales de modificaciones (Figura 7.3.D). La denominación SDN corresponde al inglés como *Site-Directed-Nucleases*, que incluyen Meganucleasas, ZFN, TALEN y CRISPR-Cas, explicados en la sección V. 7.

**Construcción [genética]** – Convencionalmente, es un arreglo lineal específico que permite ensamblar uno varios genes recombinantes que va acompañado de otros componentes que permiten la replicación de la construcción (vector) y/o su inserción en el genoma (homologías para recombinación) y/o la expresión del dominio estructural (promotor) y/o su direccionamiento a compartimentos celulares (péptido señal), así como otras propiedades.

**Corte bicatenario** – Se refiere a la capacidad de las endonucleasas tipo SDN —ya sea como dímeros o monómeros— de llevar a cabo un corte interno y específico en ambas cadenas o hebras del ADN, para promover los mecanismos de reparación heteróloga (NHEJ) u homóloga (HDR).

**Cruzas y métodos reproductivos tradicionales** – Son equivalentes a los que se indican como «...técnicas utilizadas en la reproducción y la selección tradicional,» (LBOGM, Art. 3, fracc. VI), o a aquellas «...en que los organismos resultantes puedan producirse también mediante métodos tradicionales de multiplicación o de cultivo in vivo o in vitro,» (LBOGM, Art. 6, fracc. I). En la fracción II. se indica que estos incluyen: «La utilización de técnicas de fertilización in vitro, (...), transducción, transformación\*, o cualquier otro proceso natural y la inducción poliploide,». Todos aquellos métodos que “no superen las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o la recombinación”, pueden ser considerados como alternativas para la generación de variaciones, polimorfismos, mutaciones y rearrreglos necesarios para el mejoramiento genético.

**Expresión [genética]** – Es el proceso mediante el cual los genes se transcriben por efecto de la ARN-polimerasa, produciendo transcritos, denominados también mensajeros; estos se traducen por efecto del complejo de síntesis de proteínas y los productos —que tienen funciones conferidas por los genes correspondientes— pueden localizarse y medirse usando diversos métodos.

**Expresión transitoria [dilución de]** – Cuando un tejido vegetal se ha infiltrado con un vector de expresión, este produce algunas proteínas en el interior de algunas células, pero no se replica; aquellas normalmente realizan una función local y específica, pero terminan —al igual que el vector y el gene recombinante— degradándose tras divisiones celulares subsecuentes. Dependiendo de la acción buscada previamente (mutagénesis in vivo, fenotipos de resistencia tóxica, silenciamiento epigenético, etc.), este enfoque permite probar variaciones que indiquen la o las construcciones de interés para otras transformaciones. Pero en los cultivos celulares o plantas regeneradas usando este enfoque, no se inserta en el genoma el elemento genético evaluado.

**Genes completos [nativos]** – En los organismos eucariontes, la estructura de un gen (situado en algún cromosoma), se compone de diversas regiones más o menos contiguas, algunas de las cuales no quedan representadas en la secuencia de la proteína final; algunas tienen funciones reguladoras y otras están probablemente involucradas en los rearrreglos que impulsan de varias formas cambios adaptativos y evolutivos. Cuando se hace una transformación genética usando un ‘gen completo’ se deben incluir todas las regiones genómicas determinantes para su expresión. Las versiones ‘editadas’ o procesadas

naturalmente, son más cortas ya que no llevan muchas regiones regulatorias y otras estructurales internas e interdispersas llamadas intrones. Para obtener un “ADN complementario” que pueda ser expresado en vectores específicos se utiliza la transcripción reversa desde ARN (mensajero procesado) a ADN, utilizando una enzima particular que hace una copia en este sentido. La transformación con un gen nativo, puede usarse para desarrollar un OGM **cisgénico**; utilizando segmentos del gen conduce al desarrollo de OGM **intragénicos**.

**Marcadores [moleculares]** – Algunas secuencias de ADN que normalmente no son partes de algún gen, que presentan variaciones de individuo a individuo (o entre poblaciones), pero que normalmente conservan su posición respecto a otros genes ‘cercaños’ (ligados), de interés, se establecen como marcas de posición que hace posible comprobar cruces efectivas, construir mapas del genoma y también rastrear regiones genómicas determinantes en la selección de fenotipos en progenies. Los que han sido utilizados más extensivamente y han marcado las tendencias en cuanto a abundancia, versatilidad, precisión, etc., son los RFLPs<sup>21</sup>, los AFLPs<sup>22</sup>, los microsatélites (SSR)<sup>23</sup> y actualmente, los SNP<sup>24</sup>.

**Modificaciones epigenéticas** – El ADN de eucariontes, esta normalmente protegido por proteínas que colaboran en su empacamiento en el núcleo previo a la división celular. Vistas al microscopio electrónico, las regiones más abiertas o laxas, —donde se lleva a cabo mayoritariamente la **expresión genética**— se denomina la euromatina. Algunas regiones del ADN genómico se encuentran en forma metilada que se ha asociado con zonas con baja actividad transcripcional o más densamente empacadas. El cambio en el patrón de metilación —sin alterar la secuencia nucleotídica— tiene ciertos efectos en los niveles de expresión de genes particulares. Se considera que algunos factores ambientales de forma indirecta, pueden alterar las funciones de este epigenoma.

**Movilización sistémica** [de elementos no genómicos] – Algunas proteínas pequeñas/ péptidos secretadas por células vegetales, y desplazándose por el tejido vascular, actúan a distancia como las fitohormonas. Se ha demostrado que esto ocurre también en los injertos, lo que se ha aprovechado para movilizar ciertas capacidades presentes en los pies de injerto a los vástagos. También existe evidencia de que esto ocurre asimismo con ARNs pequeños (no-codificantes) que, sintetizados y movilizados desde otros órganos, pueden ejercer una interferencia a nivel post-transcripcional, regulando la expresión de algunos genes particulares de forma sistémica, dando origen al llamado ‘silenciamiento epigenético’ u otros cambios en la regulación del desarrollo. ( ).

**Mutaciones puntuales** – Cambios de secuencia muy localizados en el genoma, que originalmente se conciben como de una sola o muy pocas pares de bases y que se detectan en **secuencias homólogas**. Con el advenimiento de los marcadores moleculares y la secuenciación masiva, se he puesto claro que la abundancia o distribución de este tipo de mutaciones es mayor, pero que eso no se refleja

---

<sup>21</sup> RFLP – Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, que se manifiestan por diferencias en la ubicación de sitios susceptibles a diferentes endonucleasas (*EcoRI*, *KpnI*, *PstI*, *HindIII*, *BamHI*, etc.)

<sup>22</sup> AFLP – Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de amplificación. Aunque es una técnica comercial estandarizada, en algún momento se refería a varias técnicas que utilizaban PCR con iniciadores arbitrarios (AP-PCR, DAF, tec-MAAP)

<sup>23</sup> SSR – Repeticiones de Secuencia Simple. Se asocian a una fracción particular del ADN genómico, ubicada y rica en loci con secuencias repetidas en tándem con abundante contenido polimórfico.

<sup>24</sup> SNP - Polimorfismos de nucleótido simple – Se refieren a cambios de un solo par de bases en un sitio particular, que se detectan con métodos de secuenciación de alto rendimiento.

directamente en la diversidad fenotípica, aunque pueden usarse como parte del ‘reloj molecular’ de la evolución.

**Mutagénesis convencional [inducida]** – Existen métodos tradicionales que, fuera de las mutaciones espontáneas —que son cambios en el genoma por causas naturales, infrecuentes y no previsibles— las demás son *inducibles* y, necesariamente han sido seleccionadas. Para hacer mutagénesis tradicional, los fitomejoradores y microbiólogos han recurrido a agentes físicos como la radiación ionizante (producida por fuentes radioactivas como un isótopo del elemento cobalto [ $^{60}\text{Co}$ ]), a sustancias químicas mutagénicas (como el etil-metano-sulfonato, EMS), o bien a la activación específica de ciertos elementos genéticos móviles *endógenos* (transposones de plantas). Todos estos agentes producen en general, rupturas aleatorias en el ADN, reacomodos o rearrreglos de diferente magnitud o ‘interrupción’ de genes, que pueden provocar uno o varios cambios en las funciones y capacidades de organismos expuestos a los mismos. Los métodos convencionales son procedimientos artificiales, azaroso y conllevan —aparte del fenotipo buscado o encontrado— la generación de mutaciones múltiples, algunas de las cuales terminan por considerarse silenciosas, no aparentes o neutras, en función de la familiaridad o historia de uso seguro que han disfrutado diversos resultados de este proceso (frutas sin semillas, tolerancia a herbicidas, calidad culinaria, etc.). La FAO y la IAEA principalmente, han incentivado este tipo de estrategia para incrementar la diversidad y versatilidad de cultivos básicos, frutales y ornamentales<sup>25</sup>. Se han registrado cerca de 3,200 mutantes independientes en 210 especies, obtenidas en 70 países con los distintos métodos tradicionales; en algunos casos, la misma característica se ha obtenido varias veces o por diferentes métodos.

**Rearreglos [genómicos]** – Se considera que, como resultado de procesos duplicativos o mutagénicos, son cambios escasos y discretos en la estructura del genoma. No obstante, se han estudiado algunos factores que incrementan su frecuencia y se ha aprovechado para la *variación somaclonal* resultante, como una herramienta de fitomejoramiento. En este fenómeno, son notables especialmente, los *elementos transponibles* de plantas que, bajo ciertas condiciones, parecen favorecer espontáneamente el reacomodo de regiones genómicas sin efectos aparentes o que generan *mayor diversidad* y posiblemente, la llamada *plasticidad genómica*. El estudio de este proceso le valió a Barbara McClintock el Premio Nobel en 1980. Algunos grupos en México han continuado investigando sus mecanismos y consecuencias en maíz (Piñero, Vielle-Calzada, Simpson y otros).

**Reparación [del ADN, sistemas de-]** En las células de los organismos, el material genético está en constante mantenimiento, especialmente durante la replicación, donde puede ocurrir, rupturas, copias con errores o aparición de elementos exógenos. En términos generales, existen 2 mecanismos para reparar zonas cortadas. Uno de ellos une extremos separados, introduciendo algunos cambios (inserciones o deleciones cortas), en la zona de ensamble. Este mecanismo se refiere como *Non-Homologous End Joining* (NHEJ). En otros casos, las enzimas participantes, utilizan las cadenas contiguas u otras secuencias con homología, como ‘moldes’ para el re-copiado correcto de zonas con cortes. A este proceso se le denomina Reparación Homóloga (HR) o también Recombinación dependiente de homología (HDR), que dependen de secuencias endógenas —que también funciona con otras exógenas— que pueden funcionar como ‘moldes’ sin integrarse a la doble cadena, o bien, ser insertados por como parte de la zona reparada.

---

<sup>25</sup> cf. Mutant Variety Database, <https://mvd.iaea.org/#!/Home>

**Secuencias homólogas** [comunes]. De acuerdo con predicciones de la teoría sintética de la evolución y gracias a los sistemas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos, sabemos que hay una similitud creciente entre los genes de cada grupo biológico, partiendo de los más antiguos hacia los más recientes. Es posible estimar inclusive, coeficientes de similitud promedio entre genomas, cromosomas y genes particulares, además de la conservación en el orden en que estos últimos están dispuestos (sintenia). Asimismo, en una sola especie, existen variaciones de un tipo común de secuencias, formando *familias multigénicas* (p.ej. las hemoglobinas, las amilasas o las alcohol-deshidrogenasas). Ese tipo de secuencias parecidas —denominadas homólogas porque provienen de un antecesor genómico común que se amplificó de algún modo durante la historia evolutiva de ese linaje— se denomina **parálogas**. Al determinar cuáles son los genes homólogos que existen entre especies emparentadas dentro de una *familia taxonómica*, los que resultan similares en razón de su *ancestría filogenética*, se denominan **ortólogos**.

**Segregación nula o herencia disociativa** – A partir de conceptos de la genética clásica (herencia mendeliana) y algunos otros de la denominada cuantitativa (herencia poligénica), se han establecido procedimientos que permiten reunir o acumular sucesivamente, ciertos genes de interés —por asociación de fenotipos y/o marcadores moleculares— en una variedad y, asimismo, hacer lo contrario: eliminar, segregar o des-asociar fenotipos, alelos o marcadores intencionalmente en una determinada progenie. Los transgenes o alguna otra inserción de la que se pueda hacer un trazamiento molecular, puede eliminarse de los genomas de una población con este tipo de procedimientos. Considerando que no se requieren rearrreglos o escisiones físicas del material —porque se sustituyen por homología con regiones ‘nativas’ de los cromosomas homólogos— no quedan reminiscencias, ni riesgos discernibles, de los procedimientos utilizados en etapas previas del proceso de mejoramiento.

**Sexual [compatibilidad]** – Dos organismos son realmente compatibles sexualmente cuando producen descendencia viable y fértil. Desde el punto de vista biológico, este es el paso crucial en la especiación ya que, cuando se genera una barrera fisiológica, conductual, estructural o de cualquier tipo que impida el intercambio de genes y la hibridación en las progenies, el llamado **acervo genético** que antes era compartido comenzaría a divergir y a acumular ciertas diferencias que tienen generalmente consecuencias, de tipo fenológico, ecológico y taxonómico.

**Sitios específicos [del genoma]** – Casi cualquier secuencia corta de nucleótidos en el genoma —lo que sería equivalente a encontrar, gramaticalmente, un artículo, una palabra, una frase o una oración en un texto— pueden presentarse a lo largo ADN. Su abundancia relativa o sus variaciones, serán una marca distintiva de ciertas zonas del genoma y/o de algunos grupos biológicos. Se ha desarrollado aplicaciones computacionales para realizar estos análisis a partir de genes y genomas secuenciados como datos bioinformáticos almacenados en grandes bibliotecas digitales de acceso público. Asimismo, existen enzimas que son capaces de reconocer estructuralmente y con precisión, ciertas secuencias cortas de 4 hasta 8 o 9 pb, a veces con una conformación palindrómica, para cortarlas entre sí. A partir de estos conocimientos, se han generaron sistemas aplicados para el reconocimiento de casi cualquier secuencia (usando activadores transcripcionales y/o enzimas de restricción), que han sido incorporados a herramientas tecnológicas para mutagénesis dirigida (con **componentes tipo SDN**), presentados en la sección V.7.

**Templado** – La replicación del ADN para generar copias de cada cromosoma, se realiza por segmentos, bajo una cierta secuencia ordenada y posteriormente, todo se completa antes de empacar el genoma en

cromosomas densos. Para el inicio de las copias semi-conservativas que generan hebras nuevas al lado de las originales, se requiere de un iniciador o molde (de 5-10 nts), que sirva de anclaje para los primeros nucleótidos que se integran a la cadena nascente; asimismo, la reparación de cortes mono- o bicatenarios, requiere en algunos casos de un templado que guíe la incorporación de los mismos o nuevos nucleótidos a la secuencia.

---



## X. Referencias generales.

(Hiperenlaces a referencias normativas internacionales, en anexo a bibliografía, p. 53)

1. Agüero, C.B., S.L. Uratsu, C. Greve, A.L.T. Powell, J.M. Labavitch, C.P. Meredith, A.M. Dandekar. (2005). Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* expressing the pear PGIP gene. *Mol. Plant Pathol.* **6** (1): 43–51. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2004.00262.X
2. Arnould, S., C. Delenda, S. Grizot, C. Desseaux, F. Pâques, G.H. Silva, J. Smith; The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy, *Protein Engineering, Design and Selection*, Volume 24, Issue 1-2, 1 January 2011, Pages 27–31, <https://doi.org/10.1093/protein/gzq083>
3. Barabaschi, D., A. Tondelli, F. Desiderio, A. Volante, P. Vaccino, G. Vale and L. Cattivelli (2016). Next generation breeding. *Plant Sci* **242**: 3-13.
4. Beetham, P. R., Kipp, P. B., Sawycky, X. L., Arntzen, C. J., & May, G. D. (1999). A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(15), 8774–8778. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8774>
5. Beetham PR, Gocal GFW, Schopke C, Sauer NJ, Pearce J, Segami RE, Mozoruk J (2014) Targeted gene modification using oligonucleotide mediated gene repair. *Int Pat App* WO2014144987, 14 Mar 2014
6. Belfanti, E., E. Silberberg-Dilworth, S. Tartarini, A. Patocchi, M. Barbieri, J. Zhu, B. A. Vinatzer, L. Gianfranceschi, C. Gessler and S. Sansavini (2004). The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(3): 886-890.
7. Bender, J. (2012). RNA-directed DNA methylation: getting a grip on mechanism. *Curr Biol* **22**(10): R400-401.
8. Bogdanove, A. J., Bohm, A., Miller, J. C., Morgan, R. D., & Stoddard, B. L. (2018). Engineering altered protein–DNA recognition specificity. *Nucleic Acids Research*, **46**(10), 4845–4871. <https://doi.org/10.1093/nar/gky289>
9. Boulin, T. and O. Hobert (2012). From genes to function: the *C. elegans* genetic toolbox. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**(1): 114-137.
10. Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, **33**(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
11. Breyer, D., Herman, P., Brandenburger, A., Gheysen, G., Remaut, E., Soumillon, P., Van Doorselaere, J., Custers, R., Pauwels, K., Sneyers, M. & Reheul, D. (2009). Genetic

modification through oligonucleotidemediated mutagenesis. A GMO regulatory challenge?  
*Environ Biosafety Res.* **8**: 57-64.

12. Castel, S. E., & Martienssen, R. A. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature rev Genetics*, **14**(2): 100-12.
13. Chawla R., R. Shakya and C. M. Rommens (2012). Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. *Plant Biotech J.* **10**: 913–924
14. Chen Q. & H. Lai, (2015). Gene Delivery into Plant Cells for Recombinant Protein Production. *BioMed Research International*, Vol. 2015, Article ID 932161, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/932161>
15. Chrispeels M.J., & D.E. Sadava (1994). *Plants, genes and agriculture* (foreword by Jeff Schell). Boston: Jones and Barlett Publ. 478 pp.
16. de Vetten, N., Wolters, A., Raemakers, K., van der Meer, I., ter Stege, R., Heeres, E., Heeres, P. and Visser, R. (2003). A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat. Biotech.* **21**: 439 – 442.
17. D'Halluin, K., Vanderstraeten, C., Van Hulle, J., Rosolowska, J., Van Den Brande, I., Pennewaert, A., ... Broadhvest, J. (2013). Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant Biotechnology J.* **11**(8): 933–941. <https://doi.org/10.1111/pbi.12085>
18. Dirks, R., K. van Dun, C. B. de Snoo, M. van den Berg, C. L. Lelivelt, W. Voermans, L. Woudenberg, J. P. de Wit, K. Reinink, J. W. Schut, E. van der Zeeuw, A. Vogelaar, G. Freymark, E. W. Gutteling, M. N. Keppel, P. van Drongelen, M. Kieny, P. Ellul, A. Touraev, H. Ma, H. de Jong and E. Wijnker (2009). Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnol J.* **7**(9): 837-845.
19. Djukanovic, V., Smith, J., Lowe, K., Yang, M., Gao, H., Jones, S., ... Alexander Lyznik, L. (2013). Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene ( *MS26* ) using a re-designed I- *Cre* I homing endonuclease. *The Plant Journal*, **76**(5), 888–899. <https://doi.org/10.1111/tpj.12335>.
20. Dutt, M., Z.T. Li, K.T. Kelley, S.A. Dhekney, M.M. Van Aman, J. Tattersall, and D.J. Gray. (2007). Rootstock protein transmission in grapevines. *Acta Hort.* **738**:749–754.
21. Eckerstofer M., M. Miklau, H. Gaugitsch (2014) *New Plant Breeding Techniques and Risks Associated with their Application. Umweltbundesamt Reports, Band 0477*, Environment Agency Austria. ISBN: 978-3-99004-282-3doi: 10.13140/2.1.3448.1449
22. Eschen-Lippold, L., Landgraf, R., Smolka, U. , Schulze, S., Heilmann, M., Heilmann, I., Hause, G. and Rosahl, S. (2012), Activation of defense against *Phytophthora infestans* in potato by

down-regulation of syntaxin gene expression. *New Phytologist*, **193**: 985-996.  
doi:[10.1111/j.1469-8137.2011.04024.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04024.x)

23. Espinoza, C., R. Schlechter, D. Herrera, E. Torres, A. Serrano, C. Medina and P. Arce-Johnson (2013). Cisgenesis and intragenesis: new tools for improving crops. *Biol Res* **46**(4): 323-331.
24. FAO (2010). Biotechnologies for Agricultural Development: Proceedings of the FAO international technical conference on "Agricultural Biotechnologies in Developing Countries: Options and Opportunities in Crops, Forestry, Livestock, Fisheries and Agro-industry to face the challenges of food insecurity and climate change (ABDC-10). Rome: The Food and Agriculture Organization of the United Nations. 569 pp. [www.fao.org/biotech](http://www.fao.org/biotech)
25. Federoff N. & N.M. Brown (2004). Mendel in the kitchen: a scientist's view of genetically modified foods. Washington DC: Joseph Henry Press. 370 pp.
26. Febres, V. J., Lee, R. F., & Moore, G. A. (2008). Transgenic resistance to Citrus tristeza virus in grapefruit. *Plant Cell Reports*, *27*(1), 93–104. doi: 10.1007/s00299-007-0445-1
27. Finke, A., Kuhlmann, M., & Mette, M. F. (2012). IDN2 has a role downstream of siRNA formation in RNA-directed DNA methylation. *Epigenetics*, *7*(8), 950-60.
28. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna (2007). F.G. Bolívar Zapata (comp. ed.). Arias-Ortiz, C. et al., 2aed. México DF, El Colegio Nacional; coeds.: Academia Mexicana de Ciencias/ UNAM/ Instituto de Biotecnología/ CONACYT/ CIBIOGEM. 718 pp.
29. Geier T., K. Eimert, R. Scherer, C. Nickel (2008). Production and rooting behaviour of rolB-transgenic plants of grape rootstock 'Richter 110' (*Vitis berlandieri* × *V. rupestris*) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **94** (3): 269-280.
30. Gleba, Y. Tusé, D. and Giritch A. (2014), "Plant viral vectors for delivery by Agrobacterium" In: Plant Viral Vectors, vol. 375 of *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 155–192, Springer: Berlin.
31. **Glosario-CBt-AMC/2017** (Anexo I) pp. 355-420, *En*: Comité de Biotecnología de la AMC/ F. Bolívar, coord. "Transgénicos, grandes beneficios, ausencia de daños y mitos" AMC/ UNAM/ I-Biotecnología/ El Colegio Nacional.
32. **Glossary-NASEM/2017**. pp. 179-80, In: National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2017. *Preparing for Future Products of Biotechnology*. Washington, DC: The National Academies Press. doi: 10.17226/24605. (NASEM-217)
33. Goetz, M., Hooper, L. C., Johnson, S. D., Rodrigues, J. C., Vivian-Smith, A., & Koltunow, A. M. (2007). Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. *Plant Physiol (Bethesda)*, **145**(2), 351-66.

34. Groszmann, M., I. K. Greaves, N. Albert, R. Fujimoto, C. A. Helliwell, E. S. Dennis and W. J. Peacock (2011). Epigenetics in plants-vernalisation and hybrid vigour. *Biochim Biophys Acta* **1809**(8): 427-437.
35. Guo, Q., Liu, Q., Liang, G., Smith, N. A., & Wang, M.-B. (2016). RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. *Curr Genomics*, *17*, 476–489. <https://doi.org/DOI: 10.2174/138920291766616052010 3117>
36. Gupta, M., DeKelder, R. C., Palta, A., Clifford, C., Gopalan, S., Miller, J. C., ... Petolino, J. F. (2012). Transcriptional activation of *Brassica napus*  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II with an engineered zinc finger protein transcription factor. *Plant Biotechnology Journal*, *10*(7), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00695.x>
37. Haroldsen, V.M.; Chi-Ham, C.L. & Bennett, A.B. (2012a): Transgene mobilization and regulatory uncertainty for non-GE fruit products of transgenic rootstocks. *J. of Biotechnology* **161**: 349–353.
38. Haroldsen VM, Szczerba MW, Aktas H, Lopez-Baltazar J, Odias MJ, Chi-Ham CL, Labavitch JM, Bennett AB and Powell ALT (2012b) Mobility of transgenic nucleic acids and proteins within grafted rootstocks for agricultural improvement. *Front Plant Sci.* **3**:39. doi: 10.3389/fpls.2012.00039
39. Hartung, F. and J. Schiemann (2014). Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J* **78**(5): 742-752.
40. Haverkort, A.J., Struik, P.C., Visser, R.G.F. and Jacobsen, E. (2009). Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* **52**, 249 –264.
41. Holme I. B., Wendt T. and Holm P.B., (2012). Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology J* **11**: 395–407.
42. Ikeuchi, M., A. Iwase and K. Sugimoto (2015). Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol* **28**: 60-67.
43. Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, *41*(20), e188–e188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>
44. Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H., & Masuta, C. (2011). RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene targeted by a viral vector: a potent gene silencing system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. *Plant signaling & behavior*, *6*(8), 1090-3.
45. Kanchiswamy, C. N. (2016). "DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement." *Plant Cell Rep* **35** (7): 1469-1474.

46. Kim, Y.G, Cha, J., and S. Chandrasegaran (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(3):1156-1160.
47. Kuhlmann, M., Finke, A., Mascher, M. and Mette, M. F. (2014), DNA methylation maintenance consolidates RNA-directed DNA methylation and transcriptional gene silencing over generations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **80**: 269-281. doi:10.1111/tpj.12630
48. Kusaba, M. (2004). RNA interference in crop plants. *Curr Opin Biotechnol* **15**(2): 139-143.
49. Leuzinger K, Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, Zhou X, Chen Q. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *J. Vis Exp* (77) 2013
50. Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., & Yang, B. (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology*, **30**(5), 390–392. <https://doi.org/10.1038/nbt.2199>
51. Lorkovic Z.J., U. Naumann, A. J.M. Matzke, M. Matzke. (2012). Involvement of a GHKL ATPase in RNA-Directed DNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* **22**: 933–938, DOI 10.1016/j.cub.2012.03.061
52. Lusser, M. and H. V. Davies (2013). Comparative regulatory approaches for groups of new plant breeding techniques. *N Biotechnol* **30**(5): 437-446.
53. Lusser, M., C. Parisi, D. Plan and E. Rodriguez-Cerezo (2012). Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat Biotechnol* **30**(3): 231-239.
54. Ma L, E. Lukasik, F Gawehns, F.I. W. Takken (2012), The use of Agro-infiltration for transient Expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. In: Bolton M.D., B.P.H.J. Thomma (eds), "Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols." *Meth. Molec. Biol.* 835, DOI 10.1007\_978-1-61779-501-5\_4
55. Mao, Y. B., Tao, X. Y., Xue, X. Y., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2010). Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic research*, **20**(3), 665-73.
56. Martin A., H. Adam, M. Díaz-Mendoza, M. Zurczak, N.D. González-Schain, P. Suárez-López. (2009) Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development* **136**: 2873-2881.
57. Martínez-Navarro, A.C., S. V. Galván-Gordillo, B. Xoconostle-Cázares, R. Ruiz-Medrano (2013). Vascular gene expression: a hypothesis. *Front. Plant Sci.* **17** (4): 261. doi: 10.3389/fpls.2013.00261. eCollection 2013.
58. Mathieu, O. and J. Bender (2004). RNA-directed DNA methylation. *J Cell Sci* **117**(Pt 21): 4881-4888.

59. Mudge K., J. Janick, S. Scofield, E.E. Goldschmidt (2009), A history of grafting, (no. 9) pp. 437-484 In: Janick J. ed., *Horticultural Reviews* **35**. NY: John Wiley & Sons.
60. Murphy D. J. (2011). Plants, biotechnology and agriculture. Pondicherry (India). CAB International/ Cambridge University Press. 310 pp.
61. Nagel, A.K., H. Kalariya, G. Schnabel (2010). *Gastrodia* Antifungal Protein (GAFP-1) and Its Transcript Are Absent from Scions of Chimeric-grafted Plum. *HortScience* **45**(2):188–192.
62. Okuzaki, A., & Toriyama, K. (2004). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Reports*, **22**(7), 509–512. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0698-2>
63. Parrott, W., Chassy, B., Ligon, J., Meyer, L., Petrick, J., Zhou, J., ... & Levine, M. (2010). Application of food and feed safety assessment principles to evaluate transgenic approaches to gene modulation in crops. *Food Chem Toxicol* **48**(7): 1773-1790.
64. Raven P.H. & G.B. Johnson (1989) *Biology* (2<sup>nd</sup> Ed.). St. Louis (MO): Times Mirror/ Mosby College Publ. 1142 pp. + appendices.
65. Rinaldo, A. R., & Ayliffe, M. (2015). Gene targeting and editing in crop plants: a new era of precision opportunities. *Molecular Breeding*, **35**(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0210-z>
66. Rommens C. M. (2007). Intragenic Crop Improvement: Combining the Benefits of Traditional Breeding and Genetic Engineering. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 4281-4288
67. Sauer, N. J., J. Mozoruk, R. B. Miller, Z. J. Warburg, K. A. Walker, P. R. Beetham, C. R. Schopke and G. F. Gocal (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnol J* **14**(2): 496-502.
68. Sauer, N. J., Narváez-Vásquez, J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Woodward, M. J., ... Gocal, G. F. W. (2016). Oligonucleotide-Mediated Genome Editing Provides Precision and Function to Engineered Nucleases and Antibiotics in Plants. *Plant Physiology*, **170**(4), 1917–1928. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01696>
69. Schaart, J. G., C. C. van de Wiel, L. A. Lotz and M. J. Smulders (2016). Opportunities for Products of New Plant Breeding Techniques. *Trends Plant Sci* **21**(5): 438-449.
70. Schinkel, H., & Schillberg, S. (2016). Genome editing: intellectual property and product development in plant biotechnology. *Plant Cell Reports*, **35**(7), 1487–1491. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1988-9>
71. Schöb H., Kunz C., Meins F. Jr. (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Mol Gen Genet.* **256** (5): 581-5.

72. Schouten, H. J., Krens, F. a, & Jacobsen, E. (2006). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO Reports*, **7**(8), 750–753. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400769>
73. Sensi, A., O. Brandenberg, K. Gosh, A. Sonino, et al. (2011). Biosafety Resource Book (modules a-e). Rome: The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). [www.fao.org/biotech](http://www.fao.org/biotech)
74. Shao, Y., Y. Guan, L. Wang, Z. Qiu, M. Liu, Y. Chen, L. Wu, Y. Li, X. Ma, M. Liu and D. Li (2014). CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat Protoc* **9**(10): 2493-2512.
75. Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKolver, R. C., Moehle, E. A., Worden, S. E., ... Urnov, F. D. (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, **459**(7245), 437–441. <https://doi.org/10.1038/nature07992>
76. Schwind, N. , Zwiebel, M. , Itaya, A. , Ding, B. , Wang, M. , Krczal, G. And Wassenegger, M. (2009), RNAi-mediated resistance to *Potato Spindle Tuber Viroid* In transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Molecular Plant Pathology*, **10**: 459-469. doi:10.1111/J.1364-3703.2009.00546.X
77. Singh, A., Joshi, M., & Devi, E. L. (2015). Alternative to Transgenesis: Cisgenesis and Intragenesis. In J. M. Al-Khayri, S. M. Jain, & D. V Johnson (Eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools* (pp. 345–367). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0_12)
78. Sprink, T., D. Eriksson, J. Schiemann and F. Hartung (2016). Regulatory hurdles for genome editing: process- vs. product-based approaches in different regulatory contexts. *Plant Cell Rep* **35**(7): 1493-1506.
79. Stegemann S. M. Keuthe, S. Greiner, R. Bock (2012). Horizontal transfer of chloroplast genomes between plant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109** (7):2434-8. doi: 10.1073/pnas.1114076109. Epub 2012 Jan 30.
80. Svitashv, S., Young, J., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S.C. & Cigan, A.M. (2015). Targeted mutagenesis, precise gene editing and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiology* **169**: 931-945
81. Thyssen G., Z. Svab, P. Maliga (2012). Cell-to-cell movement of plastids in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109** (7):2439-43. doi: 10.1073/pnas.1114297109.
82. Underwood, B. A., Tieman, D. M., Shibuya, K., Dexter, R. J., Loucas, H. M., Simkin, A. J., Sims, C. A., Schmelz, E. A., Klee, H. J., ... Clark, D. G. (2005). Ethylene-regulated floral volatile synthesis in petunia corollas. *Plant Physiol. (Bethesda)*, **138**(1), 255-66.
83. Upadhyay, S. K., Kumar, J., Alok, A., & Tuli, R. (2013). RNA-guided genome editing for target

gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(12), 2233–2238.  
<https://doi.org/10.1534/g3.113.008847>

84. Van de Wiel, C. C. M., J. G. Schaart, L. A. P. Lotz and M. J. M. Smulders (2017). New traits in crops produced by genome editing techniques based on deletions. *Plant Biotechnol Rep* 11(1): 1-8.
85. Vogel B. (2012). *New Plant Breeding Techniques. Groundwork for the Clarification of Outstanding Questions for the Legal Regulation of New Plant Breeding Techniques*. Federal Office for the Environment (FOEN), Zurich: 124 pp.
86. Vogel B. (2016). *New Plant Breeding Techniques. Update of the 2012 Baseline Report* Swiss Federal Office for the Environment [BAFU/FOEN], Soil and Biotechnology Division. Switzerland. **Accesible en la liga AWEL.**
87. Wendt, T., Holm, P. B., Starker, C. G., Christian, M., Voytas, D. F., Brinch-Pedersen, H., & Holme, I. B. (2013). TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology*, 83(3), 279–285.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-013-0078-4>
88. Wijnker, E., K. van Dun, C. B. de Snoo, C. L. Lelivelt, J. J. Keurentjes, N. S. Naharudin, M. Ravi, S. W. Chan, H. de Jong and R. Dirks (2012). Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. *Nat Genet* 44(4): 467-470.
89. Wijnker E., Deurhof L, van de Belt J., B. de Snoo, Blankestijn H, Becker F, Ravi M, Chan S, van Dun K, Lelivelt C., de Jong H, Dirks R, Keurentjes J. Hybrid recreation by reverse breeding in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Protocols* 9 (4): 762-772.
90. Xu, Y. (2010). *Molecular breeding* (foreword by Norman Borlaug). Didcot (UK): CAB International/ Marton Book Services. 734 pp.
91. Zeinipour M., Azadi P., Majd A., Kermani M.J., Irian S., Hosseini S.M., Mii M. (2018). Agroinfiltration: a rapid and reliable method to select suitable rose cultivars for blue flower production. *Physiol Mol Biol Plants*. 24(3):503-511. doi: 10.1007/s12298-018-0516-5.
92. Zhu, T., Peterson, D. J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczynski, C. L., & Bowen, B. (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(15), 8768–8773. doi: 10.1073/PNAS.96.15.8768

| PAÍS  | Hiper-enlaces de internet (URL) sobre documentos, noticias y referencias oficiales sobre el enfoque o estatus regulatorio de NPBTs  |
|---|---|
| Argentina                                   | <a href="http://64.76.123.202/site/agregado_de_valor/biotechnology/10-DIRECTORATE/index.php">http://64.76.123.202/site/agregado_de_valor/biotechnology/10-DIRECTORATE/index.php</a> ;   |
| Chile                                       | <a href="http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology">http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology</a>   |
| Brasil                                      | <a href="https://agrobiobrasil.org.br/wp-content/uploads/2018/05/Normative-Resolution-16-of-January-15-2018.pdf">https://agrobiobrasil.org.br/wp-content/uploads/2018/05/Normative-Resolution-16-of-January-15-2018.pdf</a>   |
| Colombia                                    | <a href="http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology">http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology</a>   |
| Canada                                      | <a href="http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-underreview/eng/1300208455751/1300208520765">http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-underreview/eng/1300208455751/1300208520765</a><br><a href="http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/nf-an/guidelines-lignesdirectriceseng.php#a1">http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/nf-an/guidelines-lignesdirectriceseng.php#a1</a> ;<br><a href="http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/C.R.C.,_c._870/FullText.html">http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/C.R.C.,_c._870/FullText.html</a> |
| EEUU (USDA/ crops)                          | <a href="http://www.aphis.usda.gov/brs/fedregister/coordinated_framework.pd">http://www.aphis.usda.gov/brs/fedregister/coordinated_framework.pd</a><br><a href="http://www2.epa.gov/regulatory-information-sector/agriculture-sectors">http://www2.epa.gov/regulatory-information-sector/agriculture-sectors</a><br><a href="http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Biotechnology/ucm096095.htm">http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Biotechnology/ucm096095.htm</a>   |
| MÉXICO                                      | No están disponibles  |
| Australia (OGTR/ environmental release)     | <a href="http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/amendment+proposals-1">http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/amendment+proposals-1</a> ;<br><a href="http://health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/gene-technology-review">http://health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/gene-technology-review</a><br><a href="http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/about-index-1#act">http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/about-index-1#act</a>   |
| Nueva Zelandia (EPA/ environmental release) | <a href="http://www.biosecurity.govt.nz/regs/imports/plants/gmo1">http://www.biosecurity.govt.nz/regs/imports/plants/gmo1</a><br><a href="http://www.legislation.govt.nz/act/public/1996/0030/latest/DLM381222.html">http://www.legislation.govt.nz/act/public/1996/0030/latest/DLM381222.html</a><br><a href="http://www.epa.govt.nz/neworganisms/Pages/default.aspx">http://www.epa.govt.nz/neworganisms/Pages/default.aspx</a>   |
| Filipinas                                   | <a href="http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology">http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology</a>   |
| Japón                                       | <a href="http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology">http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology</a>   |
| Corea del Sur                               | <a href="http://www.unep.org/biosafety/files/KRNBFrep.pdf">http://www.unep.org/biosafety/files/KRNBFrep.pdf</a><br><a href="http://www.naqs.go.kr/english/business/business_5.jsp">http://www.naqs.go.kr/english/business/business_5.jsp</a>  |
| India                                       | <a href="http://agricoop.nic.in/seedpolicy.htm#6">http://agricoop.nic.in/seedpolicy.htm#6</a>   |
| China                                       | <a href="http://english.gov.cn/laws/2005-08/24/content_25837.htm">http://english.gov.cn/laws/2005-08/24/content_25837.htm</a>   |
| Sudáfrica                                   | <a href="http://www.info.gov.za/acts/1997/act15.htm">http://www.info.gov.za/acts/1997/act15.htm</a>   |
| Unión Europea (28 - GB)                     | <a href="http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology">http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology</a><br><a href="http://curia.europa.eu/juris/document/document_print.jsf?doclang=ES&amp;text=&amp;pageIndex=0&amp;part=1&amp;mode=lst&amp;docid=198532&amp;occ=first&amp;dir=&amp;cid">http://curia.europa.eu/juris/document/document_print.jsf?doclang=ES&amp;text=&amp;pageIndex=0&amp;part=1&amp;mode=lst&amp;docid=198532&amp;occ=first&amp;dir=&amp;cid</a>  |
| Suecia/ Noruega                             | <a href="http://www.teknat.umu.se/english/about-the-faculty/news/newsdetailpage/green-light-in-the-tunnel-opinion-of-the-swedish-board-of-agriculture-a-crispr-cas9-mutant-but-not-a-gmo.cid259265">http://www.teknat.umu.se/english/about-the-faculty/news/newsdetailpage/green-light-in-the-tunnel-opinion-of-the-swedish-board-of-agriculture-a-crispr-cas9-mutant-but-not-a-gmo.cid259265</a>   |