



## **Informe de la Comisión Nacional de Bioseguridad**

### **Mutagénesis aleatoria *in vitro* en cultivos celulares vegetales**

#### **Antecedentes**

Tras la sentencia de julio de 2018 del Tribunal de Justicia de las Comunidades Europeas (TJCE), en febrero de este año, el Conseil d'Etat francés solicitó al gobierno francés que reconsiderara la lista de técnicas de modificación genética y productos derivados (variedades vegetales), que se han utilizado convencionalmente y que tiene un largo historial de seguridad (<https://reut.rs/3dqehAo>). Tras este análisis de “reconsideración” realizado, el gobierno francés ha formulado una propuesta para cambiar su legislación sobre los organismos modificados genéticamente (OMG) que fue notificada a la Comisión Europea (véase el Anexo). Esta propuesta lleva a la situación de que las plantas regeneradas a partir de células cultivadas *in vitro* que han sido sometidas a la aplicación de mutágenos físicos o químicos quedan, según lo solicitado por el gobierno francés a la Comisión Europea, sujetas a las previsiones de la legislación francesa sobre OMG. La propuesta hace por tanto una diferenciación entre mutagénesis *in vivo* e *in vitro*, ya que la primera quedaba excluida de los requisitos de la legislación sobre OMG de la Unión Europea. Ambas técnicas ya se han aplicado antes de 2001 y por lo tanto la posible aprobación de la propuesta de legislación francesa sobre OMG obtendría un alcance regulatorio que es más amplio que la Directiva 2001/18/CE.

#### **Introducción: la mutagénesis para la reproducción vegetal**

Las técnicas mutagénicas en mejora vegetal empezaron con el trabajo de Stadler al final de la década de 1920 (Stadler, L.J., 1928). Desde entonces, el número de variedades liberadas al mercado usando esta técnica ha crecido de forma continua hasta alcanzar más de 3.300 variedades (Shu *et al.* 2012).

A fines de la década de 1920, los investigadores descubrieron que se pueden obtener mutaciones (cambios en el ADN) exponiendo a las plantas a agentes mutágenos físicos (rayos X y gamma, neutrones, protones, etc.) o químicos (etilmetanosulfonato, azida de sodio, etc.). Estas mutaciones inducidas través de los procedimientos tradicionales de mutagénesis física o química, ocurren al azar en el genoma y generan una enorme variabilidad que puede dar lugar a la aparición de características interesantes que son seleccionadas por el mejorador.

Históricamente, el uso de la mutagénesis en la reproducción ha involucrado pruebas genéticas avanzadas y la selección de mutantes individuales con rasgos mejorados y su incorporación a los programas de reproducción. Desde 1960, se han llevado a cabo evaluaciones de las posibilidades y limitaciones del mejoramiento por mutación en muchas especies de cultivos, tanto reproductores como reproducidos clonalmente. En 1964 se desarrollaron programas de investigación coordinados a nivel internacional por la División Conjunta FAO/OIEA de Técnicas Nucleares en la Alimentación y la Agricultura. En 2012, la base de datos de variedades mutantes de la FAO/OIEA enumeró 3.200 cultivares liberados oficialmente en más de 200 especies de plantas que habían sido



producidas por el mejoramiento por mutación. Estos incluyeron 534 líneas de arroz, 205 líneas de trigo y 71 líneas de maíz (<http://www-infocris.iaea.org> o <http://mvgs.iaea.org>), (EFSA, 2012).

Después de una disminución en la utilización de estas técnicas a finales del siglo XX, los primeros años del siglo XXI presenciaron un resurgimiento de las tecnologías de mutación debido a una comprensión rápida y mayor de la mutagénesis y las disciplinas relacionadas, lo que condujo a más aplicaciones. La comprensión de la base molecular de la mutagénesis (daño y reparación del ADN) transformó la inducción de mutaciones de eventos fortuitos en técnicas basadas en la ciencia. El uso de herramientas moleculares y genómicas para la detección y caracterización de mutantes también permitió que el mejoramiento de mutaciones abarcara y utilizara los descubrimientos e innovaciones tecnológicas más recientes en investigación de genómica de plantas y biología molecular. Por último, pero no menos importante, la mutagénesis es una herramienta importante para el fitomejoramiento como una de las técnicas más seguras para desarrollar la genética inversa en cultivos. Esta técnica permite, sin tener ninguna información previa sobre la función de la planta, desarrollar una planta con un fenotipo específico con las características óptimas para el fitomejorador.

Por lo tanto, la mutagénesis es una herramienta básica en manos de los mejoradores de plantas para el desarrollo de nuevos cultivares con tolerancia a estrés abiótico, resistencia a plagas y enfermedades y el mejoramiento de la calidad nutricional y el rendimiento agrícola (Xu *et al.*, 2012).

### **Características de las mutagénesis aleatoria *in vitro***

La mutagénesis no dirigida induce a través de los agentes mutagénicos una gran cantidad de variaciones en diferentes cromosomas, que suele ser proporcional a la dosis del agente que se empleó para causar las mutaciones. Las mutaciones que se inducen son al azar, no se sabe qué tipo de mutaciones o dónde ocurren en el genoma de la planta, pero originan nuevas variedades que pueden ser aprovechables por ofrecer caracteres nuevos interesantes (Sikora *et al.*, 2011).

Las técnicas de mutagénesis se basan en el hecho de que el daño al ADN inducido química o físicamente no siempre se repara fielmente. Aunque el uso de mutágenos químicos y físicos en la reproducción ha sido claramente exitoso, existen dos limitaciones importantes para el uso de mutagénesis física y química inducida. Primera, cuando las mutaciones introducidas son perjudiciales o están fuertemente vinculadas con otras mutaciones lesivas. En segundo lugar, aunque no son procesos completamente al azar, las técnicas de mutagénesis física y química no son específicas en el sentido de que no pueden apuntar a secuencias de ADN predeterminadas (sitios en el genoma). Una dificultad adicional puede ser la redundancia genética presente en muchas especies de plantas como resultado de la duplicación de genes y la poliploidía, de modo que muchas mutaciones no tienen un efecto detectable en la planta (Holme *et al.*, 2019).

La mutagénesis *in vitro* consiste en la inducción de mutaciones mediante el tratamiento de explantes o cultivos *in vitro* (protoplastos, células, tejidos y órganos) con un mutágeno, seguido de detección/selección y caracterización de mutantes. Las ventajas de la metodología radican en que i)



el tratamiento es más uniforme, ii) se aumenta la capacidad de regenerar plantas a partir de una o pocas células, iii) hay una mayor facilidad de segregación de quimeras cuando se forman, iv) las condiciones son muy controladas y v) se reducen los costos de los tratamientos físicos y químicos (mayor número de individuos por unidad de área) (Qaim et al 2020).

En comparación con las metodologías que implican el tratamiento de material *in vivo*, los explantes cultivados *in vitro* proporcionan una opción más amplia de selección controlada después del tratamiento mutagénico. El cribado realizado *in vitro* permite el manejo de grandes poblaciones, evitando el problema de trabajar con un bajo número de individuos, como suele ser el caso del material vegetal *in vivo*. La suspensión celular mutagenizada, las microsporas y los cultivos de protoplastos tienen el mayor potencial para la selección *in vitro* debido a su uniformidad, para lo cual el investigador puede utilizar diferentes condiciones experimentales.

Una vez que se realiza la mutagénesis y la selección, la población puede crecer, proliferar y regenerarse en individuos completos. Proporcionando condiciones de cultivo óptimas, idealmente, se puede regenerar una planta a partir de un cultivo en suspensión de células individuales o células embriónicas. Sin embargo, en ausencia de un método *in vitro* optimizado, la propagación a través de la formación de yemas adventicias en las que las yemas se desarrollan a partir de una o un número restringido de células desdiferenciadas, es una opción útil para producir plantas mutantes.

El material regenerado a partir de células o yemas *in vitro* pueden propagarse vegetativamente para una evaluación adicional en campo del carácter mutado, como es también necesario realizar con el material mutagenizado en condiciones *in vivo*.

### **Variedades registradas que se han obtenido o son derivadas de técnicas de mutagénesis**

Actualmente la base de datos FAO/IAEA Mutant Varieties Database (<https://mvd.iaea.org/>, Mutant-VD) posee más de 3.300 variedades obtenidas o derivadas mediante mutagénesis. No obstante, este número es pequeño si se tiene en cuenta que el nº aproximado de variedades obtenidas por cualquier método que hay registradas a nivel mundial es de 500.000-600.000 mil, según la base de datos de la unión internacional para la protección de nuevas variedades de plantas (UPOV). Aproximadamente el 70% de las variedades que aparecen en la Mutant-VD se han obtenido directamente por mutagénesis y el otro 30% se han obtenido por retrocruzamiento entre una variedad o línea obtenida por mutagénesis y otro cultivada ([www.iaea.org](http://www.iaea.org)). La base de datos Mutant-VD contiene la información de las variedades, y en la ficha de cada una de ellas viene el método utilizado, habiéndose obtenido la inmensa mayoría mediante mutagénesis de semillas. La mayor cantidad de cultivares en esta base de datos corresponde a arroz, cebada, trigo y soja, y frutales donde el método de mutagénesis más utilizado es el de irradiación de yemas. Desde el 2010 se han incluido unas 125 variedades en el listado, que es solo una porción del total de variedades registradas en ese periodo a nivel mundial, y entre ellas se encuentran como obtenidas a partir de mutagénesis de células en cultivo *in vitro* una serie de variedades ornamentales:



## Conclusiones

- La "mutagénesis" se excluye del ámbito de aplicación de la normativa de OMG en la Directiva de 2001 (Anexo IB) y normas anteriores. La Comisión no tiene constancia de la existencia de dictámenes de EFSA de evaluación del riesgo de organismos obtenidos mediante mutagénesis *in vitro* en base a la normativa de OMG. Si bien, se ha encontrado informes de evaluación del riesgo favorables por parte de otras Agencias, como la canadiense:
  - a. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/food-biotechnology-imidazolinone-herbicide-tolerant-canola-lines-ns738-ns1471-ns1473.html>
  - b. <https://www.inspection.gc.ca/plant-health/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd1995-03/eng/1303707055806/1303751917598>
- En el dictamen de EFSA de 2012 sobre ZFN3 y otras nucleasas dirigidas se describen las tecnologías de mutagénesis sin hacer una distinción, en cuanto a riesgos, en función de si es *in vivo* o *in vitro*.
- En comparación con la mutagénesis *in vivo*, en la mutagénesis *in vitro* el tratamiento es más uniforme, se aumenta la capacidad de regenerar plantas a partir de una o pocas células, hay una mayor facilidad de segregación de quimeras cuando se forman, las condiciones son muy controladas y se reducen los costos de los tratamientos físicos y químicos (mayor número de individuos por unidad de área).
- En ambos tipos de mutagénesis los principales riesgos sobre la salud serían problemas de toxicidad y alergenidad. Sin embargo, estas técnicas se utilizan antes del año 2001 y ha quedado científicamente probado que no suponen riesgos para la salud o el medio ambiente (Shu *et al.*, 2012).

Madrid, 25 de junio de 2020



## **Bibliografía**

- EFSA, 2012. EFSA. Panel on Genetically modified organisms (GMO); Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function. EFSA Journal 2012;10(10):2943. [31 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2943.
- FAO, 2011. Plant Mutation Breeding and Biotechnology, Q.Y. Shu, B.P. Forster, H.Nakagawa. Plant Breeding and Genetics Section. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, Austria.
- FAO/IAEA, 1995. Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. Proceedings of a Symposium, Vienna, 19-23 June 1995 jointly organized by IAEA and FAO.
- Forloni, Matteo, Alex Y. Liu, and Narendra Wajapeyee (2019) Methods for in Vitro Mutagenesis. Cold Spring Harbor Protocols, 12. pdb-top097733.
- Holme IB, Gregersen PL and Brinch-Pedersen H (2019) Induced Genetic Variation in Crop Plants by Random or Targeted Mutagenesis: Convergence and Differences. Front. Plant Sci. 10:1468. doi: 10.3389/fpls.2019.01468
- Shu, Q.Y., Forster, B.P., Nakagawa, H. and Nakagawa, H. eds., (2012). Plant mutation breeding and biotechnology. CABI.
- IAEA/FAO, 1991. Plant mutation breeding for crop improvement. Proceedings of an International Symposium on the contribution on plant mutation breeding to crop improvement. Vienna, June 1990.
- Qaim, M., 2020. Role of New Plant Breeding Technologies for Food Security and Sustainable Agricultural Development. *Applied Economic Perspectives and Policy*, 42(2), pp.129-150.
- Shu, Q., Forster, B.P., & Nakagawa, H. 2012. *Plant mutation breeding and biotechnology*. CABI.
- Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J. and Olsson, O., 2011. Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International journal of plant genomics*, 2011.
- Stadler, L.J. (1928a). Genetic effects of X-rays in maize. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 14: 69–75.
- Xu, L., Najeeb, U., Naeem, M. S., Wan, G. L., Jin, Z. L, Khan F., et al. In Vitro Mutagenesis and Genetic Improvement. Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume. Pages 151-173



## Anexo

### **Propuesta de la República de Francia sobre la modificación de su legislación sobre OMG**

**Groups concerned:** *Businesses, research institutes and other structures developing, using or placing organisms resulting from genetic modification or their products on the market, farmers.*

**Purpose:** *To amend the list of genetic modification techniques traditionally used without any noted drawbacks with regard to public health or the environment.*

**Entry into force:** *The text shall enter into force on the day after its publication.*

**Notice:** *The Decree amends the list of genetic modification techniques considered to be traditionally used without any noted drawbacks with regard to public health or the environment, to specify therein the status of random mutagenesis techniques. Genetically modified organisms obtained via the techniques on this list are not subject to the provisions of Title III of Book V of the legislative part of the French Environmental Code [Code de l'environnement], nor to its Articles L125-3 and L515-13.*

**References:** *The French Environmental Code, as amended by this Decree, may be consulted on the Légifrance website (<http://www.legifrance.gouv.fr>).*

#### **The Prime Minister,**

*On the basis of the report by the Minister for the Ecological and Inclusive Transition,*

*Having regard to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Regulation 90/220/EEC;*

*Having regard to Directive (EU) 2015/1535 of the European Parliament and of the Council of 9 September 2015 laying down a procedure for the provision of information in the field of technical regulations and of rules on Information Society services, and in particular Notification No [...];*

*Having regard to the French Environmental Code, particularly Articles L531-2 and D531-2 thereof;*

*Having regard to the opinion of the High Council for Biotechnology dated [...],*

*Having regard to the public consultation held from [...] to [...]2019, in accordance with Article L123-19-1 of the French Environmental Code,*

*Hereby decrees:*

#### **Article 1**

*Article D531-2 of the French Environmental Code is amended as follows:*

*1. In the first paragraph, after the words 'as giving rise to a genetic modification', the words 'or which have been traditionally used without any noted drawbacks with regard to public health or the environment' are inserted;*

*2. 2(a) reads as follows:*

*'a) Random mutagenesis, with the exception of in vitro random mutagenesis consisting in subjecting plant cells cultivated in vitro to chemical or physical mutagenic agents.*

#### **Article 2**

*Plant crops obtained via an in vitro random mutagenesis technique mentioned in 2(a) of Article D531-2 of the French Environmental Code, as amended by this Decree, which were sown or planted before the date of their registration on a list laid down by order of the Minister for Agriculture listing the varieties whose registration in the catalogue has been cancelled or which satisfy the conditions for such cancellation, are allowed to be brought to term.*

#### **Article 3**

*The Minister for the Ecological and Inclusive Transition, the Minister for Agriculture and Food, the Minister for Higher Education, Research and Innovation, and the Minister for Economy and Finance shall be responsible, within the scope of their respective competences, for the implementation of this Decree, which shall be published in the Official Journal of the French Republic.*