

**RESUMEN DE LA SOLICITUD:
AUTORIZACIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR PARA INVESTIGACIÓN**

A. INFORMACIÓN GENERAL

1. Nombre del solicitante Centro de Investigación de la Caña de Azúcar, CENICAÑA.	2. Nombre del contacto Freddy Fernando Garcés Obando John Jaime Riascos Arcos
3. Dirección del solicitante Campus experimental, kilómetro 7 vía Florida-Cali, Valle del Cauca	4. Dirección del contacto Campus experimental, kilómetro 7 vía Florida-Cali, Valle del Cauca
5. Nombre del producto (Identificador Único y otros nombres) Identificador OECD: No aplica Nombre Comercial: Caña de azúcar Otros Nombres: No aplica	
6. Objetivo de la solicitud Solicitud de ampliación de autorización de investigación en medio confinado para los proyectos: 1) Resistencia al virus de la hoja amarilla en caña de azúcar; 2) Transformación genética de caña de azúcar para resistencia a enfermedades bacterianas; 3) Incremento del contenido de azúcar, biomasa y tolerancia a estreses abióticos (estrés hídrico, aluminio y salinidad) en caña de azúcar; 4) Optimización de metodologías para la transformación genética en caña de azúcar (<i>Saccharum</i> spp.); 5) Transformación genética de caña de azúcar para resistencia al barrenador del tallo (<i>Diatraea</i> spp.); 6) Validación de genes asociados con respuesta a estrés hídrico en caña de azúcar utilizando <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo; y 7) Edición genómica en caña de azúcar para la validación de la tecnología CRISPR y genes candidatos asociados a estrés hídrico.	
7. Aprobaciones y usos en otros países No se han otorgado aprobaciones para estos OVM, ya que son productos que se encuentran en la fase de investigación.	
8. Algún otro uso aprobado en Colombia: Los eventos de caña de azúcar no tienen aprobación de uso en el país.	

B. INFORMACIÓN RELACIONADA CON EL ORGANISMO VIVO MODIFICADO - OVM

1. Nombre completo de los parentales

Familia: Poaceae,
 Subfamilia: Panicoideae,
 Tribu: Andropogoneae
 Género: *Saccharum*.

Especies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*

Variedades: CC 01-1940, CC 01-1228, CC 09-066, CC 93-3826, CC 14-1167, CC 11-0132, CC 15-2259 y/o CC 15-2554.

Familia: Brassicaceae
 Género: *Arabidopsis*
 Especie: *Arabidopsis thaliana*

2. Nombre completo de los donadores

Proyecto 1. Resistencia al virus de la hoja amarilla. El fragmento del gen de la cápside procede del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV). *Agrobacterium tumefaciens* como fuente del terminador NOS; *Zea mays*, del promotor de ubiquitina pUbi-1; *Escherichia coli*, de secuencias asociadas con marcadores y clonación; el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), del promotor 35S; y *Staphylococcus* spp., del gen reportero gusplus.

Proyecto 2. Resistencia a enfermedades bacterianas. *Spinacia oleracea* es la fuente del gen de defensina 1SD. *Agrobacterium tumefaciens* del terminador NOS; *Zea mays* del promotor pUbi-1; *Escherichia coli* de secuencias de marcadores y clonación; CaMV del promotor 35S y *Staphylococcus* spp. del gen reportero gusplus.

Proyecto 3. Incremento de sacarosa y biomasa y tolerancia a estreses abióticos. *Escherichia coli* como fuente del gen marcador nptII.

Proyecto 4. Optimización de metodologías de transformación genética. *Staphylococcus* spp. del gen gusplus; *Aequorea victoria* es origen de la secuencia GFP de la que deriva sfGFP; *Beta vulgaris* de secuencias relacionadas con el reportero RUBY; *Escherichia coli* de marcadores y otras secuencias; el virus del mosaico del tabaco (TMV) de secuencia líder 5'; *Oryza sativa* del promotor Act1; *Homo sapiens* de señal de poliadenilación hGH; Virus del Mosaico de la Higuera (Fig Mosaic Virus, FMV), del promotor 34S; CaMV de secuencias reguladoras; *Zea mays* del promotor pUbi-1; y *Agrobacterium tumefaciens* de secuencias NOS.

Proyecto 5. Resistencia a *Diatraea* spp. *Bacillus thuringiensis* es la fuente de los genes insecticidas Cry y Vip. *Escherichia coli* del marcador nptII; CaMV y TMV de secuencias reguladoras; *Zea mays* del promotor de ubiquitina; *Oryza sativa* del promotor Act1; *Homo sapiens* de señal de poliadenilación hGH; FMV del promotor 35S; y *Agrobacterium tumefaciens* de secuencias NOS.

Proyecto 6. Validación de genes de estrés hídrico en *Arabidopsis thaliana*. Los genes de interés proceden de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) y se introducen en *A. thaliana*, que es el

organismo receptor, no el donante de esos genes. El promotor 35S procede de CaMV; secuencias NOS de *Agrobacterium tumefaciens* y el marcador nptII de *Escherichia coli*.

Proyecto 7. Edición genómica en caña de azúcar. *Streptococcus pyogenes* como fuente de Cas9; *Zea mays*, del promotor pUbi-1; *Oryza sativa*, de las secuencias U3 que regulan el ARN guía; *Pisum sativum*, del terminador E9; CaMV, de secuencias reguladoras; y *Escherichia coli*, del marcador hptII. Las secuencias objetivo y los ARN guía diseñados para genes de caña corresponden a *Saccharum* spp.; esto no convierte a la caña en un donante externo de Cas9.

3. Descripción de la modificación genética:

Proyecto	Descripción
1. Resistencia al virus de la hoja amarilla	Se transformó caña de azúcar por biobalística con un fragmento del gen de la cápside del virus de la hoja amarilla, destinado a inducir resistencia mediante ARN de interferencia.
2. Resistencia a enfermedades bacterianas	Se introdujo por biobalística el gen de defensina 1SD (SoD2) para buscar resistencia al raquitismo de la soca y la escaldadura de la hoja.
3. Sacarosa, biomasa y estreses abióticos	Se transformaron las variedades CC 01-1940 y CC 01-1228 mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con genes B1 y B3 (biomasa), Y1 (sacarosa y rendimiento) y W1, W2 y W8 (respuesta a estrés hídrico, aluminio y sales), además del marcador <i>nptII</i> .
4. Optimización de la transformación genética	Se generan plantas de caña mediante biobalística o transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para ajustar la eficiencia de los protocolos. Las construcciones incluyen reporteros <i>gusplus</i> , <i>gusplus-sfgfp</i> y RUBY, y marcadores de selección como <i>hptII</i> y <i>nptII</i> . El propósito de estas modificaciones es detectar y comparar la transformación, no conferir resistencia a una plaga o enfermedad.
5. Resistencia a <i>Diatraea</i> spp.	Se transforma caña de azúcar con genes de <i>Bacillus thuringiensis</i> que codifican las proteínas insecticidas Cry1Ab y Vip3Aa, con el objetivo de reducir el daño causado por larvas de <i>Diatraea</i> spp.
6. Validación de genes de estrés hídrico	Se transformó <i>Arabidopsis thaliana</i> , no caña de azúcar, mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para evaluar genes candidatos procedentes de caña. Se obtuvieron líneas estables T3 para SOD-ERF10, ERF, FA y GRP, con mejoras de supervivencia bajo déficit hídrico frente al control no transformado.
7. Edición genómica en caña de azúcar	Se introdujo por biobalística el sistema CRISPR/Cas9 para editar genes de caña, incluidos <i>BU1</i> , <i>ALS</i> y <i>PDS</i> . El objetivo principal es establecer y validar la metodología de edición.

C. INFORMACION RELACIONADA CON LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1. Método usado para transformar la planta:	
Proyecto	Método
1. Resistencia al virus de la hoja amarilla	Biobalística: bombardeo de tejido de caña con las construcciones que contienen el fragmento viral de interés y los componentes utilizados para selección y detección.
2. Resistencia a enfermedades bacterianas	Biobalística: introducción del gen de defensina <i>1SD</i> en tejido de caña.
3. Sacarosa, biomasa y estreses abióticos	Biobalística y transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
4. Optimización de la transformación genética	Biobalística y transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ambos métodos son objeto de ajuste y comparación en el proyecto.
5. Resistencia a <i>Diatraea</i> spp.	Biobalística sobre callo embriogénico. También contempla transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
6. Validación de genes de estrés hídrico	Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediante inmersión floral de <i>Arabidopsis thaliana</i> , la planta modelo receptora.
7. Edición genómica en caña de azúcar	Biobalística de callo embriogénico para introducir las construcciones con el sistema CRISPR/Cas9. Este es el método de entrega; CRISPR/Cas9 es el sistema empleado para producir la edición genética.
2. Diferencias del evento y Cultivar convencional:	
Proyecto	Diferencias
1. Resistencia al virus de la hoja amarilla	Las plantas transformadas contienen el fragmento viral destinado a conferir resistencia mediante ARN de interferencia. Se identificaron eventos con posible comportamiento resistente.
2. Resistencia a enfermedades bacterianas	Las plantas transformadas expresan el gen de defensina <i>1SD</i> . En evaluaciones preliminares de invernadero, algunos eventos presentaron menor carga bacteriana.
3. Sacarosa, biomasa y estreses abióticos	Se describen plantas transformadas con rasgos asociados a mayor biomasa y respuesta al estrés hídrico. Sin embargo, en la evaluación fenotípica final informada, ningún evento mostró una diferencia significativa frente a los testigos comerciales no transformados.
4. Optimización de la transformación genética	La diferencia buscada es la presencia y expresión de marcadores y reporteros que permitan reconocer el tejido transformado: actividad de <i>gusplus</i> , fluorescencia de <i>gusplus-sfgfp</i> o coloración roja asociada con RUBY. No se propone en este proyecto una mejora agronómica de las plantas frente a variedades convencionales.
5. Resistencia a <i>Diatraea</i> spp.	Algunas líneas transformadas producen Cry1Ab y mostraron mortalidad de larvas en bioensayos de laboratorio: tres eventos alcanzaron entre 70 % y 80 %.
6. Validación de genes de estrés hídrico	La comparación corresponde a <i>Arabidopsis thaliana</i> transformada frente a <i>A. thaliana</i> no transformada. Las líneas estables con SOD-ERF10, ERF, FA y GRP mostraron mayor supervivencia bajo déficit hídrico; para SOD-ERF10 se informó hasta 4,3 veces la supervivencia y 1,8 veces la biomasa del control. Los genes asociados con exceso hídrico no tuvieron evaluación funcional concluyente.
7. Edición genómica en caña de azúcar	Se confirmaron dos eventos con edición de <i>ALS</i> y una planta albina con edición parcial y heterogénea de <i>PDS</i> , a diferencia de las secuencias sin editar utilizadas como referencia. No se detectó edición <i>knock-out</i> de <i>BU1</i> . No se evidencia una ventaja agronómica de los eventos editados frente a caña convencional.

3. Estabilidad genética y/o fenotípica del inserto:

Proyecto	Evidencia informada y límite de la conclusión
1. Resistencia al virus de la hoja amarilla	Se detectaron los genes introducidos por PCR y, de los 18 eventos sometidos a evaluación posterior, cuatro mostraron evidencia del transgén por RT-qPCR.
2. Resistencia a enfermedades bacterianas	Aunque se detectó y expresó inicialmente <i>1SD</i> , se informa alto quimerismo y ausencia de estabilidad en la integración y expresión del transgén. Se señala una posible pérdida durante la propagación, que impidió reproducir de manera confiable la característica de resistencia.
3. Sacarosa, biomasa y estreses abióticos	Las pruebas de Southern blot identificaron eventos con 1 a 10 copias del transgén y clones con integración estable detectable en diferentes ciclos. En cambio, la evaluación fenotípica final no encontró diferencias significativas frente a los testigos comerciales no transformados.
4. Optimización de la transformación genética	Se confirmó por PCR la presencia de <i>nptII</i> en plantas regeneradas y del casete RUBY en eventos transformados. El proyecto continúa evaluando la transformación estable y los patrones de integración; no se presentan resultados que establezcan la estabilidad del inserto o de la expresión del reportero a través de ciclos o generaciones.
5. Resistencia a <i>Diatraea</i> spp.	Se detectó <i>Cry1Ab</i> por PCR y se cuantificó su proteína mediante ELISA en eventos seleccionados; algunos produjeron mortalidad larval en bioensayos. Estas pruebas documentan presencia y expresión en el material evaluado.
6. Validación de genes de estrés hídrico	Se informan líneas transgénicas estables de <i>Arabidopsis thaliana</i> en generación T3 para SOD-ERF10, ERF, FA y GRP, con detección molecular y respuesta fenotípica frente al déficit hídrico. Para genes asociados con exceso hídrico solo se alcanzaron generaciones tempranas y no se demostró estabilidad funcional comparable.
7. Edición genómica en caña de azúcar	Se confirmaron dos eventos editados de <i>ALS</i> y, mediante secuenciación, una planta con edición de <i>PDS</i> parcial y heterogénea, con distintas variantes en la región objetivo.