

Para: Comité de Articulación Institucional (CAI) y Evaluación del Riesgo en Bioseguridad (ERB).

De: Grupo ad-hoc sobre caracterización e identificación molecular (GAHCIM).

Asunto: Informe GAHCIM Soja HB4 para uso comercial.

Participaron en la elaboración de este informe evaluadores de las siguientes instituciones: MGAP, INASE, LATITUD/LATU, INIA e IP-MONTEVIDEO cuyos *curriculum vitae* se encuentran disponibles en la Secretaría del Sistema Nacional de Bioseguridad.

El Grupo GAHCIM se reunió en Talleres de Trabajo convocados por la ERB, los días 5 de Octubre y 16 de noviembre de 2018 en MGAP, y el 13 y 27 de setiembre de 2019 en la Expo Prado y MGAP, respectivamente, el 2 de agosto de 2022 en LATU, y el 20 de setiembre de 2022, 25 de abril y 2 de mayo de 2023 en forma virtual.

Fecha 05/10/2018

La soja genéticamente modificada por la introducción del gen HaHB4 exhibe el fenotipo de tolerancia a diversos estreses ambientales, incluida la tolerancia a sequía, lo que permite a la planta mantener y manifestar un aumento del rendimiento en condiciones ambientales adversas.

El gen HaHB4 (*Helianthus annuus* homeobox 4), natural de girasol, codifica para el factor de transcripción (FT) HAHB4, perteneciente a la subfamilia HD-Zip I, cuya expresión está positivamente regulada por estreses hídrico y salino. En forma similar a otros FT, la expresión de este gen confiere un fenotipo complejo. En particular, la expresión de HaHB4 provoca un retraso en el ingreso a la senescencia de la planta.

En la soja HB4 también se ha introducido el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus*, pero su expresión, si bien resultó suficiente para la selección de las plantas transgénicas en la fase del desarrollo del evento, no alcanzó el nivel necesario para la expresión del fenotipo de tolerancia a herbicidas basados en glufosinato de amonio a las dosis habituales de uso*. HaHB4 se induce por etileno, una hormona con un rol preponderante en la inducción de la senescencia, proceso que ocurre de forma natural previamente a la cosecha. Por otra parte, este FT se expresa en oscuridad.

Observaciones

En la detección de los productos de amplificación superpuestos originados por el inserto (Fig B3.2.2.F2), pág. 37, no se comprende la diferencia de tamaños entre las bandas obtenidas en el control y el evento transgénico (banda 753/754; 755/756; 757/758). En ninguno de los pares de primers empleados, los productos de amplificación coinciden con el tamaño esperado. Se esperaría que fueran del mismo tamaño.

Nota: en esta figura del dossier el par 750/752 comprendería todo el inserto (4710 pb) y en la figura luce una banda de 1000 pb que claramente corresponde al par 750/751. Asumimos que es una equivocación en el rótulo de la figura.

En la Figura B3.3.F1, pág. 39 en la detección de los productos de amplificación desde las secuencias flanqueantes, luce en el parental una banda de aprox. 700-800 bp mientras que en el texto se reporta como 588 bp. Por favor, aclarar a qué se debe el tamaño teórico de 588 bp y la diferencia observada en el gel.

Fecha 16/11/2018

Presentes: MRichero, MMenoni, MDalla Rizza

Se continúa el análisis del evento. *La empresa el 26/6/2018 presenta información adicional comunicando que el evento HB4 presenta tolerancia al glufosinato de amonio en oposición a lo que se informó originalmente en el *dossier*. Comunica además que la composición y las características asociadas a la inocuidad y equivalencia nutricional de los productos derivados permanecen sin modificar, no existiendo información que modifique la caracterización molecular de la soja presentada sometida anteriormente.

La característica de tolerancia se considera efectiva cuando se manifiesta ante dosis del herbicida 4X y preferentemente 8X de la dosis, corroborándose en experimentos de campo en Argentina y EUA. A dosis 8X del herbicida se observó una pequeña reducción del rendimiento en las plantas modificadas.

Se analizó la información presentada el 1/11/2018 sobre ensayos a campo en Argentina. Los resultados presentados muestran que no hay penalidad en rendimiento en dosis de glufosinato hasta 4X.

Fecha 13/09/2019

Presentes: ACorrea, MDalla Rizza

Se analiza la respuesta de la empresa Rizobacter presentada en el día de hoy ante solicitud GAHCIM realizada el día 2 de Setiembre 2019.

Se confirmó observaciones realizadas por GAHCIM referido a diferencia de rótulo en la figura B3.2.2.F1 que explica diferencias.

Las respuestas referidas a las diferencias en los pesos de las bandas obtenidas en las figuras B3.2.2.F2 y B3.3.F1, las mismas están enfocadas a problemas electroforéticos como ser voltaje utilizado, tiempo de corrida y cantidad de ADN sembrada en el gel. Sugerimos realizar las corridas con los cambios necesarios para determinar si dichas diferencias se mantienen.

Se aguarda respuesta de la empresa.

Fecha 27/09/2019

Presentes: A. P. Mulet, M. Richero.

Se analiza la respuesta de la empresa Rizobacter presentada en el día 26 de setiembre ante solicitud GAHCIM realizada el día 20 de Setiembre 2019. Se recibió el informe de la secuenciación del evento por lo que se conoce complementemente la caracterización del inserto. Entendemos que la información que aportan las figuras B3.2.2.F2 y B3.3.F1, por un lado es redundante (porque en ambos métodos se indica la inserción de una única copia), pero por otro lado, no apoya los resultados de la secuenciación, dado que indica la presencia de un mayor número de pares de bases en el evento que en el plásmido control.

Se solicita a la empresa repetir los geles o retirar las figuras B3.2.2.F2 y B3.3.F1 del dossier.

Se aguarda la respuesta de la empresa.

Fecha 02/10/2019

A partir de la comunicación recibida el 01/10/2019 por mail de parte de la empresa del retiro de las figuras B3.2.2.F2 y B3.3.F1 del dossier se culmina el análisis del evento.

No se encontraron elementos de peligro para la Soja HB4-PAT para uso comercial.

Fecha 2/08/2022

El Grupo GAHCIM convocado por la ERB se reunió en forma presencial el día 2 de agosto de 2022. Ante la consulta del grupo GAHSHA sobre los estudios bioinformáticos para determinar el potencial tóxico o alergénico de la proteína HAHB4, se revisó la información ya analizada en 2019.

La alergenicidad potencial de la proteína HAHB4 fue examinada utilizando la base de datos de acceso público desarrollada por el FARRP (AllergenOnline, www.allergenonline.org). La versión número 14 de esta base de datos, revisada por última vez en enero de 2014, contiene 1706 alérgenos.

También se analizó la posible existencia de homología estructural de la proteína HAHB4 con alérgenos. Para ello, se utilizó la base de datos SDAP (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>), que en su última actualización (Febrero de 2013) contiene 1312 secuencias de alérgenos e isoalérgenos, 92 estructuras determinadas experimentalmente y 458 modelos estructurales de alérgenos y 29 epítopes reconocidos por inmunoglobulinas de tipo E.

Para analizar la posible toxicidad de la proteína HAHB4 se utilizó la base de datos de toxinas animales (ATDB) que reúne 9114 compuestos tóxicos (<http://protchem.hunnu.edu.cn/toxin/>).

Si bien el análisis bioinformático realizado en su momento no detectó posibles similitudes de secuencias (homologías, alineamientos o identidades) de la proteína HAHB4 con toxinas o alérgenos, se debe solicitar un análisis con las bases de datos actualizadas.

Fecha 20/09/2022

Se analiza la información actualizada de los ensayos bioinformáticos (versión número 21 de la base de datos, actualizada en Febrero 14, 2021).

La búsqueda bioinformática de nuevos ORF creados en una región que abarca el inserto más 200 pb de ADN genómico en las uniones 5' y 3' dentro de los seis marcos de lectura permitió la identificación de 74 péptidos putativos que tienen hasta 187 aminoácidos de longitud. Solo siete de estos péptidos tienen 100 o más aminoácidos. Dos de ellos son los nuevos productos de expresión, HAHB4 y PAT. Un péptido putativo no muestra homología con ningún péptido conocido. Respecto a los otros cuatro, se encontraron similitudes con proteínas putativas, vectores de clonación o proteínas del virus del mosaico del coliflor.

La homología de los péptidos putativos con cualquier proteína conocida se examinó usando el algoritmo BLASTp y la base de datos de proteínas NCBI.

Se realizaron análisis bioinformáticos para evaluar la posible toxicidad o alergenicidad de todos los péptidos putativos.

No se encontró homología de secuencia superior al 35 % con ningún alérgeno dentro de una ventana móvil de 80 aminoácidos contiguos para cada péptido putativo en la base de datos FARRP. De manera similar, no se encontró identidad cuando analizaron 8 aminoácidos contiguos y se comparó con epítopes alergénicos en la base de datos utilizando la herramienta de búsqueda en línea FASTA.

Sobre la base de datos de toxinas y antitoxinas del TADB2 y las bases de datos del NCBI, se encontraron algunas homologías con el péptido 45, que corresponde a PAT, con el

dominio GNAT de una nueva familia de proteínas pertenecientes a los sistemas toxina-antitoxina tipo II. Se sabe que este tipo de dominio está presente en proteínas de muchas especies. Por ejemplo, las N-acetiltransferasas relacionadas con GNAT catalizan la transferencia de un resto acilo de la acil coenzima A (acil-CoA) a un grupo diverso de sustratos y están ampliamente distribuidos en todos los dominios de la vida.

Además, la seguridad de la proteína PAT ha sido establecida por precedentes científicos y regulatorios. Se expresa en cultivos transgénicos comerciales aprobados en muchos países, incorporados a cultivos tolerantes al glufosinato desde el inicio del desarrollo de los transgénicos.

Ninguna de las secuencias evaluadas mostró una homología relevante con alérgenos, toxinas o antinutrientes conocidos.

Revisado 25 de abril y 2 de mayo de 2023

En resumen, luego de analizada la información solicitada, el grupo GAHCIM no encontró elementos de riesgo para uso comercial del evento en soja HB4.
