

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 Algodón GHB614xT304-40xGHB119xCOT102
Fecha: 9 de agosto de 2019

Participaron en la elaboración del informe los técnicos de las siguientes instituciones: MGAP, INASE, LATITUD/LATU, INIA e Inst. Pasteur.

El Grupo GAHCIM se reunió en Talleres de Trabajo convocados por la ERB, los días 12 de julio, 26 de Julio y 9 de agosto de 2019.

Solicitud para producción de semilla y comercial 2018.

El algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102, denominado comercialmente GlyTol LibertyLink es tolerante a la aplicación de los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato y con protección frente al daño causado por ciertas especies de insectos lepidópteros.

El evento de algodón GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102 expresa las proteínas:

- PAT/bar, confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. El gen bar está presente en las construcciones pTDL008 (evento T304-40) y pTEM12 (evento GHB119), en la primera está regulado por el promotor constitutivo 35S, mientras que en la segunda está regulado por Pcsvmv XYZ.
- 2mEPSPS, confiere tolerancia al herbicida glifosato. El gen 2mepsps está regulado por el promotor constitutivo Ph4a748At.
- Cry1Ab, confiere protección frente al ataque de ciertas especies de insectos lepidópteros. El gen cry1Ab está regulado por el promotor constitutivo Ps7s7.
- Cry2Ae, confiere protección frente al ataque de ciertas especies de insectos lepidópteros. El gen cry2Ae está regulado por el promotor constitutivo 35S.
- Vip3Aa19, confiere protección frente al ataque de ciertas especies de insectos lepidópteros. El gen vip3A(a) está regulado por el promotor constitutivo Act2.
- APH4 (higromicina fosfotransferasa), utilizado como marcador de selección en el proceso de obtención de uno de los eventos parentales. El gen aph4 está regulado por el promotor constitutivo Ubq3int.

Protección a Lepidópteros: *Heliothis virescens*, *Helicoverpa* spp., *Pectinophora gossypiella*, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera* spp.

Las proteínas 2mEPSPS y PAT/bar combinadas otorgan a las plantas tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio respectivamente. El acumulado de algodón GLTP se encuentra desregulado para su comercialización en más de un país. Entre las observaciones realizadas se encuentra la estabilidad del fenotipo a lo largo de múltiples cruzamientos y solo son elegidos para avanzar en el proceso, aquellos que presentan estabilidad fenotípica.

Análisis de información molecular del evento

El evento T 304-40 se insertó una copia parcial flanqueado por una copia incompleta e invertida del cassette Cry 1ab y una copia del terminador 3' me1. La secuencia completa está ubicada en el cromosoma A 02 (Artim, 2003 M433510-01-1; Peeters, 2014 y 2016). En las secuencias flanqueantes existe una delección de 32 bp del genoma del algodón sin afectar la expresión. A

partir del estudio de nuevos ORF se encontraron dos ORF putativos los cuales no son relevantes por tener poca coincidencia con el RBS consenso de algodón (De Pestel, 2008 M31238401-01-1).

El evento GHB119 se integró una única copia en el cromosoma D 13. Se identificaron tres nuevos ORF quiméricos. Los nucleótidos circundantes de los tres ORF también fueron sometidos a un análisis de homología, comparándolo con elementos regulatorios importantes para la transcripción y la traducción. Como no están presentes todos los elementos reguladores en la secuencia de ADN en el extremo 5' o 3' de los nuevos ORFs, la probabilidad de una expresión de proteínas debido a la inserción de ADN que contiene el cry2Ae y la construcción del gen bar, es altamente improbable (Verhaeghe y De Pestel, 2008).

En el evento COT 102 tiene una inserción única, faltando 86 bp que fueron eliminadas del genoma del algodón. Este evento presenta un truncamiento de secuencias del borde izquierdo y derecho durante la transformación sin impacto en la expresión.

En el evento GHB 614, se integró una copia única ubicado en el cromosoma D 09. Mediante análisis bioinformático se verificó que no se interrumpen genes endógenos de algodón y se detectaron 2 posibles ORF en la posición 5' del inserto. Es altamente improbable que haya expresión de estos nuevos elementos dado que faltan elementos esenciales del promotor para la transcripción (ej: caja TATA) (Vandermariere y De Pestel, 2006).

La estabilidad de los insertos en el apilado fue verificada mediante Southern (Artim, 2003; Peeters, 2014 y 2016).

Se estudiaron las secuencias flanqueantes para todos los eventos (existen pequeñas deleciones de nucleótidos) y en modo general coincide con el genoma original del algodón.

Información sobre expresión constitutiva de *aph4*

El informe EFSA (2004) clasifica la APH4 (higromicina fosfotransferasa) dentro del grupo I de marcadores de selección en plantas (los pertenecientes al grupo II están desaconsejados para uso en eventos de liberación comercial).

Según EFSA (2004): 'hph gene: La higromicina no se utiliza en la terapia humana y no hay resistencia cruzada con otros antibióticos utilizados para la terapia humana. El antibiótico fue desarrollado originalmente para uso veterinario y todavía se añade en algunas partes del mundo a la alimentación animal como antihelmíntico. La higromicina no se utiliza clínicamente en humanos, pero puede utilizarse en medicina veterinaria para el tratamiento de cerdos y aves de corral (EE.UU., no autorizada en el Reino Unido).'

Según la Oficina del regulador de tecnología genética (AU), 'Sin embargo, como la mayoría de las proteínas, el NPTII y la HPH se inactivan rápidamente en el jugo gástrico de mamíferos simulado (Fuchs *et al.*, 1993; FSANZ, 2004; Lu *et al.*, 2007). Por lo tanto, en una digestión normal, sería de esperar que cualquier proteína de resistencia a los antibióticos se degradara antes de que pudiera inactivar el antibiótico correspondiente, lo que anularía cualquier posible interferencia con la administración oral del antibiótico (EFSA, 2009).'

Según EFSA (2004, 2009), concluyeron que el uso de los genes *nptII* y *aph4* como marcadores de selección en plantas GM no plantea un riesgo a la salud humana o animal, así como tampoco al ambiente.

Conclusión. El grupo GAHCIM ha revisado la información presentada en el dossier verificando estabilidad, número de inserciones en el apilado, segregación de los eventos simples, proteínas putativas expresadas de nuevos ORF. Se verificó que la presencia del gen de resistencia a la higromicina no involucraría un riesgo para salud humana, animal o al ambiente. La información suministrada es clara y suficiente. El grupo no observa elementos de preocupación para este evento.

Referencias

Risk Assessment Reference: Marker genes in GM plants (2017). Office of the Gene Technology Regulator. Australian Government. Department of Health.

Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. The EFSA Journal (2004) 48, 1-18.

Statement of EFSA on the consolidated presentation of opinions on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. The EFSA Journal (2009) 1108, 1-8.