

**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 Trigo HB4-PAT.**  
**Fecha: 29 de abril de 2019.**

Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las siguientes instituciones del CAI: INASE, INIA, MGAP, LATITUD, IP-Montevideo e IIBCE. La información y CV de los evaluadores se encuentra disponible en la Oficina de Bioseguridad.

El Grupo GAHCIM se reunió en Talleres de Trabajo convocados por la ERB, los días 15 y 22 de marzo, 12 y 26 de abril de 2019. Se analizó la información proporcionada por la empresa y se solicitó información adicional.

### **Trigo IND-ØØ412-7**

El gen HaHB4 (*Helianthus annuus* homeobox 4), natural de girasol, codifica para el factor de transcripción HAHB4, perteneciente a la subfamilia HD-Zip I, cuya expresión está positivamente regulada por estreses hídrico y salino, y por la presencia de las hormonas ácido abscísico (ABA), etileno y ácido jasmónico (Dezar y col., 2005b; Manavella y col., 2006 y 2008c; Cabello y col., 2007). En girasol, HaHB4 se expresa naturalmente en niveles muy bajos, pero estos niveles suben abruptamente cuando las plantas se enfrentan a condiciones de estrés hídrico, salino, oscuridad o frente al ataque de insectos, constituyendo uno de los pilares de la planta en su defensa contra factores ambientales (Gago y col., 2002; Dezar y col., 2005a; Manavella y col., 2006 y 2008a, b y c). El gen bar, proveniente de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica para la enzima fosfinotricina acetil-transferasa (PAT), que aporta a la planta el fenotipo de tolerancia a herbicidas basados en glufosinato de amonio, permitiendo el uso de estos herbicidas para la selección de las plantas transformadas y el control de malezas en cultivo (Thompson y col., 1987).

La expresión de los nuevos productos está regulada por el promotor, el extremo 5' no traducido y el primer intrón del gen de ubiquitina (Ubi-1) de maíz (Christensen y col., 1992). Por otro lado, la terminación de la transcripción está regulada por Tnos, la secuencia 3' no traducida del gen de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (Depicker y col., 1982), ampliamente utilizada en la modificación genética de cultivos.

En el proceso de transformación para generar el trigo INDØØ412-7 se utilizaron dos vectores, uno conteniendo la secuencia codificante del gen HaHB4 de girasol (pIND4-HB4) y otro con la secuencia codificante del gen bar de *Streptomyces hygroscopicus* (pIND4-Bar). En el dossier se presentan los mapas de los 2 vectores utilizados.

Se identificaron 2 inserciones en el cromosoma 2D, una denominada "inserto largo" de 47.611 pb y otra de 20.418 pb denominada como "inserto corto". Además de los genes de interés, se incorporaron "secuencias acompañantes", según se reporta en el dossier. Estas secuencias son: el origen de replicación del plásmido pBR322; CDS bla (secuencia codificante de la  $\beta$ -lactamasa de *E. coli*) (marcador de selección que confiere resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos como ampicilina) y "otros componentes" como prGbl1-1 (promotor de globulina 7S de trigo); CDS gus (secuencia que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli*) y T35S CaMV (terminador de la transcripción del virus mosaico de coliflor). Para confirmar estas inserciones realizan análisis de Southern blot y NGS del cromosoma 2D, aislado mediante *Chromosome sorting*.

Se describe que las inserciones de los genes *bla* y *gus* no son activas ya que en el caso de *bla*, su CDS está bajo la regulación de un promotor procariota, no funcional en plantas. Para *gus*, tanto la CDS como los elementos reguladores que la acompañan no están completos. Se verificó la ausencia de transcritos de *bla* mediante PCR reversa, utilizando primers adecuados. En el caso de HaHB4 y *bar*, el estudio se realizó con Real Time PCR y sondas Taqman, mientras que en el caso de *gus* se analizó por PCR a tiempo final y por técnicas de histoquímica para ver la ausencia de actividad enzimática. El análisis de expresión de las proteínas fue realizado en tejidos de hojas. Dado que el promotor utilizado es ubicuo sería también deseable analizar la expresión en otros tejidos.

A partir de los seis marcos de lectura posibles y todos los codones de iniciación y terminación encontrados, se generaron 19 péptidos putativos para el inserto corto (Figura B3.9.F1) y 48 para el inserto largo (Figura B3.9.F2). El resultado detallado de este análisis se presenta en las Tablas 4.7.2.T1 y T2 (Reporte RT04PP). La secuencia aminoacídica de estos péptidos putativos fue sometida al análisis de alergenicidad y toxicidad que los productos de expresión esperados (descrito en la sección B4.3) y ninguno de ellos mostró similitud con alérgenos ni toxinas conocidos.

Para estudiar la estabilidad de los insertos a través de las generaciones, se analizaron plantas de las generaciones T5, T6 y T7 para todos los elementos presentes en la construcción (HaHB4, *bar*, *bla* y *gus*) y las secuencias quiméricas de los puntos de unión de los insertos largo y corto con el genoma del trigo (JPL y JPS). Se analizaron por Real Time PCR las secuencias *bar* y el gen endógeno de actina de trigo usando sondas tipo Taqman. Los demás elementos se analizaron por PCR tiempo final. En las tres generaciones se evidenció la presencia de HaHB4, *bar*, *bla*, JPLa y b, y JPS a y b. Con esto concluyen que la transformación genética es estable.

Tras la evaluación del evento de trigo IND-00412-7 HB4 se destaca que además de la inserción de los genes del factor de transcripción HAHB4 y de la enzima PAT, generadoras del fenotipo buscado, otras secuencias acompañantes forman parte del evento de inserción, correspondiendo a un alto porcentaje del total de nucleótidos nuevos incorporados al genoma de la planta. Dentro de estas secuencias se incluyen secuencias que forman parte del vector proveniente de los constructos que se utilizaron en la transformación, así como también secuencias que no formaban parte del objetivo de los experimentos realizados, como ser la secuencia que codifica para el gen *gus*. Con respecto a esto último, la explicación informada es que se puede deber a una contaminación, se expresa que "La presencia de las secuencias parciales del gen *gus* y sus elementos regulatorios merece una aclaración..., solo podemos conjeturar que provienen de un error experimental o contaminación". En este sentido, el análisis de expresión del gen *gus*, no logró detección de la presencia de la proteína GUS. Por otro lado, y para el caso del gen *bla*, que sí formaba parte del constructo de transformación, el mismo se insertó en 12 copias completas y 7 copias incompletas, en 2 sitios del cromosoma 2D del genoma de la planta, mencionado anteriormente como el inserto corto y el inserto largo. El gen *bla*, se encuentra bajo regulación de un promotor procariota, por lo que no se espera transcripción de estos genes en la planta. Esto fue confirmado por estudios de PCR en muestras de hojas, no pudiéndose detectar la presencia de tales transcritos.

A pesar del bajo riesgo que pueda presentar la presencia de los genes *gus* y *bla*, esto hace preguntarnos ¿qué ocurriría si para el caso del gen *bla* (que confiere resistencia a antibióticos del tipo ampicilina), por ejemplo, el mismo pueda activarse y por ende esta proteína llegara a

consumo animal –en caso menos problemático el consumidor final- y más aún a un consumidor bajo tratamiento de antibióticos  $\beta$  –lactámicos? La probabilidad de ocurrencia basada en la existencia de elementos móviles en las plantas es muy baja y casi improbable, pero en caso de existir, su consecuencia podría ser grave, en particular para uso forrajero del evento, que no implica un procesamiento posterior del material vegetal. La probabilidad de ocurrencia de elementos móviles que activen alguna de las copias del gen bla presentes es muy baja y hacen improbable su expresión. No obstante, observamos que el gen bla no está presente naturalmente en plantas y su mera presencia es objeto de análisis. El gen bla es necesario para la construcción del inserto, pero su presencia en el evento no hace a la característica de tolerancia a sequía. De este modo, su presencia no es necesaria a los fines de la característica, pero introduce una característica (no funcional) que amerita su evaluación.

Existen numerosos estudios enfocados en el riesgo de la presencia de genes bla en lo que refiere a transferencia horizontal. En este sentido no se han encontrado riesgos perceptibles de la transferencia horizontal de genes bla. Por otro lado, la presencia de genes de resistencia a antibióticos fue evaluada previamente por la agencia reguladora europea EFSA. Para ello, se agruparon los diferentes marcadores de resistencia a antibióticos en 3 grupos: I, II y III, donde antibióticos del tipo ampicilina entrarían dentro del grupo II. En este sentido y a pesar de que en dicho informe se describe la ausencia de resultados científicos que demuestren un riesgo cuantificable en lo que a transferencia horizontal refiere, concluyen el restringir el cultivo de OGM conteniendo resistencia a antibióticos pertenecientes al grupo II únicamente para cultivos de experimentación contenida, no siendo el caso, por ejemplo, para los marcadores del grupo I, donde se pueden habilitar tanto para la experimentación como su comercialización (EFSA 2004). Además, existe tecnología disponible para eliminar las secuencias acompañantes.

En resumen, el grupo GAHCIM evaluó el trigo HB4 y concluye que existe un riesgo asociado a la liberación de este evento en el ambiente. Señalamos que desde el punto de vista molecular las “secuencias acompañantes” que menciona la empresa agregan incertidumbre innecesaria para la asignación del riesgo del evento. En este sentido, se enfatiza la posición de la autoridad alimentaria reguladora europea en relación a la presencia del gen bla en OGM, limitando el cultivo únicamente para experimentación contenida, no debiendo estar presente el gen bla para su empleo en cultivos comerciales.

EFSA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. (Question N° EFSA-Q-2003-109).

---