

SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN DOCUMENTO DE DECISIÓN

Soja genéticamente modificada IND-ØØ41Ø-5 (OECD), que confiere tolerancia a sequía, presentado por el Instituto de Agrobiotecnología Rosario S.A.

Sobre la base del análisis de la información presentada por el solicitante y del conocimiento científico disponible, los suscriptos, miembros de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) y de la Dirección de Biotecnología recomiendan dar por completada la Segunda Fase de Evaluación de la soja genéticamente modificada IND-ØØ41Ø-5, concluyendo que los riesgos derivados de la liberación de este organismo vegetal genéticamente modificado (OVGM) en el agroecosistema, en cultivo a gran escala, no son significativamente diferentes de los inherentes al cultivo de soja no GM.

La soja GM IND-ØØ41Ø-5 ha sido ensayada a campo en Argentina 2008 hasta 2014 y para tal fin fueron solicitados y evaluados por la CONABIA once (11) permisos para experimentación y/o liberación confinada al medio agropecuario que han cumplido con la normativa vigente para los OVGM, y han sido autorizados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP).

El presente Documento de Decisión se aplica a la soja GM IND-ØØ41Ø-5 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de este material con cualquier soja no GM obtenidos en forma convencional.

I. ORGANISMO VEGETAL GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OVGM)

1. Nombres común y científico: Soja (*Glycine max L Merr*)

2. Denominación del evento: IND-ØØ41Ø-5

3. Modificaciones introducidas: Tolerancia a sequía conferida por el gen *HaHB4*.

3.1. Método de transformación:

El evento IND-ØØ41Ø-5 ha sido obtenido por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2. Secuencias introducidas en el evento IND-ØØ41Ø-5:

3.2.1. Secuencia: *HaHB4*

La secuencia del gen *HaHB4* (*Helianthus annuus homeobox 4*) natural de girasol, codifica para el factor de transcripción HAHB4 perteneciente a la subfamilia HD-Zip I, involucrado en la respuesta de la planta a estrés hídrico y salino.

3.2.2. Secuencia: *bar*

El gen *bar* aislado de *Streptomyces hygroscopicus*, codifica para la proteína fosfotricina-acetil transferasa (PAT) la cual aporta tolerancia a glufosinato de amonio. Sin embargo, la misma fue empleada en condiciones *in vitro* como marcador para la selección de plantas transformadas durante el desarrollo y no será utilizada su característica fenotípica a campo.

3.2.3. Otros elementos:

La expresión del gen *HaHB4* se encuentra bajo la regulación de un fragmento de su promotor natural *LPF* (*Long Promoter Fragment*), el cual es inducido por estreses abióticos, principalmente sequía, pero no se puede descartar inducción por otros estreses relacionados, tales como salinidad, viento y calor.

La terminación de la transcripción del gen *HaHB4* está regulada por el elemento *Tnos*, derivado de la secuencia 3' del gen *nos* que codifica para la enzima nopalina sintasa proveniente del plásmido Ti aportado por *A. tumefaciens*.

La expresión del gen *bar* es controlado por una doble copia del promotor (*pr2x35S*) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), la secuencia viral 5' líder proveniente del virus del grabado del tabaco (TEV) que actúa como activador de la traducción y, por la secuencia 3' de los genes de proteínas vegetativas de reserva de soja (*Tvsp*) cuya función es regular la terminación de la transcripción.

3.3. Número de copias, integridad y/o rearrreglos dentro del inserto.

Los genes y sus secuencias regulatorias, así como los elementos adicionales detallados más arriba, se encuentran formando parte de un único inserto, el cual se comporta como un locus único.

El análisis molecular de la inserción en el genoma confirmó que el inserto se encuentra en una sola copia. Su integridad se verificó mediante Secuenciación de Nueva Generación (*Next-Generation Sequencing*, NGS) y el Análisis de Secuencias

de Unión (*Junction Sequence Analysis*, JSA), así como también mediante técnicas clásicas de secuenciación de Sanger y Southern blot.

Por otro lado, el alineamiento de las secuencias del inserto con el plásmido pIND2-HB4 utilizado en la transformación confirma que la organización de los elementos genéticos conservó la misma disposición durante el proceso de transformación.

Los extremos del inserto corresponden a las secuencias remanentes del borde derecho (RB del inglés Right Border) e izquierdo (LB del inglés Left Border) del plásmido Ti como es de esperar para una transformación mediada por *A. tumefaciens*. El análisis de NGS reveló que luego de la integración del ADN-T en el genoma de la soja IND-ØØ41Ø-5, el RB sufrió una delección de modo que sólo se insertaron tres bases de dicha secuencia en el presente evento.

Por último, el análisis de las secuencias correspondientes al esqueleto del plásmido pIND2-HB4 demostró que no se introdujo en el genoma de la planta ningún otro elemento del vector que estuviera ubicado por fuera de la región del ADN-T. La comprobación de ausencia de secuencias no deseadas del vector fue realizada mediante PCR con primers diseñados para amplificar segmentos que cubren la totalidad de su esqueleto.

3.4. Regiones flanqueantes

La inserción del ADN-T se produjo en el cromosoma 9 del genoma de la soja. La secuenciación del inserto y sus regiones flanqueantes indicó que no existe interrupción de genes ni elementos regulatorios en el sitio de integración. A su vez, los resultados obtenidos indicaron que la inserción del ADN-T produjo una delección de 142 pb en el genoma, cerca del RB del inserto. Esta delección se encuentra en una región intergénica, sin función aparente, ubicada 179 pb río abajo de la región 3'UTR del gen *glyma09g26270* correspondiente a un miembro no caracterizado de la familia de proteínas F-Box de soja.

Los estudios bioinformáticos, considerando una región que comprende el inserto más 200 nucleótidos del genoma de soja a cada lado del mismo, muestran que la inserción no generó nuevos marcos de lectura abiertos. Sin embargo, analizando los seis marcos de lectura posibles en la totalidad del fragmento indicado, se detectaron ocho sitios de iniciación/terminación en las regiones del genoma vegetal que se incluyeron en este análisis: cuatro en el flanco izquierdo y cuatro en el derecho. Sólo

dos de los hipotéticos productos de transcripción que podrían generarse a partir de estos sitios podrían dar lugar a péptidos novedosos ya que comprenden el genoma vegetal y secuencias del inserto. Sin embargo, ninguno de los péptidos putativos mostró homología mayor al 35% con alérgenos conocidos y tampoco hubo similitud relevante con toxinas que sugieran riesgos asociados a la traducción de estos marcos y que deban ser considerados. (FARRP, 2012: AllergenOnLine, www.allergenonline.org y ATDB; base de datos de toxinas animales, <http://protchem.hunnu.edu.cn/toxin/>, He y col., 2008).

Asimismo, se analizó la estructura primaria de los péptidos hipotéticos que se podrían generar a partir de las nuevas secuencias nucleotídicas. La extensión de la región genómica analizada comprendió todos los nucleótidos incluidos en el inserto.

A partir de los seis marcos de lectura posibles y todos los codones de iniciación y terminación ubicados dentro de la región indicada, se generaron 66 péptidos putativos de 8 a 177 pb. Si bien todos estos péptidos fueron sometidos al análisis informático, solo seis péptidos resultaron tener 100 o más aminoácidos.

Haciendo una comparación de secuencias con el algoritmo BLASTP en la base de datos del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), se comprobó que 2 de los péptidos identificados corresponden a los productos de expresión esperados: HAHB4 y PAT. Un péptido mostró homología con una polimerasa de un virus de arroz y 2 péptidos con una proteína del virus mosaico de coliflor, esperable considerando que provienen del promotor de 35S de este virus. El último péptido analizado no mostró homología significativa con ningún péptido de la base de datos del NCBI.

La posible alergenicidad y toxicidad de estos péptidos fue analizada con distintas herramientas bio-informáticas mencionadas anteriormente. Ninguno de los péptidos putativos resultó poseer una homología $\geq 35\%$ (en tramos de 80 aminoácidos) con los alérgenos registrados en esa base de datos, ni identidades con epítopes alergénicos en las secuencias sucesivas de 8 aminoácidos. A la vez que el alineamiento de la secuencia aminoacídica de cada uno de los péptidos putativos con la de las toxinas de la base de datos utilizando el algoritmo BLASTP, no surgió ninguna homología relevante (con E score $< 1 \times 10^{-5}$).

En conclusión, de producirse la traducción de los péptidos putativos que aparecen analizando todos los posibles marcos de lectura generados a partir de la inserción en el evento IND-ØØ41Ø-5, ninguno resultaría potencialmente alergénico ni tóxico.

4. Detección del evento

La presencia de este evento puede ser determinada experimentalmente de manera específica mediante PCR utilizando oligos específicos para el evento analizando muestras de semilla, grano y forraje.

5. Mecanismo de acción de HAHB4

El fenotipo de tolerancia que exhibe la soja IND-ØØ41Ø-5 se debe a la participación del factor de transcripción HAHB4 en las vías de transducción de señales involucradas en la respuesta a estrés hídrico y salino. Se sabe que HAHB4 interactúa directamente con al menos tres fitohormonas: ácido abscísico, etileno y ácido jasmónico, y en esta interacción se basa gran parte de su mecanismo de acción. Además, interactúa con otros metabolitos involucrados en procesos tales como la fotosíntesis (clorofila) y la síntesis de osmoprotectores (poliaminas y glicin betaínas).

La expresión del gen *HaHB4* está positivamente regulada por los estreses ambientales ya mencionados, y en forma similar a otros factores de transcripción, la expresión de este gen confiere un fenotipo complejo.

El etileno induce la expresión de *HaHB4* y fenómenos relacionados tales como el proceso de senescencia. Sin embargo, estudios a nivel molecular y fisiológico comprobaron que la expresión de *HaHB4* disminuye la sensibilidad de las plantas al etileno y podría, en ciertas situaciones, afectar su síntesis. Un fenómeno que corrobora esto, es el marcado retraso en la entrada en senescencia que se observa en las plantas GM que expresan HAHB4. Dado los conocimientos sobre el modo de acción del etileno se postula que las plantas GM permanecen fotosintéticamente activas por más tiempo, permitiendo que continúe la síntesis de osmoprotectores y evitando un cierre estomático temprano.

El ácido abscísico, por su parte, provoca una clara inducción de *HaHB4* a nivel transcripcional, actuando sobre la región promotora del gen *HaHB4*. Hasta el presente, no se analizó la acción de HAHB4 sobre la síntesis o percepción de esta hormona, pero tampoco existen indicios directos de que esto pueda ocurrir. Sin embargo, cabe aclarar que fenómenos

directamente relacionados con el incremento en la síntesis de ácido abscísico, tales como sequía y salinidad, también provocan la inducción a nivel transcripcional del gen *HaHB4*.

Por otra parte, el ácido jasmónico cumple un papel significativo en las respuestas a estrés que involucren daño en la membrana plasmática de las células vegetales, participando así en la ruta de transducción de señales involucradas en mecanismos de defensa contra insectos o en respuestas a daño mecánico (ver punto 6: Potencial para producir impactos en el agroecosistema).

En particular, en la soja IND-ØØ41Ø-5, la expresión de *HaHB4* produce un retraso en el ingreso a la senescencia de la planta. Este fenotipo es provocado principalmente por una disminución de la sensibilidad al etileno.

Como conclusión general, puede decirse que la expresión de *HaHB4* en el evento objeto de la presente solicitud, es capaz de generar el fenotipo de tolerancia a la sequía, sin desencadenar en la planta procesos ajenos a sus mecanismos fisiológicos normales. Mediante la regulación de la respuesta al etileno, una serie de vías de señalización permiten a la planta sobrellevar la falta de agua en espera de la cesación del estrés, sin entrar en senescencia, quedando así en condiciones adecuadas para continuar su crecimiento al mejorar las condiciones.

II. EVALUACIÓN DE RIESGO

1. Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Comparada con la soja convencional, la soja IND-ØØ41Ø-5 no tiene mayor capacidad de sobrevivir sin asistencia humana y/o de adquirir características de maleza. La presencia del gen cuya expresión determina el fenotipo de tolerancia a sequía confiere una ventaja selectiva a la soja IND-ØØ41Ø-5 cuando se la expone a esta condición de estrés ambiental, pero ello no es suficiente para que la planta adquiriera características de maleza.

2. Potencial para la transferencia horizontal o intercambio de genes del OVGМ con otros organismos

2.1. La biología reproductiva de la soja IND-ØØ41Ø-5 no es diferente a la de la soja que no ha sido modificada genéticamente; además no existen en el país especies cultivables ni silvestres sexualmente compatibles con la soja.

2.2. De la literatura científica disponible hasta el momento no surge la existencia de fenómenos de transferencia horizontal de genes desde la soja hacia microorganismos,

vectores virales o insectos. Por lo tanto, se considera que no existen razones para suponer que esta característica haya cambiado en la soja IND-ØØ41Ø-5.

2.3. Las características de la soja IND-ØØ41Ø-5, al igual que cualquier otra soja no GM, determinan que es muy poco probable que, como consecuencia de su consumo, puedan transferirse genes desde alimentos que contengan ácidos nucleicos derivados de esta soja, hacia microorganismos presentes en el tracto digestivo. Entre las razones para realizar esta afirmación pueden mencionarse: la acción degradadora de las enzimas digestivas sobre los ácidos nucleicos ingeridos con los alimentos y la ausencia, en los insertos, de elementos de conjugación, transposición u otras formas de movilización que favorezcan la transferencia de genes desde los materiales involucrados hacia microorganismos.

3. Productos de la expresión de las secuencias introducidas

Durante la campaña 2012-2013 se llevaron a cabo ensayos a campo para un estudio de expresión HAHB4 y PAT en 6 sitios distribuidos en 5 localidades de Argentina, las cuales representan regiones con diversas condiciones ambientales.

3.1. Proteína HAHB4:

La proteína HAHB4 se expresa en concentraciones muy bajas, es por ello que se utilizó la técnica de cromatografía líquida seguida de espectrometría de masa dirigida para su detección. La puesta a punto se realizó utilizando HAHB4 recombinante producida en *Escherichia coli*. Se determinó que el límite de detección del método (LD) es de 0,3 µg de proteína por gramo de tejido seco. Los resultados presentados para muestras de grano y hoja tomadas en estadios R3/R4 de los ensayos a campo para los sitios estudiados, se encontraron por debajo del límite de detección.

Para confirmar la presencia de la proteína HAHB4 en el evento IND-ØØ41Ø-5, se llevó a cabo un ensayo en cámara de crecimiento, sometiendo a las plantas GM a condiciones extremas de estrés abiótico con el propósito de producir sobreexpresión de HAHB4. Por otro lado, se adaptó la metodología a un equipamiento con mayor sensibilidad (detector de triple cuadrupolo, TSQ). De esta manera se logró mejorar la sensibilidad y alcanzar un LD de 0,003 µg HAHB4/g de hoja. Luego de un prolongado tratamiento con ácido abscísico, cloruro de sodio o manitol (inductores de la expresión de la proteína HAHB4), seguido de un período de incubación en oscuridad se obtuvieron los siguientes valores de HAHB4 en muestras de hoja y raíz en estadios V2/V3:

Tabla 1: Detección de HAHB4

Tratamiento	Horas de Tratamiento	Condiciones de luz en el momento de la toma de muestra	Apariencia de la planta	Detección de HAHB4
Acido Abscísico (15 mM)	4 hr	Oscuridad	No marchita	no detectable
Acido Abscísico (15 mM)	16 hr	Oscuridad	Levemente marchita	detectada en hoja y raíz a 0,004 y 0,002 $\mu\text{g/g PS}^1$
NaCl (200 mM)	16 hr	Oscuridad	No marchita	detectada en hoja y raíz a 0,003 y 0,002 $\mu\text{g/g PS}$
Acido Abscísico (15 mM)	67 hr	Luz de día	Seca y marrón excepto cotiledones	no detectable
Manitol (100 mM)	67 hr	Luz de día	Hojas marchitas con bordes marrones	no detectable en hoja; detectada en raíz a 0,005 $\mu\text{g/g PS}$
Manitol (100 mM)	72 hr	Oscuridad por 4,5 hrs, luego de 67 hrs de tratamiento	Hojas marchitas con bordes marrones	detectada en hoja at 0,004 $\mu\text{g/g PS}$; raíz no analizada

¹: PS: peso seco

Fuente: INDEAR S.A.

Dado que el valor más alto obtenido (0,005 $\mu\text{g HAHB4/g}$ de peso seco) se encuentra por encima del LD, se le puede asignar un valor numérico a la detección. Sin embargo, el error asociado es tan grande que el resultado obtenido no tiene el grado de precisión que se considera aceptable. Por lo tanto, se declara que la proteína HAHB4 es detectable pero no cuantificable.

Estos resultados se condicen con la característica de los factores de transcripción, como es el caso de HAHB4, los cuales se expresan en concentraciones extremadamente bajas.

3.2. Proteína PAT:

La concentración de PAT fue determinada mediante la técnica de ELISA en muestras de forraje (estadio R3/R4) y grano.

Los valores máximos obtenidos para el evento IND-ØØ41Ø-5 fueron de 71,17 µg de PAT por gramo de semilla y 11,14 µg de PAT por gramo de forraje (expresados en base a peso fresco). Estos valores están dentro del rango reportado para otros eventos transgénicos ya desregulados (0,005 a 900 µg /g de peso fresco), por tanto no representa un riesgo respecto a su seguridad ambiental (CERA, 2011).

Tabla 2: Niveles de expresión de PAT en forraje y grano en soja IND-ØØ41Ø-5 y Williams 82 (parental)

Sitio	IND- ØØ41Ø-5 (µg/g PF ± EE)		Williams 82	
	Forraje	Grano	Forraje	Grano
A	7.49 ± 1.39	69.05 ± 1.07	0	0
D2	9.51 ± 0.56	34.49 ± 1.55	0	0
G1	6.72 ± 1.00	30.33 ± 1.20	0	0
Q1	5.44 ± 0.74	65.57 ± 1.54	0	0
Q2	7.46 ± 1.61	68.70 ± 1.35	0	0
W1	7.74 ± 0.65	23.00 ± 2.83	0	0

PF = peso fresco, EE = error estandar.

Sitios: A= Monte Buey, Córdoba; D2= Corral de Bustos, Córdoba, segunda fecha de siembra; G1= Carmen de Areco, Buenos Aires, primera fecha de siembra; Q1= Hughes, Santa Fe, primera fecha de siembra; Q2= Hughes, Santa Fe, segunda fecha de siembra; W1= Aranguren, Entre Rios, primera fecha de siembra.

Fuente: INDEAR S.A.

4. Estabilidad fenotípica y genotípica

Los estudios de segregación del evento mostraron que la heredabilidad y estabilidad del mismo sigue un patrón mendeliano simple, comportándose como un locus cromosómico único. Se verificó la integridad del inserto experimentalmente a lo largo de 6 generaciones,

mediante la utilización de la metodología denominada Multiplex PCR y la técnica de Southern Blot. De esta manera se corroboró que la estructura de la región integrada en el evento IND-ØØ41Ø-5 se conservó a través de las generaciones analizadas y es idéntica a la que tenía en el plásmido utilizado en la transformación. Asimismo, se verificó que no han aparecido fragmentos del inserto en otras partes del genoma en las generaciones estudiadas.

5. Patogenicidad para otros organismos

5.1. La soja es reconocida como una planta no patógena para otros organismos, y esta característica no se encuentra alterada en la soja GM comprendida en este documento.

5.2. Si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en la soja IND-ØØ41Ø-5 provienen de fitopatógenos, tales como la secuencia promotora (*pr2x35S*), la secuencia viral 5' líder (TEV), el terminador *Tnos* y las secuencias de los bordes derecho e izquierdo originarios de *A. tumefaciens*, no se encuentran presentes en el evento secuencias que confieran las correspondientes características patogénicas de los organismos de los que provienen, careciendo por lo tanto este evento de riesgos de patogenicidad producidos por dichos elementos.

6. Potencial para producir impactos en el agroecosistema

En la evaluación agronómica, realizada mediante estudios a campo, se compararon las características agrofenotípicas entre las plantas de soja portadoras del evento IND-ØØ41Ø-5 y la soja convencional Williams 82. Las características evaluadas fueron: días a emergencia, stand inicial de plantas por metro lineal, vigor de plántulas, altura de plántula, días a floración, altura final de plantas, días a madurez, dehiscencia de vainas, vuelco de plantas, stand final de plantas por metro lineal, humedad del grano, peso de 1000 granos y rendimiento. Se demostró que la soja objeto de la presente solicitud, en forma comparativa con la isolínea de soja convencional, tiene un comportamiento agronómico que no se ha modificado más allá de las características intencionalmente introducidas.

Por otro lado, la introducción del gen *HaHB4* en el genoma de la soja IND-ØØ41Ø-5 no genera cambios en la interacción simbiótica con *Bradyrhizobium japonicum* cuando se la compara con el control no GM.

Asimismo, el evento IND-ØØ41Ø-5 no es capaz de efectuar interacciones que afecten la diversidad y la abundancia de artrópodos de los distintos grupos funcionales que puedan estar presentes en el agroecosistema receptor, incluyendo artrópodos benéficos.

En forma consistente con el fenotipo, la actividad del factor de transcripción HAHB4 en la soja GM, no se tradujo en una mayor resistencia a la herbivoría. Esto estaría relacionado directamente con la característica inducible del promotor *LPF*, responsable de regular la expresión de HAHB4.

7. Potencial tóxico o alergénico

Los resultados del ensayo de termoestabilidad realizados a 60, 75 y 90°C, sugieren que la proteína HAHB4 es estable a las temperaturas ensayadas.

Sin embargo, la caracterización de la proteína HAHB4 expresada en la soja IND-ØØ41Ø-5 y las comparaciones de la secuencia de aminoácidos de ésta con las secuencias de proteínas tóxicas o alergénicas conocidas, no muestran niveles de identidad que permitan indicar posibles efectos tóxicos o alergénicos.

Asimismo, estudios de digestibilidad de la proteína HAHB4 producidas en *E. coli*, mostraron que se digieren rápidamente en fluidos gástricos simulados.

Estos resultados tomados en conjunto conforman evidencia consistente para inferir que es altamente improbable que la proteína HAHB4 tenga características alergénicas o tóxicas.

El análisis de la secuencia de la proteína PAT expresada en este evento indicó que es equivalente a la proteína PAT presente en numerosos eventos GM que ya cuentan con aprobación comercial, y cuyos análisis bioinformáticos no encontraron homologías entre la secuencia de dicha proteína con alérgenos o toxinas en la base de datos utilizadas.

8. Composición centesimal del OVG

Se verificó la equivalencia composicional entre el cultivo GM y su contraparte no GM siguiendo las recomendaciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 2012; por sus siglas en inglés).

Se determinaron así, los niveles de 53 componentes (nutrientes, micronutrientes, vitaminas, minerales y anti-nutrientes) a partir de muestras de grano y forraje (R3/R5), provenientes del evento en evaluación y del comparador (parental), obtenidas de ensayos a campo realizados en seis sitios distribuidos en 5 localidades de Argentina, las cuales presentaron naturalmente diferentes niveles de estrés ambiental (alto, medio y bajo).

Además, con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo de soja, se incluyeron 5 variedades comerciales de referencia.

El estudio composicional presentado para el evento evidencia que, si bien se encontraron algunas diferencias significativas, todos los valores obtenidos estuvieron dentro del rango de la literatura científica o bien, acompañaron la tendencia de los resultados para un sitio específico; por lo tanto, las diferencias observadas no fueron consideradas biológicamente relevantes.

Por otra parte, lo anterior se considera indicativo de la ausencia de efectos no esperados producto de la transformación genética.