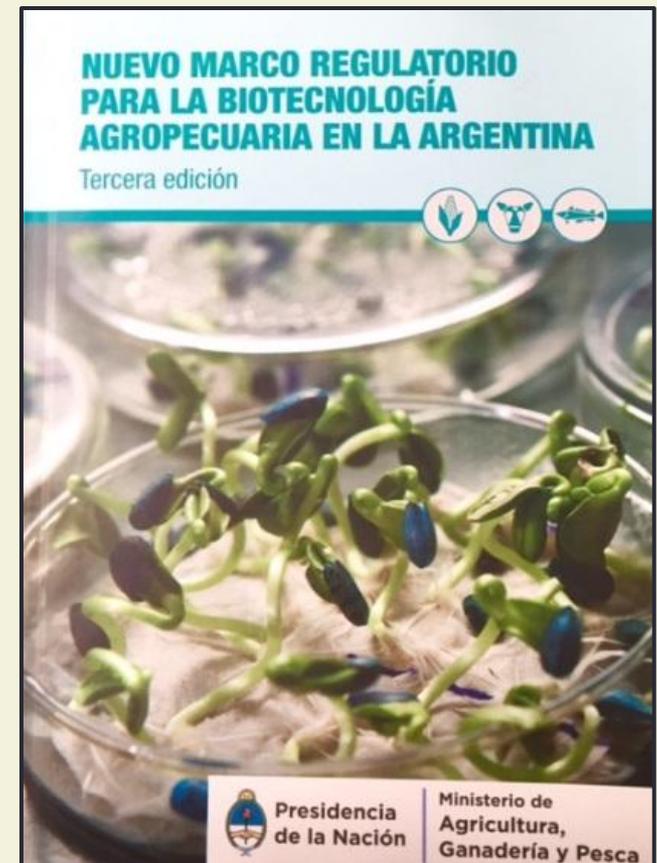


MARCO REGULATORIO PARA LA BIOTECNOLOGÍA EN ARGENTINA

Lic. Agustina Whelan

Marco Regulatorio – Perfil Argentino

- Producción agropecuaria fuerte y bien establecida
- Primer país en América del Sur en regular actividades con OGMs (desde 1991)
- Es un sistema que se caracteriza por tener base científica y ser flexible



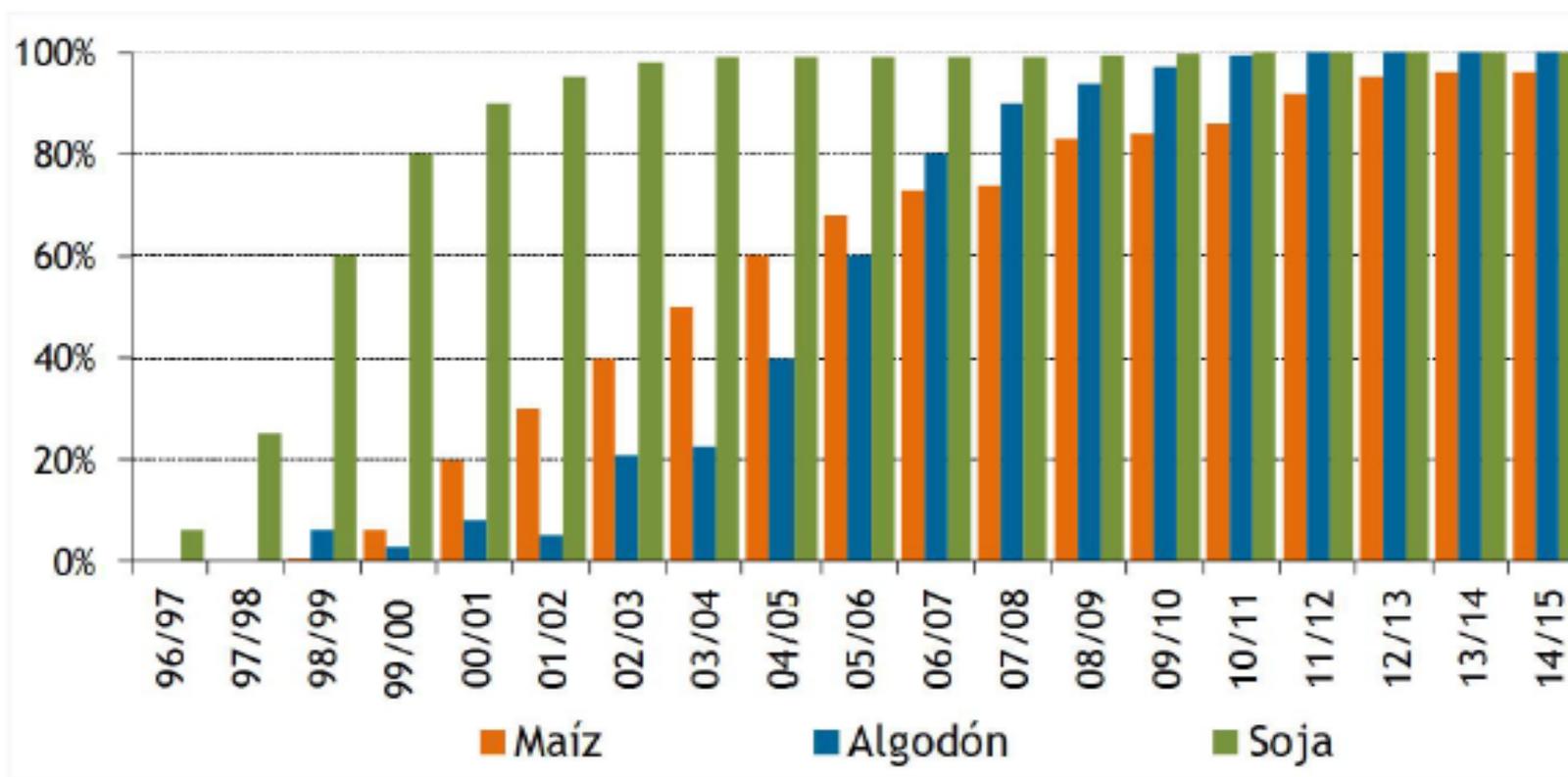
Marco Regulatorio – Perfil Argentino

- Posición internacional de liderazgo (3er lugar)
- 24,3 millones de hectáreas sembradas con cultivos GM
- **1996**: primera aprobación comercial del un cultivo GM (soja tolerante a glifosato)
- **2005**: Primera experimentación a campo con un animal GM **cual?**



Marco regulatorio – Evolución histórica de superficie sembrada cultivada con GM

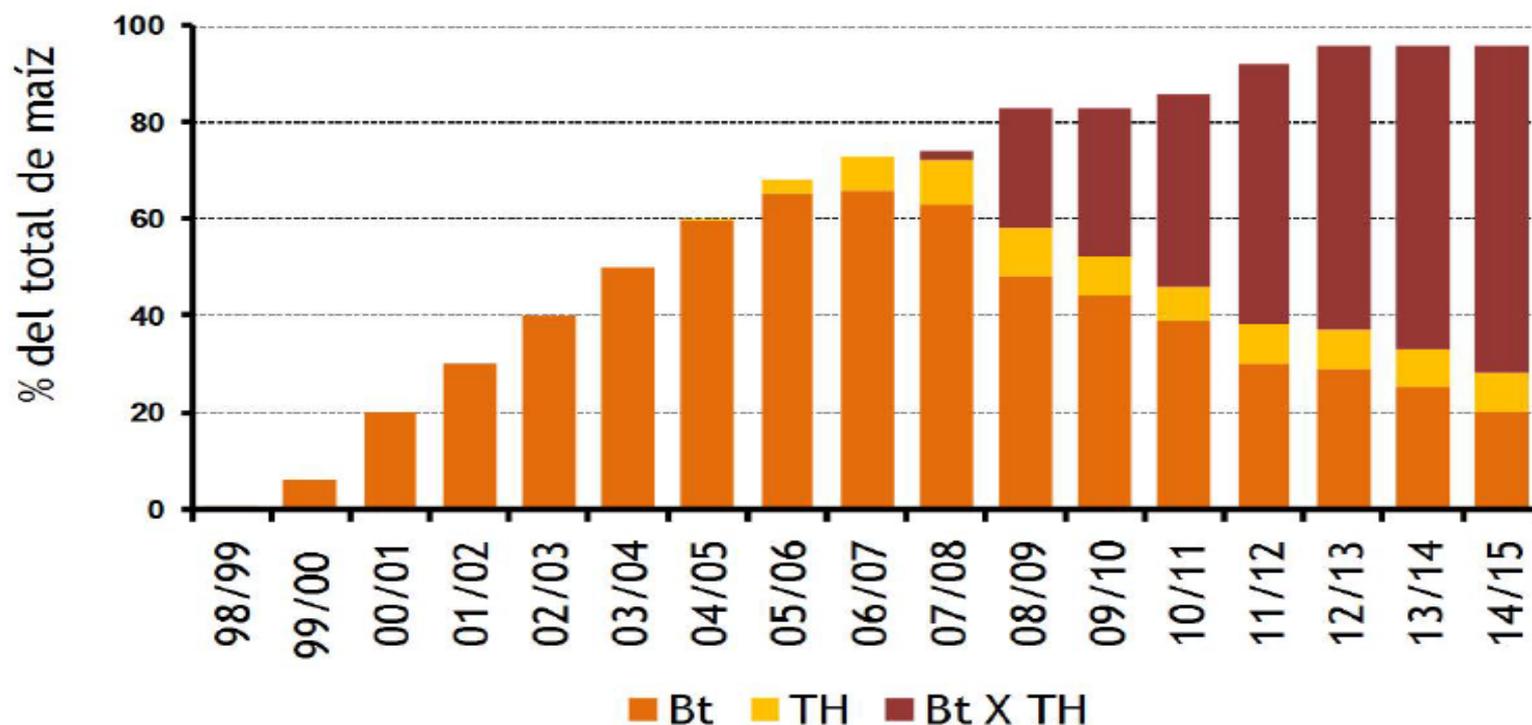
Argentina: evolución de la superficie cultivada con OGM (como % del total de cada cultivo)



Fuente: ArgenBio

Marco regulatorio – Argentina: evolución de la superficie de maíz Bt, TH y Bt xTH

Argentina: evolución de la superficie de maíz Bt, TH y Bt X TH

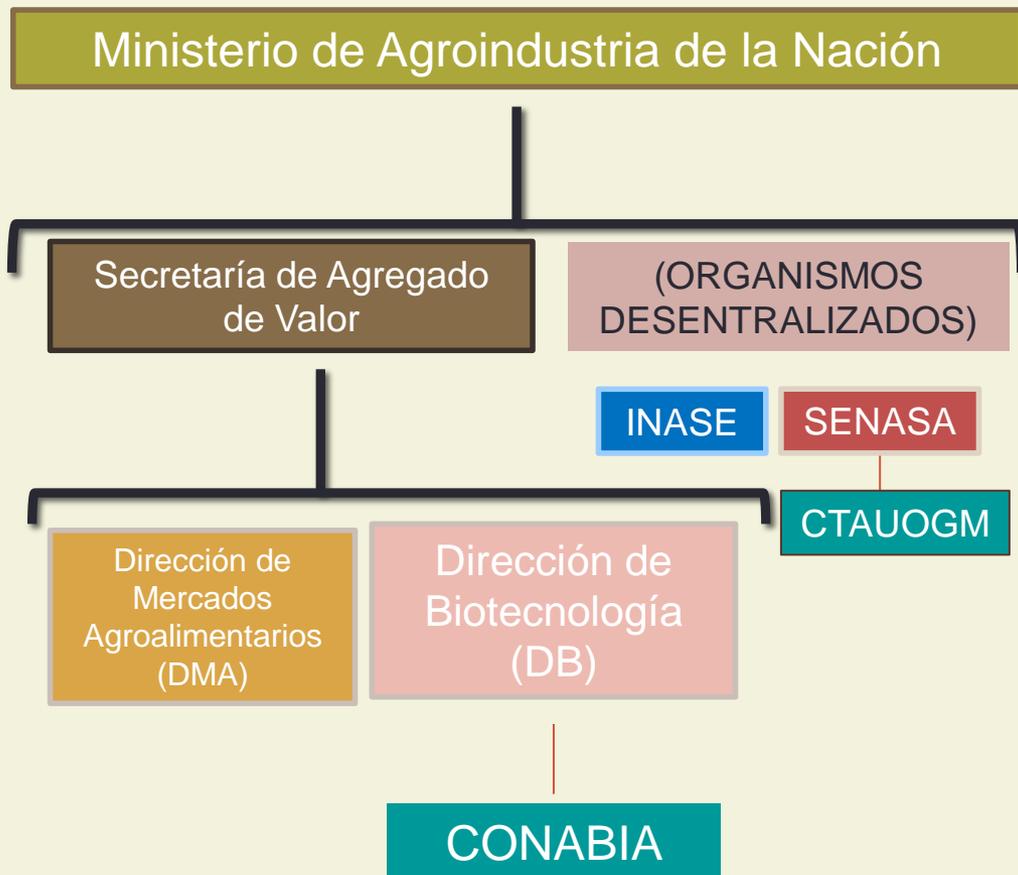


Marco Regulatorio – Definición

- La resolución **N°763/11** del Ministerio de Agroindustria de la Nación es la resolución marco que establece una serie de lineamientos para regular las actividades con vegetales, animales y microorganismos.



Organismos involucrados



• **CONABIA:** Comisión Nacional Asesora en Biotecnología Agropecuaria (**Agroecosistema**)

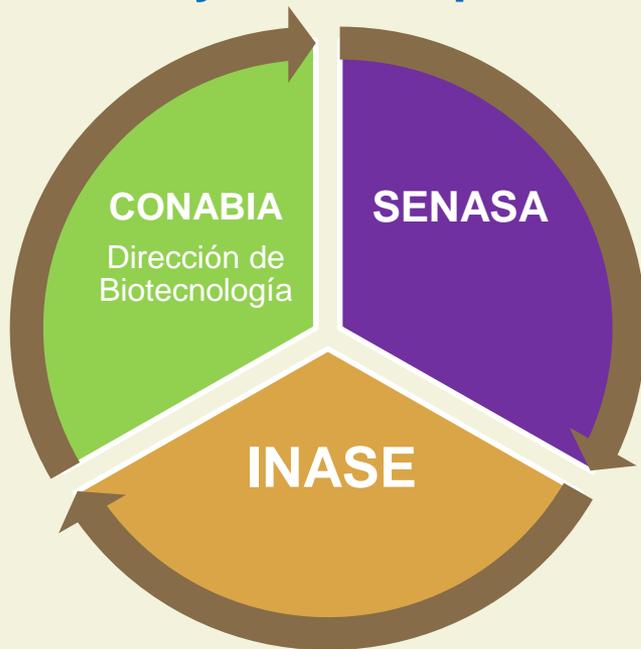
• **SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (**Inocuidad Alimentaria**)

• **CTAUOGM:** Comité Técnico Asesor para el Uso de OGM

• **INASE:** Instituto Nacional de Semillas

Organismos involucrados - Permisos

Ensayos a campo



Liberación Comercial

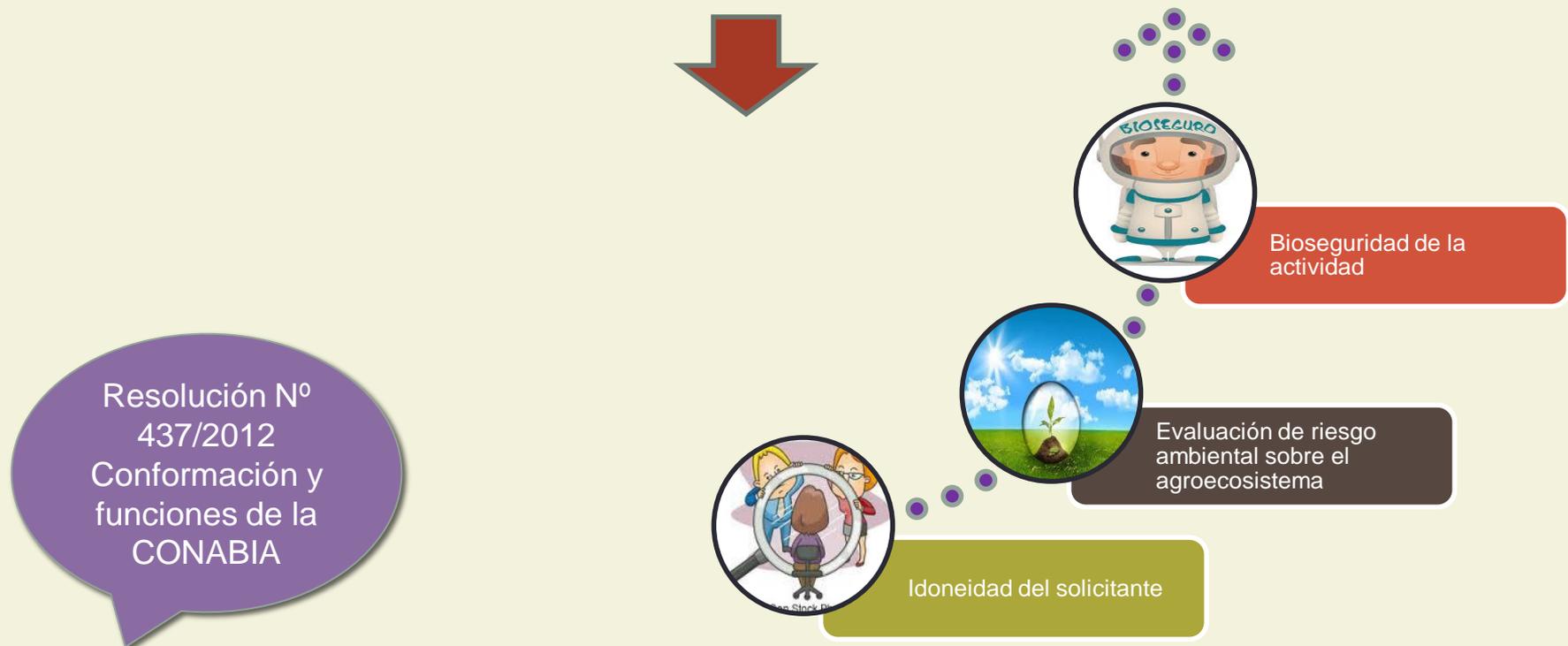


Proceso de Aprobación Comercial

- » Aprobación comercial: concedida por el Secretario de Agregado de Valor.
- » Sigue un enfoque de caso por caso con base científica
- » La evaluación de riesgo se centra en el medio ambiente, alimentación y los impactos en la producción y comercialización del OVGGM.
- Está impulsado por 3 comisiones independientes (DB/CONABIA/Inase, SENASA/CTAUOGM y DMA)

Dirección de Biotecnología y CONABIA

- ✓ Personas físicas o jurídicas deben tramitar un permiso ante la Secretaria de Agregado de Valor.
- ✓ La Dirección de Biotecnología junto a la **CONABIA** evalúan una serie de requisitos:



Dirección de Biotecnología y CONABIA – Permisos para OVG M



Evalúa las autorizaciones para experimentación y/o liberación al medio

FASE I

- Obtención o ingreso del material OVG M al país
- Liberación al agroecosistema (guarda, siembra y cosecha)
- Disposición final
- Monitoreo posterior en el sitio de liberación entre otros



Determinar los efectos del OVG M sobre el agroecosistema para su aprobación comercial

FASE II

- Caracterización Molecular del OVG M
- Características de los nuevos productos expresados
- Caracterización Agronómica
- Impacto del OVG M sobre el agroecosistema

Resoluciones - Organismos Vegetales Genéticamente Modificados (OVGM)

Resolución 701/11: complementaria a la Resolución 763/11. Posee las guías generales aplicables a las actividades que involucran Plantas Genéticamente Modificadas que NO cuentan con aprobación comercial

Fase I

(Permiso de ensayos a campo de manera confinada)

- **Anexo II**, solicitud de autorización para la liberación experimental de OVGM regulados

Fase II

(Análisis de riesgo ambiental para la liberación comercial)

- **Anexo III**, Solicitud de evaluación de segunda fase para OVGM

Resoluciones - Organismos Vegetales Genéticamente Modificados (OVGM)

Resoluciones



17/2013

- Producción de semilla y/o biomasa GM que contenga materiales regulados en la república Argentina

241/2012

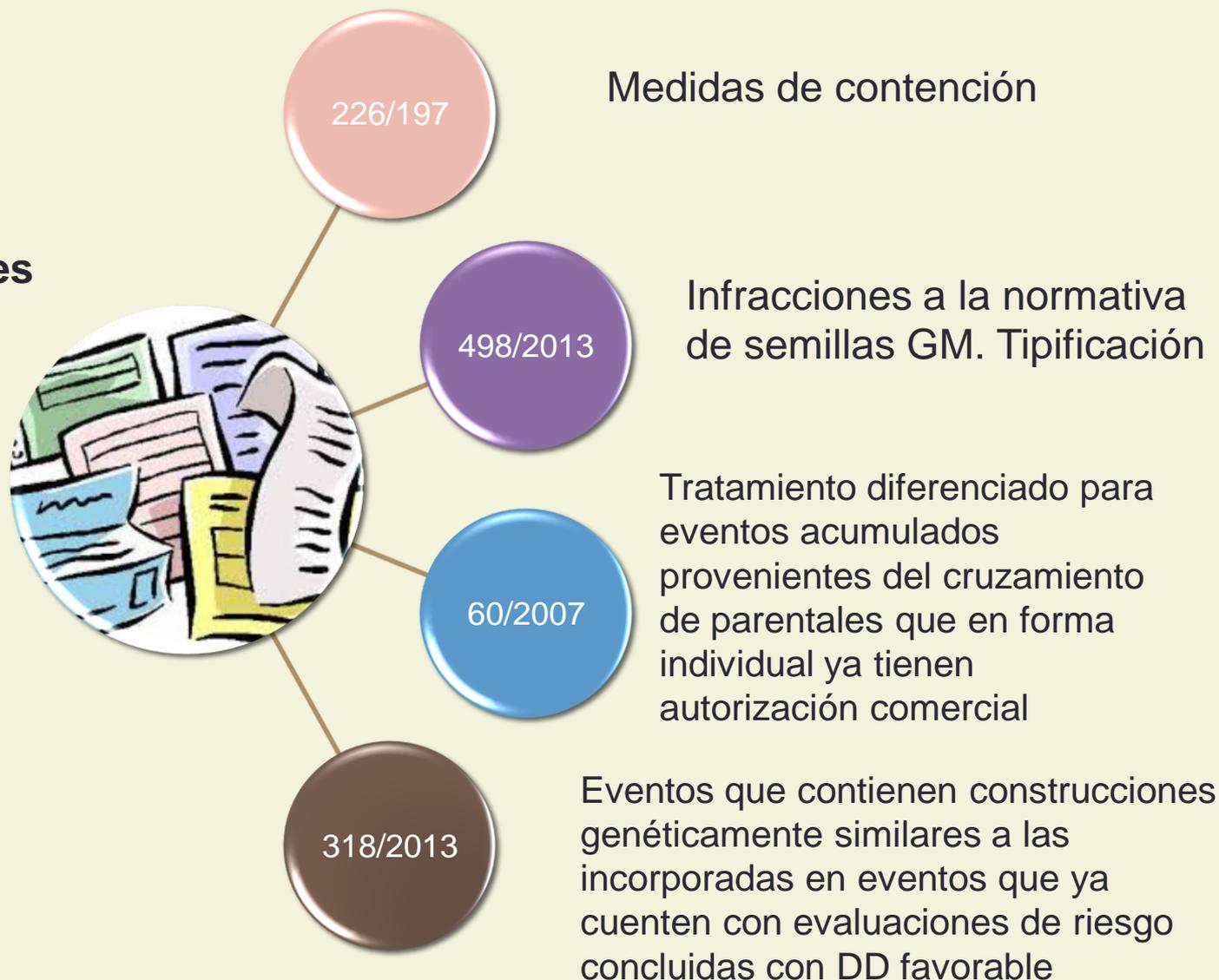
- Autorización de las actividades que se llevan a cabo en invernáculos de Bioseguridad con OVGM

173/2015

- Nuevas Técnicas de mejoramiento vegetal

Resoluciones - Organismos Vegetales Genéticamente Modificados (OVGM)

Resoluciones



Resoluciones - Microorganismos y animales Genéticamente Modificados

Animales



Resolución N° 57/2003

- Permiso para proyectos experimentales y/o liberación al medio de AGM.

Resolución N° 177/2013

- Importación de AGM de uso agropecuario

Microorganismos



Resolución N° 656/1992

- Permiso para experimentación y/o liberación al medio de MGM y/o sus productos para aplicación en animales



New Plant Breeding Techniques /implicancias regulatorias

New Breeding Techniques

- Técnicas utilizadas para el mejoramiento vegetal
- Alternativa a los métodos de mejora convencional y a la ingeniería genética
- Importante herramienta que permite soluciones innovadoras a los nuevos desafíos de la agricultura
- Permiten generar mutaciones específicas en el genoma
- Modificar rasgos sin realizar cambios en la secuencia del genoma

New Breeding Techniques

Clasificación



Técnicas de mutagénesis dirigida



Técnicas que emplean transgénesis como paso intermedio para obtener plantas que no contienen genes exógenos



Técnicas de transformación de plantas con secuencias de ADN procedentes de especies compatibles



Técnicas de injerto en las cuales la parte injertada no contiene ninguna nueva secuencia de ADN.



Técnicas de transformación de plantas con ADN exógeno

New Breeding Techniques

Definiciones



- ❖ **Organismo Genéticamente Modificado:** Organismo que posee una *combinación de material genético* obtenida a través de la aplicación de biotecnología moderna.

New Breeding Techniques

Criteria



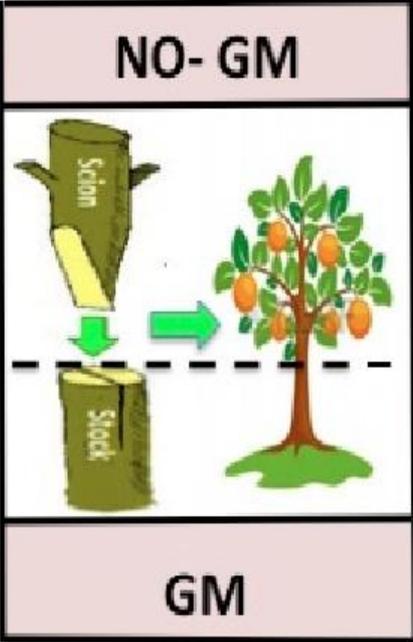
- Para que una modificación genética sea considerada una nueva combinación de material genético, se analizará si se ha producido una inserción en el genoma en forma estable y conjunta de UNO (1) o más genes o secuencias de ADN que forman parte de una construcción genética definida.

New Breeding Techniques

Técnica	Conclusión preliminar
Cisgenesis	<p data-bbox="993 394 1881 572">Hay una nueva combinación de material genético dentro del genoma de la planta</p>  <p data-bbox="993 839 1881 1018">El producto final sería considerado OGM de acuerdo a la resolución vigente.</p>
Intragenesis	
Inmersión floral	
SDN*-3	
Biología Sintética	

SDN* : (Nucleasas Sitio Dirigidas): Set de Técnicas que pueden ser utilizadas para introducir un cambio en el genoma de la planta. Por Ejemplo, TALEN, Zinc Finger, Meganucleasas CRISPR/Cas . (*MariaLusserand Howard V. Davies*)

New Breeding Techniques

Técnica	Conclusión preliminar
<p data-bbox="85 329 272 379">Grafting</p> <p data-bbox="85 444 475 551">Ejemplo: árbol de Naranja</p> <div data-bbox="85 701 498 1343">  <p>The diagram illustrates the grafting process. On the left, a 'Scion' (a piece of a tree branch) is shown being inserted into a 'Stock' (the root system of another tree). A dashed horizontal line separates the scion from the stock. A green arrow points from the scion to the stock, and another green arrow points from the stock to a final tree on the right. The final tree is labeled 'GM' (Genetically Modified) at the bottom. The top of the diagram is labeled 'NO-GM'.</p> </div>	<p data-bbox="693 329 1406 379">Como el árbol crece en el campo</p> <div data-bbox="1141 439 1277 544">  </div> <p data-bbox="587 529 1843 644">El producto final sería considerado OGM de acuerdo a la resolución vigente</p> <ul data-bbox="587 729 1843 1172" style="list-style-type: none"> • Si el aplicante quisiera desarrollar un nuevo producto en donde el tallo cuenta con autorización comercial y la parte aérea es no GM, el producto resultante no será regulado. • El análisis de riesgo alimentario podría ser obligatorio aunque el producto (la naranja) corresponde a a la parte no GM del grafting.

New Breeding Techniques

Técnica	Conclusión preliminar
Reverse Breeding	<ul style="list-style-type: none">• En el producto resultante no hay una nueva combinación de material genético
Metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM)	<ul style="list-style-type: none">• El aplicante deberá demostrar evidencia de la remoción del transgen utilizado temporalmente del producto final.  <p>Si la evidencia muestra que no hay transgen en el producto final, este producto no sería regulado.</p>

New Breeding Techniques

Técnica	Conclusión preliminar
SDN-1	<ul style="list-style-type: none">• La modificación dentro del genoma de la planta es sitio específica. Como resultado no hay una nueva combinación de material genético.
SDN-2	<ul style="list-style-type: none">• El aplicante deberá demostrar evidencia de la remoción del transgen utilizado temporalmente del producto final. <div data-bbox="1020 905 1190 1105" style="text-align: center;"></div> <p data-bbox="544 1119 1812 1233">Si la evidencia muestra que no hay transgen en el producto final, este producto no sería regulado.</p>

New Breeding Techniques

Técnica	Conclusión preliminar
Mutagenesis dirigida por Oligonucleotidos	<p data-bbox="697 439 1831 539">Hay diferentes tipos de oligonucleotidos que pueden ser usados</p> <ul data-bbox="697 611 1649 825" style="list-style-type: none">• Single stranded DNA oligonucleotides• Chimeric oligonucleotides• Triple helix-forming oligonucleotides (TFOs)• RNA oligonucleotides  <p data-bbox="697 1011 1831 1168">El producto resultante puede o no tener una nueva combinación de material genético dependiendo de la extensión y naturaleza de la modificación.</p>

New Breeding Techniques

Técnica	Conclusión preliminar
Agroinfiltración	<ul style="list-style-type: none">• Contexto de ensayos experimentales• Expresión transiente de transgenes• No hay inserción de material genético dentro del genoma de la planta
Agroinoculación	El análisis de riesgo deberá hacer foco en el microorganismo que lleva la construcción de interés.

New Breeding Techniques

Resolución para NPBTs

GMO?

- Esta resolución no es limitada para la técnicas descriptas anteriormente.
- Enfoque de caso a caso
- Es abierta para evaluar cualquier otra técnica nueva
- Establece los pasos a seguir cuando el aplicante quiere hacer uso de estas técnicas.

New Breeding Techniques



El aplicante deberá suministrar:

- Información acerca del proceso de como fue obtenido el producto derivado de una NPBT
- Evidencia de las modificaciones genéticas introducidas
- Evidencia de remoción del transgen usado temporalmente para la obtención del producto (Si es necesario)

New Breeding Techniques

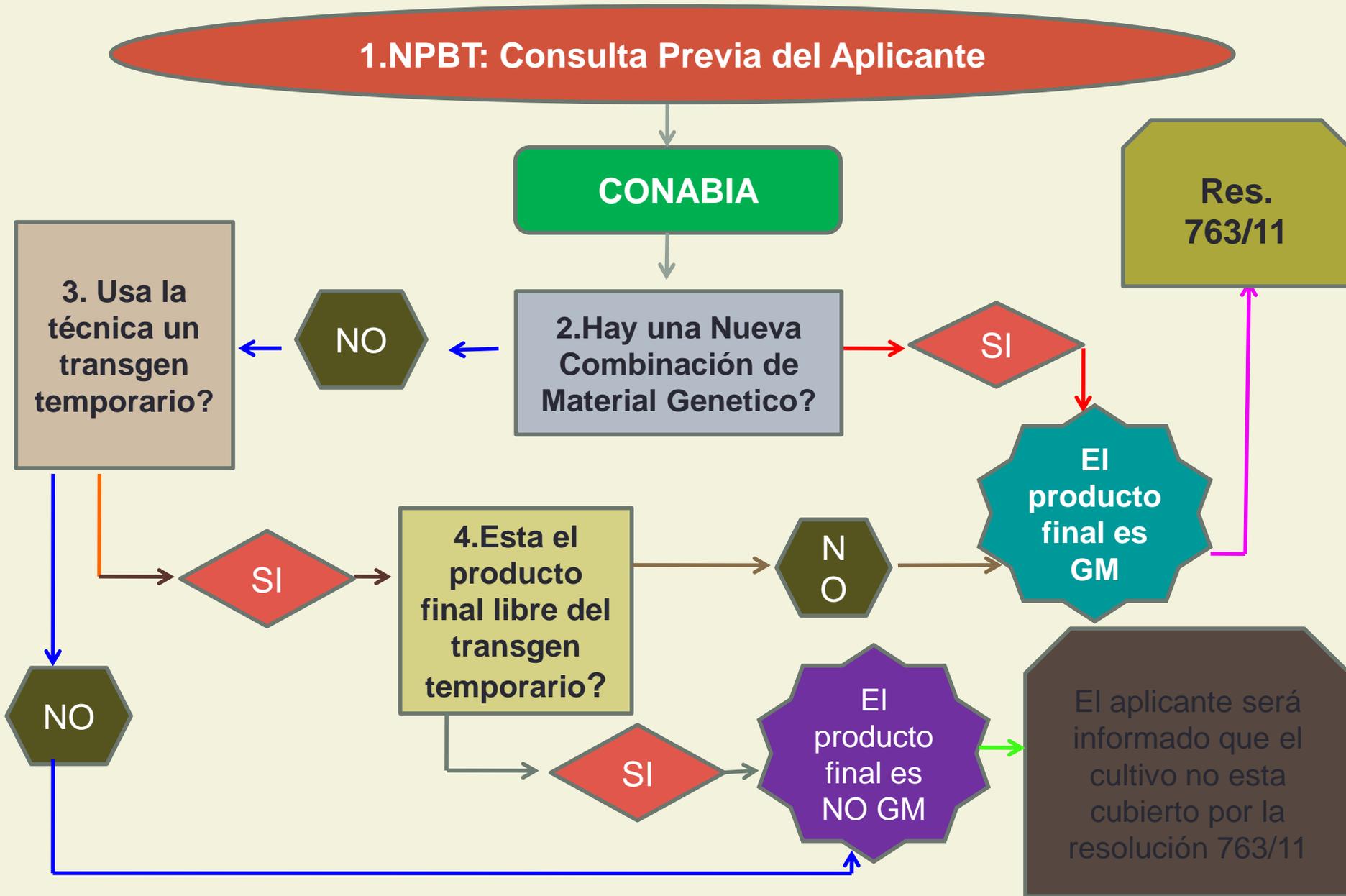
CONABIA determinará:



- Si la modificación genética en el genoma de la planta no tiene suficiente entidad para ser considerada una nueva combinación de material genético.
- Si la información suministrada confirma que el transgen usado temporariamente fue removido del cultivo a comercializar

Si los supuesto anteriores se cumplen; el aplicante será informado que el cultivo no está alcanzado por la resolución de Organismos Genéticamente Modificados.

Propuesta de evaluación para NPBT



Case studies



NBTs



Case I: Okuzaki A, Toriyama K, Plant Cell Rep, 2004, 22: 509-512

Host

- Rice

Technique ODM

- **Introducing chimeric RNA/DNA oligonucleotides** designed to target the codons for Trp-548 and Ser-627 of the endogenous rice acetolactate synthase (ALS) gene so it would confer resistance to ALS-inhibiting herbicides.
- **Transformation method:** Biobalistic.
- 35s-GFP “transiently” used to estimate the number of cells that received the gold particles



Rice

- **Phenotype: Resistance to sulfonylurea and imidazolinone herbicides**

Original codon	Final codon
TGG (Trp)	TTG (Leu)
AGT (Ser)	ATT (Ile)

Case I: Okuzaki A, Toriyama K, Plant Cell Rep, 2004, 22: 509-512

Chimeric RNA/DNA Oligonucleotide Design

CO W548L

```

TTGCGCG ac cac cac guT *AAC CUC caU uCC aa TT
TT
TTCGCGC3' 5'TG GTG GTG CAA TTG GAG GAT AGG TT TT
Val Val Gln Leu Glu Asp Arg
    
```

CO S627I

```

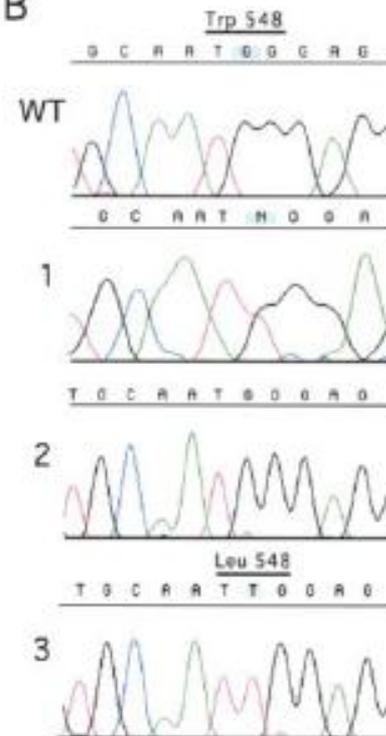
TTGCGCG ga uac uag ggT *TAA Ccc ccg cgu aa TT
TT
TTCGCGC3' 5'TCT ATG ATC CCA ATT GGG GGC GCA TT TT
Met Ile Pro Ile Gly Gly Ala
    
```

✓ Results:

A



B





Case II: Wenzhi J, *et al*, Nucleic Acids Research, 2013, Vol. 41, No.

20

Host

- Rice

Technique

Cas9/
single guide RNA
(sgRNA) system

- Transient expression in rice protoplast cells of Cas9/sgRNA
- Generated a 9 nt deletion the promoter region of genes *OsSWEET14*.

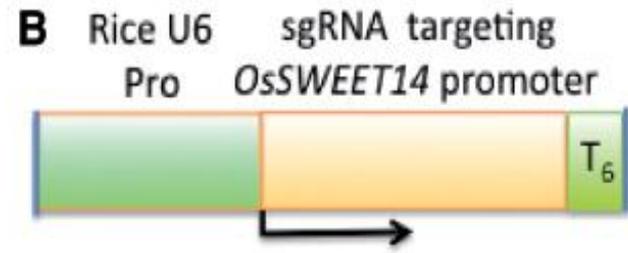
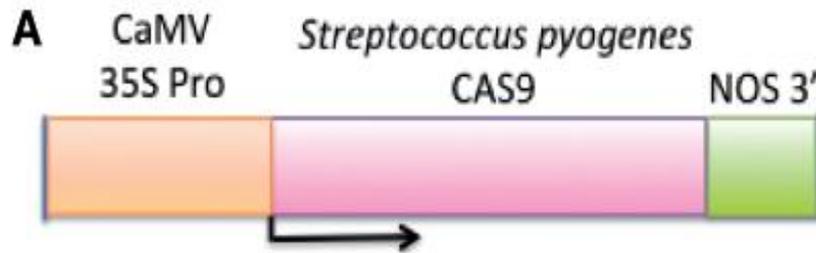


- **Phenotype:** bacterial blight resistant (expected).
- Simmilar modification obtained using TALEN .



Case II: Wenzhi J, et al, Nucleic Acids Research, 2013, Vol. 41, No. 20

✓ Result:



C *OsSWEET14* 5' -GCACTATATAAACCCCCTCCAACCAGGTGCTAAGCTCATCA -3'
sgRNA 3' -AGGUUGGUCCACGAUUCGAG -5'

D GCACTATATAAACCCCCTCCAACCAGGTGCTAAGCTCATCA WT
GCACTATATAAAC-----CCAGGTGCTAAGCTCATCA -9



Case III: D'Halluin *et al*, Plant biotech journal, 2013 (11) 933-941

Host

- GM Cotton GHB119
- **Transformation method:** *Agrobacterium tumefaciens*
- **Phenotype:** Glufosinate tolerant (*bar*)
Lepidoptera Resistant (*cry2Ae*).

Technique Meganuclease

- Biolistic introduction of Meganuclease gene and “repair DNA” for homologous insertion of two genes (*epsps* and *hprt*).



Cotton

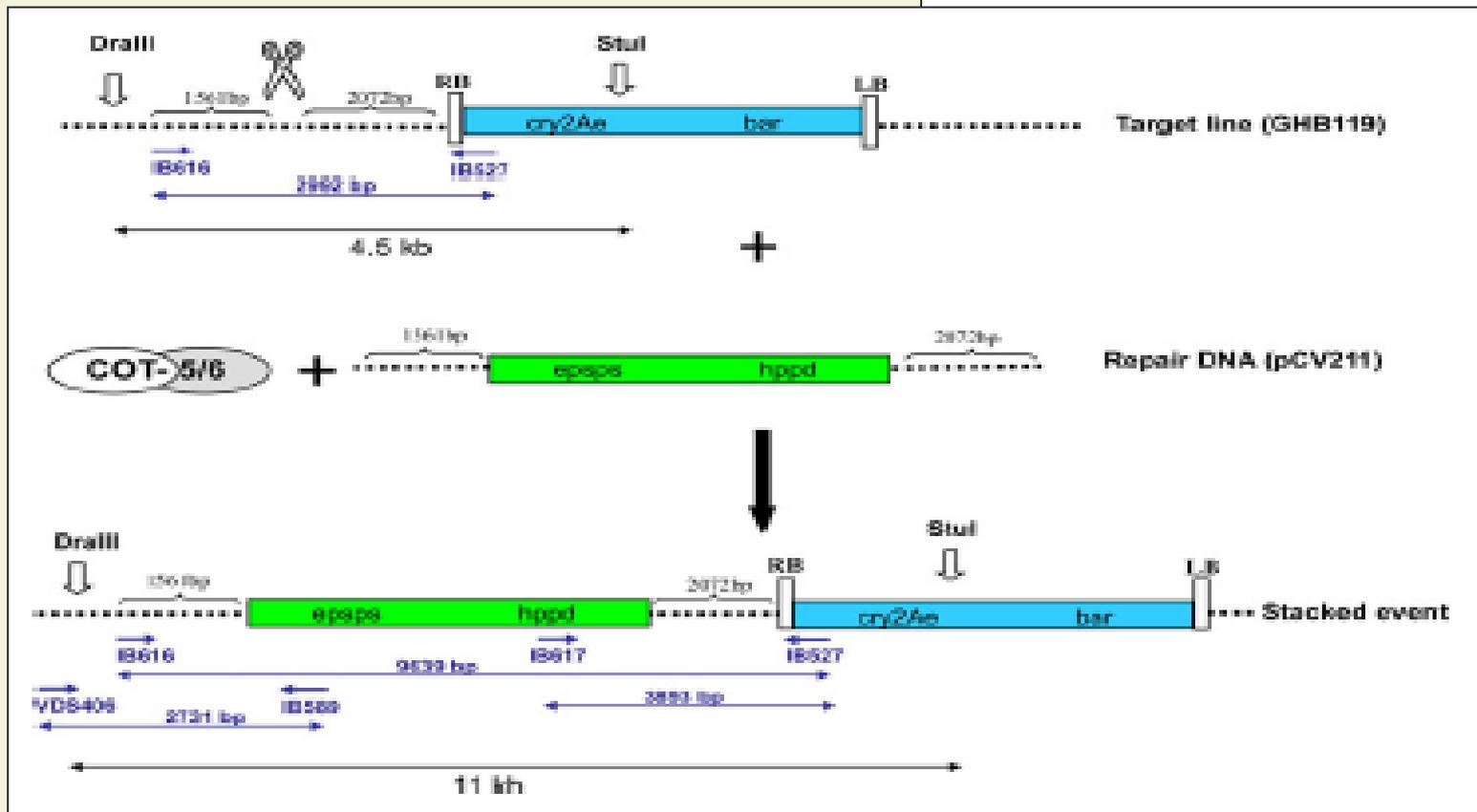
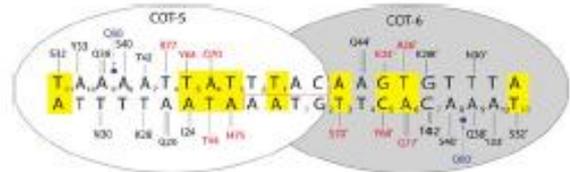
- The “repair DNA” cassette was inserted next to a pre-existing event
- The Meganuclease gene was not stably integrated into the genome (*Southern Blot*)
- **Phenotype:** Herbicide tolerant (glufosinate, **glifosate**, **tembotrione**) and Lepidoptera Resistant



Case III: D'Halluin *et al*, Plant biotech journal, 2013 (11) 933-941

Mega nuclease Design

✓ Result:





Case IV: Frans A. Krens et al, *frontiers in Plant Science*, April 2015 Volume 6 Article 286

Host

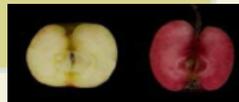
- Apple tree

Technique Cisgenesis

- *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation
- The construction contains MdMYB10 (gene from a red-fleshed apple coding for a transcription factor involved in regulating anthocyanin biosynthesis), flanked by its native promoter and terminator, RB and LB



- **Phenotype:** Red fleshed apple fruits with an appealing red appearance and an increased level of anthocyanin-based antioxidants
- The construction was integrated into the *genome* (**PCR**)





Case IV: Frans A. Krens et al, *frontiers in Plant Science*, April 2015 Volume 6 Article 286

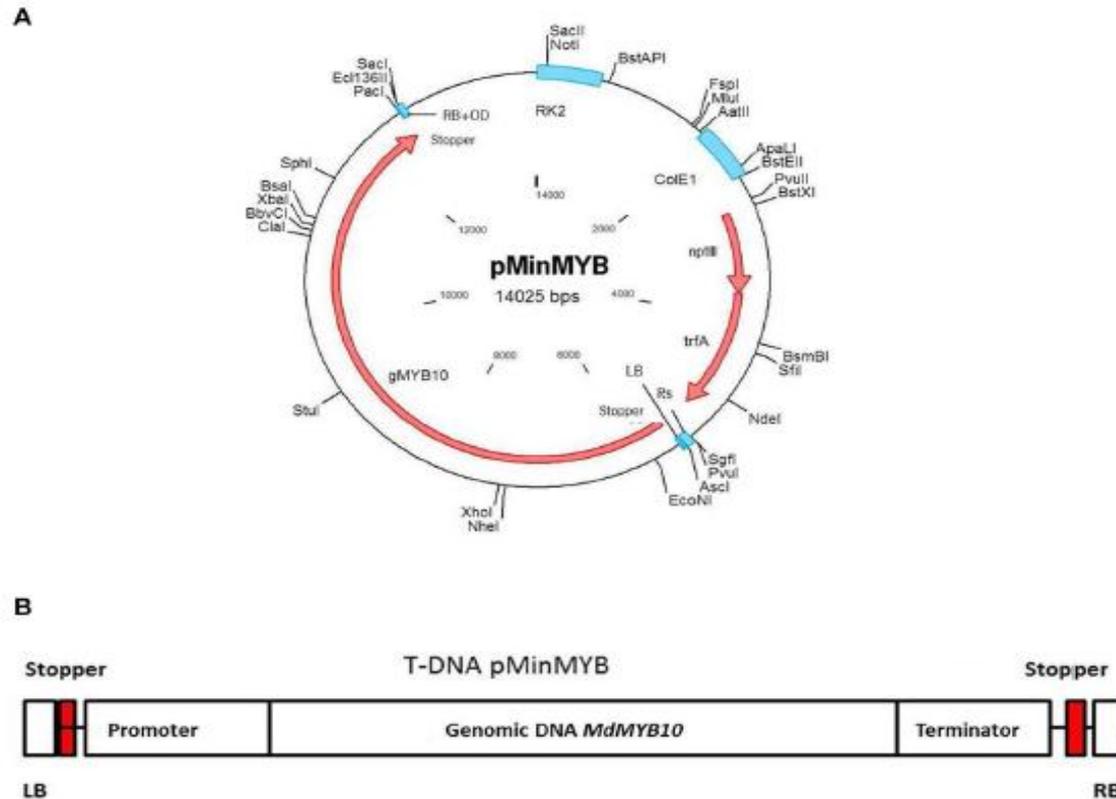


FIGURE 1 | Schematic representation of the pMinMYB vector carrying only the *MdMYB10* gene sequence between the T-DNA borders. The *MdMYB10* sequence encompasses the promoter, 1768 bp including the additional repeats (6-fold repeat; R6) described by

Espley et al. (2009), the coding region including introns 4184 bp and the terminator region of 1053 bp. **(A)** The entire plasmid. **(B)** The T-DNA region. RB, right border and LB, left border respectively; OD, overdrive sequence; Rs, recombination site.