

Grupo Ad Hoc sobre CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR (GAHCIM)

Información requerida para la caracterización molecular de los eventos en desarrollo nacionales para evaluación confinada de campo:

1. Información general del evento (especie, gen de interés, característica introducida). Describir la construcción genética detallando con qué metodología se obtuvo, el gen de interés e información sobre alergenidad y toxicidad.
2. Indicar qué tipo de resistencias a antibióticos pudieron ser introducidas.
3. Detallar el protocolo molecular de identificación del evento que lo diferencia del cultivo sin modificar y mostrar evidencia de que funcione. En caso de ser necesario se deberá proveer material para usar como control positivo.

Evento: Soja Jingdou323.

Tipo de liberación: evaluación confinada de campo de evento nacional en desarrollo nacionales.

Fecha: 20/09/2022

El Grupo GAHCIM se reunió en la reunión virtual de Trabajo convocada por la ERB los días 14 de setiembre de 2021, 26 de julio, 16 y 30 de agosto, y 20 de setiembre de 2022

Participaron en la elaboración del informe: MSc. Fabiana Rey (LATU), Lic. Bioq. Mariana Richero (DGSA-MGAP), Lic. Bioq. Mariana Menoni (INASE), Dra. Analía Sanabria (DINACEA- MA), PhD. Pablo Fresia (I. Pasteur), PhD. Agustín Correa (I. Pasteur).

Se analizó la información presentada para el evento Soja Jingdou323.

El evento de soja *Soja Jingdou323* contiene tres genes principales: *g2m-epsps*, *gr79-epsps* y *cry1C* que derivan de *Pseudomonas fluorescens*, metagenoma de microorganismos del suelo y *Bacillus thuringiensis*, respectivamente.

La enzima EPSP endógena de la planta es sensible al glifosato y su actividad es inhibida por el glifosato, lo que eventualmente conduce a la muerte. El gen *epsps* de *Pseudomonas fluorescens* o del metagenoma de microorganismos del suelo codifica una enzima insensible al glifosato, que no es inhibida por éste y confiere tolerancia al glifosato. Además, el gen *cry1C* resistente a insectos de *Bacillus thuringiensis* confiere resistencia a insectos lepidópteros. Es importante destacar que la combinación de diferentes estrategias contribuye a una mayor resistencia al glifosato en las plantas. Por lo tanto, Jingdou 323 expresado con G2M-EPSPS, GR79M-EPSPS y *cry1C* puede mejorar significativamente la tolerancia al glifosato y la resistencia a los insectos.

El evento en Soja Jingdou323 contiene casetes de expresión para tres genes: (a) el casete de expresión del gen *g2m-epsps*, que consiste en el promotor 35S, el gen *g2m-epsps* y el terminador PolyA; (b) el casete de expresión del gen *cry1C*, que consiste en el promotor 35S, el gen *cry1C* y el terminador NOS y (c) el casete de expresión del gen *gr79-epsps*, que consiste en el promotor pUbi, el gen *gr79-epsps* y el terminador PolyA. Tanto G2M-EPSPS como GR79M-EPSPS cuentan con un péptido señal, CTP4, derivado del cloroplasto, que dirige la proteína expresada hacia el cloroplasto y actúa en el cloroplasto.

La soja Jingdou323 fue desarrollada a través de transformación del nodo cotiledonario mediada por *Agrobacterium* con el plásmido pGR18, que es el sistema de transformación estable, más

utilizado en la soja. Para mejorar significativamente la eficiencia de transformación, también se usó en el evento apilado un sistema de transformación optimizado asociado con el co-tratamiento con surfactante y sonicación.

Caracterización molecular y estabilidad del ADN insertado

La caracterización molecular del locus transgénico de la soja Jingdou323 se realizó mediante análisis del sitio de inserción, análisis genético de la progenie y PCRs evento específicos. Se confirmó que existe una única inserción de la secuencia exógena. Se determinó que el sitio de inserción está entre 15122549-15122594 en el cromosoma 13 en el genoma de la soja, y que la secuencia del T-DNA en la soja modificada genéticamente Jingdou323 es consistente con el orden de los elementos genéticos correspondientes en el plásmido de transformación GR18. Debido a la inserción de T-DNA, se encontró en Jingdou 323 una delección de 44 pb en la posición del cromosoma 13: 15122550 a 15122593.

Se desarrolló método de PCR específico para la soja y se presenta información de secuencia de primers, amplicones y condiciones de amplificación.

El rasgo incorporado podría heredarse de manera constante en diferentes generaciones de Jingdou 323. Las generaciones F1 se transmitieron de manera estable a la generación F2 siguiendo la ley de segregación de Mendel. Todas las generaciones F1 expresaron el rasgo dominante, mientras que los rasgos dominantes y los rasgos recesivos de las generaciones F2 tenían una proporción de 3:1.

Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)

Se confirmó la expresión de *G2m-EPSPS*, *GR79m-EPSPS* y *Cry1C* a partir de una extracción de ARN de raíces, tallos, hojas y semillas por RT-PCR. Los niveles de expresión de cada proteína en los diferentes tejidos se cuantificaron por ELISA.

Alergenicidad y toxicidad

La evaluación de la homología de secuencia entre *G2m-EPSPS*, *GR79m-EPSPS* y *Cry1C* y varios alérgenos se realizaron con diferentes bases de datos de alérgenos (<http://www.allergenonline.org/> y http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_src.html). Los resultados de la alineación de longitud completa, la alineación de la secuencia de 80 aminoácidos y la alineación de 8 aminoácidos consecutivos mostraron que las proteínas *G2m-EPSPS*, *GR79m-EPSPS* y *Cry1C* no tienen una alta homología de secuencia con alérgenos conocidos, y su potencial de alergia es bajo.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas *G2m-EPSPS*, *GR79m-EPSPS* y *Cry1C* se alinearon con las de la base de datos Toxin and Toxin Target (<http://www.t3db.ca/>), y los resultados mostraron que no tienen una gran similitud de secuencia con proteínas tóxicas conocidas y su potencial tóxico es bajo.

El grupo GAHCIM no encuentra elementos de riesgo para la bioseguridad en el evento en desarrollo Soja Jingdou323 para su evaluación confinada de campo.