

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 alergenicidad 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 ZH10-6

Tipo de liberación: evaluación confinada de campo de eventos en desarrollo nacionales.

Fecha: 18/10/2022

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, 23 y 30 de agosto y 18 de octubre de 2022.

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

El evento de Soja HZ10-6 contiene dos genes principales: G2-EPSPS y GAT, que derivan de *Pseudomonas fluorescens* y del metagenoma de microorganismos del suelo, respectivamente. La enzima EPSP endógena de la planta es sensible al glifosato y su actividad es inhibida por éste, lo que eventualmente conduce a la muerte. El gen G2-EPSPS de *Pseudomonas fluorescens* codifica una enzima que no es inhibida por el glifosato, por lo que le confiere tolerancia a éste. Además, el gen GAT desintoxica eficazmente el glifosato mediante N-acetilación. Es importante destacar que la combinación de diferentes estrategias contribuye a una mayor resistencia al glifosato en las plantas. Por lo tanto, ZH10-6 expresado con genes G2-EPSPS y GAT puede mejorar significativamente la tolerancia al glifosato.

La transformación del nodo cotiledonario fue mediada por *Agrobacterium*. Para mejorar significativamente la eficiencia de transformación, se utilizó un sistema de transformación optimizado con la patente de ZL201310594164.7 en el evento apilado.

La proteína EPSPS es una enzima de la ruta del shikimato (biosíntesis de compuestos aromáticos en microorganismos y plantas). Estas proteínas son muy abundantes en la naturaleza y están presentes en alimentos procesados que contienen plantas y microorganismos. No hay reportes de alergenicidad de las mismas en humanos o animales. La proteína GAT tiene mayor homología con la glifosato N-acetiltransferasa de *B. licheniformis*. Este tipo de proteínas tiene historia de uso seguro.

La empresa presenta información muy completa y detallada de la comparación de las proteínas expresadas en ZH10-6 y de sus contrapartes expresadas en un sistema de expresión procariota. Demuestran que son sustancialmente equivalentes y por lo tanto usan las segundas para realizar los estudios de toxicidad aguda, estabilidad térmica y digestibilidad.

El análisis bioinformático para el estudio de toxicidad y alergenicidad de las proteínas fue realizado por el *National Institute of Nutrition and Health of the Chinese Center for Disease Control and Prevention*. Fue realizado según la norma nacional china “*Bioinformatics Analysis Method for Amino Acid Sequence Similarity between Foreign Proteins and Toxic Proteins or Anti-nutritional Factors for Food Safety Detection of Genetically Modified Organisms and Their Products (No. 2630-16-2017 Announcement of the Ministry of Agriculture)*”. Los resultados demuestran que las secuencias aminoacídicas de las proteínas G2-EPSPS y GAT no tienen similitud de secuencias con proteínas tóxicas.

Se utilizó la base de datos de alérgenos (<http://www.allergenonline.org/>) para evaluar la homología de secuencia entre las proteínas G2-EPSPS o GAT y varios alérgenos. Los resultados de la alineación de longitud completa mostraron que las proteínas G2-EPSPS y GAT no tenían homología con las proteínas alergénicas existentes ($E < 1,000000$). La similitud de las proteínas G2-EPSPS y GAT, con cualquier proteína alergénica, en 80 aminoácidos consecutivos fue inferior al umbral del 35 %. Tampoco se encontraron coincidencias entre la proteína G2-EPSPS o GAT y proteínas alergénicas al analizar 8 aminoácidos contiguos. La base de datos de estructuras de proteínas de alérgenos (http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_src.html) también se utilizó para evaluar la homología estructural entre las proteínas G2-EPSPS o GAT y varias proteínas de alérgenos. Los resultados mostraron que las proteínas G2-EPSPS y GAT no tenían alta homología de secuencia con los alérgenos conocidos, lo que demuestra una baja posibilidad de que tengan potencial alérgico.

La caracterización del ADN insertado se realizó mediante la secuenciación de segunda y tercera generación del genoma de soja ZH10-6. Estos resultados se combinaron con secuenciación de productos de amplificación y análisis bioinformáticos. Los resultados indican que el *cassette* de expresión se insertó en la posición 7979555 to 7980541, en el cromosoma 17 del genoma de soja de referencia.

El fragmento insertado consiste en tres partes:

- a) un fragmento T-ADN que contiene los *cassettes* de expresión *g2-epsps* y *gat* intactos
- b) una secuencia de 3472 pb del genoma de soja que recombinó en el fragmento insertado, que alinea con la secuencia del genoma de soja de la línea receptora ZH10, que corresponde a la posición 7977069-7980527 del genoma de la soja de referencia.
- c) un fragmento T-ADN truncado que contiene el *cassette* de expresión *g2-epsps* y parte del promotor CaMV 35S

Se realizó un ensayo ELISA para analizar la estabilidad de la expresión de la proteína G2-EPSPS y GAT en tres generaciones T3, T4 y T5 en 5 estados (VC, V3, R2, R6 y R8). La proteína G2-EPSPS y la proteína GAT se expresaron de manera estable en 5 tejidos de la soja GM a lo largo de 3 generaciones. La proteína GAT se expresó de manera estable en 5 tejidos de la soja GM a lo largo de 3 generaciones, el nivel de expresión de proteína GAT fue relativamente alto en hojas, raíces y flores, y fue relativamente bajo en tallos y semillas.

El evento puede detectarse utilizando el método de PCR convencional proporcionado por la empresa.

En base a la información presentada el grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento en desarrollo Soja ZH10-6 para su evaluación confinada de campo.
