

Grupo *Ad Hoc* sobre CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR (GAHCIM)

Términos de Referencia para el análisis de la evaluación del riesgo en bioseguridad:

- Genes y otros elementos introducidos
- Características de los organismos donantes
- Métodos de transformación
- Caracterización molecular y estabilidad del ADN insertado
- Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)
- Análisis bioinformático
- Método de detección

Evento: Soja DBN-09004-6

Tipo de liberación: Comercial

Fecha: 22 de agosto de 2023

El Grupo GAHCIM se reunió en los Talleres de Trabajo convocados por la ERB el 28 de abril y el 5 de mayo del 2020 (en forma virtual); el 28 de febrero (en forma presencial) y el 22 de agosto (en forma virtual) del 2023.

Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las siguientes instituciones: MGAP-DGSA, INASE, LATITUD/LATU e INIA cuyos curriculum vitae se encuentran disponibles en la Secretaría del Sistema Nacional de Bioseguridad.

Se analizó la información presentada para el evento en soja DBN-09004-6.

Genes y otros elementos introducidos

Los genes introducidos en la soja GGT confieren a la planta dos fenotipos, tolerancia a herbicidas basados en glufosinato de amonio, dado por el gen *pat*, proveniente de *Streptomyces viridochromogenes* y tolerancia a glifosato, debido al gen *cp4-epsps* derivada de *Agrobacterium* sp. CP4.

La enzima PAT, expresada en el evento DBN-09004-6, acetila específicamente a la L-fosfinotricina inactivando los herbicidas basados en glufosinato de amonio. La expresión del gen *pat* está regulada por el promotor y terminador transcripcional 35S del Virus del Mosaico del Coliflor. La proteína CP4 EPSPS expresada en plantas tolerantes al glifosato es funcionalmente equivalente a las enzimas EPSPS endógenas de las plantas, excepto por su menor afinidad por el glifosato. La expresión del gen *cp4-epsps* se encuentra bajo la regulación promotor constitutivo prGm17gTsf1 de *Glycine max* y el terminador transcripcional tPsE9 de *Pisum sativum* L. Además, *cp4-epsps* se encuentra fusionado a la secuencia del péptido tránsito spAtCTP2 de *Arabidopsis thaliana* que permite el tránsito a cloroplastos donde ocurren las reacciones de la vía del shikimato y la síntesis de aminoácidos aromáticos.

Ambas proteínas, PAT y CP4 EPSPS, se encuentran reguladas por promotores constitutivos, por lo que su expresión tiene lugar en todos los tejidos vegetales y durante todo el ciclo del cultivo.

Características de los organismos donantes

Los organismos donantes de las secuencias *pat* y *epsps*, *S. viridochromogenes* y *Agrobacterium sp.CP4*, no son patógenos, ni presentan alergenicidad o toxicidad.

Si bien algunos de los elementos genéticos reguladores utilizados en la construcción provienen de organismos donantes (*Agrobacterium tumefaciens*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, Virus del Mosaico del Coliflor, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae*) que pueden ser patógenos de plantas, humanos o animales, están desprovistos de los componentes que son esenciales para la expresión de las características patogénicas. Por lo tanto, en las secuencias genéticas insertadas en la soja GGT no existen riesgos para la salud humana o animal.

Métodos de transformación

Para la obtención de la soja GGT, se utilizó el método de transformación mediado por *Agrobacterium*. Brevemente, para la transferencia del ADN-T contenido en el vector SY4003, nudos cotiledonares aislados de semillas de soja (cv Jack) pre-germinadas por 4-6 días, fueron inmersos en una suspensión de *Agrobacterium*. Luego de 3 días en medio de infección, los nodos fueron cultivados en medio sólido conteniendo Cefalosporina (150-250 mg/L). La selección se realizó utilizando glifosato (10 mg/ml).

Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)

Los niveles de expresión de PAT y CP4 EPSPS se midieron en muestras de hoja y grano obtenidas de ensayos a campo realizados durante las campañas 2015/2016 realizadas en localidades de Argentina que representan las principales áreas de producción de soja y las diversas condiciones ambientales de este cultivo. En las parcelas del evento transgénico se aplicaron tratamientos específicos: sin aplicación de herbicida, con aplicación de glufosinato, de glifosato o de ambos herbicidas. La línea parental no recibió ningún tratamiento con herbicidas. Las muestras de forraje se tomaron en el estadio R3/R4, y las de semilla se recolectaron a madurez (R8).

Los resultados obtenidos indican que los niveles de las proteínas PAT y CP4 EPSPS son menores o comparables a los reportados para otros eventos aprobados, los cuales han demostrado ser inocuos para la seguridad alimentaria y ambiental. Todas las muestras de soja DBN-09004-6 mostraron valores comparables de PAT independientemente del tratamiento aplicado. El valor más alto medido en semilla fue de 0,61 µg/g de peso fresco (PF) y en hoja 1,40 µg/g PF. El mayor nivel de expresión de CP4 EPSPS detectado fue de 239,8µg/g PF en semillas, y 132,3 µg/g PF en hoja.

Caracterización molecular y estabilidad del ADN insertado

El análisis de la inserción del evento, mediante caminata cromosómica y secuenciación por el método de Sanger, permitió confirmar que la secuencia de la inserción en el evento DBN-09004-6 es idéntica al ADN-T del vector utilizado en la transformación. Asimismo, los resultados obtenidos por *Southern blot* permiten concluir que el evento DBN-09004-6 contiene una única inserción que se detecta en generaciones avanzadas (T5, T6 y T7).

Estos estudios confirman que la integración tuvo lugar en un único locus (específicamente en el cromosoma 13) y correspondió a una única copia de ADN-T completa entre los bordes bNLB y bNRB. No se detectaron otros fragmentos del inserto ni del vector en el genoma del evento DBN-09004-6.

Como consecuencia de la inserción, se produjo la delección de un fragmento de 1545 pb del genoma de soja. Esta secuencia corresponde a una región intergénica y no interrumpe ningún gen o secuencia conocida del genoma de soja. Estos cambios son comunes durante la transformación de plantas y presumiblemente resultan de mecanismos de ruptura y reparación de la doble cadena durante el proceso de transformación mediado por *Agrobacterium*.

El análisis por PCR (con *primers* específicos para cada gen de interés) de plantas homocigotas de las generaciones T1, T2, T3, T4, T5 y T6, obtenidas por auto-fecundación, mostró la presencia de bandas únicas correspondientes a los amplicones producidos por *epsps* y *pat*, indicando que esos genes se heredan establemente entre generaciones.

La segregación se estudió con plantas de la generación T1, obteniéndose una progenie que presentaba una relación de positivas a negativas próxima a 3:1, mostrando que ambos elementos génicos, *epsps* y *pat*, se heredan de acuerdo con principios Mendelianos.

Otros estudios de segregación se realizaron sobre la progenie resultante del cruzamiento de una planta de soja DBN-09004-6 con el cultivar de soja convencional SY026, lo que produjo semillas hemicigotas F1. Las plantas F1 se autopolinizaron para producir semillas F2. Las plantas F2 fueron examinadas para determinar la presencia de los transgenes *epsps* y *pat*, y los individuos F2 hemicigotas se seleccionaron para producir semillas F3 por autopolinización. La segregación analizada en las generaciones F2 y F3 demostró la relación esperada 1:2:1, confirmando que la inserción se hereda de acuerdo con principios Mendelianos.

Además, la estabilidad del fenotipo fue estudiada mediante la aplicación de tratamientos con glifosato y glufosinato para determinar la tolerancia a los herbicidas. Plantas T2, T3, T4, T5, T6 y BC3F3 resultaron ser tolerantes a ambos herbicidas.

Análisis bioinformático

Se realizó el análisis informático sobre una secuencia que comprende el inserto y 200 pb de las regiones flanqueantes 5' y 3'. Para detectar marcos de lectura abiertos, se examinó la presencia de codones de inicio y terminación de la transcripción, usando un script local desarrollado usando las herramientas BioPython (<http://www.biopython.org>). Se consideraron para el análisis todos los péptidos de ocho o más aminoácidos. Se utilizó el algoritmo BLASTp y la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para evaluar las homologías de estos péptidos putativos con proteínas conocidas. La similitud se evaluó usando el valor de E, tomando 1×10^{-5} como el valor de corte para definir un alineamiento genuino.

El análisis bioinformático mostró que la inserción no generó nuevos marcos de lectura en el genoma de soja. Sin embargo, tres marcos de lectura preexistentes asociados a péptidos putativos cortos, resultaron ligeramente modificados. Todos los péptidos putativos restantes se originan dentro de la secuencia insertada.

El análisis bioinformático indicó la existencia de 78 péptidos putativos dentro del inserto, con longitudes de ocho hasta 531 aminoácidos. Todos los péptidos se sometieron a análisis

bioinformáticos de alergenicidad y toxicidad. Solo 4 de estos péptidos superan los 100 aminoácidos: dos se asociaron a los nuevos productos de expresión esperados: CP4 EPSPS y fosfinotricina N-acetiltransferasa, el tercero resultó ser similar a la proteína de la matriz del cuerpo de inclusión, y el cuarto no coincidió con ninguna proteína en la base de datos del NCBI.

No se encontró una identidad de secuencia superior al 35 % con ningún alérgeno en la base de datos FARRP cuando se analizaron (2023) las secuencias obtenidas usando una ventana deslizante de 80 aminoácidos contiguos. De manera similar, no se encontró identidad cuando una ventana deslizante de 8 aminoácidos contiguos en cada péptido putativo se alineó con epítomos alergénicos de la base de datos

La evaluación de la toxicidad potencial de los péptidos putativos mediante el algoritmo BLASTp (Altschul et al. 1990) de búsqueda de homología de secuencia con toxinas incluidas en la base de datos ToxDB (2023) no mostró ninguna homología significativa (puntuación $E < 1 \times 10^{-5}$).

No hay evidencia experimental que indique que la transcripción de los ORF putativos anteriores realmente ocurra. Además, los resultados sugieren que en el caso altamente improbable de que cualquiera de las secuencias anteriores se transcribiera y finalmente se tradujera, los productos resultantes no se considerarían alergénicos o tóxicos debido a la falta de similitud de secuencia con alérgenos conocidos y toxinas.

Método de detección

El 28 de febrero se abrió el sobre de información confidencial verificando que contiene la información detallada de los métodos de detección. La validación por el JRC se encuentra en proceso.

Conclusión:

El grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento DBN-09004-6 para su liberación comercial.
