

Para: Comité de Articulación Institucional (CAI) y Evaluación del Riesgo en Bioseguridad (ERB).
De: Grupo *ad-hoc* sobre caracterización e identificación molecular (GAHCIM).
Asunto: Informe GAHCIM Soja SYHTOH2 para uso comercial
Fecha: 27 de octubre de 2020.

Participaron en la elaboración del informe:

Lic. Bioq. Mariana Richero (DGSA)
Lic. Bioq. Mariana Menoni (INASE)
Lic. Bioq. MSc. Fabiana Rey (LATITUD/LATU)
Lic. Bioq. PhD. Agustín Correa (Instituto Pasteur)
Lic. Biol. PhD. Pablo Fresia (Instituto Pasteur)
Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza (INIA)

El Grupo GAHCIM se reunió en Talleres de Trabajo convocados por la ERB, en MGAP el día 22 de junio de 2018, 19 y 26 de mayo de 2020, y 27 de octubre de 2020.

Característica:

Tolerancia a las aplicaciones de herbicidas conteniendo glufosinato de amonio y a herbicidas pertenecientes a la familia de los inhibidores de la p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) (como el mesotrione, entre otros).

Genes y elementos genéticos introducidos:

La soja derivada del evento de transformación SYHTOH2 (denominada en el dossier soja SYHTOH2), fue desarrollada utilizando el método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, con el objetivo de incorporar de manera estable a los genes *pat* y *avhppd-03* en su genoma.

El gen *pat*, derivado de *Streptomyces viridochromogenes*, codifica para la enzima fosfinotricin acetil-transferasa (PAT). Cuando esta proteína es expresada en plantas, tiene la capacidad de acetilar la L-fosfinotricina, el componente activo del herbicida glufosinato de amonio, resultando en un fenotipo tolerante al herbicida en postemergencia.

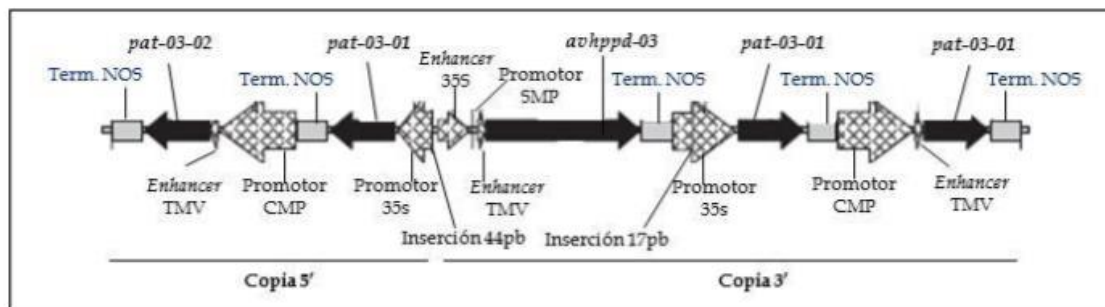
El gen *avhppd-03* codifica para la enzima p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (AvHPPD-03) derivada de la avena (*Avena sativa*). La proteína AvHPPD-03, posee una menor afinidad de unión a los herbicidas pertenecientes a la familia de los inhibidores de la HPPD, en comparación a la enzima HPPD nativa de soja. Cuando el gen *avhppd-03* se expresa en la soja SYHTOH2 confiere tolerancia pre- y post-emergente a dicho tipo de herbicidas.

La utilización del herbicida glufosinato de amonio permite control de las siguientes malezas resistentes al glifosato: *Amaranthus quitensis*, *Sorghum halepense* y *Eleusine indica*, mientras que el isoxaflutole y el mesotrione (inhibidores de las HPPDs) controlan a *Amaranthus quitensis*, *Echinochloa colona* y *Eleusine indica*.

Caracterización molecular y estabilidad del inserto:

Los genes se expresan a partir de promotores constitutivos (promotor SMP de *cestrum yellow leaf curling* virus para el gen *avhppd-03* y promotor 35S del virus del mosaico del coliflor para el gen *pat-03-01*). El evento SYHT0H2 fue caracterizado molecularmente, mediante Southern blot y secuenciación. La estabilidad genética del inserto fue evaluada mediante Southern blot y por evaluación de los patrones de herencia de los transgenes a lo largo de tres generaciones. También se caracterizaron las regiones flanqueantes al inserto y se determinó si el inserto interrumpe la secuencia de algún gen conocido. El inserto contiene una única copia del gen *avhppd-03*, cuatro copias del gen *pat*, una copia de los enhancers del gen *avhppd-03*, dos copias del promotor 35S, dos copias del promotor CMP, dos copias del enhancer TMV, y 5 copias del terminador NOS. Se analizaron los resultados de Southern blot presentados para determinar el número de sitios de integración y confirmar el número de copias de cada elemento funcional presentes en el genoma de la soja SYHT0H2. Adicionalmente, una secuencia corta de 44 pb, similar a *avhppd-03*, se encuentra entre las dos copias. Existe además una inserción de 17pb en el promotor 35S presente en la copia 3'; las últimas 15pb de esta inserción son una copia de la secuencia que se encuentra río arriba de esta inserción.

La información es clara y confirma los datos presentados.



Mapa del inserto del evento SYHT0H2. Se indican los diferentes elementos presentes en las copias 3' y 5'.

En los extremos 5' y 3' fueron amplificadas por PCR las regiones flanqueantes al inserto (1000 pb hacia cada extremo) con el objetivo de determinar sus secuencias nucleotídicas. Se verificó por análisis bioinformático que el inserto presente en el evento SYHT0H2 no interrumpe genes endógenos y además se evaluó la potencial existencia de nuevos marcos abiertos de lectura, que pudieran haberse generado como resultado de la inserción y que codifiquen para péptidos de al menos 30 aminoácidos. Se identificaron así 47 marcos abiertos de lectura en el ADN-T (excluyendo los 5 marcos para AvHPPD-03 y PAT), y un marco abierto en la unión inserto-genoma en el extremo 5'.

La comparación de alérgenos consistió en dos búsquedas de alineación. Una búsqueda FASTA de longitud completa evaluó las alineaciones de cada una de las secuencias, con criterios mínimos de al menos 80 aminoácidos de longitud de alineación con más de 35% de identidad de aminoácidos (28 aa) compartidos sobre la longitud de la alineación. Toda alineación que supere este criterio de similitud de secuencias indica potencial de similitud de secuencia inmunológicamente relevante (Comisión del Codex Alimentarius 2009).

También se realizó una búsqueda de coincidencia de alineación de ocho aminoácidos para identificar ocho o más aminoácidos contiguos que pueden ser compartidos con secuencias de alérgenos conocidos o supuestos. Para determinar si las secuencias mostraron o no similitud

de secuencia de aminoácidos con toxinas, se realizó una búsqueda BLASTP para identificar las alineaciones potencialmente relevantes contra la base de datos de toxinas con un valor E de 1×10^{-5} como umbral inicial. No se identificaron similitudes de aminoácidos significativas con ninguna de las secuencias presentes en las bases de datos (estudio realizado en 2017)

El evento cuenta con el método de detección y cuantificación por PCR en tiempo real validado y publicado por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (JRC).

El grupo GAHCIM no observa elementos de riesgo en cuanto a la caracterización e identificación molecular para la autorización del evento en soja, M SYHT0H2, para uso comercial.
