

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
- Análisis de posibles interacciones

Evento: Algodón GHB811

Tipo de liberación: Comercial

Fecha: 15/03/2022

El Grupo GAHCIM se reunió en la reunión virtual de trabajo convocada por la ERB los días 25 de mayo, 8 y 15 de junio de 2021, 8 y 15 de marzo de 2022.

Participaron en la elaboración del informe evaluadores de INIA, LATU, IP, MGAP, INASE y MA.

Fecha: 15 de junio de 2021

Se analizó la información presentada para el evento Algodón GHB811.

El algodón BCS-GH811 (GHB811), también denominado algodón HPPD, expresa las proteínas 2mEPSPS, la cual confiere tolerancia al herbicida glifosato y HPPD W336, que confiere tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD.

El gen 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mepsps) codifica para la proteína 2mEPSPS. El gen hppdPfw336-1Pa codifica para la proteína HPPD W336, contiene una sustitución aminoacídica (glicina por triptófano) en la posición 336, que le confiere a la enzima insensibilidad a los herbicidas inhibidores de HPPD, como es el caso del isoxaflutole, conservando su actividad original.

Ambos genes se encuentran regulados por promotores constitutivos. El promotor Pcsvmv regula la expresión del gen hppdPfw336-1Pa y el promotor Ph4a748 dirige la expresión del gen 2mepsps. Si bien se informa que las características adquiridas se expresan de forma constitutiva en todas las etapas de desarrollo del OGM y en todos los tejidos, no se presentaron estudios de expresión de proteínas en el dossier o la bibliografía.

El Algodón GHB811 fue desarrollado a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* usando el vector pTSIH09, que contiene los cassettes de expresión de los genes hppdPfw336-1Pa y 2mepsps. El evento de transformación BCS-GH811-4 no cuenta con genes y/o secuencias acompañantes.

La caracterización molecular del locus transgénico del algodón GHB811 fue realizada por medio

de un estudio de *Southern blot* y confirmada mediante la secuenciación completa del inserto. Luego, se realizó una segunda secuenciación del locus transgénico y de inserción con la finalidad de cumplir con los nuevos requisitos establecidos por la EURL. Del análisis de *Southern blot*, se obtuvieron los fragmentos esperados para una integración completa de una copia única de ADN-T en un locus único del genoma del evento de algodón GHB811, siendo que la secuencia del locus de inserción se localiza en el cromosoma A05 de algodón. Los resultados de *Southern blot* confirmaron la ausencia de segmentos potenciales del esqueleto del vector pTSIH09 en el transgén.

Se llevó a cabo un análisis bioinformático sobre la secuencia del locus transgénico del evento de algodón GHB811, para identificar marcos abiertos de lectura (ORF). Las secuencias resultantes de más de 30aa se compararon con las bases de datos de alérgenos de 2018. No se encontró identidad biológicamente relevante de las secuencias con ninguna proteína alérgena conocida. Además, no se encontró ninguna coincidencia con las proteínas alergénicas conocidas al analizar la homología de 8 residuos continuos. Tampoco se encontró ninguna identidad biológicamente relevante con proteínas tóxicas de la base de datos no redundante de NCBI. En conclusión, no hubo hallazgos *in silico* ni alergénicos ni toxicológicos con los potenciales ORF polipeptídicos.

Se demostró mediante análisis de PCR que el locus transgénico GHB811 de algodón es estable en las generaciones T1, T3, T4, BC1F2 y BC2F3. Además, a lo largo de tres generaciones se verificó que la segregación se da según los principios mendelianos y los resultados son consistentes con lo esperado a partir de un único inserto.

El evento de algodón GHB811 puede ser detectado por PCR a través del análisis de ADN genómico extraído de materiales (semilla y/o grano, forraje, etc.) de algodón. El método de detección por PCR está validado y publicado por el JRC.

25 de mayo:

Se solicita la siguiente bibliografía para continuar el análisis:

Back, P.; 2016; M-572036-02-1 (AS)
Dreesen, 2015b; M-533573-02-1, (MM)
Dreesen, 2016; M-548778-02-1 (MR)
Van Hoecke, 2018; 17-RSCT0054
Van Hoecke, A.; 2017; M-581222-01-1 (MR)
Posadas EE, 2018; 18-TXTHS001-2
Wu, A. J.; 2016; M-547925-01-1 (AS)

7 de junio de 2021:

Se estudian 5 de los reportes solicitados. No están disponibles Van Hoecke, 2018; 17-RSCT0054 ni Posadas EE, 2018; 18-TXTHS001-2. El grupo queda a la espera de estos reportes para continuar el análisis del evento.

15 de junio de 2021

Se estudian Van Hoecke, 2018; 17-RSCT0054 y Posadas EE, 2018; 18-TXTHS001-2.

Para cerrar el informe está pendiente la presentación por parte de la empresa de los estudios de expresión de proteínas

8 de Marzo 2022

Se recibió la información solicitada referente a la expresión de proteínas. La misma resume lo siguiente:

Se determinó la expresión de las proteínas 2mEPSPS y HPPD W336, en plantas tratadas y sin tratar con herbicidas específicos. Los niveles de las proteínas se analizaron por ELISA a partir de hoja, raíz, polen, botón floral, cápsula, planta entera y semilla. No se observaron variaciones en los niveles de proteína entre los estados tratados y sin tratar. Los niveles de proteína 2mEPSPS determinados en los diferentes tejidos y polen variaron entre 12,86 a 1762 ug/g. Para el caso de la proteína HPPD los mismos variaron de 10.91 a 1673.89 ug/g siendo prácticamente indetectables en polen.

Conclusión:

El grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento GHB811 para su liberación comercial
