

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 MON 94313

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

Tipo de solicitud: Ensayos experimentales y liberación comercial (para consumo directo y/o procesamiento)

Fecha: 24 de setiembre de 2024

El Grupo GAHCIM se reunió en los Talleres de Trabajo convocados por la ERB en forma virtual 27 de febrero y 5 de marzo, y en forma presencial 2 de abril, 30 de julio y 24 de setiembre de 2024. Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las siguientes instituciones: DGSA-MGAP, INASE, LATU, MA, INIA, IP Montevideo y FCIEN - UDELAR.

Se analizó la información presentada para el evento en soja MON 94313

Genes y otros elementos introducidos

La soja MON 94313 es tolerante a herbicidas a base de glufosinato, dicamba, 2,4-D y mesotriona. Contiene el gen de fosfotricina N-acetiltransferasa (pat) de *Streptomyces viridochromogenes* que expresa la proteína PAT para conferir tolerancia a herbicidas a base de glufosinato, un gen de demetilasa (dmo) de *Stenotrophomonas maltophilia* que expresa una proteína dicamba monooxigenasa (DMO) para conferir tolerancia al herbicida dicamba, el gen ft_t.1, una versión modificada del gen R-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasa (RdpA) de *Sphingobium herbicidavorans* que expresa la proteína FT_T.1 (FOPs y 2,4-D dioxigenasa) para conferir tolerancia al herbicida 2,4-D, y el gen tdo de *Oryza sativa* que expresa la proteína tricetona dioxigenasa (TDO) para conferir tolerancia al herbicida mesotriona. No presenta secuencias o genes acompañantes adicionales a los cassettes de expresión mencionados.

Características de los organismos donantes

El gen *dmo* deriva de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*, aislada del suelo. *S. maltophilia* es ubicua en el ambiente. Se ha utilizado como agente de biocontrol en la patogénesis de plantas y animales. Puede formar biopelículas que se vuelven resistentes a los antibióticos. Se ha encontrado *S. maltophilia* en individuos sanos, sin observar ningún peligro para la salud humana y como patógeno oportunista en huéspedes inmunocomprometidos. Más allá de esto, no es conocida por su patogenicidad humana o animal. El historial de exposición a *S. maltophilia* ha sido revisado por múltiples agencias regulatorias en el mundo, durante la evaluación de eventos tolerantes a dicamba sin identificarse problemas de seguridad o alergenicidad por las agencias reguladoras (p. ej., MON 87429, MON 87419 y MON 87708).

El gen *pat* proviene de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes*. Las especies de *Streptomyces* están muy extendidas en el ambiente y no se consideran patógenas para plantas, humanos u otros animales. Este organismo se revisó ampliamente durante la evaluación de varios eventos de tolerancia al glufosinato (por ej., A5547-127, MON 87429 y MON 87419) y no se encontraron problemas de seguridad o alergenicidad identificados por las agencias reguladoras.

La soja MON 94313 contiene el gen *ft_t.1*, una versión modificada del gen *Rdpa* de *Sphingobium herbicidavorans*, que expresa la proteína FT_T.1. Una proteína casi idéntica, FT_T, se expresa en el maíz MON 87429. *S. herbicidavorans*, es una bacteria común del suelo, gram negativa, con forma de bastón, inmóvil y que no forma esporas. Es estrictamente aeróbica y quimioorganotrófica, y no se ha reportado que esté asociada con enfermedades humanas. Las propiedades de biosíntesis y biodegradación de este género han sido explotadas en la industria alimentaria, biorremediación y biocombustibles. A pesar de la presencia ubicua de especies de *Sphingobium* en el ambiente, no se conocen informes adversos de seguridad o alergenicidad.

El gen *tdo* proviene del arroz asiático (*Oryza sativa* subsp *japonica*). Es uno de los cultivos más importantes del mundo y sirve como fuente de alimento principal para más de la mitad de la población mundial. Cuenta con una larga historia como alimento humano y animal por lo que es considerado una fuente segura de alimento.

Métodos de transformación

La soja MON 94313 se desarrolló a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* de embriones de soja de la variedad de soja A3555. Luego de la transformación se utilizaron técnicas de cruzamiento, segregación, selección y cribado para aislar las plantas que contenían la secuencia del ADN-T I con los casetes de expresión *dmo*, *pat*, *ft_t.1* y *tdo*, pero no las secuencias ADN-T II o del esqueleto del plásmido o vector.

Se presentó el mapa circular del vector utilizado para el desarrollo conteniendo los dos ADN-T (I y II) y la descripción de los elementos genéticos presentes en el vector.

Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)

Como parte de la caracterización se midieron los niveles de expresión de las proteínas DMO, FT_T.1, PAT y TDO en diversos tejidos de soja MON 94313 mediante un inmunoensayo multiplex para las proteínas DMO, PAT y FT_T.1 y mediante un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) para la proteína TDO. Los niveles de expresión de proteínas introducidas se determinaron en tejidos relevantes y se pueden utilizar para evaluar la exposición en alimentos y piensos en humanos y animales. Se utilizó un diseño de bloques aleatorios con cuatro repeticiones durante el año 2020 en cinco localidades de los Estados Unidos. Los lugares elegidos para la siembra fueron representativos de las regiones productoras de soja. Las muestras incluyeron forraje, hojas (OSL1, OSL2, OSL3 y OSL4 (del inglés, *over season leaf*)); se recolectaron granos y raíces en cada parcela replicada de todos los sitios.

Se realizaron tratamientos con herbicidas dicamba, glufosinato, 2,4-D y mesotriona. El nivel medio de proteína DMO en la soja MON 94313 en todos los sitios fue más alto en OSL4 de hoja con 410 µg/g de masa seca (ms) y más bajo en la raíz con 20 µg/g de ms. El nivel medio de proteína DMO en los granos de soja MON 94313 fue de 40 µg/g ms.

El nivel medio de proteína PAT en la soja MON 94313 en todos los sitios fue más alto en la hoja OSL3 con 25 µg/g ms y más bajo en la raíz con 3,7 µg/g ms. El nivel medio de proteína PAT en la soja MON 94313 fue de 3,8 µg/g ms.

El nivel medio de proteína FT_T.1 en la soja MON 94313 en todos los sitios fue más alto en la hoja OSL4 con 28 µg/g ms y más bajo en la raíz con 4,1 µg/g ms. El nivel medio de proteína FT_T.1 en la soja MON 94313 fue de 6,1 µg/g ms.

El nivel medio de proteína TDO en la soja MON 94313 en todos los sitios fue más alto en la hoja OSL1 con 41 µg/g ms y más bajo en la raíz, <LOQ (por ej., 0,50 µg/g mseg para la raíz). El nivel medio de proteína TDO en la soja MON 94313 fue de 5 µg/g ms.

Caracterización molecular y estabilidad del ADN insertado

La caracterización molecular del evento de soja MON 94313 se realizó utilizando una estrategia de NGS (cobertura integral del genoma), combinada con análisis y mapeo bioinformático de las lecturas generadas, además de la secuenciación directa dirigida específicamente al *locus* de inserción y secuencias adyacentes. Se determinó el número de insertos de secuencias, la secuencia, identidad e integridad del ADN insertado, la presencia o ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido de transformación o cualquier otra secuencia no intencional del plásmido PV-GMHT529103, la integridad y organización del sitio de inserción en comparación con el *locus* del control convencional y la estabilidad generacional del ADN insertado a través de 5 generaciones de cruzamiento convencional.

La caracterización molecular de la soja MON 94313 se realizó mediante una combinación de secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis bioinformáticos. Los resultados muestran que la soja MON 94313 contiene una copia del ADN-T I previsto. Este presenta los casetes de expresión génica *dmo*, *pat*, *ft_t.1* y *tdo*. En conjunto, la caracterización de la modificación genética en la soja MON 94313 demuestra que una sola copia del ADN-T I se integró de manera estable en un solo *locus* del genoma de la soja. Ninguna secuencia del plásmido PV-GMHT529103 o del ADN-T II está presente en la soja MON 94313.

Análisis bioinformático

Con el objetivo de determinar si ocurrieron deleciones o rearrreglos en el sitio de inserción se realizó una secuenciación dirigida y el análisis de secuencia sobre el ADN genómico de la soja control A3555.

La PCR se realizó con cebadores específicos para la secuencia de ADN genómico que flanquea los extremos 5' y 3' del inserto en la soja MON 94313. La comparación de secuencias entre el producto de PCR generado a partir del control convencional y las secuencias flanqueantes 5' y 3' del inserto de MON 94313 indican que se eliminaron 40 bases de ADN genómico de soja durante la integración del ADN-T. Estos rearrreglos moleculares ocurren comúnmente durante la transformación de la planta y, muy posiblemente, ocurran como consecuencia de la acción de los mecanismos de reparación del ADN doble cadena de la planta durante el proceso de transformación mediado por *Agrobacterium*. El resto de las secuencias de ADN genómico de soja que flanquean el inserto en MON 94313 son idénticas al control convencional.

Como parte de una evaluación bioinformática integral de MON 94313, la secuencia de ADN genómico que flanquea el sitio de inserción del ADN-T se utilizó como secuencia de consulta para determinar si algún gen endógeno en el genoma de la soja resultó interrumpido y analizar los ORFs del genoma presentes en las regiones flanqueantes al inserto. Para ello, la secuencia flanqueante genómica adyacente al sitio de inserción de MON 94313 se utilizó como consulta en una búsqueda FASTA36 contra el genoma de referencia de soja de GenBank GMA_2021. Los resultados indicaron que no se alteró ningún elemento endógeno y que el ADN-T de MON 94313 se encuentra dentro del cromosoma 13 del genoma de la soja.

Alergenicidad y toxicidad

Se realizó un análisis bioinformático para evaluar el potencial de alergenidad, toxicidad o actividad biológica de los péptidos putativos codificados por la traducción de los seis marcos de lectura (ORF) de la secuencia de ADN-T insertada en MON 94313. Estas secuencias se tradujeron desde un codón de terminación hasta el siguiente, en los seis marcos de lectura. Se analizaron en búsquedas tanto en FASTA como en ventanas móviles de 8 aminoácidos contra la base de datos AD_2021, y una búsqueda FASTA contra las bases de datos TOX_2021 y PRT_2021.

La base de datos de alérgenos, gliadinas y gluteninas (AD_2021) fue generada a partir de la base de datos de acceso público denominada *Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) del Health and Environmental Sciences Institute (HESI)*. La base de datos PRT_2021 fue directamente descargada de la base de datos de proteínas GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Por otro lado, la base de datos TOX_2021 es un subconjunto de secuencias derivadas de la base de datos de proteínas Swiss-Prot la cual fue seleccionada mediante una búsqueda con palabras clave y filtrada para remover proteínas que, muy posiblemente, no presentaran actividad tóxica.

La similitud estructural de la secuencia de consulta con las secuencias de la base de datos se evaluó utilizando el algoritmo FASTA. Como valor de corte para determinar la significancia de los alineamientos obtenidos, se fijó el valor de E-score $\leq 1 \times 10^{-5}$. En general, los alineamientos entre dos secuencias requieren un valor de E-score menor o igual a $1e^{-5}$ (1×10^{-5}) para considerarse homólogos, es decir, para pensar que podrían reflejar la existencia de estructuras y funciones compartidas. Aunque todas las alineaciones se inspeccionaron visualmente,

cualquier secuencia alineada que obtuviera una puntuación E de $\leq 1e-5$ se analizó en mayor detalle para determinar si representaba una homología de secuencia relevante. Para profundizar la evaluación, se aplicó un enfoque conservador adicional; las secuencias se identificaron como potencialmente reactivas cruzadas si la identidad lineal es superior al 35% en una superposición de aminoácidos ≥ 80 (*Codex Alimentarius*, 2009).

Para las búsquedas de aminoácidos de ventana móvil, las secuencias de aminoácidos analizadas que contenían menos de 80 aminoácidos de longitud se consultaron tal cual. Los que contenían más de 80 aminoácidos se dividieron en ventanas de 80 aminoácidos superpuestas antes del alineamiento. Se realizaron búsquedas en ventanas móviles de 80 aminoácidos utilizando FASTA con un valor de corte inicial E-score de 100 y luego se evaluaron los alineamientos obtenidos para identificar si alguna secuencia produce un alineamiento que contenga las 29 coincidencias requeridas para superar el umbral del 35% de identidad que se cree que indica un potencial de cruzamiento alergénico reactividad (*Codex Alimentarius*, 2009).

Evaluación de homología con AD_2021

Ninguna de las secuencias de los seis marcos traducidos produjo una alineación con una puntuación E de $\leq 1e-5$ al usar la base de datos AD_2021 para realizar una búsqueda FASTA. Ninguna alineación de FASTA alcanzó o excedió el umbral del *Codex* de más del 35 % sobre 80 aminoácidos.

Cuando se sometió a una búsqueda deslizante de 8 unidades en la base de datos AD_2021, el ORF 4 arrojó una única coincidencia de 8 unidades con AKJ77987.1 descrita como “*Allergen Tri a 43; desconocido*” de *Triticum aestivum*. Sin embargo, los únicos productos de traducción esperados de la inserción de T-DNA en MON 94313 están codificados en los ORF 3, 2 y 1 respectivamente. Además, no hay un inicio de metionina contextualmente apropiado aguas arriba de este motivo. En consecuencia, no hay evidencia que sugiera que el péptido putativo que contiene la coincidencia única de 8 aa con AKJ77987.1 se produce en la planta, ni que ese epítipo específico sería capaz de provocar una respuesta alérgica independientemente.

Evaluación de la homología con TOX_2021 y PRT_2021

Ninguna de las secuencias de los seis marcos traducidos produjo alineaciones con una puntuación E de $\leq 1e-5$ al usar la base de datos TOX_2021 para realizar una búsqueda FASTA.

Cinco de los marcos traducidos produjeron alineaciones con puntajes E de $\leq 1e-5$ cuando se usó la base de datos PRT_2021 para realizar una búsqueda FASTA.

Las alineaciones de cada uno de los marcos traducidos (1-6), aunque identifican positivamente algunas proteínas, no indican ningún potencial de actividad biológica adversa. En consecuencia, no hay motivo para sospechar que se esperaría que alguna proteína, traducida o putativa, contribuya a efectos biológicos adversos.

En resumen, estos datos indican que no se observaron similitudes de secuencia biológicamente relevantes entre los seis marcos de lectura traducidos del ADN-T y alérgenos, toxinas o proteínas biológicamente activas asociadas con efectos adversos para humanos o la salud animal. Aparte de la traducción de DMO, FT_T.1, TDO y PAT, no existe evidencia que indique que se traduzca ninguna otra secuencia del ADN-T. Más bien, los resultados de estos análisis bioinformáticos

indican que en el improbable caso de que alguna de las secuencias analizadas en este documento se encuentre en la planta, o que ocurriera una traducción de la secuencia distinta a la de los productos previstos, ninguna compartiría similitud o identidad significativa con alérgenos conocidos, toxinas u otras proteínas biológicamente activas que podrían afectar la salud humana o animal.

Método de detección

El protocolo para la detección del evento MON 94313, basado en la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real, está validado y publicado en la página web del JRC.

Conclusión:

El grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento Soja MON 94313 para ensayos experimentales. Para su liberación comercial es necesario analizar los resultados bioinformáticos de alergenidad y toxicidad con bases de datos actualizadas.

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 MON 94313

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

Tipo de solicitud: Liberación comercial (para consumo directo y/o procesamiento)

Fecha: 27 de mayo de 2026

El Grupo GAHCIM se reunió en los Talleres de Trabajo convocados por la ERB en forma virtual los días 12 y 19 de mayo de 2026. Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las instituciones: DGSA-MGAP e INIA.

En setiembre de 2024, el grupo GAHCIM analizó la información presentada para el evento Soja MON94313 y no identificó riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento para ensayos experimentales. Para su liberación comercial solicitó analizar los resultados bioinformáticos de alergenicidad y toxicidad con bases de datos actualizadas (ver informe GAHCIM del 24 de setiembre de 2024). A la fecha el grupo GAHCIM no ha recibido la información solicitada.

Dado que las proteínas PAT y DMO expresadas por el evento Soja MON 94313, ya fueron evaluadas en otros organismos vegetales genéticamente modificados que fueron aprobados en Uruguay y su seguridad ha sido extensamente establecida en evaluaciones previas, se analizarán únicamente las nuevas proteína FT_T.1 y TDO.

Alergenicidad

A partir de las secuencias de las proteínas FT_T.1 y TDO presentadas en el *dossier* se realizó el análisis bioinformático utilizando el programa COMPASS a partir de la base de datos de acceso público denominada *Comprehensive Protein Allergen Resource* (COMPARE) del *Health and Environmental Sciences Institute* (HESI).

La similitud estructural de la secuencia de consulta con las secuencias de la base de datos se evaluó utilizando el algoritmo FASTA. Como valor de corte para determinar la significancia de los alineamientos obtenidos, se fijó un valor de *E-value* ≤ 10 .

Al analizar las proteínas FT_T.1 y TDO no hubo alineamientos que alcanzaran o superaran el umbral establecido de identidad lineal superior al 35% en una superposición de aminoácidos ≥ 80 , en las búsquedas con ventanas de 80 aminoácidos superpuestas mediante FASTA en la base de datos COMPARE (2026). Tampoco se encontraron alineamientos en las búsquedas de ventana móvil de 8 aminoácidos.

En conclusión, los análisis de búsqueda FASTA y de ventana móvil de 8 aminoácidos indican que no se observaron similitudes de secuencia biológicamente relevantes entre alérgenos conocidos y las proteínas FT_T.1 y TDO.

Toxicidad

Dado que no se cuenta con una base de datos de acceso público que reúna las secuencias de proteínas que presentan actividad tóxica no se realizaron los análisis a partir de las secuencias de las proteínas presentadas en el *dossier*.

En el informe EFSA del evento Soja MON 94313 (EFSA GMO Panel, 2026) publicado en enero del presente año consta que los análisis bioinformáticos actualizados confirmaron que las proteínas DMO, PAT, FT_T.1 y TDO no presentan similitudes significativas con toxinas conocidas.

Además, en el informe EFSA se presentan resultados de ensayos de evaluación *in vivo* de toxicidad aguda, subaguda y subcrónica para las nuevas proteínas FT_T.1 y TDO que fueron analizados por el grupo GAHSHA, sin identificar probables efectos adversos a la salud humana y animal (ver informe GAHSHA del 24 de abril de 2026).

Conclusión:

El grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento Soja MON 94313 para su liberación comercial.

Referencias:

EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), 2026. Scientific Opinion on the Assessment of genetically modified soybean MON 94313 (application GMFF-2022-6595). EFSA Journal 2026; 24(1): 9843, 37 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2026.9843>

Informe GAHCIM Soja MON 94313, 24 de setiembre de 2024.

Informe GAHSHA Soja MON 94313, 24 de abril de 2026.