

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 DBN08002-3

Tipo de liberación: Comercial

El Grupo GAHCIM se reunió virtualmente convocado por la ERB los días 27 de abril y 4 de mayo de 2021; el 28 de febrero y 22 de agosto de 2023.

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

Se analizó la información presentada para el evento en soja DBN08002-3.

El evento de soja DBN-08002-3 contiene dos genes principales: el gen *pat* y el gen *Vip3Aa19*. El gen *pat* expresa la enzima N-fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT) de *Streptomyces viridochromogenes*, cuya actividad consiste en inactivar por acetilación el principio activo de los herbicidas basados en glufosinato de amonio. Esta propiedad se utilizó para la selección de los transformantes durante el proceso de desarrollo del evento. El gen *Vip3Aa19* expresa la proteína insecticida Vip3Aa19, que se produce en la fase de crecimiento vegetativa de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88, y le otorga al evento en consideración el genotipo de resistencia a ciertas especies de insectos lepidópteros.

La soja DBN08002-3 confiere resistencia al menos a 14 especies de insectos *Lepidoptera*, incluyendo: *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Clanis bilineata*, *Etiella zinckenella*, *Argyrogramma agnate*, *Agrotis ypsilon*, *Chrysodeixys includens*, *Rachiplusia nu*, *Anticarsia gemmatalis*, *Helicoverpa gelotopon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmioides* y *Crosidosema aporema*.

Características de los organismos donantes

Los organismos donantes *Bacillus thuringiensis* cepa AB88, *Streptomyces viridochromogenes*, *A. tumefaciens*, *A. thaliana* y Virus del Mosaico del coliflor no son patógenos, ni presentan alergenicidad o toxicidad.

Todos los elementos genéticos del plásmido utilizado para obtener el evento en consideración son de origen sintético.

Método de transformación

La soja DBN-08002-3 fue obtenida por transformación mediada por *Agrobacterium* de nudos cotiledonares. El vector de transformación, pDBN4006, se obtuvo subclonando dos casetes de expresión en tándem. El primer casete, asociado a la proteína Vip3Aa19 consiste en el promotor de *Actina2* de *Arabidopsis thaliana* (AtAct2), la secuencia codificante del gen *Vip3Aa19* de *B. thuringiensis* (*mVip3Aa*) y la secuencia terminadora del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* (tNos). El segundo casete, asociado a la proteína PAT, consiste en el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (pr35S), la secuencia codificante de la fosfinotricina N-acetiltransferasa de *Streptomyces* (cPAT) y el terminador 35S del Virus del Mosaico del Coliflor (t35S). El vector de origen a su vez contiene los bordes de la región del ADN-T del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, necesarias para la transferencia del ADN-T al genoma de las células vegetales.

Genes y otros elementos introducidos

Además de las secuencias de los genes *Vip3Aa19* y *pat* introducidos, junto con los elementos regulatorios, el evento DBN-08002-3 presenta únicamente las secuencias bNLB y bNRB, correspondientes a los bordes izquierdo y derecho, respectivamente, del plásmido Ti de *Agrobacterium*. No se han incorporado otros elementos no deseados del vector.

Caracterización molecular y estabilidad del ADN insertado

Mediante Southern blot utilizando sondas específicas para cada gen se comprobó que el evento DBN-08002-3 contiene un único inserto. Además, se pudo determinar que presenta una única copia de los genes *Vip3Aa19* y *pat*. La secuencia del inserto en el evento de soja DBN-08002-3 fue obtenida a través de una serie de productos de PCR superpuestos. Los resultados de este análisis indican que no se incorporaron porciones de genes.

Las secuencias flanqueantes del inserto en el evento DBN-08002-3 se obtuvieron a partir de la generación T0 utilizando TAIL-PCR. Para ello, se sintetizaron oligonucleótidos específicos basados en las secuencias de los bordes del ADN-T y primers degenerados utilizando ADN genómico del evento DBN-08002-3 como molde. Los amplicones resultantes fueron secuenciados para obtener las secuencias flanqueantes del inserto.

Mediante mapeo sobre el genoma de soja utilizando BLASTN se determinó que la inserción del ADN-T ocurrió en un único locus del cromosoma 03 y no interrumpió ningún gen ni otro elemento genético anotado del genoma de soja (*Glycine max* Wm82.a2.v1). La inserción fue localizada a 6563 pb de la región 5' del gen putativo más próximo, y 3462 pb de la región 3' del gen putativo más próximo. Se produjo una deleción de 6 pb en el locus de inserción. Este fragmento de 6 pb está en una región intergénica y no interrumpe ningún gen o secuencia anotada. Tales cambios son comunes durante la transformación y presumiblemente resultan del mecanismo de reparación de la doble cadena durante el proceso de transformación mediado por *A. tumefaciens*.

Se comprobó la estabilidad del ADN-T y la integridad de la composición de la secuencia a lo largo de seis generaciones, el análisis de segregación y la estabilidad genética. También se evaluó la estabilidad fenotípica de la resistencia a los insectos y la tolerancia a los herbicidas. Se verificó

una eficacia alta y estable frente a *Spodoptera exigua* en las generaciones T2, T4, T6 y T8 con el fondo genético Jack, la generación BC2F3 bajo el fondo SY001 y la generación BC1F3 bajo el fondo SY048.

Análisis bioinformático

Todos los péptidos putativos fueron analizados en búsqueda de homologías con proteínas conocidas utilizando el algoritmo BLASTp y la base de datos de proteínas de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se detectaron 85 péptidos putativos que resultaron tener entre 8 y 789 aminoácidos. Solo 4 de ellos poseen 100 o más aminoácidos. Dos de esos 4 péptidos con 100 o más aminoácidos corresponden a los productos de expresión esperados: Vip3Aa19 (Péptido 6) y PAT (Péptido 11). De los otros dos péptidos con más de 100 aminoácidos, el 37 resultó ser similar a la proteína de la matriz del cuerpo de inclusión del virus del mosaico del coliflor, y el 45 no mostró homología con ninguna proteína registrada en la base de datos NCBI.

La alergenicidad fue evaluada comparando la secuencia aminoacídica con las de alérgenos agrupados en la base de datos AllergenOnLine (www.allergenonline.org). Los análisis presentados se realizaron con la base de datos FARRP2023. No se encontró una identidad de secuencia superior al 35 % con ningún alérgeno en la base de datos FARRP cuando se analizaron las secuencias obtenidas usando una ventana deslizante de 80 aminoácidos contiguos. De manera similar, cuando se comparó una ventana deslizante de 8 aminoácidos contiguos no se encontró identidad de secuencia con epítodos alergénicos en la base de datos.

La toxicidad potencial de todos los péptidos putativos se evaluó en 2023 utilizando la base de datos ToxDB mediante BLASTp (puntuación $E < 1 \times 10^{-5}$). Se obtuvieron un total de 30 coincidencias. El análisis de estos resultados reveló que todos ellos son proteínas Vip3 o componentes de la familia GNAT. Un análisis posterior reveló que los ORF (ORF6 y ORF11) correspondientes a los 30 resultados coincidentes se ubican dentro del gen mVip3Aa y pat.

Más allá de estas similitudes, teniendo en cuenta la larga historia de uso seguro establecido de Vip3Aa y PAT, y estudios de toxicidad desarrollados previamente, es poco probable que estos péptidos putativos resulten tóxicos para humanos o animales.

Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)

Para determinar los niveles de los nuevos productos de expresión en la soja DBN-08002-3, se utilizaron muestras provenientes de tres ensayos a campo realizados durante 2018 en tres sitios de China, representativos de las regiones de producción comercial de soja en ese país. Se tomaron muestras en tres estadios diferentes del ciclo del cultivo: R2 (raíz, tallo, hoja y flor), R6 (raíz, tallo, hoja) y R8 (grano). Los niveles de Vip3Aa19 y PAT se cuantificaron utilizando kits de ELISA comerciales. Los resultados de estos ensayos mostraron que las proteínas Vip3Aa19 y PAT se expresan en todos los tejidos de soja DBN-08002-3 analizados, y están ausentes en las muestras de la variedad control Jack. Los niveles de Vip3Aa19 en los diferentes tejidos y estadios de soja DBN-08002-3 fueron de 0,46 – 15,47 $\mu\text{g/g}$ peso seco, valores que están dentro de los reportados en literatura (ILSI, 2012). En cuanto a la proteína PAT, también estuvo presente en todos los tejidos y estadios analizados, y los niveles medidos fueron de 40,23 – 244,31 $\mu\text{g/g}$ peso seco. Estos valores son similares a los encontrados en otros eventos comercialmente aprobados que expresan esta proteína (CERA, 2011).

Método de detección

La soja DBN-08002-3 puede ser detectada y cuantificada de manera evento- específica, utilizando técnicas de PCR y *primers* específicamente diseñados para ello. El 28 de febrero fue enviada la información confidencial con método de detección detallado. El material de referencia está a disposición de las autoridades regulatorias y será entregado ante su requerimiento.

El grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento DBN-08002-3 para su liberación comercial.
