

Grupo Ad Hoc sobre CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR (GAHCIM)

Información requerida para la caracterización molecular de los eventos en desarrollo nacionales para evaluación confinada de campo:

1. Información general del evento (especie, gen de interés, característica introducida). Describir la construcción genética detallando con qué metodología se obtuvo, el gen de interés e información sobre alergenicidad y toxicidad.
2. Indicar qué tipo de resistencias a antibióticos pudieron ser introducidas.
3. Detallar el protocolo molecular de identificación del evento que lo diferencia del cultivo sin modificar y mostrar evidencia de que funcione. En caso de ser necesario se deberá proveer material para usar como control positivo.

Evento: Soja OE01 y OE04

Tipo de liberación: evaluación confinada de campo de evento nacional en desarrollo nacionales.

Fecha: 04/10/2022

El Grupo GAHCIM se reunió en la reunión virtual de Trabajo convocada por la ERB el 27 de setiembre y el 4 de octubre de 2022

Participaron en la elaboración del informe: MSc. Fabiana Rey (LATU), Lic. Bioq. Mariana Richero (DGSA-MGAP), Dra. Analía Sanabria (DINACEA- MA).

Se analizó la información presentada para soja Williams 82, eventos en desarrollo OE01 y OE04.

1.1 Información general del evento

El evento OE-1 y el evento OE-4, corresponden a eventos de soja (*Glycine max*), cultivar Williams 82, transformado con una construcción génica que expresa la región codificante (cDNA) del gen OsDIAT de arroz (LOC_Os05g15530). El gen OsDIAT se expresa a partir del promotor p35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV) . Como región 3' no traducida, se utilizó el terminador del gen PinII de arroz.

OsDIAT codifica una proteína con un dominio aminotransferasa, con similitud de secuencia con aminotransferasas involucradas en el síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina). Confiere tolerancia a sequía a través de promover la acumulación de aminoácidos de cadena ramificada (Branched Chain Amino Acids: BCAA). Los BCAAs actúan como osmolitos compatibles en condiciones de déficit hídrico.

Se ha sugerido que, en condiciones de escasez de energía inducida por condiciones de estrés, los BCAA pueden catabolizarse en el ciclo TCA para generar energía, prevenir la acumulación de metabolitos tóxicos o funcionar como sustrato respiratorio alternativo. Las BCAA aminotransferasas (BCAT) catalizan el último paso de la síntesis y/o el primer paso de la degradación de los BCAA, que en las plantas se producen en los cloroplastos o en las mitocondrias, respectivamente.

En segundo lugar, la construcción expresa el gen *bar*, como marcador de selección en cultivo de tejidos. El gen *bar*, de *Streptomyces hygroscopicus*, en el cassette de expresión está bajo el

control del promotor 35S (al igual que OsDIAT) y el terminador Nos (3'Nos). Confiere resistencia al herbicida Basta (glufosinato de amonio) en las plantas transgénicas. El gen *bar* es parte de la ruta de biosíntesis de un antibiótico tripéptido que se compone de fosfotricina (PPT), que es un inhibidor irreversible de la glutamina sintetasa, y dos residuos de L-alanina. El glufosinato de amonio es el PPT sintetizado químicamente y se utiliza como herbicida no selectivo

La secuencia codificante del gen OsDIAT (cDNA), fue clonada en los sitios de restricción *Xba*I y *Pac*I de un vector binario derivado del vector pPZP200, conteniendo el cassette de expresión de resistencia a glufosinato de amonio. La construcción resultante se denominó 35D35B (pPZP35S-DIAAT_35S-BAR). Se presenta el mapa del vector en el dossier.

Se empleó el método de transformación de soja basado en el protocolo utilizado por el grupo de la Universidad Estatal de Iowa, en el que se utilizan semillas embebidas durante 20 horas diseccionadas en explantes de media semilla para exponer el nódulo cotiledóneo antes de la inoculación con *Agrobacterium*.

Se evaluó la configuración final del transgén en las plantas de soja transgénica DIAT mediante una PCR superpuesta utilizando tres conjuntos de cebadores específicos de genes (detallados en el dossier).

1.2 Alergenicidad y toxicidad

La secuencia completa de aminoácidos de DIAT no presenta homología con las secuencias de la base de datos de productos de patógenos o alérgenos conocidos.

La evaluación de cada alineamiento resultante utiliza el criterio mínimo de al menos 80 aminoácidos de longitud de alineamiento con una identidad de aminoácidos compartida superior al 35 %. Cualquier alineamiento que exceda estos criterios para la similitud de secuencia compartida indica el potencial de similitud de secuencia inmunológicamente relevante (Comisión del Codex Alimentarius, 2009). Además, cualquier coincidencia de ocho (o más) aminoácidos contiguos idénticos entre la secuencia de aminoácidos de DIAT y cualquier secuencia en la base de datos de alérgenos podría indicar la posibilidad de una similitud de secuencia inmunológicamente relevante.

A partir de los resultados, no se observó una similitud de secuencia significativa entre la secuencia de aminoácidos de DIAT y cualquier entrada en la base de datos FARRP AllergenOnline (2021) Además, no se observaron coincidencias entre ninguna secuencia de ocho o más aminoácidos contiguos de DIAT y ninguna entrada en la base de datos FARRP AllergenOnline (2021).

2. Indicar qué tipo de resistencias a antibióticos pudieron ser introducidas

No se emplean antibióticos en el desarrollo de los eventos OE-1 y OE-4.

3. Detallar el protocolo molecular de identificación del evento que lo diferencia del cultivo sin modificar y mostrar evidencia de que funcione. En caso de ser necesario se deberá proveer material para usar como control positivo.

Se presenta el protocolo validado de detección específica de los eventos OE-1 y OE-4 basado en PCR a tiempo final, detallando condiciones de amplificación, primers y tamaño esperado del amplicón, a partir de ADN genómico de hojas.

En base a la información presentada el grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular de los eventos en desarrollo Soja OE01 y OE04 para su evaluación confinada de campo.
