

Grupo *Ad Hoc* sobre CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR (GAHCIM)

El Grupo GAHCIM se reunió en los Talleres de Trabajo convocados por la ERB, en IIBCE el día 27 de mayo, en DILAVE-MGAP el día 17 de junio de 2016 y en DGSA-MGAP el 26 de enero de 2017.

Participaron en la elaboración del informe: Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza (INIA), Lic. Bioq. Fabiana Rey (LATU), Biól. Molec. MSc. Ana Paula Mulet (IP), Lic. Bioq. Mariana Menoni (INASE), Lic. Bioq. MSc. Paola Russi (IIBCE).

Soja MON 89788 × MON 87708 x MON 87751 x MON87701

El evento apilado fue generado por cruzamiento convencional de variedades de soja que contienen los eventos individuales MON 89788, MON 87708, MON 87751 y MON87701. El apilado presenta tolerancia a los herbicidas glifosato (CP4 EPSPS) y dicamba (DMO), y resistencia a lepidópteros debido a la expresión de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 y Cry1Ac. Los eventos individuales MON 89788, MON 87708 y MON 87701 ya fueron estudiados por el grupo GAHCIM, por lo cual el presente informe se centrará en el estudio de MON 87751 y su interacción en el apilado.

El evento MON87751 expresa las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2, derivadas de *Bacillus thuringiensis*, que confieren protección contra el ataque de ciertos insectos lepidópteros. La expresión del gen Cry1A.105 se encuentra regulada por el promotor y secuencia líder de la familia génica *rbcS* (*P-RbcS4*) de *Arabidopsis thaliana*. Contiene una secuencia de localización al cloroplasto, proveniente de la misma familia génica. La expresión del gen Cry2Ab2 es regulada mediante la secuencia del promotor del gen de actina de *Arabidopsis thaliana* y también contiene una secuencia de localización al cloroplasto.

Se brinda en forma clara el mapa y la información de las secuencias que constituyen el vector empleado en la transformación de MON 87751 mediante *Agrobacterium tumefaciens*. El vector de transformación contiene 2 T-DNA, que se integran de manera independiente en el genoma. El T-DNA I contiene los genes *cry* y el T-DNA II contiene los marcadores de selección (*aadA* y *spA*). Para evitar la presencia de estos marcadores de selección en el producto final, se utilizaron técnicas de cruzamiento convencional, segregación, selección y screening, seleccionando las plantas que sólo contienen el T-DNA I.

La caracterización molecular del evento MON 87751 se realizó utilizando conjuntamente técnicas de NGS (del inglés, *Next Generation Sequencing*) y un análisis bioinformático para detectar las secuencias de unión del inserto con el genoma o JSA (del inglés, *Junction Sequence Analysis*). Esta técnica permite determinar el número de insertos en el genoma y número de copias de los genes insertados. Se constató la presencia del inserto en copia única, no verificándose otras secuencias del vector. Además, se realizó la amplificación por PCR y secuenciación específica del inserto, para conocer su secuencia nucleotídica completa. Se corroboró que no hayan sucedido rearrreglos o deleciones durante la integración del inserto, mediante la secuenciación directa del producto de amplificación del sitio de inserción del *cassette* en el genoma de la soja control.

Los ensayos de caracterización molecular fueron realizados en R3, mediante la técnica NGS/JSA. Para determinar la estabilidad del inserto se evaluaron 4 generaciones (R4, R5, R6, R7), que fueron comparadas con R3.

Los resultados de los análisis bioinformáticos de generación de nuevos ORF (del inglés, *Open Reading Frame*) indican que podrían generarse, pero es poco probable que se expresen en la planta por carecer de las estructuras genéticas necesarias. De todas formas se analizó su homología con proteínas presentes en las bases de datos de alérgenos, toxinas y otras proteínas, no encontrándose similitudes relevantes, siguiendo los lineamientos y umbrales de significancia establecidos por el *Codex Alimentarius*. Este análisis fue verificado tanto para el MON 87751 como para el evento apilado.

Se revisó la información presentada en Chinnadurai y Phil (2014) sobre los niveles de expresión de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1Ac, DMO y CP4 EPSPS en tejidos de soja MON 87751 × MON 87701 × MON 87708 × MON 89788 comparados con los valores obtenidos para los eventos individuales correspondientes, usados como controles. No se realizan observaciones sobre la información presentada.

El evento MON 87751 no cuenta con el protocolo de detección y cuantificación validado por el Laboratorio de Referencia JRC-CRL, pero fue suministrado por la empresa solicitante.

Se solicita especificar en qué generación se realizó el estudio de estabilidad de los insertos en el apilado y la documentación que lo respalde, ya que no se observa en la información presentada (Chen *et al.*, 2014). En caso de que se haya realizado en R3 o una generación más avanzada se considera adecuado.

El grupo GAHCIM se reunió en el Taller de Trabajo convocado por la ERB el 26 de enero de 2017 en DGSA-MGAP. Entre los temas analizados en dicha oportunidad, se verificó que los estudios de estabilidad de los insertos en el apilado se realizaron en la quinta generación (información presentada por el solicitante en Expediente No. 2017/7/1/1/703 del 24/01/17).

En conclusión, el grupo no presenta objeciones en cuanto a la caracterización e identificación molecular para la autorización del evento en soja, MON89788XMON87708XMON87751XMON87701, para su uso ya sea bajo condiciones controladas de bioseguridad (ensayos de investigación y para el registro nacional de cultivares por INASE) o a nivel comercial.