

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 Maíz MON 95379-3

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

Fecha: 12 de noviembre de 2024

El Grupo GAHCIM se reunió en reuniones virtuales de trabajo convocadas por la ERB los días 23 de marzo, 6 y 20 de abril de 2021, 20 de setiembre de 2022 y 12 de noviembre de 2024.

Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las siguientes instituciones: INIA, LATU, Instituto 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 Maíz MON95379-3.

Genes y otros elementos introducidos

El maíz portador del evento MON 95379 fue obtenido mediante técnicas de biotecnología moderna. El inserto de ADN introducido en el maíz MON 95379 contiene los cassettes de expresión cry1B.868 y cry1Da_7, que codifican las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da_7 respectivamente. Las secuencias codificantes de ambas proteínas derivan de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* (Bt), y otorgan al maíz MON 95379 la característica de protección frente al daño ocasionado por plagas blanco de insectos lepidópteros. Las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da_7, al igual que las demás proteínas pertenecientes a esta familia, confieren control de insectos al formar poros en el tracto intestinal del insecto que conducen a retraso en el desarrollo y/o muerte del mismo.

Según se reporta, el maíz MON 95379 no presenta secuencias o genes acompañantes adicionales a los cassettes de expresión mencionados. El vector de transformación contenía un solo ADN de transferencia que incluía los cassettes de expresión cry1B.868 y cry1Da_7 y un cassette de expresión del gen cp4 epsps como marcador de selección. Se utilizó un sistema de recombinación Cre/lox para retirar el cassette del marcador de selección, seleccionando posteriormente solamente aquellas plantas que contenían los cassettes de expresión cry1B.868 y cry1Da_7, sin secuencias del esqueleto del vector o del cassette marcador de selección cp4 epsps.

Caracterización molecular y estabilidad del ADN insertado

La caracterización molecular del evento de maíz MON 95379 se realizó utilizando una estrategia de secuenciación de alta procesividad o NGS combinada con el análisis y mapeo bioinformático de las lecturas generadas. Esto permite detectar las secuencias de unión entre el inserto y el genoma de la planta y así determinar el número de insertos presentes en el genoma de maíz.

Además, para completar el análisis, se realizó secuenciación directa del inserto y del sitio de inserción en el genoma del maíz. De esta forma se pudo verificar:

- 1) Que existe un único inserto de ADN proveniente del plásmido de transformación.
- 2) La identidad e integridad de la secuencia insertada.
- 3) La ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido de transformación u otras secuencias

no intencionales.

- 4) La integridad y organización de la secuencia del sitio de inserción comparado con el locus control.
- 5) La estabilidad del ADN insertado a través de 3 generaciones de cruzamiento convencional.

Se analizó la información presentada sobre el análisis de segregación del inserto en tres generaciones de maíz, demostrando un único sitio de inserción y herencia mendeliana. El evento MON 95379 ha demostrado ser estable y no se ha detectado reversión o pérdida de material genético en las generaciones analizadas.

Análisis bioinformático

La secuencia de ADN-T se tradujo en seis marcos de lectura. Cada secuencia traducida se comparó mediante búsquedas FASTA y de ventana deslizante en la base de datos AD_2024 y búsquedas FASTA en las bases de datos TOX_2024 y PRT_2024. Los resultados indican que no se observaron similitudes de secuencias biológicamente relevantes entre los seis marcos de lectura traducidos del ADN-T y los alérgenos, toxinas o proteínas biológicamente activas asociadas con efectos adversos para la salud humana o animal. Aparte de la traducción de Cry1Da_7 y Cry1B.868, no existe evidencia que indique que se traduzca alguna otra secuencia del ADN-T. 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 de que se produjera la traducción de una secuencia distinta de Cry1Da_7 y Cry1B.868, ninguna compartiría similitud o identidad significativa con alérgenos, toxinas u otras proteínas biológicamente activas conocidas que pudieran afectar la salud humana o animal.

Para determinar si algún ORF endógeno resultó interrumpido por la inserción del ADN-T en el maíz MON95379 y analizar los ORFs del genoma del maíz presentes en las regiones flanqueantes al inserto, se evaluó la secuencia de ADN del sitio de inserción y las regiones flanqueantes mediante los análisis bioinformáticos BLASTn y BLASTx. En conjunto, los resultados de la evaluación bioinformática BLASTn y BLASTx indican que es poco probable que un ORF endógeno haya resultado interrumpido en el sitio de inserción del ADN-T en el maíz MON 95379. Se encontró un ORF predicho en la secuencia que flanquea el sitio de inserción, sin embargo, se trata de una secuencia hipotética y pobremente caracterizada. Cabe notar que la inserción del ADN-T no interrumpe directamente esta secuencia hipotética, y se desconoce si su proximidad pudiera afectarla.

Además, se analizó la existencia de similitudes de secuencia biológicamente relevantes entre las supuestas secuencias de unión de flanco traducidas y alérgenos, toxinas o proteínas biológicamente activas asociadas con efectos adversos para la salud humana o animal. Los resultados de estos análisis bioinformáticos indican, que en el improbable caso de que cualquiera de las supuestas secuencias de unión de flanco analizadas se encuentre en planta, o se produzca la traducción de una secuencia distinta de Cry1Da_7 y Cry1B.868, ninguna compartiría similitudes significativas o identidad con alérgenos conocidos, toxinas u otras proteínas biológicamente activas que podrían afectar la salud humana o animal.

Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)

Las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da_7 derivan de elementos genéticos que codifican las proteínas cristalinas (Cry) que se expresan como inclusiones parasporales (δ endotoxinas) en la bacteria *Bacillus*

thuringiensis (Bt). Como se mencionó previamente, la proteína Cry1B.868 en MON 95379 es una proteína quimérica que contiene dominios derivados de las proteínas Cry1 salvaje de las subclases Cry1A, Cry1B, y Cry1C las cuales se expresan de manera nativa en Bt. Para mejorar la actividad insecticida de Cry1Da, Cry1Da_7 se diseñó con pequeños cambios de aminoácidos. La actividad insecticida mejorada debido a pequeñas diferencias de aminoácidos se ha descrito previamente. La proteína Cry1Da_7 en MON 95379 comparte un nivel alto (99.7%) de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína Cry1Da. Las proteínas de la subclase Cry1Da se coexpresan de forma nativa junto con Cry1Ab y Cry1Ca en Bt subsp. *aizawai*, que es el ingrediente activo en varias formulaciones comerciales de biopesticidas.

Los niveles de expresión de las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da_7 fueron determinados mediante un ensayo validado de ELISA usando como referencia las mismas proteínas Cry1B.868 y Cry1Da_7 producidas en *Bacillus thuringiensis*. Los niveles de proteína (ng/ml) fueron determinados: en hoja en dos estadios (Hoja 1 y Hoja 4), raíz en dos estadios (Raíz 1 y Raíz de Forraje), estigma, polen, forraje y grano, con resultados iguales o superiores al Límite de Cuantificación (LC) convertidos a microgramo por gramo ($\mu\text{g/g}$) de peso fresco (pf). La media para la proteína Cry1B.868 en el maíz MON 95379, considerando las cinco localidades analizadas de la zona de producción maicera de los Estados Unidos, presentó su valor más elevado en las muestras de hoja (Hoja 1) con $630 \mu\text{g/g}$ ps, mientras que el valor más bajo se encontró en raíz de forraje con $22 \mu\text{g/g}$ ps. La media de proteína Cry1B.868 en grano de MON 95379 fue de $26 \mu\text{g/g}$ ps. La media para la proteína Cry1Da_7 en el maíz MON 95379, considerando las cinco localidades analizadas de la zona de producción maicera de los Estados Unidos, a través de todos los sitios presentó su valor más elevado en las muestras de hoja (Hoja 1) con $92 \mu\text{g/g}$ ps, mientras que el valor más bajo se encontró en polen, por debajo del LC. La media de proteína Cry1Da_7 en grano de MON 95379 fue de $0.25 \mu\text{g/g}$ ps.

Método de detección

El evento de maíz MON 95379 puede ser detectado por PCR utilizando semilla, grano, forraje y todo subproducto que contenga ADN de maíz con un mínimo grado de integridad que permita su amplificación. Se presenta el protocolo validado de detección específico para el evento MON 95379 basado en la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. El protocolo para la detección del evento MON 95379, se entrega como Información Confidencial.

El grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento Soja MON 95379 para ensayos experimentales, producción comercial de semillas, consumo directo o procesamiento.