

## 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 de ADN insertado
- Análisis bioinformático
- Estabilidad del ADN insertado
- Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)
- Análisis de posibles interacciones

**Evento: Maíz DP 910521-2**

**Tipo de liberación: Comercial**

**Fecha: 20 de mayo de 2025**

El Grupo GAHCIM convocado por la ERB se reunió en LATU el 28 de febrero y el 28 de marzo de 2023 en DGSA de manera presencial. Los días 7, 14 y 21 de marzo y 11 de julio de 2023 se realizaron reuniones virtuales. El 20 de mayo de 2025 se analizó la información actualizada sobre estudios bioinformáticos.

Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las siguientes instituciones: INIA, LATU, I. Pasteur, MGAP y MA. Cuyos CV se encuentran disponibles en la oficina de Bioseguridad del MGAP.

El maíz DP 910521-2 fue modificado genéticamente para la expresión constitutiva y sistémica de 3 proteínas:

- La proteína Cry1B.34 está codificada por el gen *cry1B.34*, un gen quimérico compuesto por secuencias de un gen de clase *cry1B*, el gen *cry1Ca1* y el gen *cry9Db1*, todos derivados de *Bacillus thuringiensis*. La proteína Cry1B.34 expresada es eficaz contra ciertas plagas de lepidópteros susceptibles, al provocar la alteración del epitelio del intestino medio. Al igual que otras proteínas Cry, la proteína Cry1B.34 expresada se une a los receptores en la membrana con microvellosidades del intestino de las plagas de lepidópteros susceptibles y provoca la muerte celular, a través de la formación de poros conductores de iones no específicos en la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio.
- La proteína PAT, codificada por el gen *mo-pat*, proviene de *Streptomyces viridochromogenes*. Confiere tolerancia al ingrediente activo del herbicida glufosinato de amonio, el ingrediente activo en los herbicidas de fosfinotricina. El glufosinato se asemeja químicamente al aminoácido glutamato y actúa para inhibir una enzima llamada glutamina sintetasa, que participa en la síntesis de glutamina. Asimismo, la glutamina sintetasa también está involucrada en la desintoxicación de amoníaco. Debido a su similitud con el glutamato, el glufosinato bloquea la actividad de la

glutamina sintetasa, lo que da como resultado una reducción de los niveles de glutamina y un aumento correspondiente en las concentraciones de amoníaco en los tejidos de las plantas, lo que provoca la alteración de la membrana celular y el cese de la fotosíntesis, y así la muerte de la planta. La proteína PAT confiere tolerancia a los herbicidas a base de glufosinato de amonio al acetilar la fosfotricina, un isómero del glufosinato de amonio, detoxificando así el herbicida.

- La proteína PMI, codificada por el gen *pmi* de *Escherichia coli*, confiere tolerancia a la manosa, utilizado como marcador de selección durante la transformación. La proteína PMI cataliza la interconversión reversible entre manosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. La manosa es fosforilada por la hexocinasa a manosa-6-fosfato y, en presencia de PMI, entra en la vía glucolítica luego de la isomerización a fructosa 6-fosfato. En ausencia de PMI, la manosa-6-fosfato es acumulada en las células vegetales e inhibe la glucólisis; además, los altos niveles de manosa pueden generar otros impactos en la fotosíntesis y la producción de ATP. Sin embargo, en presencia de PMI, las células vegetales pueden sobrevivir en medios que contienen manosa como fuente de carbono, lo que permite utilizar PMI como marcador de selección.

### **Método de transformación**

En la construcción del maíz DP-91Ø521-2 se emplean dos pasos de transformación secuencial para (1) inserción de una secuencia de sitio de integración, denominada secuencia de 'plataforma de aterrizaje' (*landing pad*), en una ubicación específica del genoma del maíz usando biolística y (2) inserción de los *cassettes* de expresión en la plataforma de aterrizaje del genoma del maíz, también por biolística.

El *primer paso* de transformación utilizó el bombardeo conjunto de microproyectiles con cuatro plásmidos (PHP71012, PHP70594, PHP21139 y PHP21875) para insertar la secuencia de la plataforma de aterrizaje mediante Inserción Sitio Específico (SSI), en un sitio de integración preseleccionado en el genoma del maíz utilizando CRISPR-Cas9. La plataforma de aterrizaje fue insertada en el genoma del maíz mediante un mecanismo celular conocido como reparación dirigida por homología. Se seleccionó una línea de maíz que contenía la secuencia de plataforma de aterrizaje esperada, pero que no contenía secuencias de ADN de plásmido no deseadas y se avanzó al siguiente paso en el proceso de transformación.

El *segundo paso* de transformación, se utilizó el bombardeo conjunto de microproyectiles con cuatro plásmidos (PHP79620, PHP5096, PHP21875, PHP73572) para insertar los genes objetivo de PHP79620 en la plataforma de aterrizaje. Las plantas de maíz fueron regeneradas después de la transformación y se realizó su caracterización molecular. Se seleccionó una línea de maíz que contenía la inserción de ADN prevista, pero que no contenía secuencias de ADN de plásmido no deseadas y se avanzó al siguiente paso en el proceso de desarrollo de eventos.

Resumiendo, el método de transformación, el maíz DP-91Ø521-2 es un evento modificado genéticamente en el que se ha utilizado CRISPR-Cas9 para insertar la secuencia de la plataforma de aterrizaje. La secuencia de la plataforma de aterrizaje SSI fue incorporada en la ubicación de inserción preseleccionada en el genoma del maíz mediante Recombinación Homóloga Dirigida (RDH); luego, los *cassettes* de expresión previstos fueron insertados en la plataforma de aterrizaje SSI mediante recombinación.

### **Caracterización molecular del ADN insertado**

La caracterización del maíz DP-91Ø521-2 fue realizada utilizando un método de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) conocido como *Southern-by-Sequencing* (SbS) para determinar el número de copias de inserción y la organización dentro del genoma de la planta y para confirmar la ausencia de secuencias del esqueleto del plásmido y otras secuencias de plásmido no deseadas.

Se determinó la secuencia del inserto DP910521 y de las regiones genómicas flanqueantes para confirmar la integridad del ADN insertado derivado de PHP71012 y PHP79620. La secuencia determinada en el maíz DP910521 tiene una longitud total de 18420 pb, compuesta por 1097 pb de la región genómica de flanco 5', 1054 pb de la región genómica de flanco 3' y 16269 pb de ADN insertado. Al comparar la secuencia de la inserción DP910521 con las secuencias previstas de la plataforma de aterrizaje del plásmido PHP71012 y la región del fragmento de recombinación en el plásmido PHP79620, se confirmó que el inserto DP910521 tenía las secuencias esperadas derivadas tanto del PHP71012 como del PHP79620.

En definitiva, el análisis SbS de la generación T1 del maíz DP-91Ø521-2 demostró que el maíz DP-91Ø521-2 contiene una sola copia del ADN insertado derivado de PHP79620 y PHP71012, con la organización esperada, y que no hay inserciones adicionales, esqueleto de plásmido u otras secuencias de plásmido no deseadas en su genoma.

### **Análisis bioinformático**

#### Análisis de ORF

Se realizó una evaluación de marcos de lectura abiertos potencialmente traducidos (ORF) siguiendo los criterios internacionales establecidos (FAO/OMS 2001, *Codex Alimentarius Commission* 2003). Se identificaron un total de 925 marcos de lectura entre codones de terminación traducidos  $\geq$  ocho aminoácidos para la secuencia de maíz DP-91Ø521-2. Al realizar una búsqueda de homología con la base de datos COMPARE, mostró 7 péptidos putativos con  $> 35\%$  de identidad con 11 alérgenos conocidos sobre la "ventana móvil de 80 aminoácidos". Dado que los péptidos putativos carecen de valores significativos de homología ( $E\text{-value}=1 \times 10^{-4}$ ) y además carecen de elementos regulatorios como promotores y terminadores, la evaluación bioinformática del inserto de maíz DP-91Ø521-2 no generó similitudes de secuencia de aminoácidos biológicamente relevantes con alérgenos, toxinas u otras proteínas conocidas que serían perjudiciales para humanos o animales.

#### Análisis de alergenicidad

Se comparó la secuencia de las proteínas Cry1B.34, PAT y PMI con alérgenos conocidos de acuerdo con las directrices pertinentes (*Comisión del Codex Alimentarius*, 2003; FAO/OMS, 2001). Los resultados de la búsqueda de las secuencias de las proteínas Cry1B.34, PAT y PMI en la base de datos COMPARE de secuencias de alérgenos conocidos reporta que no se encontraron alineaciones de una longitud igual o superior a 80 con una identidad de secuencia  $> 35\%$ . No se identificaron coincidencias de 8 residuos contiguos entre la secuencia de las proteínas y las secuencias de alérgenos. En el caso de la proteína PMI se encontró una coincidencia continua de 8 residuos de aminoácidos entre la secuencia de la proteína PMI y la secuencia de un alérgeno (una alfa-parvalbúmina de rana putativa).

La PMI tiene un historial de uso seguro en cultivos sin reacciones adversas conocidas, incluyendo alergias

(ISAAA, 2020). La alergia a las ranas es poco frecuente y se da por reacción cruzada por epítomos de IgE compartidos con parvalbúminas presentes en el pescado, causantes de alergias más comunes al pescado. Aunque no se han mapeado los epítomos de IgE en la parvalbúmina de rana, la coincidencia de 8 residuos entre PMI y el alérgeno de rana CAC83047.1 se encuentra fuera de los epítomos identificados en parvalbúminas de pescado con reactividad cruzada. Además, la coincidencia de 8 residuos entre PMI y la parvalbúmina de rana presenta tres desajustes con la alineación homóloga en la parvalbúmina de pescado Gad m 1, lo que hace muy improbable que este 8-mero sea un epítomo de IgE con reactividad cruzada. PMI y la parvalbúmina de rana también presentan patrones de plegamiento distintos, y los péptidos coincidentes de 8 residuos se ubican en diferentes entornos estructurales dentro de sus respectivas proteínas. La dependencia estructural descrita de los epítomos de parvalbúmina con respecto a su alergenidad, considerando las distintas conformaciones de las secuencias coincidentes dentro de sus respectivas proteínas, no sugiere actividad alérgica en PMI. En conclusión, es improbable que la coincidencia de 8 residuos entre PMI y el alérgeno de rana represente un riesgo de reactividad cruzada, como se ha demostrado empíricamente por su historial de uso seguro en cultivos.

#### Análisis de toxicidad

En las búsquedas BLASTP de las proteínas PMI y Cry1B.34 en la base de datos de proteínas nr del NCBI se obtuvo el máximo número de alineamientos (100), todos con valores E de cero. En el caso de PMI los alineamientos corresponden a proteínas manosa-6-fosfato isomerasa, las cuales provienen predominantemente de cepas de *E. coli*, en cambio para Cry1B.34 corresponden a diversas proteínas cristalinas insecticidas de diferentes especies de *Bacillus*.

Mediante la búsqueda BLASTP de la proteína PAT en la base de datos de proteínas nr del NCBI se obtuvo también un número máximo de alineamientos de 100, con un rango de valores E de  $3,59 \times 10^{-132}$  y  $1,08 \times 10^{-53}$ , para fosfotricina N-acetiltransferasas y N-acetiltransferasas de la familia GNAT de diversas bacterias. El alineamiento con valor E =  $3,59 \times 10^{-132}$  corresponde a una fosfotricina N-acetiltransferasa (identidad = 100%; longitud = 183 aa) de *Streptomyces viridochromogenes*, que es la fuente de la secuencia codificante original de PAT.

En resumen, para las proteínas PAT, PMI y Cry1B.34 ninguna de las secuencias encontradas por la búsqueda BLASTP corresponde a proteínas con toxicidad conocida para humanos o animales.

#### Estabilidad del inserto y segregación

Los análisis genotípicos y fenotípicos en cuatro generaciones segregantes (F1, F2, BC1 y BC1S1) y una generación no segregante (BC1S3), demostraron la herencia mendeliana del evento DP-91Ø521-2. Los resultados genotípicos basados en qPCR y PCR de punto final demostraron que las proporciones de segregación observadas coincidían con las proporciones de segregación esperadas para las cinco generaciones. Los resultados del análisis fenotípico de tolerancia al herbicida glufosinato están alineados con los resultados genotípicos.

**Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)**

Para determinar la concentración de las nuevas proteínas expresadas Cry1B.34, PAT y PMI, se recolectaron muestras de tejido durante la campaña 2020 en seis sitios en las regiones comerciales de cultivo de maíz de los Estados Unidos y Canadá. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro bloques en cada sitio. Se determinaron las concentraciones por la técnica de ELISA en los siguientes tejidos: hoja, raíz, polen, tallo, forraje y grano.

**Método de detección**

Desde 2024 se cuenta con un método de detección y cuantificación del evento DP-91Ø521-2 validado por el JRC.

**Conclusión:**

**El grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento Maíz DP-91Ø521-2 para su liberación comercial.**

-----