

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

El Grupo GAHCIM se reunió en la reunión virtual de Trabajo convocada por la ERB los días 2 y 9 de marzo, 20 de abril y de setiembre de 2021.

Participaron en la elaboración del informe: Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza (INIA), MSc. Fabiana Rey (LATU), PhD. Pablo Fresia (I. Pasteur), PhD. Agustín Correa (I. Pasteur), Lic. Bioq. Mariana Richero (DGSA-MGAP), Lic. Bioq. Mariana Menoni (INASE).

Se analizó la información presentada para el Maíz 3272xBt11xMIR162xGA21.

El OVGM 3272xBt11xMIR162xGA21 fue obtenido mediante cruzamiento convencional de los cuatro eventos parentales. El gen principal del evento 3272, amy797E, es una quimera de genes provenientes de *Archaeas hipertermófilas* del orden Thermococcales, que tiene actividad de amilasa, provocando la hidrólisis del almidón en azúcares simples (dextrina, maltosa y glucosa). Los genes de alfa amilasas que dan origen al gen amy797E, BD5031, BD5064 y BD5063, se aislaron de bibliotecas de ADN construidas a partir de cultivos de organismos del orden Thermococcales y de microorganismos aislados del Océano Pacífico que se encuentran a altas temperaturas. La enzima quimérica está constituida por cuatro fragmentos de BD5031, dos fragmentos de BD5064 y tres fragmentos de BD5063. Se agregaron señales de direccionamiento en el extremo N y C terminal de la secuencia de alfa-amilasa para optimizar la expresión proteica, que presenta condiciones óptimas de actividad enzimática altamente compatibles con aquellas de la etapa de licuefacción del almidón de la molienda húmeda del maíz. La secuencia de tránsito al retículo endoplasmático en el extremo N-terminal y la secuencia SEKDEL en el extremo C-terminal permiten dirigir y retener la proteína en este complejo sistema de membranas, respectivamente.

El maíz 3272 (SYN-E3272-5) fue obtenido mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. El resto de los eventos fueron oportunamente analizados en las solicitudes realizadas para cada uno de ellos y cuentan con autorización para ser comercializados en Uruguay.

El evento de maíz 3272 expresa la proteína sintética termoestable alfa amilasa (AMY797E) y el marcador de selección PMI (fosfomanosa isomerasa). Análisis de *Southern blot* de la generación BC4F1 demostraron que este evento únicamente contiene una copia del gen amy797E, del gen pmi, el promotor Gzein, el promotor ZmUbiInt y el terminador NOS, presentes en el T-DNA insertado. Además, no se encontraron secuencias del vector pNOV7013 usado.

La estabilidad del gen en BC1, BC2 y BC3 se analizó mediante *Southern blot* y secuenciación, confirmándose la integridad del inserto e identificando un único sitio de integración. Los patrones de hibridación, utilizando una sonda para detectar al gen amy797E, demostraron que el inserto es estable hasta la cuarta generación y se hereda de acuerdo con un patrón

mendeliano simple tanto para amy797E y pmi. El análisis de la secuencia de todo el inserto confirma su integridad y que la contigüidad de los elementos funcionales se mantuvo. Se observa un truncamiento de 23 pb en la unión del borde derecho del inserto y otro de 7 pb en la unión del borde izquierdo.

Se realizó un estudio de las secuencias genómicas que flanquean al inserto 3272, identificándose 3 secuencias nucleotídicas o ORF que contenían un codón de iniciación y un largo de más de 30 aminoácidos. Cada ORF hipotético se tradujo a su secuencia aminoacídica y se evaluó la posibilidad mediante alineamientos con base de datos de sus grados de similitud con alérgenos y toxinas. Los resultados de dichos alineamientos revelaron que no existía una similitud significativa entre las 3 secuencias identificadas traducidas y las secuencias presentes en la base de datos de alérgenos FARRP, concluyendo que no existen secuencias aminoacídicas biológicamente relevantes con alérgenos putativos o conocidos. Resultados similares se obtuvieron con el análisis de toxinas cuando se utilizó la base de datos de toxinas creada por la NCBI Entrez® Protein Database (2015). La búsqueda de alérgenos debe ser actualizada ya que existen nuevas versiones de la base de datos 'The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) AllergenOnline.org'.

Sobre las interacciones en el evento apilado:

La ausencia de interacción al acumular los eventos individuales Bt11, MIR162 y GA21 y sus productos de expresión (Cry1Ab, Vip3Aa20, PMI, PAT y mEPSPS) en el maíz Bt11xMIR162xGA21, ya fue analizada previamente. La posibilidad de interacción directa entre de interacción directa entre AMY797E (producto del evento 32729 y el resto de los productos de expresión del acumulado (proteínas Cry1Ab, Vip3Aa20, PMI, PAT y mEPSPS), las cuales poseen un patrón de expresión ubicuo, se ven disminuidas debido a que:

1) el gen amy797E presente en el evento 3272 es modulado por un promotor de maíz (GZein), que dirige su expresión en el endosperma del grano. Los estudios de cuantificación de proteínas muestran que la AMY797E se expresa en grano y no está presente en otros tejidos.

2) la proteína posee una secuencia de tránsito al retículo endoplasmático en el extremo N-terminal y una secuencia SEKDEL en el extremo C-terminal que permiten orientarla y retenerla en dicho sistema de membranas, respectivamente.

Además, AMY797E no comparte rutas metabólicas con los otros productos de expresión que tienen blancos de acción diferentes. Por lo tanto, no se ha identificado ninguna interacción potencial con implicancias en la seguridad del producto en el acumulado 3272xBt11xMIR162xGA21.

A partir de la información analizada el grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos para ensayos de Investigación/INASE del evento Maíz 3272xBt11xMIR162xGA2.

Para la liberación Comercial del evento, es necesario solicitar la actualización de la búsqueda

de alérgenos según la última versión de la base de datos 'The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) AllergenOnline.org', al momento que el grupo de inocuidad realice el análisis para uso comercial.
