

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 DAS 01131-6

Tipo de liberación: Comercial

Fecha: 29 de julio de 2025

El Grupo GAHCIM convocado por la ERB se reunió el 9 y 23 de mayo, el 11 de julio de 2023 y el 29 de julio de 2025. Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las siguientes instituciones: INIA, LATU, MGAP, MA e INASE cuyos CV se encuentran en la oficina de Bioseguridad del MGAP.

El maíz DAS-01131-3 otorga tolerancia a ciertos insectos lepidópteros susceptibles y tolerancia a los herbicidas a base de glifosato. Los promotores que conducen la expresión de los genes introducidos son constitutivos, y las características incorporadas se manifiestan en todas las etapas de desarrollo del cultivo y en todos los tejidos de la planta. Tiene numerosas autorizaciones experimentales, más de 25, en distintos países, como Argentina, Brasil, Canadá y Estados Unidos.

Genes y otros elementos introducidos

Se transformó la línea pública de maíz B104 con el plásmido PHP88492, conteniendo dos cassettes génicos, para producir maíz DAS-01131-3. El cassette del gen *cry1Da2*, expresa la proteína Cry1Da2, contiene un gen quimérico compuesto por secuencias del gen *cry1Da2* que codifica una toxina núcleo insecticida y un derivado del gen *cry1Ab*, ambos derivados de *Bacillus thuringiensis*. El cassette del gen *dgt-28 epsps*, expresa la proteína DGT-28 EPSPS, contiene un gen 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate sintasa (*epsps*) derivado de *Streptomyces sviveus*, fusionado a un péptido de tránsito del cloroplasto quimérico, TraP8, de *Brassica napus* y *Brassica rapa*. La proteína expresada DGT-28 EPSPS es dirigida al cloroplasto del maíz a través del péptido TraP8 para proveer tolerancia al herbicida glifosato.

Elementos regulatorios. La expresión del gen *cry1Da2* está controlada por la región promotora del gen1 de ubiquitina del maíz (*ubiZM1*), incluyendo la región 5' no traducida (UTR) e intrón. El terminador del gen *cry1Da2* es la región terminadora del gen de *ubiZM1*. La expresión del gen *dgt-28 epsps* es controlada por una segunda copia del promotor *ubiZM1*, incluyendo la región 5' UTR e intrón, y una segunda copia del terminador *ubiZM1*.

Características de los organismos donantes

Los microorganismos donantes, *Bacillus thuringiensis* y *Streptomyces sviveus*, así como los vegetales *Brassica napus* y *Brassica rapa*, no presentan patogenicidad, toxicidad y/o alergenicidad.

Métodos de transformación

El maíz DAS-01131-3 fue generado por una transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando el plásmido PHP88492, se brinda información sobre el mapa del plásmido, de la región del ADN-T del plásmido y la descripción de los elementos constitutivos del plásmido vector.

Caracterización molecular de ADN insertado

En base al análisis de *Southern by Sequencing* se determinó que el maíz DAS-01131-3 contiene una sola copia del ADN insertado derivado del ADN-T de PHP88492, con la organización esperada, y que no hay inserciones inesperadas ni secuencias de plásmido en su genoma. Se analizó el número de uniones únicas que está relacionado con el número de inserciones de plásmidos presentes en el genoma del maíz (se espera que una sola inserción de ADN-T tenga dos uniones únicas). El análisis SbS de diez plantas de la generación T1 segregante de maíz DAS-01131-3 mostró seis plantas positivas que contenían el ADN insertado. Cada una de estas plantas contenía dos uniones de inserción del genoma únicas, una en cada extremo de la inserción, que eran idénticas en las seis plantas. No se identificaron uniones inesperadas entre regiones no contiguas de la inserción prevista, lo que indica que no hay reordenamientos, deleciones o duplicaciones en el ADN insertado. Además, no hubo uniones entre la secuencia del esqueleto de PHP88492 y las secuencias del genoma del maíz, lo que demuestra que no se incorporaron secuencias del esqueleto del plásmido en el maíz DAS-01131-3.

Análisis bioinformático

Se realizaron dos búsquedas separadas de las secuencias de las proteínas DGT-28 EPSPS y Cry1Da2 utilizando la base de datos *Comprehensive Protein Allergen Resource* (COMPARE) (febrero, 2024) disponible en <http://comparedatabase.org>. Esta base de datos revisada por pares es un esfuerzo de colaboración del Comité de Alérgenos Proteicos, Toxinas y Bioinformática (PATB) del Instituto de Ciencias Ambientales y de la Salud (HESI) y está compuesta por 2748 secuencias.

Los alineamientos generados se examinaron para identificar cualquiera que tenga una longitud de 80 o más y posea una identidad de secuencia > 35 %. La segunda búsqueda utilizó el programa FUZZPRO (Emboss Package (v6.6.0)) para identificar cualquier coincidencia idéntica de 8 residuos contiguos entre las secuencias de las proteínas DGT-28 EPSPS y Cry1Da2 las secuencias del alérgeno. Los resultados de la búsqueda de las secuencias de las proteínas DGT-28 EPSPS y Cry1Da2 frente a la base de datos COMPARE de secuencias de alérgenos conocidas no encontraron alineaciones de una longitud de 80 o más con una identidad de secuencia > 35 %. En la segunda búsqueda no se identificaron coincidencias contiguas de 8 residuos entre la secuencia de las proteínas en estudio y las secuencias del alérgeno. En conjunto, estos

datos indican que no surgió ningún problema de alergenicidad a partir de la evaluación bioinformática de las proteínas DGT-28 EPSPS y Cry1Da2.

El estudio de toxicidad se basó en comparar la secuencia proteica de DGT-28 EPSPS y de Cry1Da2 contra la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI (actualizada en setiembre, 2024) que contiene datos provenientes de distintas fuentes de datos, incluyendo traducciones de nucleótidos a partir de regiones codificantes anotadas en las bases de datos GenBank y RefSeq del NCBI, así como secuencias proteicas provenientes de las bases de datos Swiss-Prot (The UniProt Consortium, 2023), Protein Information Resource (PIR), Protein Research Foundation (PRF; <http://www.prf.or.jp/index-e.html>) y Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)

La búsqueda entre la secuencia de proteína DGT-28 EPSPS y Cry1Da2, con las secuencias de proteína en la base de datos interna de toxinas se realizó con BLASTP usando el umbral de valor E se estableció en 10^{-4} . No se devolvieron alineaciones con un valor $E \leq 10^{-4}$ entre la secuencia de proteína DGT-28 EPSPS y Cry1Da2 con ninguna secuencia de proteína en la base de datos interna de toxinas. Por lo tanto, no surgieron problemas de toxicidad a partir de la evaluación bioinformática de las proteínas DGT-28 EPSPS y Cry1Da2.

Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)

La proteína Cry1Da2, codificada por el gen cry1Da2 en DAS-Ø1131-3, al igual que otras proteínas Cry, se une a los receptores en la membrana del borde con microvellosidades de las especies lepidópteros susceptibles y provoca la muerte celular a través de la formación de poros conductores de iones en la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio. La especificidad de las proteínas Cry se debe en parte a los receptores específicos presentes en el intestino medio de los insectos susceptibles, así como a la activación por proteasas en el intestino medio alcalino de los insectos.

La proteína DGT-28 EPSPS tiene el mismo mecanismo de acción que la proteína CP4 EPSPS (autorizada para uso alimentario y/o animal por parte de las autoridades reguladoras en más de 25 países y/o regiones diferentes demostrando una amplia familiaridad en cultivos comercializados). La proteína DGT-28 EPSPS cataliza la reacción de shikimato-3-fosfato (S3P) con fosfoenolpiruvato (PEP) para producir 5 enolpiruvilshikimato 3-fosfato y fosfato inorgánico en la vía del shikimato. La proteína DGT-28 EPSPS expresada se dirige a los cloroplastos del maíz a través del péptido TraP8 para proporcionar tolerancia al herbicida glifosato.

Se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas Cry1Da2 y DGT-28 EPSPS en el maíz DAS-01131-3. 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 recolectaron las siguientes muestras de tejido: hoja (etapas de crecimiento V6, V9, R1 y R4), raíz (etapas de crecimiento V9, R1 y R4), polen (etapa de crecimiento R1), tallo (etapa de crecimiento R1), forraje (etapa de crecimiento R4 etapa de crecimiento) y grano (etapa de crecimiento R6). Se determinaron las concentraciones de las proteínas Cry1Da2 y DGT-28 EPSPS utilizando

ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas cuantitativos (ELISA).

Estudio de nuevos ORF

Para la secuencia de maíz DAS 01131-3 se identificaron un total de 723 marcos de lectura, entre codones stop, de una longitud \geq a ocho aminoácidos, y que estaban completamente contenidos dentro de la inserción o cruzando el límite entre la inserción y un borde genómico. Entre ellos, 195 son marcos de lectura abiertos (ORF) que comienzan con una metionina, incluidos los ORF que codifican las proteínas Cry1Da2 y DGT-28 EPSPS.

Seis de los marcos de lectura entre de codones stop \geq 29 aa del maíz DAS1131 arrojaron alineaciones con un porcentaje de identidad $>$ 35 % y una longitud de alineación \geq 80 aa, en la búsqueda en la base de datos de alérgenos. Sin embargo, un análisis posterior indicó que estas alineaciones son probablemente falsos positivos. Ninguno de los marcos de lectura entre codones stop \geq 8 aa en maíz DAS1131 produjo una coincidencia de ocho aminoácidos contiguos con un alérgeno.

No se obtuvieron alineaciones con un valor $E \leq 10^{-4}$ entre un marco de lectura entre codones stop traducido y cualquier secuencia de proteína en la base de datos interna de toxinas. Once marcos de lectura entre codones stop traducidos produjeron alineaciones con secuencias de proteínas en la base de datos de proteínas NCBI-nr con valores $E \leq 10^{-4}$, ninguna con toxinas. Por lo tanto, la evaluación bioinformática del inserto de maíz DAS1131 no generó similitudes de secuencia de aminoácidos biológicamente relevantes con alérgenos, toxinas u otras proteínas conocidas que serían dañinas para humanos o animales.

Estabilidad del ADN insertado

Se realizó un análisis de segregación en cinco generaciones de maíz DAS-Ø1131-3 para confirmar el patrón de herencia mendeliana del ADN insertado durante el proceso de mejoramiento. Los resultados del análisis de segregación multigeneracional demostraron que el ADN insertado en el maíz DAS-01131-3 segregó como un solo locus de acuerdo con las reglas mendelianas de herencia para un solo locus genético, lo que indica una integración estable del inserto en el genoma del maíz y un patrón de herencia genética estable a través de las generaciones durante el proceso de fitomejoramiento.

Método de detección

El método de detección y cuantificación del evento de maíz DAS-Ø1131-3 se encuentra validado por el JRC desde enero de 2025.

Conclusión:

El grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento Maíz DAS-01131-3 para su liberación comercial.
