

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

Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las siguientes instituciones del CAI: INASE, LATU, MGAP, INIA e IP. La información y CV de los evaluadores se encuentra disponible en la Oficina de Bioseguridad.

Fecha 13/09/2019

El Grupo GAHCIM se reunió convocado por la ERB, en ARU el día de la fecha.

Se revisó el informe presentado por la EFSA (EFSA Journal 2013;11(10):3356). Se comprendieron las diferencias en largos de las secuencias de las Figuras inicial y adicional, no presentando objeciones por parte de la comisión. Se da por culminado el análisis y GAHCIM no observa elementos de preocupación para este evento.

Fecha: 19/10/18

El Grupo GAHCIM se reunió convocado por la ERB, en el MGAP el día de la fecha.

Se recibe y analiza la respuesta de la empresa (16 de Octubre) a nuestra consulta. Se entiende no satisfactoria la respuesta y se detalla nuevamente la pregunta en el evento Maíz T25 a solicitar ampliación a la empresa.

1. La Figura 1 del informe adicional no coincide con la correspondiente Figura presentada en el dossier original.

Figura presentada en la información adicional:

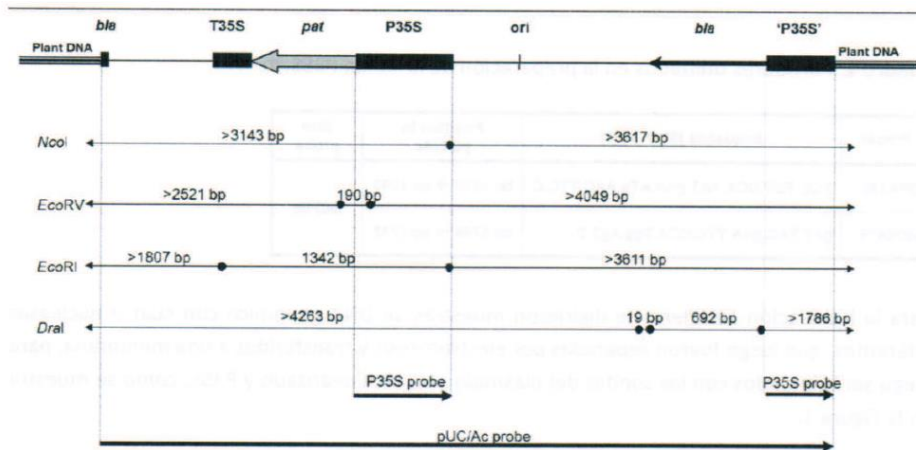


Figura 1. Estrategia de hibridación. En el esquema se muestran ambas sondas y los sitios de hibridación. No se muestra la sonda pUC/Ac continuando aguas arriba o aguas abajo del sitio de hibridación, sino sólo se ha destacado el fragmento relevante a la hibridación, a pesar que la sonda corresponde a la totalidad del plasmidio

Figura 2 del Dossier:

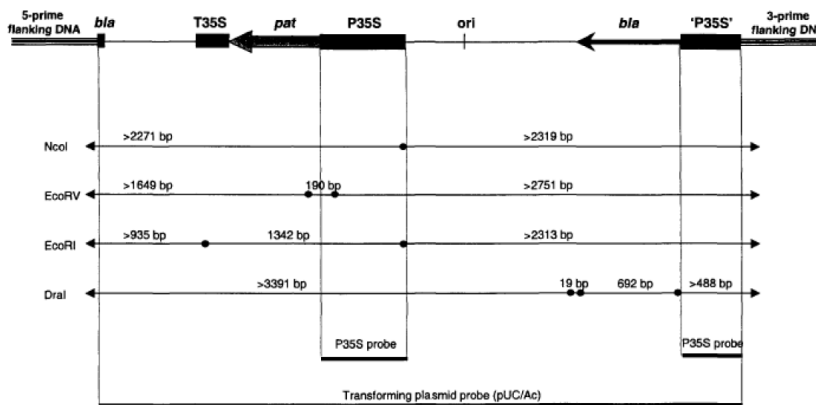


Figura 2. Esquema de las zonas de hibridación utilizadas en el análisis de Southern blot

Analizando la Figura 1 de la información presentada en el dossier, no queda claro el tamaño de los fragmentos que surgen de la digestión con diferentes enzimas que suman indistintamente 4590 pb con el tamaño del vector que es de 3982 pb - 190 pb deletados del gen *bla* + el inserto trunco del promotor P35S de 346 pb = 4138 pb (secuencia de DNA insertada en el genoma del maíz T25 de 4139 pb citada en sección B3.5). **Se tiene una diferencia numérica de 452 pb (4590bp - 4138bp) que no se explican.** En el caso de la información presentada en el informe adicional, esta diferencia es mayor. Se recibe la referencia Moens, 2014; M-133960-03-1.

2. Explicar las diferencias observadas entre los tamaños de fragmentos obtenidos con las diferentes enzimas de restricción en el estudio original y el adicional, pej en Fig. 1 para *NcoI* fragmentos ≥ 3143 y ≥ 3617 versus Fig. 2 fragmentos ≥ 2271 y ≥ 2319 respectivamente. Las secuencias flanqueantes no se deberían considerar en el cálculo del tamaño de los fragmentos esperados (solo hasta el borde de la inserción como lucen en Figuras). En el mismo sentido, para *NcoI* (ídem para todas las enzimas de restricción) la suma de tamaños de fragmentos de restricción en Fig 1 es 6760 bp y en Fig 2 resulta 4590 bp.

Fecha: 9/02/18

El Grupo GAHCIM se reunió convocado por la ERB, en el MGAP el día 9 de febrero de 2018.

Se chequearon los informes GAHCIM de los eventos MAIZ MON89034XTC1507XNK603XDAS40278-9 (comercial 2013) y SOJA FG72 (semilla y comercial 2014) con fecha de informe CAI al viernes 16 de febrero 2018. Ambos informes han sido realizados y están completos.

Se analiza la información adicional presentada por la empresa del evento Maíz T25.

La Figura 1 del informe adicional no coincide con la correspondiente Figura presentada en el dossier original.

Figura presentada en la información adicional:

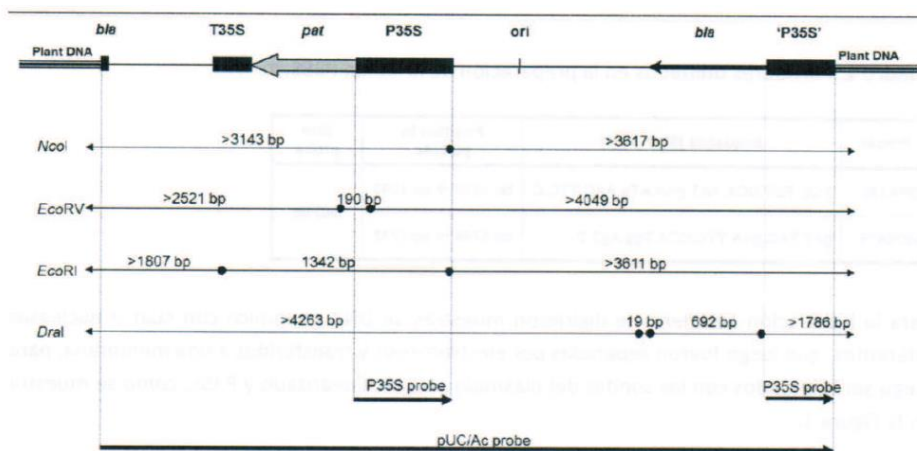


Figura 1. Estrategia de hibridación. En el esquema se muestran ambas sondas y los sitios de hibridación. No se muestra la sonda pUC/Ac continuando aguas arriba o aguas abajo del sitio de hibridación, sino sólo se ha destacado el fragmento relevante a la hibridación, a pesar que la sonda corresponde a la totalidad del plasmidio

Figura 2 del Dossier:

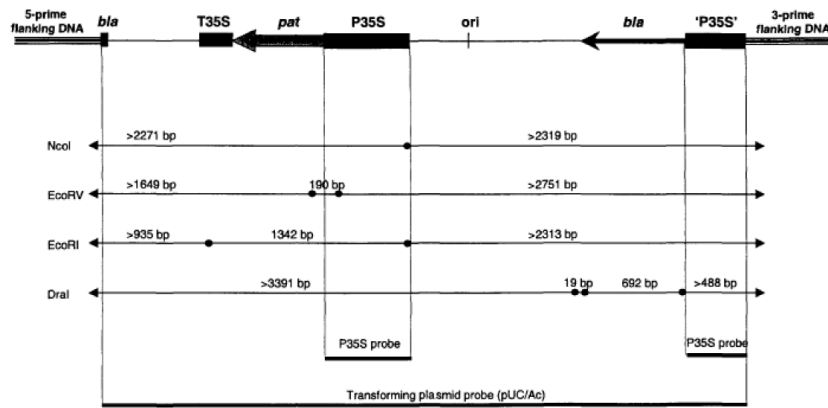


Figura 2. Esquema de las zonas de hibridación utilizadas en el análisis de Southern blot

Analizando la Figura 1 de la información presentada en el dossier, no queda claro el tamaño de los fragmentos que surgen de la digestión con diferentes enzimas que suman indistintamente 4590 pb con el tamaño del vector que es de 3982 pb + el inserto trunco del promotor P35S de 346 pb - faltantes 190 pb del gen bla = 4138 pb. Se tiene una diferencia numérica de 452 pb que no se explican. En el caso de la información presentada en el informe adicional, esta diferencia es mayor. Falta la referencia Moens, 2014; M-133960-03-1.

Fecha: 19/05/14

El Grupo GAHCIM se reunió en los Talleres de Trabajo convocados por la ERB, en el LATU el día 21 de abril y en MGAP el día 13 de mayo de 2014.

Maíz T25

El método de transformación utilizado para la generación de este evento fue una técnica de incorporación directa por la cual el ADN plasmidial fue introducido dentro de protoplastos de maíz (Klonus, 1998a, M-147573-01-1).

El gen pat introducido dentro del evento de maíz T25 proviene de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes* que es una bacteria gram positiva, aeróbica, esporulante que se encuentra presente en el suelo y pertenece a la familia Streptomycetae. No se conoce que S.

viridochromogenes sea un patógeno para el hombre o haya sido asociada con otras propiedades conocidas por afectar la salud.

Se brinda en forma clara el mapa y la información de las secuencias que constituyen los vectores empleados en la transformación del evento T25. La integración del evento es nuclear y existe un único sitio de integración. El locus *pat* presente en el evento de maíz T25 está compuesto por una copia del cassette *pat*. Esto fue demostrado mediante Southern blot y confirmado por secuenciación del inserto. Se utilizaron 2 sondas: una correspondiente al promotor 35 S y otra al plásmido completo. Si bien se dice que esta última sonda corresponde al plásmido, en el esquema de la Figura 2 (apartado B3.2.1) ésta parece corresponder al fragmento inserto (que incluye los fragmentos no funcionales del gen *bla* y la duplicación del P35). **Por lo tanto sugerimos incluir o clarificar porque no se usaron sondas de todos los elementos que forman parte del pUC/Ac y como diseñaron la sonda que abarca el plásmido y fragmentos adicionales insertados.** Este inserto posee integrado un fragmento (pb 196 hasta la pb 861 = 665pb) no funcional del gen *bla*. Los Southern blot realizados y la secuenciación del inserto permitieron determinar que en el genoma del evento de maíz T25 se integró una copia del casete *pat* (P35S-*pat*-T35S) flanqueada por un fragmento trunco del promotor P35S (346 pb) que interrumpe la porción final del gen *bla*, que pierde de esta manera 190 pb de su extremo 5'. Aparecen además en el inserto 4 pb del gen *bla* insertados en el extremo 3' del inserto.

Las secuencias flanqueantes del inserto integrado en el evento de maíz T25 fueron analizadas en varias etapas y por distintos métodos (PCR, Southern blot, secuenciación de ADN). Fueron comparadas con las de bases de datos de secuencias y se encontró que muestran una alta similitud de secuencia (90- 97%) con el locus publicado de *Zea mays* bz (bronze); el alelo de la alcohol deshidrogenasa 1 (*adh1*) de *Zea mays*; el cluster de genes que codifican para la proteína de 22 kDa alfa zein de *Zea mays* y el gen del activador transcripcional (*b1*) de *Zea mays* subespecie *maysB*, alelo *b1-B'*, hebra parcialmente codificante. **Se concluye de estos resultados que el inserto del evento T25 se integró en uno de los bloques grandes de retrotransposones que se encuentran flanqueando las regiones bronze, *adh1* y zein de 22kDa. Esta conclusión se contradice con la afirmación del apartado B3.7: "Todos los elementos que forman parte del inserto presente en el evento de maíz T25 están exhaustivamente caracterizados y sus funciones son conocidas. Ninguno de ellos forma parte de sistemas de movilización de genes entre plantas o entre plantas y otros organismos."**

Se realizó un estudio bioinformático sobre la secuencia del inserto y su región flanqueante. Este estudio identificó seis ORFs putativos creados en las regiones de unión. Los resultados muestran que ninguno de los nuevos ORFs creados tiene los elementos regulatorios necesarios para iniciar la transcripción y traducción.

Se determinó la **expresión de la proteína Pat** en distintos tejidos. Los valores promedio para la concentración de la misma como porcentaje de la proteína total extraíble (TEP₁) de tejido de hoja y tallo transgénico sugieren una disminución en la expresión a lo largo del tiempo. Se realizó la búsqueda de homologías de la enzima PAT (siguiendo las recomendaciones de FAO/WHO y de Codex Alimentarius) y no mostró similitud con toxinas y alérgenos conocidos. PAT posee similitud sólo con otras enzimas de actividad acetil transferasas sobre las que no se han reportado características tóxicas o alergénicas.

Para este evento se ha demostrado la estabilidad genética (southern blot) y del fenotipo. El locus *pat* presente en el evento T25 se transfiere a la población siguiendo un patrón mendeliano dominante simple. Se muestra el cálculo de la proporción de plantas sensibles y tolerantes a glufosinato de amonio obtenidas durante el proceso de introgresión del locus en los materiales experimentales y comerciales en numerosas cruzas y retrocruzas. La estabilidad del locus *pat* en el evento de maíz fue demostrada por medio de Southern blot en plantas de la tercera generación de retrocruza entre el evento y la línea B73. **La bibliografía que se presenta al respecto no incluye el análisis de la estabilidad por regiones, únicamente en generaciones.**

Se presenta **método de detección del OVGM**. Bayer ha desarrollado un protocolo "Nested PCR" que incluye un control interno de reacción cuyo detalle puede obtenerse en De Beuckeleer M. 1998. **Se solicita información sobre disponibilidad de muestras de control.**