

Barros Blancos, 18 de agosto de 2011

Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
Coordinadora de Evaluación del Riesgo en Bioseguridad (ERB)
Ing. Agr. Alejandra Ferenczi:

De acuerdo a la solicitud por parte de la ERB, se eleva el presente informe realizado en el marco de los grupos *ad hoc*. sobre caracterización e identificación molecular en el cual ha participado INASE a través de su técnico designado.

En esta oportunidad los eventos considerados fueron: en soja A5547-127, A2704-12 y MON87701 x MON89788 (BtRR2Y) y los eventos de maíz MAIZ: BT 11 x MIR 162 x GA21 y MON89034 x MON88017.

Para los cinco eventos estudiados se han realizado avances significativos en cuanto a la evaluación de riesgo de aspectos moleculares. Se presenta la información detallada para cada evento cuyos informes son compartidos por INASE.

Grupo GAHCIM

Soja A5547-127

El evento A 5547-127 presenta un inserto único, que contiene una única copia del casete del gen *pat* y el mismo se hereda como locus dominante simple. Este evento fue obtenido por biobalística.

El inserto contiene todas las secuencias del plásmido vector pB2/35SAcK, incluyendo secuencias del vector pUC 19 y dos fragmentos (3' y 5') del gene *bla*. El gene fue usado como un marcador de selección de las bacterias transformadas durante el proceso de clonación de ADN y los pasos de recombinación previos a la transformación de las células vegetales. Estos fragmentos no constituyen un gen funcional en la soja A 5547-127 y el gene *bla* no se expresa.

La proteína PAT no muestra homología con proteínas tóxicas y/o alergénicas. La proteína PAT ha sido extensivamente evaluada (ver informe EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSA-GMO-NL-2005-18) for the placing on the

market of the glufosinate tolerant soybean A2704-12, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Bayer CropScience, *The EFSA Journal* (2007) 524, 1-22) y no surgen elementos de preocupación de la seguridad de la proteína PAT.

Se presentó un análisis bioinformático llevado a cabo para los marcos abiertos de lectura (ORFs) cubriendo 3 puntos de unión en el inserto, la unión inserto/genoma de soja y la región 5' cloroplasto/genoma de soja. Este análisis mostró que es improbable que los 8 ORFs putativos sean expresados en la soja A 5547-127. Aún en el caso hipotético que se expresen, ninguno de los polipéptidos mostraría homología de secuencia con toxinas o alérgenos conocidos. La caracterización molecular del ADN insertado y las regiones flanqueantes de la soja A 5547-127 no presentan elementos de preocupación de seguridad y se presentó evidencia suficiente de la estabilidad de la estructura del inserto y de la nueva característica introducida.

La información presentada sobre la estabilidad genética (segregación y transferencia a la progenie) del ADN insertado en diversas generaciones resulta adecuada y suficiente.

También este evento cuenta con el protocolo ajustado y validado del método para cuantificar el evento por RT-PCR aportado por la JRC-CRL.

Se sugiere solicitar a la empresa los controles positivos y negativos.

Soja: A2704-12

En el dossier se presenta la información del mapa del vector empleado en la transformación (pB2/35SAck) así como el método de obtención del mismo a partir del plásmido pUC19. Se cuenta con la información de los genes y demás secuencias introducidas, así como la secuencia de las regiones del genoma flanqueantes al inserto. Se presenta la información correspondiente a los análisis de Southern Blot (fotos de geles realizados) así como las citas de los artículos correspondientes.

1) Características de los organismos donantes

Los organismos donantes para cada secuencia introducida: bacteria *S. vidriochromogenes* (gen PAT), y virus del mosaico de la coliflor (promotor y terminador 35S) y *Escherichia coli* (gen bl, sitio de múltiple clonado y origen de replicación del vector pUC19). *S. vidriochromogenes* es una

bacteria esporulante gram + del suelo, perteneciente al género *Streptomyces*, la cual no se conoce por ser un patógeno para el hombre ni está asociado a otras propiedades como la producción de toxinas que puedan afectar la salud humana.

2) Métodos de transformación

El método utilizado para la obtención de este evento fue biobalística, utilizando para el bombardeo el plásmido pB2/35SAck digerido con la enzima *PvuI* que interrumpe el gen *bla*. La selección de los brotes transformados fue realizada rociando el cultivo con glufosinato de amonio.

Elementos insertados

Se insertaron todos los elementos del plásmido pB2/35SAck. El tamaño total del inserto en este evento es de 6780 pb.

Integridad del inserto y caracterización de los rearreglos.

A través de la secuenciación de dicho inserto se confirmó la presencia de dos copias del casete del gen pat en un locus simple unidos por un fragmento *PvuI* invertido de 957 pb del plásmido de transformación pB2/35SAck. Estas flanquean dos fragmentos de orientación invertida del gen *bla*. Las secuencias integradas son idénticas a las presentes en el plásmido.

Número de inserciones

Este evento posee un único sitio de integración que contiene la construcción genética presente en el referido plásmido, lo cual fue demostrado mediante experimentos de Southern blot y confirmado por el análisis del patrón de herencia del locus *pat*. El control en los experimentos de Southern blot fue el ADN genómico de su línea parental no genéticamente modificada A2704.

Número de copias

Mediante experimentos de Southern Blot con la sonda *pat*, al utilizar enzimas de corte interno en el casete *pat* (*NcoI*/*HindIII*, *Bam HI*) se obtiene una única banda como es de esperar cuando existe una única copia. Sin embargo utilizando las enzimas *HindIII* y *NcoI*, se obtienen 2 fragmentos cuando lo esperado para la inserción de una copia era una banda única. Ya que solo existe un sitio *NcoI* “upstream” del inserto, y un sitio *Hind III* “downstream” del mismo; este patrón de bandas se

puede interpretar como el resultado de la integración de dos copias de la construcción en sentido opuesto, lo cual es luego confirmado digiriendo con las enzimas SphI y Eco RV, y posterior secuenciación del inserto.

El inserto posee dos fragmentos no funcionales del gen bla, generados por la digestión con la enzima PvuII previamente a la transformación, que flanquean el casete pat y se identifican como 5'bla y 3'bla. Esto puede observarse también a través de experimentos de Southern Blot utilizando 3 sondas bla que hibridan en la región 5' y 3' del gen bla así como en el gen mismo. Estas hibridan con los fragmentos de restricción que están entre las dos copias de los casetes pat y ningún patrón de bandas indica la existencia de un fragmento bla en el extremo 3' del inserto. En el dossier se presenta el esquema correspondiente con el orden de los elementos generado en la inserción.

La secuenciación del inserto confirmó la presencia de dos copias del casete del gen pat en un locus simple (confirmada por segregación mendeliana) que flanquean dos fragmentos de orientación invertida del gen bla, siendo las secuencias integradas idénticas a las presentes en el plásmido. Las secuencias bla integradas 3' y 5' no constituyen un gen bla intacto ya que las secuencias 5'bla están integradas en orientación invertida. La enzima β lactamasa no se expresa, tal como fue confirmado por análisis de Northern blot.

Se analizaron las secuencias del genoma vegetal que flanquean el inserto y se identificó una región flanqueante de 5' de 198 pb y otra 3' de 299 pb pertenecientes inequívocamente a *Glycine max*. A través de la comparación por medio del algoritmo BLAST de la secuencia flanqueante 5' se identificó una homología con el ADN espaciador de la región 16S-23S de cloroplastos. Sin embargo los estudios de Southern blot y segregación muestran que la inserción fue a nivel cromosomal. Este fenómeno es conocido y se debe a que la transformación por biobalística puede generar inserciones de ADN cloroplástico en el sitio de integración.

Se realizó la evaluación de expresión de proteínas de fusión mediante un análisis *in silico* de expresión de genes crípticos en este evento, y no se encontró evidencia que demostrara la generación de un transcripto nuevo en el sitio de inserción del gen, las regiones flanqueantes y la unión entre el ADN flanqueante/ sitio de inserción, lo que coincide con que no fueron observados efectos pleiotrópicos ni diferencias nutricionales en las evaluaciones realizadas.

Estabilidad de la inserción

El inserto no posee una capacidad intrínseca para transferir los genes insertados por auto-transferencia o re-movilización. Tanto la transferencia de los genes de la planta a bacteria, como entre plantas son eventos altamente improbables. Asimismo, el gen *pat* está bajo el control del promotor 35S, el cual no es funcional en bacterias; y las secuencias *bla* integradas en el genoma vegetal no constituyen un gen *bla* intacto ya que las secuencias 5' *bla* se encuentran integradas en orientación invertidas, y este gen no se expresa como fue confirmado por Northern Blot.

La estabilidad del locus *pat* en este evento, fue demostrada por Southern Blot en diferentes entornos genéticos, variadas áreas geográficas y por más de 14 generaciones, a través de las cuales se mantuvo el patrón de bandas. Los resultados demuestran que el inserto se hereda como un locus mendeliano dominante de herencia simple.

Nuevas proteínas

El evento A2704-12 de soja LibertyLink tiene como único producto de expresión la proteína PAT, codificada por el gen homónimo. No existen en la construcción genética introducida genes acompañantes que resulten en la expresión de nuevas proteínas. Se detallan en un cuadro las principales características de esta proteína, y la secuencia de aminoácidos correspondiente con la cita bibliográfica. La secuencia de esta proteína fue analizada y no se encontraron evidencias de ningún potencial tóxico o alergénico, posee únicamente similitud con otras enzimas de actividad acetil-transferasas sobre las que no se han reportado características tóxicas o alergénicas. Tampoco se encontró homología utilizando una ventana de 8 aminoácidos (con 100% de identidad dentro de la ventana) con epítopes de alérgenos conocidos ni sitios de glicosilación. Se presentan las correspondientes citas bibliográficas.

El gen *pat* introducido dentro del evento de soja A2704-12 fue producido de forma sintética utilizando una secuencia de nucleótidos modificada para utilizar codones típicos de planta, debido a que el gen nativo de la bacteria *S. vidriochromogenes* posee un alto contenido en G+C, situación no común en plantas. Se presenta la cita bibliográfica correspondiente a este trabajo. El ADN que precedía el codón de iniciación ATG fue levemente modificado, ya que se removió el sitio *Sa*II. Sin embargo esta modificación no tiene efecto en la secuencia de aminoácidos resultante de la proteína PAT. También se presenta cita al respecto.

Nivel de expresión por tejido vegetal El nivel de expresión de pat fue determinado en hojas en cuatro estadios tempranos de crecimiento, y se rociaron con el insecticida una, dos o ninguna vez; observándose que la proteína PAT representa un promedio de 0,010-0,035 % de la proteína total cruda de las hojas de este evento. Se presenta una tabla indicando el promedio de expresión en los distintos estadios evaluados. También se analizó la expresión de la proteína en raíces, tallos y hojas encontrándose que estos niveles de expresión representan 0,011%, 0,021% y 0,024% de la proteína cruda total respectivamente en cada uno de estos tejidos en la soja transgénica. También se presenta tabla con valores y cita bibliográfica respectiva este trabajo.

Se sugiere solicitar a la empresa los controles positivos y negativos.

SOJA: MON87701 x MON89788 (BtRR2Y)

Se brinda en forma clara el mapa y la información de las secuencias que constituyen los vectores PV- GMIR9 y PV- GMGOX20 empleados en la transformación de los eventos MON87701 y MON89788 respectivamente que fueron cruzados para obtener el evento apilado MON87701 x MON89788 (soja BtRR2Y). También se describen los mecanismos moleculares de acción de las proteínas codificadas por las secuencias introducidas.

Se brinda la secuencia aminoacídica de las proteínas Cry1Ac y EPSPS que produce el evento. La proteína Cry1Ac producida por el evento MON87701 tiene 4 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal que corresponden a un fragmento de la secuencia de localización cloroplástica luego de su procesamiento.

Características de los organismos donantes

Se presentan dos tablas (B91a y B91b) que resumen las características de los organismos donantes de las secuencias presentes en las construcciones génicas utilizadas para la transformación de cada evento utilizado para el apilamiento.

Métodos de transformación

El evento acumulado MON87701 x MON89788 fue obtenido por cruzamiento convencional (manual) entre líneas de soja portadoras de los eventos simples MON89788 y MON87701. Los

mismos fueron obtenidos de forma independiente utilizando la técnica de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Caracterización molecular y estabilidad del ADN insertado

El evento posee las mismas inserciones que los eventos independientes MON89788 y MON87701: se brindan tablas que describen los elementos génicos incorporados en los eventos independientes. Se cita bibliografía de ensayos de Southern blot realizados en estos eventos (Dickinson et al., 2006 y Arackal et al., 2008, respectivamente). Se mencionan ensayos de Southern blot para el evento apilado MON87701 x MON89788. **Solicitar para el evento apilado: Girault y McClain 2008; Girault y Tian 2009; Arackal et al., 2008.**

Se brinda información acerca de los análisis de integridad de los insertos para los eventos independientes que se utilizaron para la obtención del evento acumulado MON87701 x MON89788. También fueron secuenciados.

Se mencionan ensayos de Southern Blot para los eventos independientes que son citados en la bibliografía. También se mencionan ensayos de Southern Blot para el evento apilado pero no se brindan las figuras ni citas bibliográficas para los mismos.

Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)

El OGM produce las proteínas CryA1c y CP4 EPSPS que producen los eventos independientes MON89788 y MON87701.

La proteína madura CP4 EPSPS en MON89788 es idéntica a la producida en la soja Roundup Ready evento 40-3-2. La proteína Cry1Ac producida en MON 87701 tiene 100% de similitud a la producida en el algodón Bollgard pero posee cuatro aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal de la misma que corresponden a la secuencia de localización en el cloroplasto.

La proteína CP4 EPSPS tiene una expresión constitutiva en todos los tejidos de la planta mientras que la proteína Cry1Ac está bajo el control de la secuencia P- *RbcS4* que regula su expresión en órganos aéreos de la planta. Se presenta una tabla con la información pero no se cita ningún trabajo de referencia.

Se mencionan y describen ensayos de segregación y estabilidad genómica de los eventos independientes.

Se cuenta con métodos de detección mediante PCR para el evento que fueron validados por el Laboratorio de Referencia de la Comunidad Europea (Community Reference Laboratory, CRL), y se encuentran disponibles en <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>. Las proteínas producidas por el evento también pueden ser detectadas utilizando el método de ELISA.

Se sugiere solicitar a la empresa los controles positivos y negativos.

MAIZ: BT 11 x MIR 162 x GA21

Genes y otros elementos introducidos

- a. Mapa del vector empleado
- b. Secuencia de la proteína

a) Tanto genes y secuencias regulatorias introducidas se encuentran debidamente detallados así como los mapas de los vectores empleados para cada uno de los eventos individuales que conforman el evento apilado.

b) Se cuenta además con la secuencia de las proteínas Cry1Ab, PAT, PMI, Vip3Aa20 y mEPSPS. Se indica en el texto que el gen Vip3Aa19 del plásmido pNOV1300 difiere en un único aminoácido (posición 284: cambia lisina por glutamina) con respecto a la proteína Vip3Aa1 codificada por el gen nativo (fue modificado para acomodar el uso preferencial de codones en maíz). La secuenciación posterior del inserto MIR162 revela un cambio adicional de un aminoácido inducido posiblemente por la transformación genética (posición 129: cambia metionina por isoleucina, mutación silenciosa). Esta diferencia no afecta la especificidad insecticida. Esta proteína modificada fue denominada Vip3Aa20.

Características de los organismos donantes

Se presentan adecuadamente las descripciones de los organismos donantes: *Bacillus thuringiensis* y *Streptomyces vidrochromogenes* (BT11); *Zea mays* L (GA21); *Bacillus thuringiensis*, *E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens* (MIR162).

Del mismo modo se presentan datos de patogenicidad, toxicidad y alergenicidad de las proteínas expresadas Cry1Ab, PAT, mEPSPS, Vip3A20 yPMI, no habiéndose detectado estas características. Se incluyen las citas correspondientes a estudios bioinformáticos y ensayos para determinar LD50. Asimismo se presenta la evidencia del uso del *B. thuringensis* como insecticida comercial por más de 40 años.

Se describe la capacidad invasiva, alelopática y posibilidades de transferencia natural a otros organismos (especies cultivadas emparentadas y parientes silvestres, especies relacionadas u otros organismos, detallando citas y evidencias al respecto, concluyendo la improbabilidad de cualquiera de estos eventos.

También se presentan antecedentes del uso de los genes principales en la misma u otras especies. Únicamente el mEPSPS no ha sido usado en otros eventos u especies sino eventos con genes similares o alternativas del mismo, los genes PAT y Cry1AB han sido utilizados en otras especies y en la misma especie (otros eventos) respectivamente. El vip3Aa únicamente ha sido utilizado en algodón.

Métodos de transformación

El evento **GA21** fue realizado a través del método de “Gene gun” utilizando el fragmento de restricción NotI, conteniendo el promotor de actina, intrón de actina, péptido de transporte a cloroplastos, gen mutante mepsps y terminador NOS.

El evento **BT11** fue desarrollado a través de transferencia directa (por electroporación) de la construcción genética a protoplastos de línea H8540s y regeneración en medio selectivo. La transformación de protoplastos se realizó por la acción sinérgica de MgCl₂ y polietilén glicol (PEG) de acuerdo a la metodología citada.

Para generar el evento **MIR162** se utilizó el método de transformación genética via *Agrobacterium tumefaciens*.

Caracterización molecular y estabilidad del ADN insertado

- a. Elementos genéticos insertados (y cuales no se insertaron)
- b. Integridad de los elementos insertados, caracterización de los rearreglos
- c. Número de inserciones
- d. Número de copias por inserción

e. Estabilidad de la inserción a través de las generaciones

a. Elementos genéticos insertados (y cuáles no se insertaron).

No se incorporan otras regiones del vector al OVG (se presenta experimento de southern blot con sondas específicas para pUC19 que corresponde al GA21).

En cuanto a los eventos BT11 y MIR162 se aclara que por los experimentos de Southern blot no se detectan secuencias del vector. Se presentan estos experimentos utilizando las sondas de los vectores correspondientes para evento simple MIR 162 (información para Japón).

b. Integridad de los elementos insertados, caracterización de los rearreglos

Para el GA21 se determinan 3 copias completas del fragmento de restricción NotI (3,4 Kb) y 3 copias parciales. La copia 1 contiene el promotor de actina de arroz truncado (delección 5' de 696pb), primer exón e intrón de actina, péptido de tránsito optimizado, gen mepsps y terminador NOS. La copia 5 contiene un promotor de actina completo, primer exón e intrón de actina, péptido de tránsito optimizado y los primeros 288 pb del gen mepsps que finalizan en un codón de terminación y no contiene terminador NOS. Y la copia 6, contiene únicamente el promotor de actina de arroz y el primer exón de actina truncado.

c. Número de inserciones- Se presentan los análisis de Southern Blot para los 3 eventos:

GA21- Utilizando las enzimas Hind III, SacI y SphI y la sonda específica del gen mepsps, se produce más de una señal de hibridación lo cual corrobora la presencia de múltiples copias de este cassette.

BT11- Este evento posee un único sitio de inserción con una copia de cada cassette pat y cry1Ab. Se realizaron cortes con Nde I, sphI y BgIII/EcoRI (de corte externo) e hibridación con las respectivas sondas para ambos genes principales encontrándose una única banda en el evento apilado y respectivo evento simple, comprobándose de este modo la integridad de los cassettes cry1Ab y pat durante el cruzamiento convencional.

MIR162- Se efectuaron distintos análisis cortando con 3 enzimas de restricción distintas (Kpn I, EcoRV, Nco I) demostrando que este evento también contiene una copia intacta del cassette introducido.

NO SE PRESENTAN DATOS sobre el análisis southern con sonda para el gen PMI para verificar los sitios de inserción. Aparece en el informe molecular para Japón.

BT11xMIR162xGA21 Los patrones de hibridación de cada evento individual fueron retenidos por este híbrido, demostrando que la integridad del inserto transgénico fue mantenida durante el cruzamiento convencional.

d. Número de copias.

NO SE PRESENTA INFORMACIÓN de Southern, RT-PCR o información de secuencia que demuestre el número de copia/s del inserto. Se menciona en el dossier que fue realizado por secuenciación para el GA21 pero no se presenta información.

e) Estabilidad de la inserción a través de las generaciones

El maíz triple apilado fue obtenido por cruzamiento tradicional de los eventos individuales. Para cada evento particular los insertos se integran en forma estable (datos presentados oportunamente para BT11 y GA21). Cada evento segrega de manera mendeliana simple e independiente entre sí. (faltan las citas)

En este informe se presenta únicamente la información relativa al evento MIR162. Para analizar la estabilidad genética se realizaron análisis de PCR en tres generaciones de maíz MIR162 y se determinaron las proporciones de herencia de los genes vip3Aa20 y pmi. Para todas las generaciones la frecuencia de segregación esperada fue 1:1. Estos datos son consistentes con el análisis de Southern blot que indican que se produjo una integración estable del inserto en un único sitio en el genoma. Se realizaron análisis southern blot con ambas sondas vipAa19 y 20. Estos datos demuestran que se mantienen la estabilidad del inserto durante múltiples generaciones.

La estabilidad de los insertos fue también corroborada en híbridos portadores del apilamiento de los tres eventos.

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

- a. Que nuevas proteínas, relacionadas con la construcción genética se fabrica en el OGM
- b. Son iguales a los originales en estructura, propiedades y función (bioinformática?)
- c. En que tejido y en que niveles están presentes estas proteínas en las plantas.
- d. Los niveles de expresión son diferentes regiones geográficas en distintos fondos genéticos y a lo largo de las generaciones?

- e. Es posible usar una proteína recombinante fabricada en bacterias para ensayos en los que se requiere una mayor cantidad de proteína?

NB: El lugar y nivel de expresión del gene depende del promotor y también del sitio del genoma en que se inserta.

a. El producto de los elementos genéticos que se expresan (cry1Ab, pat, vip3Aa20, pmi y mepsps) se describe en forma detallada y se presenta la secuencia correspondiente de aminoácidos.

b. Se analiza el mecanismo molecular y la actividad biológica de cada una de estas proteínas, mostrando que las propiedades respectivas se mantienen en relación a la molécula original. La enzima mEPSPS es una versión tolerante a glifosato de la enzima EPSPS original del maíz que es inactivada por el herbicida. La actividad insecticida de la proteína Cry1Ab producida por el maíz Bt11 es equivalente a aquella producida por la bacteria. A diferencia de las proteínas Cry, las proteínas Vip se producen durante el crecimiento vegetativo de la bacteria y se secretan como proteínas solubles en el medio extracelular, continúan produciéndose en la fase estacionaria del desarrollo y la esporulación. Las proteínas Cry y Vip tienen diferentes blancos y modos específicos de acción.

La proteínas PMI es común en la naturaleza y se encuentran a través de todos los reinos, aunque menos frecuentemente en el reino vegetal.

No existen estudios de alta performance (high throughput) ni de genómica, transcriptómica, proteómica o metabolómica para este evento.

Fueron también realizados estudios de bioinformática para determinar homología con secuencias conocidas de patógenos, toxinas u alérgenos/ Degradabilidad

mEPSPS: 445aa (comparada a la Base de datos de Syngenta Biotechnology, Inc Allergen Database)- No se encontró homología significativa entre péptidos de 80aa o más aa contiguos entre dicha proteína y la base SBI. Asimismo, esta proteína es degradada rápidamente en ensayos de digestibilidad in vitro, es sensible al calor y al procesamiento. Se aportan las citas correspondientes

BT11: Se analizan las proteínas Cry y PAT, no detectándose homologías significativas de secuencias con proteínas tóxicas para mamíferos, ni muestran similitud de secuencia con alérgenos conocidos o péptidos inmunológicamente importantes (epítopes 8-12aa) (no especifica cual base de datos usaron para Cry). Para la proteína PAT se presenta cita y bases de datos utilizadas (GeneBank, FASTADB). Asimismo, son degradadas rápidamente en ensayos de digestión in vitro.

MIR162 Tanto para Vip3Aa20 como para PMI se realizaron búsquedas de homología con la base de Datos de Alérgenos de Syngente Biotechnology, Inc (SBI vr.4.0), que contiene 1414 proteínas de alérgenos o alérgenos putativos. Esta es idéntica a la base de datos pública del Programa Food Allergy Research. Se realizaron 2 búsquedas: 1) comparando péptidos de 80 aa secuenciales de esta secuencia con el algoritmo FASTA, con un umbral de 35% de identidad y 2) buscando coincidencias de 8 o más aa contiguos con secuencias de la base de datos de SBI (regiones cortas que puedan indicar presencia de epítopes del anticuerpo IgE. Los resultados de estos análisis no

revelaron identidad significativa con ninguna entrada de la base de alérgenos SBI. Sin embargo se encontró una región de homología de secuencia de 8 aa idénticos adyacentes en la proteína PMI y un alérgeno conocido como alfa-parvalbumina de la especie Rana CH2001. Investigaciones posteriores utilizando un método con suero sensible (presentan cita) demostraron que no había reactividad cruzada entre esta proteína y el suero de un solo individuo del cual se conocía que había demostrado alergia mediada por la inmunoglobulina IgE a esta alfa-parvalbúmina específica. Por tanto esta homología de secuencia no es biológicamente significativa. Asimismo, esta proteína es rápidamente degradada en fluido gástrico de mamífero simulado y lábil a temperaturas mayores a 37°C.

c. y d. Se realizaron medidas de concentración para mEPSPS, Cry1Ab y PAT por tejido/ órgano (hojas, raíces, planta total, grano y polen y en relación al ciclo de la planta (antesis, madurez fisiológica, senescencia). Estos ensayos fueron realizados por ELISA. Se presentaron citas de los mismos. En general todas las concentraciones de las proteínas transgénicas, fueron similares entre el híbrido y los tres eventos individuales. Se encontraron únicamente 6 diferencias significativas entre los eventos individuales y el evento apilado en los 32 análisis estadísticos realizados. Para cada uno de estos casos, no se observó diferencia significativa en otras etapas del desarrollo.

No se analizó en distintas generaciones la concentración de estas proteínas, únicamente en distintos tejidos/órganos y etapas de la planta.

Se provee asimismo una descripción detallada de las técnicas de detección de OVGM que ya son de dominio público.

e) Si, sería posible (aunque esto no se menciona en el texto)

MAIZ MON89034 x MON88017

Se trata de un maíz con dos eventos apilados, MON89034 y MON88017, los cuales no han sido analizados previamente por la autoridad competente en forma individual. El evento MON89034 expresa los genes cry1A.105 y cry2Ab2 que codifican las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 respectivamente. Dichas proteínas confieren a las plantas de maíz resistencia contra larvas de ciertos insectos lepidópteros¹.

El evento MON88017 expresa los genes cry3Bb1 y cp4 epsps que codifican las proteínas Cry3Bb1 y CP4 EPSPS respectivamente. La proteína Cry3Bb1 confiere a las plantas de maíz resistencia contra larvas de ciertos insectos coleópteros². La proteína CP4 EPSPS confiere tolerancia al herbicida glifosato.

1. Los híbridos de maíz transformados por ingeniería genética con el evento MON89034 expresan los genes cry1A.105 y cry2Ab2 proveniente de la bacteria de suelo *Bacillus thuringiensis* (Bt). La bacteria Bt produce, durante la esporulación, un cristal de proteína tóxica, denominadas proteínas Cry, conocidas también como delta endotoxinas. Existen diferentes clases de proteínas Cry con distinta actividad insecticida. Al ingerirse la toxina (proteína Cry) por el insecto susceptible durante su fase larvaria, el pH alcalino del intestino determina su pasaje a la forma activa de la endotoxina, la cual se une a receptores

específicos de las membranas epiteliales del intestino medio del insecto, lo que genera poros que desequilibran su balance osmótico causando eventualmente su muerte. En el evento MON89034 se expresan las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 que confieren protección contra: la “oruga cogollera” (*Spodoptera frugiperda*), “isoca de la espiga” (*Helicoverpa zea*) y el “barrenador del tallo de maíz” (*Diatraea saccharalis*).

2. El gen cry3Bb1 que se expresa en el evento MON88017, proviene de la bacteria de suelo *Bacillus thuringiensis* (Bt). La bacteria Bt produce, durante la esporulación, un cristal de proteína tóxica, denominadas proteínas Cry, conocidas también como delta endotoxinas. Existen diferentes clases de proteínas Cry con distinta actividad insecticida. Al ingerirse la toxina (proteína Cry) por el insecto susceptible durante su fase larvaria, el pH alcalino del intestino determina su pasaje a la forma activa de la endotoxina, la cual se une a receptores específicos de las membranas epiteliales del intestino medio del insecto, lo que genera poros que desequilibran su balance osmótico causando eventualmente su muerte. En el evento MON88017 se expresa la proteína Cry3Bb1 que confiere protección contra la larva de *Diabrotica speciosa* que se alimenta de raíces.
3. El gen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (epsps) que se expresa en el evento MON88017 proviene de la cepa CP4 de la bacteria *Agrobacterium* spp. El producto de expresión de dicho gen (CP4 EPSPS) hace al maíz tolerante al glifosato (principio activo de la familia RoundUp de herbicidas de uso agrícola). La proteína CP4 EPSPS, se corresponde con una forma tolerante al glifosato de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa involucrada en la ruta metabólica de biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La proteína CP4 EPSPS es estructuralmente similar y funcionalmente idéntica a la enzima endógena de planta EPSPS pero con reducida afinidad por el glifosato. El glifosato inhibe a la enzima EPSPS endógena de la planta bloqueándose la biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

1) Genes y otros elementos introducidos

- a. Mapa del vector empleado
- b. Secuencia de la proteína

a) Tanto genes y secuencias regulatorias introducidas se encuentran debidamente detallados en ambos eventos apilados, así como los mecanismos moleculares por el cual los genes principales expresan el fenotipo. Los genes principales del evento MON 89034, cry1A.105 y cry2Ab2 son entomotoxinas que afectan a insectos lepidópteros. El evento MON88017 contiene dos genes principales, cry3Bb1 y cps epsps. La proteína codificada por el primero es una variante de la proteína nativa modificada en 6 aminoácidos que confiere protección contra ciertos insectos coleópteros. El gen cp4 epsps codifica para la proteína 5-enolpiruvil-3 fosfo-shikimato sintasa, componente natural de suelos y rizósfera, y confiere tolerancia al herbicida glifosato.

Se presentan los mapas de los vectores PV-ZMIR245 y el PV-ZMIR39 (utilizados para desarrollar el evento MON8934 y MON8817 respectivamente) así como los mapas de las construcciones

finales de la transformación incluyendo sitios de restricción que permiten reproducir la determinación del número de copias.

b) Se presentan también las secuencias de las proteínas y respectivos análisis que se detallarán más adelante en este informe.

2) Características de los organismos donantes

Se presenta una tabla en la cual se nombran los genes principales/acompañantes y organismo donante detallando su hábitat, patogenicidad/toxicidad/alergenicidad, capacidad invasiva, alelopática y probabilidad de transferencia natural a otros organismos receptores.

3) Métodos de transformación

El evento apilado MON8934 x MON88017 fue obtenido por cruzamiento convencional entre líneas de maíz conteniendo cada una de ellas uno de los eventos simples. Estos eventos simples fueron obtenidos por transformaciones genéticas independientes mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*. Para seleccionar el evento simple 89034 se utilizó el marcador nptII que se encuentra en el ADN-TII que se inserta en un loci distinto al ADN-TI, este es esencial para la selección de células transformadas dado el bajo número de células con integración efectiva. Al estar en sitios de inserción distintos, en la generación F1 los ADN TI y II segregan independientemente, pudiendo mediante análisis moleculares identificar aquellas plantas que poseen únicamente el inserto con los cassettes cry1A.105 y cry2Ab2. Por lo tanto, este evento está libre de marcadores de selección (confirmación por southern blot y ELISA).

Para el evento simple MON88017 se siguió un procedimiento similar, pero utilizando glifosato como agente selectivo.

a. Se describen los elementos genéticos incorporados: reguladores y genes principales, y el organismo de origen de los mismos. Se realizaron análisis moleculares basados en la técnica de Southern blot en los eventos simples y en el apilado. **Se presentan las citas de los trabajos en el dossier, no así las fotos de los geles realizados. No se encuentra en la información: Groat et al 2006 (Southern apilados).**

b. Integridad de los elementos insertados, caracterización de los rearrreglos

MON89034- La caracterización molecular indica que MON89034 contiene una copia de T-DNA I y que T-DNA II and vector backbone están ausentes. La estructura del inserto del maíz MON89034 fue determinada por Southern y secuenciación de ADN. Los datos indican que el promotor del *Cauliflower mosaic virus* e35S que regula la expresión del gen fue truncada y que la región del borde derecho T-DNA fue sustituida por la región del borde izquierdo. Se determinó la existencia de una delección de 57pb. y una adición de 10pb. en las regiones flanqueantes del maíz con el inserto MON89034 (Tu and Silvanovich, 2009a, b). Como consecuencia se generó una versión más corta del mismo, e35S⁸⁹ que no contiene el elemento potenciador duplicado en la cual el borde derecho de la construcción original fue reemplazado por una región del borde izquierdo por recombinación antes o durante el proceso de transferencia al genoma nuclear. Sin embargo, nuevos estudios de la integridad de los insertos en el evento apilado fueron realizados a través de Southern blot, PCR y secuenciación para confirmar la organización de los elementos genéticos dentro del inserto, revelando un re-arreglo en el evento MON89034 que no afectó sus secuencias codificantes ni su funcionalidad. Verificando que no se han interrumpido secuencias codificantes o reguladoras endógenas como consecuencia del inserto. No se determinaron homologías relevantes correspondientes a alérgenos o toxinas para los polipeptidos hipotéticos que pudieran ser producidos por los ORF que abarcan las regiones de unión (Girault and McClain, 2008; Tu and Silvanovich, 2009c, d, h).

MON8817- Utilizando los mismos ensayos se confirmó la misma organización interna de los elementos genéticos dentro del inserto que en el vector original para el evento MON8817, en el evento apilado.

Es posible concluir por los experimentos expuestos que el evento apilado no posee porciones de genes adicionales o parciales.

c. Número de inserciones

Los resultados de los análisis de Southern blot confirman los patrones de corte de restricción específicos del ADN_a obtenidos para el evento apilado tal como se encuentran en los eventos simples. Por lo tanto se puede confirmar la integridad de los insertos en el evento apilado, en copia única, sin copias parciales del inserto o de otras secuencias del plásmido.

MON 89034- Se digirió el DNA de este evento con la enzima NdeI y se hibridizó con una sonda que cubre la totalidad del ADN TI (de corte externo al inserto) generando un único fragmento, lo que indica un único sitio de restricción.

MON88017- El DNA se digirió con la enzima Scal, de corte externo al inserto e hibridizó con 4 sondas que cubren la totalidad del mismo, generándose un único fragmento indicativo de un único sitio de integración.

d. Número de copias por inserción

MON 89034- Utilizando una enzima con un único corte dentro del inserto, Sspl se generan dos fragmentos, lo cual también indica una única inserción.

MON88017-Digiriendo con Xbal (que corta dentro del inserto) se generan 2 bandas, confirmando nuevamente la presencia de una única copia del inserto.

e. Regiones del vector incorporadas

No se detectan fragmentos del vector en los eventos individuales ni en el apilado a través de estudios moleculares, ni fragmentos del inserto en el genoma vegetal. Verificar documentos confidenciales Rice 2006 y Beazley 2002 a y b.

f. Estabilidad de la inserción a través de las generaciones

Los insertos individuales presentes en el evento apilado carecen de la capacidad de auto transferencia o re- movilización, no influyen en la estabilidad del ADN introducido en el evento apilado como se observó a través de numerosas generaciones.

Fueron realizados estudios de segregación y transferencia a la progenie a través del test de Chi cuadrado en varias generaciones para determinar heredabilidad y estabilidad de los genes de dichos eventos. Los datos de segregación para los genes fueron generados por Monsanto. Del total de generaciones de MON8934 analizadas (4 generaciones), ningún valor para los genes cry1A.105 y cry2Ab2 presentó diferencias significativas entre proporciones esperadas y observadas, lo cual es consistente con los datos de caracterización molecular. En cada generación las plantas fueron evaluadas mediante el test de ELISA para confirmar estabilidad y segregación y la presencia de los genes se confirmó por PCR con primers específicos para cada uno de los genes en cada evento.

Para determinar la herencia y estabilidad de los genes cry3Bb1 y cp4epsps del evento MON8017, se evaluó su patrón de segregación mediante análisis de Chi cuadrado a través de 10 generaciones del proceso de mejoramiento del evento. La proteína cry3Bb1 se detectó a través del ensayo de ELISA, mientras que la cp4epsps a través de su fenotipo resistente al glifosato. Se pudo determinar a través del test chi cuadrado que los resultados observados tampoco no difieren de los esperados de forma significativa en 8 de las 10 generaciones analizadas. Se propone que una de las diferencias pueda haberse debido al azar del muestreo (número amostral bajo), y la otra (29

positivos- 0 negativos) a una selección gamética causada por la aplicación de altas dosis de glifosato a las plantas de la generación anterior. La proporción esperada teórica en el análisis Chi-cuadrado se determina de acuerdo a la constitución genética y no supone la existencia de la selección gamética ocurrida por la aplicación repetitiva del herbicida en las plantas utilizadas como madre del cruzamiento, por tanto no se refleja el resultado empírico en esta generación.

Los resultados del análisis de chi- cuadrado son consistentes con la determinación previa de un solo sitio de inserción y estos segregan de acuerdo a las leyes de herencia mendeliana.

Del mismo modo, los resultados observados a través de varias generaciones con el evento apilado muestran que la integración de los genes cry1A.105 y cry2Ab2, provenientes del evento MON8934 y los genes cry3Bb1 y cp4 epsps de MON88017, es estable a través de distintas generaciones y que los genes segregan de acuerdo a los patrones de segregación mendeliana.

d. Análisis de la expresión del ADN insertado (nuevas proteínas)

- a. Se presenta una tabla con datos de niveles de expresión en diferentes tejidos y se cita el trabajo de Hartmann 2006 y Groten 1997 (los cuales no fueron aportados)
- b. Análisis bioinformático de nuevos ORFs, con potencial tóxico/ alérgico en las secuencias flanqueantes del inserto o dentro del mismo.
- c. Es posible usar una proteína recombinante fabricada en bacterias para ensayos en los que se requiere una mayor cantidad de proteína?

NB: El lugar y nivel de expresión del gene depende del promotor y también del sitio del genoma en que se inserta.

a,b,c: Se expresan las siguientes proteínas: cry1A.105 y cry2Ab2, cry3Bb1 y cps epsps.

b. Cry1A.105 es una proteína de 133 kDa. , ha sido modificada con una similitud de secuencia de aa respecto de Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F del 90%, 93,6% y 76,7%.

La proteína Cry2Ab2 contiene 637 aa: 634 más 3aa del CTP (péptido de tránsito al cloroplasto). Posee un peso molecular teórico de 71 kDa.

La proteína Cy3Bb1 fue modificada en 6 aa respecto a la proteína nativa resultando en la versión sintética del evento MON88017, resultando en una identidad de secuencia de aa del 99,1% con la versión natural, difiriendo en 6 de los 652 aa que la componen.

Estas 3 proteínas tienen actividad insecticida, las primeras contra ciertos lepidópteros mientras que la última contra ciertos coleópteros. Se presentan los niveles de expresión por tejido en esta tabla, siendo mayor en hojas para las tres.

Cp4 EPSPS es una proteína de 47kDa consistente en un solo polipéptido de 455 aa, cuya función es restaurar la biosíntesis de aminoácidos aromáticos bloqueada por la presencia de glifosato.

Tiene una modificación para ser resistente a glifosato pero no la aclara en este dossier. También es especialmente activa en tejidos verdes.

Se citan resultados que indican que las concentraciones de cada una de las cuatro proteínas obtenidas en eventos simples fue semejante a las obtenidas en el evento apilado.

La actividad de las 3 proteínas insecticidas fue evaluada mediante bioensayos dietarios con los insectos coleópteros y lepidópteros blanco de estas proteínas, tanto individualmente como combinadas, y se pudo comprobar que no hay interacciones entre las proteínas que produzcan cambios en su actividad insecticida. Se presentan las citas correspondientes. Asimismo se analiza el potencial de interacción entre la proteína CP\$ EPSPS y las proteínas Cry. Debido a los distintos modos de acción y sitios de actividad biológica, así como a la baja concentración a la cual se expresan se concluye improbable una interacción de este tipo.

Se realizaron extensivos estudios de la potencial interacción entre las 4 proteínas expresadas debidamente citados

d. No se aportaron evidencias del tamaño de los transcritos ni se realizaron estudios de expresión en distintas regiones, ni en distinto background genético, fuera de los que realizó Monsanto durante el mejoramiento durante varias generaciones.

e. Se citan resultados de estudios bioinformáticos sobre los eventos simples para describir i) secuencia completa del inserto posibles rearrreglos, etc, ii) predicción de ORFs dentro del inserto iii= análisis de secuencias flanqueantes y predicción de nuevos orf o rearrreglos en la zona de inserción. Para todos los ORFs detectados se procede a evaluar potenciales efectos de alergenicidad, toxicidad o actividad biológica adversa (McCoy y Silvanovich 2003 a y b; McClain y Silvanovich 2006 a y b; Tu y Silvanovich 2009 a h). Estas secuencias fueron traducidas desde un primer codón stop hasta el siguiente para todos los marcos de lectura posibles. Se utilizó la ventana de búsqueda móvil de 8aa, bases de datos de dominio público y la herramienta de alineación de secuencias FASTA. No fue hallada homología de los péptidos hipotéticos encontrados en regiones flanqueantes ni ADN del inserto, con alérgenos, toxinas u otras proteínas que puedan afectar la salud humana animal, ni se interrumpió ningún ORF endógeno ya existente alrededor del sitio de inserción.

Los eventos MON89034 y MON88017 cuentan con una caracterización molecular completa del ADN insertado y sus regiones flanqueantes. Son suficientes las evidencias aportadas respecto a la estabilidad genética de la modificación.

Se cuenta con método de detección de ADN de cada evento individual y se comprobó que dichos métodos siguen siendo validos en el caso del apilado (CRD 2008, CRD2010 a y b) y se aporta la información. También métodos de detección de cada una de las cuatro proteínas mediante ELISA.

Documentación para verificar.

SOUTHERN - Beazley 2002 a y b; Rice 2006,

ANALISIS EXPRESION PROTEINAS- Hartmann 2006; Griten 1997.

ANALISIS BIOINFORMATICO; Girault y McClain 2008.

Mariela Ibarra, Ing.Agr. (M.Sc.)

INASE