

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

**Evento: Maíz DP2022166**

**Tipo de liberación: Comercial**

**Fecha: 29/07/2025**

El Grupo GAHCIM convocado por la ERB se reunió virtualmente los días 04 y 19 de abril de 2022, y en forma presencial el día 2 de agosto de 2022. El 17 de junio de 2025 se reunió virtualmente para analizar los estudios bioinformáticos con bases de datos actualizadas.

Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las siguientes instituciones: INIA, LATU, I. Pasteur, MA, INASE y MGAP.

Se analizó la información presentada para el evento Maíz DP2022166.

El evento de **maíz DP-202216-6** contiene dos genes principales: (a) el gen *zmm28* y (b) el gen *mo-pat*. El gen *zmm28* codifica para la **proteína ZMM28**, que es un factor de transcripción de *Zea mays* (maíz) y provoca un **mayor potencial de rendimiento del grano**. El gen *mo-pat* proviene de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes* y codifica para la **enzima PAT**, una fosfinotricina acetiltransferasa que confiere **tolerancia a herbicidas a base de glufosinato de amonio**.

### Método de transformación

La transformación fue mediada por *Agrobacterium*. La introducción de estos genes es acompañada de la introducción de elementos regulatorios:

- La expresión de *zmm28* está controlada por la región promotora del gen factor de iniciación de la traducción *gus2* de *Zea mays*, junto a la región intrónica del gen 1 de la ubiquitina (*ubiZM1*) de *Zea mays*. Para finalizar la transcripción del gen introducido, se emplea la región terminadora del gen del inhibidor de la proteinasa II (*pinII*) de *Solanum tuberosum*. Tiene una expresión constitutiva.
- La expresión de *mo-pat* está controlada por la región promotora del gen *ubiZM1* de *Zea mays*, que incluye la región no traducida 5'UTR y el intrón. También se emplea como terminador a una segunda copia de *pinII* de *Solanum tuberosum*.

## **Caracterización molecular del ADN insertado**

Mediante el método de secuenciación de nueva generación conocido como Southern-by-Sequencing se determinó que en el evento **DP-202216-6** se integró en una sola copia el ADN-T en el genoma del maíz. Además, no posee genes ni secuencias acompañantes o derivadas del esqueleto del plásmido utilizado. Se observó que hubo truncamientos cortos en los bordes derecho e izquierdo del ADN-T insertado, lo que se da con frecuencia en la transformación mediada por *Agrobacterium*, pero no afectó a los genes *zmm28* y *mo-pat*. Mediante análisis de Southern-Blot, ven que los genes *zmm28* y *mo-pat* permanecen intactos y estables en cinco generaciones de maíz DP202216 durante el proceso de mejoramiento.

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

Se confirmó la expresión de la proteína ZMM28 y PAT por Western Blot. La expresión de cada proteína en los diferentes tejidos se cuantificó por ELISA y Western-Blot.

## **Estabilidad del inserto y segregación**

Los estudios de segregación genotípica y fenotípica mostraron que, en las 5 generaciones evaluadas, cada uno de los genes introducidos segrega de acuerdo con las reglas de herencia mendeliana para un solo locus genético.

## **Análisis bioinformático**

### Estudio 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 45 marcos de lectura entre codones de terminación traducidos  $\geq 30$  aminoácidos para la secuencia de maíz DP202216. La alergenicidad se evaluó por comparación con la base de datos COMPARE (*Comprehensive Protein Allergen Resource*) en enero de 2019. Se analizaron los alineamientos para identificar una identidad  $\geq 35\%$  en 80 aa e identidad con alérgenos en una ventana de 8 aa contiguos.

Para evaluar homología con proteínas tóxicas todas las secuencias de posibles ORFs se compararon con la base de datos de toxinas Corteva Agriscience en enero de 2019.

El análisis bioinformático no reveló similitudes de secuencias de aminoácidos entre los posibles ORFs y ningún alérgeno, toxina o proteína peligrosa para humanos o animales.

### Alergenicidad

Los resultados de la búsqueda de la secuencia de la proteína ZMM28 en la base de datos COMPARE (2023) de secuencias de alérgenos conocidos y supuestos no encontraron alineamientos de 80 aa o más con una identidad de secuencia  $> 35\%$ . En la segunda búsqueda, no se identificaron coincidencias exactas contiguas de 8 aa entre la secuencia de la proteína ZMM28 y las secuencias de alérgenos. Dado que se trata de una proteína endógena del maíz, no se considera necesario solicitar estudios bioinformáticos con base de datos actualizadas a 2025.

La búsqueda de la secuencia de la proteína PAT en la base de datos COMPARE (2025) de secuencias de alérgenos conocidos y potenciales no reveló ninguna alineación con una identidad de secuencia superior al 35 % en  $\geq 80$  aa, incluso al considerar alineaciones inferiores a 80 aa

con una identidad de secuencia superior al 35 % tras la normalización a una ventana de 80 aa. En una segunda búsqueda, no se identificaron coincidencias exactas de 8 residuos contiguos entre la secuencia de la proteína PAT y las secuencias de alérgenos.

### Toxicidad

Los resultados de la búsqueda de la secuencia de la proteína ZMM28 en la base de datos interna de secuencias de toxinas proteicas (2023) no encontraron alineamientos con un valor  $E \leq 10^{-4}$ . La proteína ZMM28 produjo numerosos alineamientos con un valor  $E \leq 10^{-4}$  con proteínas como el factor de transcripción MADS box de varias especies en la base de datos de proteínas nr del NCBI. Esto es completamente esperado ya que ZMM28 pertenece a la familia del factor de transcripción MADS box. Ninguna de las proteínas alineadas está relacionada con ninguna proteína tóxica conocida que sea dañina para humanos o animales. Dado que se trata de una proteína endógena del maíz, no se considera necesario solicitar estudios bioinformáticos con base de datos actualizadas a 2025.

La búsqueda de proteínas PAT produjo alineamientos con un rango de valores E de  $4,12 \times 10^{-6}$  a  $4,32 \times 10^{-6}$ , con fosfinotricina N-acetiltransferasas y N-acetiltransferasas de la familia GNAT de diversas bacterias de la base de datos de proteínas nr del NCBI. 3). El alineamiento superior corresponde a una fosfinotricina N-acetiltransferasa (Número de acceso: WP\_003988626; valor  $E = 4,12 \times 10^{-6}$ ; identidad = 100%; longitud = 183 aa) de *Streptomyces viridochromogenes*, que es la fuente de la secuencia codificante original de PAT. Ninguna de las accesiones obtenidas mediante la búsqueda BLASTP corresponde a proteínas con toxicidad conocida para humanos o animales.

### **Método de detección**

El método de detección y cuantificación del evento DP202216 se encuentra validado por el JRC desde julio de 2023.

### **Conclusión:**

**Con los datos presentados a la fecha el grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento DP2022166 para su liberación comercial.**

-----