

**Para: Comité de Articulación Institucional (CAI) y Evaluación del Riesgo en Bioseguridad (ERB).**  
**De: Grupo *Ad-Hoc* sobre Caracterización e Identificación Molecular (GAHCIM).**

**Asunto: Informe GAHCIM Maíz MON 80616-9**

**Términos de Referencia para el análisis de la evaluación del riesgo en bioseguridad:**

1. Información general del evento (especie, gen de interés, característica introducida). Describir la construcción genética detallando con qué metodología se obtuvo, el gen de interés e información sobre alergenicidad y toxicidad.
2. Indicar qué tipo de resistencias a antibióticos pudieron ser introducidas.
3. Detallar el protocolo de identificación del evento, por PCR de tiempo final o PCR en tiempo real, que lo diferencia del cultivo sin modificar y mostrar evidencia de que funcione el protocolo de detección. En caso de ser necesario se deberá proveer material para usar como control positivo (30g de semillas wild-type y ADN plasmídico conteniendo el *cassette* de transformación)

**Tipo de solicitud: Evento en desarrollo para evaluación confinada de campo.**

**Fecha: 26 de agosto 2025**

El Grupo GAHCIM se reunió en los Talleres de Trabajo convocados por la ERB en forma virtual 24 de junio, 5 y 26 de agosto de 2025. Participaron en la elaboración del informe evaluadores de las siguientes instituciones: MGAP, INIA, INASE y UDELAR.

Se analizó la información presentada para el evento Maíz MON 80616-9

El maíz MON 80616 ha sido desarrollado para obtener plantas con tolerancia a herbicidas inhibidores de la PPO. El maíz MON 80616 contiene el gen *H\_N90 PPO* que codifica la protoporfirinógeno IX oxidasa de *Enterobacter cloacae*, el cual confiere tolerancia a herbicidas inhibidores de PPO. La enzima H\_N90 PPO es funcionalmente idéntica a las PPO endógenas de plantas, pero a diferencia de éstas, es tolerante a la acción de herbicidas inhibidores de PPO.

**Métodos de transformación, genes y otros elementos introducidos**

El maíz MON 80616 se obtuvo por transformación de tejido mediada por *Agrobacterium* utilizando el vector de transformación PV- ZMHT530724. Este vector contiene un único ADN de transferencia (ADN-T), que está delimitado por regiones de borde derecho e izquierdo. El ADN-T contiene los cassettes de expresión: *H\_N90 PPO* (que otorga el carácter de tolerancia a herbicidas inhibidores de PPO), *cp4 epsps* (utilizado como marcador de selección) y *Cpf1* (Cas12a) y ARNg (ARN guía), involucrados en la integración sitio específica (SDI, del inglés, *site-directed integration*) del ADN-T. Durante el proceso de transformación, el ARN guía (ARNg) dirigió a la proteína Cpf1 para cortar el ADN genómico en una ubicación deseada en el genoma

del maíz y el ADN-T se integró en el genoma utilizando enzimas endógenas de reparación de ADN mediante la unión de secuencias no homólogas (NHEJ, del inglés, *non-homologous end-joining*).

Los *cassettes cp4 epsps*, *Cpf1* (Cas12a) y ARNg se encuentran flanqueados por sitios *loxP*, lo que permite la remoción de estas secuencias del inserto final mediante un sistema de recombinación *Cre/lox*. Para esto, se seleccionaron eventos resultantes de la transformación con el vector PV-ZMHT530724 con el ADN-T integrado en la ubicación específica deseada, y se cruzaron con una línea de maíz que expresa la proteína recombinasa Cre. Posteriormente, se utilizaron técnicas de cruzamiento convencional, segregación, selección y cribado molecular para aislar aquellas plantas que contenían el *cassette* de expresión *H\_N90 PPO*, y carecían de los *cassettes cp4 epsps*, *Cpf1* (Cas12a) y ARNg, así como cualquier otra secuencia derivada del ADN-T presente en la línea de maíz que expresa la recombinasa Cre.

### **Características de los organismos donantes**

Los bordes izquierdo y derecho (B-AGRtu) presentes en la transformación, provienen de *Agrobacterium tumefaciens*. Este organismo puede afectar algunas especies vegetales, pero no tiene capacidad invasiva ni alelopática.

El promotor del gen de Ubiquitina, la secuencia guía de la región 5' no traducida de este gen, y el intrón de la región 5' no traducida del mismo, provienen del organismo *Andropogon gerardi*. El péptido de tránsito de cloroplasto N-terminal del gen *APG6* proviene del organismo *Arabidopsis thaliana*, y la región 3' no traducida del gen de tubulina alfa proviene del organismo *Arundo donax*. Ninguno de estos tres organismos presenta riesgo de alergenicidad, toxicidad ni patogenicidad, ni tienen capacidad invasiva ni alelopática.

La región codificante optimizada de la proteína protoporfirinógeno oxidasa proviene del organismo *Enterobacter cloacae*, que puede actuar como patógeno oportunista, aunque no posee relevancia clínica más allá de infecciones intrahospitalarias ni tiene capacidad invasiva o alelopática.

A su vez, dada la ausencia de especies sexualmente compatibles con todos los organismos donantes mencionados, no se espera la transferencia de estos elementos genéticos.

### **Resistencias a antibióticos**

La construcción de ADN-T utilizada para la transformación de la soja no contiene resistencias a antibióticos. El plásmido de transformación PV-ZMHT530724 contiene el gen *aadA* que confiere resistencia a la espectinomicina y estreptomycin fuera de la región del T-DNA. Como marcador de selección se utilizó la expresión del gen *cp4 epsps* que confiere resistencia a glifosato. Esta secuencia se elimina del genoma de la planta mediante el sistema *Cre/lox*.

### **Análisis bioinformático**

#### **Alergenicidad**

En la base de datos de alérgenos (AD\_2025), se realizó una búsqueda de ventana móvil de ocho aminoácidos. Se evaluó si además la identidad lineal es superior al 35% en una superposición de

aminoácidos  $\geq 80$  (*Codex Alimentarius*, 2009). No se encontraron alineamientos con una puntuación de E-score  $\leq 1e-5$ .

#### Toxicidad

Para evaluar el potencial de toxicidad se comparó la proteína PPO con las secuencias peptídicas presentes en la base de datos de toxinas TOX\_2025 y la base de datos de secuencias de proteínas PRT\_2025. No se encontraron alineamientos con una puntuación de E-score  $\leq 1e-5$ .

#### Método de detección

En la información confidencial se presenta el protocolo validado de detección específica para el evento MON 80616 basado en la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real.

#### Conclusión:

**El grupo GAHCIM no identifica riesgos significativos en cuanto a la caracterización molecular del evento en desarrollo Maíz MON 80616-9 para evaluación confinada de campo.**

-----