



RESUMEN SOLICITUD
AUTORIZACIÓN DE USO DE ALGODÓN GHB811 X T304-40 X GHB119 X COT102 X
MON88701 COMO ALIMENTO DIRECTO O COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN
DE ALIMENTOS DE CONSUMO ANIMAL.

A. INFORMACIÓN GENERAL

1. Nombre del solicitante BASF QUÍMICA COLOMBIANA S.A.	2. Nombre del contacto Luis Fernando Martínez García
3. Dirección del solicitante Calle 99 # 69C – 32, Bogotá – Colombia Teléfono: 6322260 ext. 1978	4. Dirección del contacto Calle 99 # 69C – 32, Bogotá – Colombia Teléfono: 6322260 ext. 1978
5. Nombre del producto (Identificador Único y otros nombres) Identificador OECD: BCS-GH811-4 x BCS-GHØØ4-7x BCS-GHØØ5-8x SYN-IR1Ø2-7 x MON-887Ø1-3 Otros Nombres: GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701 Nombre de la tecnología: Algodón GLIXTP	
6. Objetivo de la solicitud Autorización de uso de Algodón GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701 como alimento directo o como materia prima para la producción de alimentos de consumo animal.	
7. Aprobaciones y usos en otros países El evento GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701 El solicitante manifiesta que está desregulado en Estados Unidos y ha sido solicitado para autorización de uso a los organismos reguladores en varios países (Canadá, Japón, Singapur y Taiwán) quedando en espera el concepto respectivo de cada País.	
8. Algún otro uso aprobado en Colombia El evento GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701 aún no tiene aprobación de uso en el país, sin embargo, todos los eventos individuales y algunas subcombinaciones ya se encuentran aprobadas para su uso de consumo animal.	

B. INFORMACIÓN RELACIONADA CON EL ORGANISMO VIVO MODIFICADO - OVM

1. Nombre de parentales y/o Donadores: Organismo Familia: Malvaceae Género: Gossypium Especie: <i>Gossypium hirsutum</i> L.



Subespecie: *barbadense*; *arboreum*; *herbaceum*

Nombre común: Algodón

2. Descripción de la modificación genética

Las plantas de algodón provenientes del evento apilado GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701 que confiere resistencia a ciertos insectos lepidópteros y tolerancia a herbicidas con i.a. glufosinato de amonio, glifosato, dicamba y HPPD (como el isoxaflutol). Estas características facilitan el control de los insectos plaga y de malezas.

- **Gen hppdPf W336:** codifica para la proteína HPPD W336. La secuencia codificante hppdPf W336 fue desarrollada introduciendo una mutación puntual en el gen silvestre hppd derivado de *Pseudomonas fluorescens*. Secuencia codificante del gen 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de *Pseudomonas fluorescens* cepa A32 modificado con el reemplazo del residuo glicina 336 por triptofano, adaptado para el uso de codones de algodón. Confiere tolerancia a herbicidas inhibidores de HPPD. tales como el herbicida isoxaflutol

- **Gen 2mepsps:** codifica para la proteína 2mEPSPS. La secuencia codificante de 2mepsps fue desarrollada introduciendo dos mutaciones puntuales en el gen silvestre epsps clonado de maíz (*Zea mays*). La expresión de la proteína 2mEPSPS Codifica para proteína doble mutante 5-enolpyruvylshikimate-3phosphate synthase de *Zea mays*. confiere tolerancia a herbicidas con base en glifosato.

- **Gen bar:** Codifica la enzima fosfinotricin acetyl transferasa (PAT), de *Streptomyces hygroscopicus* cuya función es acetilar al grupo aminoácido libre del glufosinato para producir N-acetil glufosinato no herbicida y así lo desintoxica de la planta. que confiere tolerancia al glufosinato

- **Gen Cry2Ae:** codifica la proteína insecticida Cry2Ae Produce una serie de proteínas (endotoxina) que actúan específicamente sobre las larvas al destruir su sistema digestivo. que confiere protección contra el ataque de ciertos insectos lepidópteros

- **Gen Cry1Ab:** codifica la proteína insecticida Cry1Ab que confiere protección La proteína Cry1Ab, codificada por el gen cry1Ab, es efectiva solo si ingerida por insectos con un específico pH en el intestino, normalmente muy alcalino y con específicos receptores en la membrana externa epitelial del intestino, que se liga a la toxina. contra el ataque de ciertos insectos lepidópteros

- **Gen Vip3Aa19:** codifica la proteína Vip3Aa19 es una exotoxina y es estructural, funcional y bioquímicamente distintos de las endotoxinas Bt delta (o proteínas Cry). Produce una serie de proteínas (endotoxina) que actúan específicamente sobre las larvas y Confiere protección contra el ataque de ciertos insectos lepidópteros

- **Gen aph4:** codifica para expresa la enzima fosfotransferasa de higromicina B una aminociclitol fosfotransferasa (APH4), que cataliza la fosforilación de higromicina. APH4 funciona como un marcador seleccionable dominante en las etapas iniciales de laboratorio de la selección de células vegetales como células que expresan APH4 y son capaces de sobrevivir y crecer en la presencia de higromicina. La higromicina no se utiliza en la medicina clínica y la proteína APH4 no tiene ningún papel en el final del cultivo de algodón.



- **Gen dmo:** proviene de un gen de desmetilasa de *Stenotrophomonas maltophilia* que expresa una proteína dicamba monooxigenasa (DMO) para conferir tolerancia a herbicidas con i.a. dicamba. La proteína DMO desmetila rápidamente el i.a. dicamba a un metabolito inactivo ácido 3,6-diclorosalicílico (DCSA).

C. INFORMACION RELACIONADA CON LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1. Método usado para transformar la planta

La línea de algodón provenientes del evento apilado GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701 se logró por cruzamiento convencional de líneas portadoras de los eventos GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701.

Los métodos de transformación utilizados en los eventos individuales fueron:

Evento GHB811: El evento de transformación GHB811 en *Gossypium hirsutum* fue producido por transformación mediada por *Agrobacterium*, usando el vector el cual contiene los casetes de expresión de los genes *hppdPw336-1Pa* y *2mepsps*. Utilizando el método de *Agrobacterium tumefaciens* para transformación de hipocotilo de algodón. conteniendo Ticarcilina y glifosato para el desarrollo de callo embriogénico (EC). El EC transformado fue subcultivado en medio MS conteniendo glifosato para la inducción de embriones. Una vez desarrolladas, las plántulas fueron transferidas al invernadero y se testearon más adelante para su tolerancia con herbicidas inhibidores de HPPD, después de los cuales permitieron la floración y producción de semilla.

Evento T304-40: El algodón modificado genéticamente derivado del evento de transformación T304-40 se obtuvo mediante transformación de tejidos de la variedad de algodón Coker315 con el vector pTDL008 utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, método por el cual se realiza un co-cultivo de la bacteria con los plásmidos que llevan los casetes de transformación y explantes de la planta de algodón, se transfieren los explantes a un medio conteniendo el agente de selección para seleccionar las células transformadas. Los brotes transformados se transfieren a nuevos medios de selección para propiciar el crecimiento de brotes y plantas y ser trasplantados a invernadero.

Evento GHB119: El algodón modificado genéticamente derivado del evento de transformación GHB119 se obtuvo mediante transformación de tejidos de la variedad de algodón Coker312 con el vector pTEM12, utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Después de un co-cultivo, los tejidos de algodón fueron cultivados en medio selectivo con glufosinato de amonio. Una vez que se han formado los embriones somáticos, estos se han transferido en medios de germinación con fosfinotricina. Las plántulas se han transferido en el invernadero, y una vez que se ha comprobado su tolerancia al glufosinato de amonio, se han hecho crecer para la producción de semillas.

Evento COT102: El evento parental COT102 se obtuvo mediante transformación de algodón Coker312 con *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el vector de transformación pCOT1, que contiene los genes *Vip3Aa19* y *aph4*. La transformación se llevó a cabo mediante la incubación de células de *Agrobacterium*, que contiene el vector de transformación pCOT1. Las plantas se regeneraron y analizaron individualmente para la presencia del gen *Vip3Aa19* por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y técnicas para la bioactividad insecticida.



Evento MON88701: Se desarrolló a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido PV-GHHT6997 en hipocótilos de algodón. En resumen, se extirparon segmentos de hipocótilo de plántulas cultivadas en la oscuridad de semillas Coker. Después del cultivo conjunto con *Agrobacterium* que lleva el vector, los segmentos de hipocótilo. Las plantas positivas homocigotas que contenían una sola inserción de ADN-T se identificaron mediante una combinación de técnicas analíticas que incluyeron aplicaciones de dicamba y glufosinato, PCRs y análisis de transferencia Southern, lo que resultó en la producción de algodón MON88701 tolerante a dicamba y glufosinato.

2. Diferencias del evento y Cultivar convencional

Evaluación de composición se realizaron para determinar los niveles de nutrientes y antinutrientes en semilla de algodón con pelusa a partir de GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701, el equivalente no OMG y siete variedades de referencia de algodón no OMG para proporcionar rangos de referencia (mín.-máx.) y para calcular los intervalos de tolerancia. Se analizaron las muestras de grano de semilla de algodón con pelusa de ocho sitios de prueba de campo para proximales, fibra, aminoácidos, ácidos grasos, minerales, alfa-tocoferol y antinutrientes utilizando un análisis de varianza de modelo mixto (ANOVA). Se cultivó el algodón en 2019 en ensayos de campo en las regiones de cultivo de algodón de EE. UU. En cada planta de ensayo de campo, las entradas fueron replicadas cuatro veces en un diseño de bloque completo aleatorizado (RCBD) y se incluyó lo siguiente: **(Entrada A):** Contraparte no OMG (Coker 312) **(Entrada B):** Algodón GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701 no tratado con herbicidas específicos por características **(Entrada C):** Algodón GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701 tratado con herbicidas específicos por características **(Entradas F, G, H, I, J, K y L)** Tres variedades de referencia de algodón no OMG seleccionadas de un total de siete.

En resumen, de los 70 analitos de composición, 51 tuvieron niveles suficientes por encima de la LOQ para el análisis estadístico. De los 51 analitos que se analizaron estadísticamente, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para 39 analitos: 36 fueron estadísticamente distintos entre la (Entrada A) y (Entrada B y Entrada C), una fue diferente de forma estadísticamente significativa solo entre la (Entrada A) y (Entrada B) y dos fueron estadísticamente diferentes solo entre la (Entrada A) y (Entrada C). Sin embargo, la magnitud de las diferencias fue pequeña. Adicionalmente, los valores medios de GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701, tratada y no tratada con herbicidas para rasgos específicos, para todos los analitos estaban dentro del rango de las variedades de referencia y los intervalos de tolerancia. Por lo tanto, las diferencias estadísticamente significativas no se consideran biológicamente relevantes.

3. Estabilidad genética y/o fenotípica del inserto:

Se realizó un estudio para demostrar la estabilidad del inserto de los loci transgénicos de las líneas de eventos parentales GHB811, T304-40, GHB119, T304-40 x GHB119, COT102 y MON88701 en plantas de algodón individuales GHB811 x T304-40 x GHB119 x COT102 x MON88701 utilizando análisis de Southern blo. - Structural stability analysis of T304-40 x GHB119 x COT102 cotton (Peeters, 2021).

Se utilizaron sondas específicas de genes para cada evento parental en algodón GLIXTP para demostrar la estabilidad del inserto. Estas sondas incluían la sonda hppdPFW336-1Pa (P002) y 2mepsps (P008) para demostrar la estabilidad de la inserción de GHB811, la sonda bar (P067),



cry1Ab (P030) y cry2Ae (P066) para demostrar la estabilidad de inserción de T304-40, GHB119 y T304-40 x GHB119, la sonda vip3Aa19 (P032) y aph4 (P033) para demostrar la estabilidad de inserción de COT102 y la sonda CS-dmo (P064) y CS-bar (P065) para demostrar la estabilidad de inserción de MON88701. Las sondas de bar (P067) y CSbar (P065) muestran una alta similitud de secuencia. Por lo tanto, se esperaba la hibridación cruzada de la sonda bar con MON88701 y la sonda bar CS con T304-40, GHB119 y T304-40 x GHB119. Todas las sondas fueron marcadas con digoxigenina (DIG) mediante amplificación por PCR utilizando el kit de síntesis de sonda PCR DIG (Roche Applied Science).

Se evaluaron los controles negativos y positivos para cada membrana. Los datos fueron aceptables si se obtuvo el patrón de hibridación esperado. Para cada membrana, los fragmentos obtenidos para los controles positivos y las líneas parentales se compararon visualmente con los fragmentos conocidos de los marcadores de peso molecular para confirmar los fragmentos esperados. Los fragmentos visualizados para las muestras individuales GLIXTP se compararon visualmente con el patrón de hibridación de las líneas parentales. La estabilidad de inserción de las muestras individuales de GLIXTP se confirmó cuando los fragmentos obtenidos fueron de tamaño comparable a los obtenidos para las líneas parentales.

En conclusión, la estabilidad de inserción de los loci transgénicos de las líneas de algodón parental GHB811, T304-40, GHB119, COT102 y MON88701 se demostró en algodón GLIXTP.