



RESUMEN SOLICITUD
AUTORIZACIÓN DE USO DE ALGODÓN GLIX Evento BCS-GH811-4 x ACS-GHØØ1-3 x
MON-887Ø1-3 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 ACS-GHØØ1-3 x MON-887Ø1-3 Otros Nombres: GHB811 x LLCotton25 x MON 88701 Nombre de la tecnología: Algodón GLIX	
6. Objetivo de la solicitud Autorización de uso de Algodón BCS-GH811-4 x ACS-GHØØ1-3 x MON-887Ø1-3 como alimento directo o como materia prima para la producción de alimentos de consumo animal.	
7. Aprobaciones y usos en otros países Para el evento BCS-GH811-4 x ACS-GHØØ1-3 x MON-887Ø1-3 el solicitante manifiesta que está desregulado en Estados Unidos y autorizado en Canadá, Japón y Corea. Ha sido solicitado para autorización de uso a los organismos reguladores en varios países (Corea, Australia, Singapur y Taiwán) quedando en espera el concepto respectivo de cada País.	
8. Algún otro uso aprobado en Colombia El evento BCS-GH811-4 x ACS-GHØØ1-3 x MON-887Ø1-3 aún no tiene aprobación de uso en el país, sin embargo, todos los eventos individuales y algunas sub-combinaciones ya se encuentran aprobadas para su uso como consumo animal.	

B. INFORMACIÓN RELACIONADA CON EL ORGANISMO VIVO MODIFICADO - OVM

1. Nombre de parentales y/o Donadores: Organismo Familia: Malvaceae Género: <i>Gossypium</i> Especie: <i>Gossypium hirsutum</i> L. Subespecie: <i>barbadense</i> ; <i>arboreum</i> ; <i>herbaceum</i> Nombre común: Algodón



2. Descripción de la modificación genética

Las plantas de algodón provenientes del evento apilado BCS-GH811-4 x ACS-GHØØ1-3 x MON-887Ø1-3, presentan tolerancia a herbicidas con i.a. glufosinato de amonio, glifosato, dicamba y HPPD (como isoxaflutol). Estas características facilitan el control 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*. La expresión de la proteína HPPD W336 confiere tolerancia a los 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 confiere tolerancia a herbicidas con base en glifosato.
- **Gen bar:** Codifica la enzima fosfotricin acetyl transferasa (PAT), cuya función es acetilar al grupo aminoácido libre del glufosinato para producir N-acetil glufosinato no herbicida y así lo desintoxica de la planta.
- **Gen dmo:** proviene de un gen de desmetilasa de *Stenotrophomonas maltophilia* que expresa una proteína monooxigenasa dicamba (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 del algodón GLIX (evento GHB811 x LLCotton25 x MON88701) se ha obtenido mediante cruce tradicional entre los eventos de transformación GHB811, LLCotton25 y MON88701. No se ha efectuado ninguna nueva modificación genética.

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 hppdPfW336-1Pa y 2mepsps. Se germinaron semillas de algodón de la variedad Coker312 en medio Murashige & Skoog (MS). Se disectaron fragmentos de hipocotilo, que fueron transformados con el vector pTSIH09 utilizando el método de *Agrobacterium tumefaciens* para transformación de hipocotilo de algodón. Subsecuentemente, estos hipocótilos fueron incubados en medio MS para cocultivo. 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 LLCotton25: El algodón LLCotton25 se desarrolló mediante transformación por *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 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 130 germinadas. Después del cultivo conjunto con *Agrobacterium* que lleva el vector, los segmentos de hipocótilo se colocaron en una secuencia de medios para el crecimiento de callos que contenían carbenicilina y cefotaxima para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* en exceso y glufosinato para inhibir el crecimiento de células no transformadas. Se evaluó la tolerancia de las plantas R0 y R1 a dicamba y glufosinato y se probó la presencia del T-DNA (casetes de expresión dmo y bar) y la ausencia del esqueleto del vector plásmido (oriV). Posteriormente, la planta R1 homocigótica positiva para dmo y bar se autopolinizó para dar lugar a plantas R2. Las plantas R2 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

Los niveles de proteína de HPPD W336, 2mEPSPS, PAT / bar y DMO se determinaron utilizando métodos ELISA de sándwich específicos de proteínas para analizar muestras de hojas, raíces, polen, cuadro anterior al cuadro de prefloración, cápsula inmadura, plantas enteras y matrices de semillas con pelusa recolectadas en múltiples etapas de desarrollo de algodón GLIX. Además, se determinaron los niveles proteicos de HPPD W336 y 2mEPSPS presentes en muestras de plantas de algodón GHB811, PAT/bar presente en muestras de plantas de algodón LLCotton25 y DMO y PAT/bar presentes en muestras de plantas de algodón MON88701. El nivel más bajo para todas las proteínas se observó en el polen de algodón, con la excepción de 2mEPSPS en algodón GLIX no tratado. El nivel más bajo de 2mEPSPS para el algodón GLIX no tratado se observó en la raíz. Los niveles más altos de 2mEPSPS y HPPD W336 estaban en varias etapas de hoja de algodón. Los niveles más altos de PAT/bar y DMO se observaron en el cuadro anterior al cuadro de prefloración. El tratamiento con herbicidas para rasgos específicos no tuvo ningún impacto en los niveles de proteínas en los diversos tejidos del algodón GLIX. Los niveles proteicos de HPPD W336, 2mEPSPS y DMO fueron similares en el producto apilado y en su correspondiente línea parental. El nivel de proteína PAT/bar en el algodón MON88701 fue bajo en comparación con los niveles encontrados en la otra línea parental y el producto apilado, GLIX. Los niveles de proteína PAT/bar en algodón GLIX (no tratado y tratado) y algodón LLCotton25 fueron similares.

La evaluación estadística de los niveles de nutrientes y antinutrientes de la semilla de algodón con pelusa GHB811 x LLCotton25 x MON88701 (no tratada y tratada con herbicidas de rasgos específicos) en comparación con la contraparte no GM, Coker 312, reveló diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para 31 de los 51 analitos examinados. Sin embargo, los valores medios de GHB811 x LLCotton25 x MON88701 de los 31 analitos estaban dentro



del rango (mín.-máx.) de las variedades de referencia y los intervalos de tolerancia. Por lo tanto, las diferencias estadísticamente significativas no se consideran biológicamente relevantes debido a que los valores se encuentran dentro del rango de variabilidad natural. Sobre la base de la evaluación comparativa, los niveles de nutrientes y antinutrientes de la semilla de algodón con pelusa GHB811 x LLCotton25 x MON88701 son comparables a las variedades de referencia y contraparte no modificadas genéticamente.

3. Estabilidad genética y/o fenotípica del inserto:

El objetivo de este estudio fue demostrar la estabilidad de inserción de los loci transgénicos de las líneas parentales GHB811, LLCotton25 y MON88701 en plantas individuales de algodón GHB811 x LLCotton25 x MON88701 (GLIX) mediante análisis de Southern blot. Para evaluar la estabilidad del inserto del locus transgénico de la línea parental GHB811, el ADN genómico (gDNA) de plantas individuales de algodón GLIX y de todas las líneas parentales, se digirió con la enzima de restricción PstI y SapI, y se hibridó con las sondas hppdPFW336-1Pa y 2mepsps.

Todas las muestras individuales de algodón GLIX mostraron fragmentos de tamaño comparable a los obtenidos para las líneas parentales. Para evaluar la estabilidad del inserto de los loci transgénicos de las líneas parentales LLCotton25 y MON88701, el gDNA de plantas individuales de algodón GLIX y de todas las líneas parentales, se digirió con la enzima de restricción BclI y se hibridó con las sondas CS-dmo y CS-bar. Todas las muestras individuales de algodón GLIX mostraron fragmentos 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, LLCotton25 y MON88701 se demostró en algodón GLIX.