

**RESUMEN DE LA SOLICITUD PARA MAÍZ
BT11 x MIR162 x NK603 – PARA SIEMBRA Y CONSUMO ANIMAL**

A. INFORMACIÓN GENERAL

1. Nombre del solicitante SYNGENTA S.A.	2. Nombre del contacto Victoria Eugenia Peña Julieta Sol Alonso Fabeiro
3. Dirección del solicitante Calle 116 # 7-15, Oficina 601B Edificio CUSEZAR Bogotá D.C. Teléfono: (601) 6538777	4. Dirección del contacto Calle 116 # 7-15, Oficina 601B Edificio CUSEZAR Bogotá D.C. Teléfono: (601) 6538777
5. Nombre del producto (Identificador Único y otros nombres) Identificador OECD: SYN-BTØ11-1 x SYN-IR162-4 x MON- ØØ6Ø3-6 Otros Nombres: BT11 x MIR162 x NK603	
6. Objetivo de la solicitud Autorización de uso del maíz BT11 x MIR162 x NK603 para siembra y como alimento directo o como materia prima para la producción de alimentos de consumo animal.	
7. Aprobaciones y usos en otros países Los eventos por separado están aprobados para uso como consumo animal y siembra en: El evento BT11 está aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Unión Europea, Indonesia, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Nigeria, Paraguay, Filipinas, Rusia, Sur África, Sur Corea, Suiza, Taiwán, Tailandia, Turquía, Estados Unidos, Uruguay, Vietnam. El evento MIR162 está aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Unión Europea, Indonesia, Irán, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Paraguay, Filipinas, Rusia, Sur África, Sur Corea, Taiwán, Tailandia, Turquía, Estados Unidos, Vietnam, Zambia. El evento NK603 está aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Cuba, Unión Europea, Honduras, Indonesia, Irán, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Nigeria, Pakistán, Paraguay, Filipinas, Rusia, Singapur, Sur África, Sur Corea, Taiwán, Tailandia, Turquía, Estados Unidos, Uruguay, Vietnam Eventos apilados aprobados para uso como consumo animal y siembra BT11 x MIR162 x GA21: Colombia, Sur África BT11 x MIR162: Argentina, Brasil, Colombia, Unión Europea, Japón, México, Filipinas, Singapur, Sur África, Sur Corea, Taiwán, Tailandia. BT11 x MIR162 x MIR604 x TC1507: Brasil BT11 x MIR162 x NK6Ø3: Brasil y Argentina.	

BT11 x TC1507: Brasil y Argentina.
MIR162 x NK603: Brasil y Argentina.
MIR162 x TC1507: Brasil y Argentina.
TC1507 x MIR162 x NK603: Brasil, Argentina, México.
TC1507 x NK603: Argentina, Brasil, Canadá, Colombia, Unión Europea, Honduras, Irán, Japón, México, Pakistán, Filipinas, Sur África, Sur Corea, Taiwán, Turquía, Uruguay.
Bt11 x MIR162 x TC1507 x GA21: Republica de corea
Bt11 x MIR162 x MIR604 x MON89034 x 5307 x GA21: Sur África
MON89034 x TC1507 x NK603 x MIR162 x DAS40278: Argentina, Sur África, Uruguay, Republica de corea.

8. Algún otro uso aprobado en Colombia

El evento BT11 x MIR162 x NK603 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 en Colombia.

B. INFORMACIÓN RELACIONADA CON EL ORGANISMO VIVO MODIFICADO -OVM

1. Nombre de parentales y/o Donadores:

Organismo receptor:

Nombre Común Maíz

Nombre Científico *Zea mays* L.

Familia *Gramineae*

Subfamilia *Panicoideae*

Tribu *Maydeae*

Género *Zea*

Especie *Zea mays*

Organismo(s) donante(s):

Evento BT11: *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces viridochromogenes*.

Evento MIR162: *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*.

Evento NK603: *Agrobacterium tumefaciens*.

2. Descripción de la modificación genética

El maíz Bt11 x MIR162 x NK603 ha sido obtenido por fitomejoramiento convencional a través del cruzamiento del maíz Bt11, MIR162 y NK603 y, por lo tanto, expresa el fenotipo combinado de los 3 eventos parentales correspondientes:

Bt11: Expresa la proteína Cry1Ab que confiere protección frente al ataque de ciertos insectos Lepidópteros y la proteína PAT, que confiere tolerancia a herbicidas a base de glufosinato de amonio.

Gen *cry1Ab*

El producto del gen *cry1Ab* es una forma truncada de una proteína δ -endotoxina. La proteína Cry1Ab es cortada proteolíticamente en el intestino alcalino de los insectos Lepidópteros susceptibles resultando en una forma insecticida activa.

La proteína insecticida activa interactúa con una molécula receptora presente solamente en las células del epitelio del intestino medio de los insectos susceptibles, provocando poros en las membranas de las células.

Como resultado, el balance osmótico celular es perturbado, las células se hinchan y sufren lisis. Las larvas de los insectos susceptibles cesan de comer y mueren. Se determinó que existen varios sitios de acoplamiento específicos y con alta afinidad para varias proteínas Bt en el epitelio del intestino medio de los insectos susceptibles (Hofte and Whiteley, 1989). Se ha demostrado que la proteína insecticida del gen *cry1Ab* es altamente específica para ciertos insectos Lepidópteros objetivo (Melin and Cozzi, 1990).

La proteína Cry1Ab, presente en los maíces que expresan el evento Bt11 de Syngenta S.A., provee protección contra la acción fitófaga de las larvas de lepidópteros. La actividad insecticida de la proteína Cry1Ab producida por el maíz Bt11 es equivalente a aquella producida por la bacteria (EPA. 1994, MRID #43397202).

Las proteínas por lo general son degradadas por la digestión en el tracto alimentario de los mamíferos. Estudios de toxicidad con la proteína Cry1Ab en ratones, con la versión truncada de la δ -endotoxina, purificada en *E. coli*, mostró que el LD50 es superior a 4000 mg/kg. La misma concentración de proteína (4000 mg/kg) se determinó como el nivel al cual no se observa efecto. La secuencia de la δ -endotoxina no se parece a otras proteínas que tienen actividad biológica. Estudios de la digestibilidad in vitro demostraron una rápida degradación de la proteína dentro del fluido gástrico humano simulado.

Gen *pat*

El gen *pat* codifica para la enzima fosfinotricina-N-acetil transferasa (PAT), aislado del microorganismo del suelo *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494 (Strauch *et al.*, 1988). La enzima PAT ha sido usada como un marcador de selección permitiendo la identificación de células vegetales transformadas, así como la fuente de tolerancia a herbicidas a base de glufosinato de amonio (o fosfinotricina).

El glufosinato de amonio actúa inhibiendo la enzima vegetal glutamina sintasa, una proteína encargada de detoxificar el amonio, mediante su incorporación al aminoácido glutamina. La inhibición de esta enzima conduce a la acumulación de amonio en los tejidos vegetales y causando su muerte. La enzima PAT cataliza la acetilación del glufosinato de amonio, convirtiéndolo en un compuesto inactivo, detoxificando los tejidos vegetales del mismo.

Las acetiltransferasas no son proteínas tóxicas; por lo tanto, ninguna de estas alineaciones indicó la posibilidad de que PAT actúe como una toxina. PAT no es una proteína tóxica, ni PAT comparte una similitud de secuencia significativa con otras toxinas proteicas conocidas o supuestas. Además, la proteína PAT es rápidamente inactivada y digerida

cuando es sometida a pH ácido. Estas condiciones se asemejan a las del sistema digestivo de mamíferos, lo que confirma que no son tóxicas en ratones.

MIR162: Expresa la proteína Vip3Aa20, que confiere protección frente al ataque de ciertos insectos Lepidópteros plaga del maíz y la proteína PMI, utilizada como marcador de selección, que permite a las células transformantes crecer en medios conteniendo manosa como única fuente de carbono.

Gen vip3Aa20

Codifica para la proteína vegetativa insecticida Vip3Aa20, aislado de *Bacillus thuringiensis*, cepa AB88, de 89kD de peso, que muestra actividad contra ciertos insectos Lepidópteros. Las proteínas Vip3Aa comparten tiene similitudes con el modo de acción de las δ -endotoxinas del Cry1Ab, sin embargo, utilizan objetivos moleculares diferentes y forman canales de iones diferentes comparados con el gen Cry1Ab.

La proteína Vip3Aa20, no comparte secuencia de homología con las conocidas δ -endotoxinas. La acción de las proteínas Vip3Aa ha sido analizada y ha mostrado estar al nivel del epitelio del intestino medio, en donde el enlace a las células del intestino medio es seguido por una degeneración progresiva de la capa epitelial.

Esta actividad aumenta a medida que cantidades más altas de Vip3Aa en una dieta artificial se correlacionan con la interrupción de la alimentación (Selvapandiyan et al., 2001).

Vip3Aa20 no es una toxina de mamíferos, ni Vip3Aa20 comparte una similitud de secuencia significativa con otras toxinas de proteínas de mamíferos conocidas o putativas. La proteína Vip3Aa20 no es considerada tóxica debido al modo de acción para la actividad insecticida de Vip3Aa20 no es pertinente a mamíferos; la proteína Vip3Aa20 no comparte homología significativa de aminoácidos con proteínas tóxicas conocidas; la proteína Vip3Aa20 no fue tóxica para ratones y sin efectos relacionados con el tratamiento a una sola dosis de 1250 mg de Vip3Aa20/kg de peso corporal y las proteínas Vip3Aa tienen una historia de uso seguro en agricultura en los diferentes países.

NK603: Expresa la proteína CP4 EPSPS que confiere tolerancia a herbicidas a base de glifosato.

Las proteínas que confieren protección frente al ataque de ciertos insectos Lepidópteros o confiere tolerancia a herbicidas a base de glufosinato de amonio son:

Gen cp4 epsps

La proteína CP4 EPSPS es una forma de la enzima 5-enolpiruvulshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que disminuye la afinidad de unión por el glifosato, lo que confiere una mayor tolerancia al herbicida glifosato.

Un estudio ha demostrado que el nivel de proteína Cry1Ab en los granos enlatados está por debajo del límite de detección. Esto indica que el procesamiento (cocción /

esterilización a 100 – 110 °C) inactiva o destruye la proteína Cry1Ab. Lo mismo se espera que ocurra en los granos de maíz frescos cuando se los prepara para consumo. Las mazorcas se cocinan para ser consumidas (en plancha, en olla a presión, en microondas, etc.)

C. Información relacionada con la modificación genética

1. Método usado para transformar la planta

Syngenta desarrolló el maíz Bt11 × MIR162 × NK603 (*Zea mays* L., maíz) combinando tres eventos de transformación individuales mediante mejoramiento genético convencional. Este híbrido de maíz de eventos acumulados proporciona control de ciertas plagas de insectos lepidópteros y tolerancia al glufosinato de amonio y al glifosato en productos herbicidas.

El evento BT11

El maíz BT11 fue desarrollado a través de transferencia directa de la construcción genética a protoplastos de línea H8540 y regeneración en medio selectivo. Individuos de la línea portadora del evento seleccionado fueron cruzados y retrocruzados con líneas élite de maíz corporativas para asegurar su presencia en las líneas élite.

La transformación de protoplastos se realizó mediante la acción sinérgica de MgCl₂ y polietilen glicol (PEG) de acuerdo con la descripción de Negrutiu et al. (1987). La electroporación se hizo en solución de W5 a temperatura ambiente o en hielo, de acuerdo con la descripción de Shillito et al (1985). La obtención de plantas regeneradas fértiles se hizo de acuerdo con el método descrito por Morocz et al., 1990.

Evento MIR162

El maíz MIR162 fue producido por medio la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* (Negrotto et al., 2000; Hoekema et al., 1983), usando embriones inmaduros de *Zea mays*, línea NP2500xNP2499. Usando este método, elementos genéticos dentro de los extremos izquierdo y derecho del T-DNA del plásmido de transformación pNOV1300 son eficientemente transferidos e integrados dentro del genoma de la célula de la planta, mientras que los elementos externos a estos extremos generalmente no son transferidos.

Plántulas regeneradas fueron testeadas para la presencia de ambos genes vip3Aa y pmi, así como para la ausencia de la espectinomomicina (spec) gen de resistencia a antibióticos, por medio del análisis TaqMan PCR (Ingham et al., 2001). Las plantas positivas para ambos genes el pmi y el vip3Aa y negativas para el spec, fueron transferidas a invernaderos para posterior propagación.

Evento NK603

Las plantas de maíz derivadas del evento NK603 contienen el transgén cp4 epsps. El transgén cp4 epsps codifica la proteína 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) derivada de *Agrobacterium sp.* cepa CP4. El CP4 EPSPS confiere tolerancia al glifosato. Producido a través de transformación por bombardeo de micropartículas, en donde partículas de oro o tungsteno fueron recubiertas del material genético del vector binario PV-ZMGT32, el cual contiene el gen de interés cp4 epsps regulado por el promotor 1 de la actina del arroz (pRACT)T-NO y el terminador nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-NOS).

2. Diferencias del evento y Cultivar convencional

Syngenta desarrolló el maíz BT11 × MIR162 × NK603 (*Zea mays* L., maíz) combinando tres eventos de transformación individuales mediante mejoramiento Convencional. Este maíz de eventos apilados proporciona control frente a ciertas plagas de insectos lepidópteros del maíz y tolerancia a los herbicidas a base de glufosinato de amonio y glifosato.

Cuando se comparó las concentraciones de proteína en varios tipos de tejidos y etapas de desarrollo, las diferencias estadísticas no se consideran directamente significativas desde el punto de vista biológico cuando los rangos cuantitativos se solapan entre los acumulados y su respectivo evento individual o si no se producen tendencias directivas entre los tipos de tejidos o las etapas de desarrollo.

La concentración media de Cry1Ab en las hojas R1 y en los granos R6 del maíz Bt11 fue Significativamente inferior desde el punto de vista estadístico a las del maíz BT11 × MIR162 × NK603. Estas diferencias estadísticas no se consideran biológicamente significativas, ya que los rangos cuantitativos para ambos tipos de tejido se solaparon entre el evento acumulado y el evento individual.

Además, estas diferencias no se observaron en todas las etapas de desarrollo, ya que las comparaciones de las concentraciones de Cry1Ab en las hojas V6 y en la senescencia R6 no difirieron significativamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en raíces, plantas enteras y forraje.

Análisis composicional de grano y forraje del evento y comparación con maíz convencional:

Se compararon los niveles de componentes nutricionales clave en el forraje y el grano de maíz BT11 × MIR162 × NK603 con los del forraje y el grano de maíz de control convencional casi isogénico. Se sembró maíz BT11 × MIR162 × NK603 tratado con los herbicidas específicos para el evento (TSH) glufosinato y glifosato, correspondiente maíz convencional casi isogénico (control), y seis híbridos de referencia de maíz no convencional.

Se colectaron muestras de forraje y grano, y se analizaron en busca de nutrientes y antinutrientes clave para la alimentación humana y animal. En las comparaciones entre localidades de la prueba + TSH y el control, no se detectaron diferencias estadísticamente

significativas para ninguno de los componentes del forraje. Los niveles medios de todos los componentes del forraje en la prueba + TSH se encontraban dentro de los rangos de los híbridos de referencia y de los rangos publicados en la base de datos AFSI.

De los 57 componentes cuantificables en el grano que se compararon estadísticamente, los niveles de 43 componentes en la prueba + TSH no fueron significativamente diferentes de los niveles en el testigo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles entre test + TSH y el control en el caso de un proximal (grasa), cuatro minerales (calcio, hierro, manganeso y zinc), cuatro vitaminas (α -tocoferol, β -caroteno, piridoxina y tiamina), cuatro ácidos grasos (16:0 palmítico, 17:0 heptadecanoico, 18:1 oleico y 22:0 behénico) y un metabolito secundario (ácido p-cumárico).

Sin embargo, los niveles medios de todos los componentes cuantificables del grano en el test+ TSH se encontraban dentro de los rangos de los híbridos de referencia y de los rangos publicados en la base de datos AFSI. Todos los componentes del forraje y la mayoría de los componentes del grano en la prueba + TSH no difirieron del testigo. En los casos en que se produjeron diferencias, los niveles medios en test+ TSH se encontraban dentro de los intervalos considerados normales para el maíz convencional.

Por lo tanto, la conclusión es que la composición de nutrientes del forraje y el grano del maíz BT11 $\times$ MIR162 $\times$ NK603 no difieren con la composición de nutrientes de los maíces convencionales.

3. Estabilidad genética y/o fenotípica del inserto

Análisis moleculares indican que el inserto se ha integrado de forma estable en el genoma de la planta de cada evento individual (BT11, MIR162 y NK603) que se utilizó para la producción del híbrido transgénico BT11 $\times$ MIR162 $\times$ NK603.

En todos los análisis de Southern Blot, los patrones de hibridación de ADN para el maíz BT11 $\times$ MIR162 $\times$ NK603 correspondieron a las bandas de hibridación observadas para los eventos individuales. Esto indicó que la integridad del inserto transgénico de cada evento individual se preservó durante el mejoramiento convencional para producir el maíz BT11 $\times$ MIR162 $\times$ NK603.