

**RESUMEN DE LA SOLICITUD PARA MAÍZ
BT11 x TC1507 x NK603 - 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 DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ6Ø3-6 Otros Nombres: BT11 x TC1507 x NK603	
6. Objetivo de la solicitud Autorización de uso del maíz BT11 x TC1507 x NK603 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, Colombia, Indonesia, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Nigeria, Paraguay, Filipinas, Rusia, Sur África, Sur Corea, Suiza, Taiwán, Tailandia, Turquía, Estados Unidos, Uruguay, Vietnam. El evento TC 1507 Está aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Colombia, Indonesia, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Paraguay, Filipinas, Rusia, Singapur, Sur África, Sur Corea, Nueva Zelanda, Taiwán, Tailandia, Reino unido, Estados Unidos, Vietnam, Zambia. El evento NK603 Está aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Colombia, Cuba, 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: 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.

8. Algún otro uso aprobado en Colombia:

El evento BT11 x TC1507 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 TC1507: *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces viridochromogenes*

Evento NK603: *Agrobacterium tumefaciens*.

2. Descripción de la modificación genética

Las plantas de maíz provenientes del evento **BT11 x TC1507 x NK603** presentan tolerancia al ataque de un rango de insectos del orden Lepidóptera, tolerancia al ataque de ciertos insectos coleópteros y presenta tolerancia a los herbicidas con los i.a. glifosato y glufosinato de amonio.

La línea del maíz BT11 X TC1507 X NK603 se logró por fitomejoramiento convencional a través del cruzamiento de líneas portadoras de los eventos BT11, TC1507 y NK603.

Los métodos de transformación utilizados en los eventos individuales fueron:

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.

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 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.

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 al i.a. glufosinato de amonio (o fosfinotricina), ingrediente activo de herbicidas como Basta, Liberty o Finale.

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 causa la muerte de estos. La enzima PAT cataliza la acetilación del i.a. glufosinato de amonio, convirtiéndolo en un compuesto inactivo, detoxificando los tejidos vegetales del mismo.

Evento TC1507

Gen cry1F: La proteína insecticida Cry1F, una delta-endotoxina, confiere control a determinados insectos Lepidópteros plaga. Su mecanismo de acción consiste en su unión de manera selectiva a sitios específicos localizados en el epitelio del estómago medio de las especies de insectos susceptibles. Posteriormente a esta unión, se forman poros que interrumpen el flujo de iones del estómago, causando la parálisis del estómago y la muerte del insecto.

Evento NK603

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

C. Información relacionada con la modificación genética

1. Método usado para transformar la planta

Cruzamiento convencional de líneas portadoras de los eventos BT11, TC1507, NK603.

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. El ADN insertado fue el plásmido pZ01502 que consiste en dos casetes de expresión, un casete 35S-1/intron/Btk HD-1/NOS en el polilinker del sitio de clonación y un casete 35S-2/intron/PAT/Nos en el sitio Bgl II del plásmido pZ0997. Ambos casetes tienen la misma dirección de transcripción con respecto al plásmido.

pZ0997 fue construido mediante la conversión de los sitios Bsp HI (en las bp 1526 y 2354) de pZ0930 a sitios Not I mediante llenado, seguido de ligación del linker. pZ0930 fue hecho llenando el sitio Eco O 1091 del plásmido base pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985) y ligación a los linkers Bgl II. El gen ampR se usó como un marcador cuando el plásmido estaba siendo generado en *E. coli*.

Cuando está bajo el control de un promotor procariota (bacteria), el gen confiere resistencia al antibiótico ampicilina; sin un promotor vegetal no se expresa en células vegetales. El vector plásmido pZ01502 fue diseñado para facilitar la remoción del gen ampR antes de la transformación de la planta. Además, el análisis Southern blot ha mostrado que los descendientes de la línea Bt11 no llevan el gen ampR.

Evento TC1507

Se obtuvo por aceleración de partículas en células embriogénicas de maíz. El fragmento PHI8999A del vector PHP8999 fue usado para la transformación. La región que fue insertada (PHI8999A) contiene el gen cry1Fa2 de *Bacillus thuringiensis var. aizawai*, este gen está bajo el control del promotor de Ubiquitina de maíz (Ubi1ZM) y una secuencia finalizadora de *Agrobacterium tumefaciens* (ORF25PolyA).

También contiene el gen pat proveniente de *Streptomyces viridochromogenes*, que codifica para la enzima fosfinotricin acetil transferasa; este gen está bajo el control del promotor 35S y finalizador del Virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El fragmento PHI8999A no contiene el gen nptII presente en el vector PHP8999 que confiere resistencia de las células bacterianas a la kanamicina.

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 PVZMGT32, 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 x TC1507 x NK603 maíz (*Zea mays* L.) 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 x TC1507 x 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

Componentes nutricionales claves en forraje y grano del híbrido de maíz BT11 x TC1507 NK603 fueron medidos y comparados con aquellos del maíz no transgénico, casi isogénico.

Se analizó el forraje en busca de proximales y minerales (calcio y fósforo). Se analizó el grano en busca de proximales, almidón, minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, metabolitos secundarios y antinutrientes. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para probar los efectos de entrada tanto en entre las ubicaciones como dentro de cada ubicación. Se realizaron comparaciones estadísticas entre la prueba + TSH y el control.

Además, los niveles medios de los componentes se compararon con el rango (mínimo a máximo) de valores para los seis híbridos de referencia no transgénicos y con los rangos para el maíz convencional publicados en la Base de Datos de Composición de Cultivos del Instituto de Sistemas de Agricultura y Alimentos (AFSI).

La conclusión del estudio es que la composición de nutrientes del forraje y el grano del maíz BT11 x TC1507x NK603 no es materialmente diferente de la del maíz de control no transgénico, casi isogénico o de la del maíz convencional.

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 x TC1507 x NK603) que se utilizó para la producción del híbrido transgénico BT11 x TC1507 x NK603.

En todos los análisis de Southern Blot, los patrones de hibridación de ADN para el maíz BT11 x TC1507 x 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 x TC1507 x NK603.