

**RESUMEN DE LA SOLICITUD PARA MAÍZ
BT11 x MIR162 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 SYN-IR162-4 x DAS-Ø15Ø7-1 x MON- ØØ6Ø3-6 Otros Nombres: BT11 x MIR162 x TC1507 x NK603	
6. Objetivo de la solicitud Autorización de uso del maíz BT11 x MIR162 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, 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 TC 1507 está aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Unión Europea, Indonesia, Irán, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Paraguay, Filipinas, Rusia, Singapur, 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: 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 NK603: 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.

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

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 MIR162 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.

El híbrido de maíz Bt11 x MIR162 x TC1507 x NK603, fue seleccionado del cruzamiento convencional entre los eventos Bt11, MIR162, TC1507 y NK603.

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).

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.

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).

Gen *pmi*

Codifica la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI) de *E. coli* (cepa K-12), que permite que las células vegetales portadoras del gen *pmi* utilicen manosa como fuente de carbono. Este gen actúa como marcador de selección durante el proceso de obtención de plantas genéticamente modificadas.

Gen *cry1Fa2*

La proteína insecticida Cry1F, una δ endotoxina, confiere resistencia 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.

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, MIR162, TC1507, y 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 polietilén 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 0 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 pZO1502 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 MIR162

El protocolo utilizado en la obtención del plásmido pNOV1300 sigue procedimientos patrón de biología molecular, descritos por Sambrook et al (1989). Los genes vip3Aa19 y pm1 fueron cortados utilizando enzimas de restricción disponibles comercialmente, introducidos en los vectores cortados y ligados al vector de *Agrobacterium* para crear la construcción final pNOV1300.

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.

La replicación del pNOV1300 en *A. tumefaciens* cepa LBA4404 (licenciada de Japan Tobacco), se hizo posible vía recombinación homóloga con un “acceptor vector” (también llamado pSB1) que lleva el origen de replicación para múltiples hospederos (Komari et al., 1996).

La cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* lleva un plásmido Ti desarmado (Ooms et al., 1982), de donde el T-DNA ha sido borrado. Este plásmido Ti lleva los genes vir que codifican por proteínas que se requieren para transferir la región del T-DNA del plásmido pNOV1300 a las células de la planta para integración al genoma del maíz.

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 × MIR162 × TC1507 × NK603 (*Zea mays* L., maíz) combinando cuatro 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 × TC1507 × 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 × TC1507 × NK603 con los del forraje y el grano de maíz de control convencional casi isogénico. Se sembró maíz BT11 × MIR162 × TC1507 × 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 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.

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 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.

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 x MIR162 x TC1507 x 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, TC1507 y NK603) que se utilizó para la producción del híbrido transgénico BT11 x MIR162 x TC1507 x NK603.

En todos los análisis de Southern Blot, los patrones de hibridación de ADN para el maíz BT11 x MIR162 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 MIR162 x TC1507 x NK603.