RESUMEN SOLICITUD DEL MAÍZ MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603 PARA CONSUMO ANIMAL

A. INFORMACIÓN GENERAL

Nombre del solicitante Compañía Agrícola S.A.S	***Nombre del contacto*** Andres Guillen Gomez
Dirección del solicitante Avda. Américas #57-52 – PBX (1)4234504 502, Bogotá.	***Dirección del contacto*** Avda. Américas #57-52 – PBX (1)4234504 502, Bogotá.
Nombre del producto (Identificador de OECD y otros nombre) **Identificador OECD:** MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87419-8 x MON-ØØ6Ø3-6 **Otros nombres:**	
Objetivo de la solicitud. Aprobación uso del Maíz MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603 como alimento directo o como materia prima para la producción de alimentos de consumo animal.	
Aprobaciones y usos en otros países: El evento MON87427 ha sido aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Indonesia, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Nigeria, Filipinas, Singapur, Corea del Sur, Taiwán, Estados Unidos y Vietnam para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento MON89034 ha sido aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Unión Europea, Honduras, Indonesia, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Nigeria, Paraguay, Filipinas, Federación Rusa, Singapur, Sur África, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia, Turquía, Estados Unidos y Vietnam para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento MIR162 ha sido aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Unión Europea, Indonesia, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Paraguay, Filipinas, Federación Rusia, Singapur, Sur África, Corea del Sur, Taiwán, Turquía, Estados Unidos, Vietnam y Zambia para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento MON87419 ha sido aprobado en Argentina, Brasil, Canadá, Japón, México, Nueva Zelanda, Corea del Sur, Taiwán y Estados Unidos para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento NK603 ha sido 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, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia, Turquía, Estados Unidos, Uruguay y Vietnam para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento MON87427 x MON87419 x NK603 ha sido aprobado en Brasil para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento MON87427 x MON89034 x NK603 ha sido aprobado en la Unión Europea, Japón, México, Corea del Sur y Taiwán para consumo humano y/o animal y/o siembra.	

El evento MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87411 ha sido aprobado en Argentina, Brasil, Japón, México, Corea del Sur y Taiwán para consumo humano y/o animal y/o siembra.

El evento MON87427 x MON89034 x MIR162 x NK603 ha sido aprobado en Argentina, Brasil, Japón, México, Corea del Sur y Taiwán para consumo humano y/o animal y/o siembra.

El evento MON89034 x NK603 ha sido aprobado en Argentina, Brasil, Canadá, Unión Europea, Japón, México, Nigeria, Pakistán, Filipinas, Sur África, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia y Turquía para consumo humano y/o animal y/o siembra.

El evento MIR162 x MON89034 ha sido aprobado en Argentina, Brasil, México y Taiwán para consumo humano, animal y siembra.

El evento MIR162 x NK603 ha sido aprobado en Argentina y Brasil, México y Taiwán para consumo humano y/o animal y/o siembra.

El evento MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603 ha sido aprobado para para consumo humano y animal en Japón y para siembra en Corea del Sur.

Algún otro uso aprobado en el país:
El evento MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603 aún no tiene aprobación de uso en el país. Sin embargo, ya existe aprobación para algunos de los eventos individuales y/o combinaciones que lo componen.

B. INFORMACIÓN RELACIONADA CON EL OVM

1. Nombre de parentales y/o Donadores:
Familia: Poaceae
Género: *Zea*
Especie: *Z. mays* L
Nombre común: Maíz
Líneas: MON87427, MON89034, MIR162, MON87419 y NK603.

2. *Descripción de la modificación genética:*
El maíz con tecnología MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603 se desarrolló mediante el cruzamiento convencional de los eventos MON87427, MON89034, MIR162, MON87419 y NK603, los cuales individualmente fueron producidos con el uso de la biotecnología moderna.

El maíz MON87427 presenta expresión tejido-específica de la proteína CP4 EPSPS (*5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa)*, que le da tolerancia o resistencia a herbicidas a base de glifosato, en la mayoría de la planta, con excepción de los tejidos reproductivos masculinos como el polen o tapete donde no se presenta la expresión de esta proteína y son por ende susceptibles al glifosato. Para ello se utilizó un promotor específico y una combinación intrónica (*e35S-hsp70*) para dirigir la expresión de la proteína CP4 EPSPS en tejidos vegetativos y reproductores femeninos, confiriendo tolerancia al glifosato en los tejidos de las hojas, el tallo y las raíces y en los tejidos que se desarrollan dentro de la semilla o del grano y en la pelusa.

El maíz MON89034 se desarrolló por transformación de maíz mediada por A. tumesfaciens. Para esto, se utilizó el vector binario PVZMIR245 que contenía dos regiones de T-DNA. En la primera región se insertaron las secuencias de expresión de los genes *cry1A*.105 y *cry2Ab2*. La construcción del gen *cry1A*.105 incluyó el promotor P-e35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) con una región potencializadora duplicada, la secuencia no traducida 5' de la clorofila a/b del trigo (proteína de unión - LCab), el intrón del gen de la Actina del arroz (I-*Ract1*) y la región 3' no traducida de la secuencia de la proteína de choque térmico del trigo 17 (T-*Hsp17*), que termina la transcripción y le proporciona la señal de poliadenilación al mRNA. Cada una de las secuencias codificadoras fue modificada para optimizar su expresión en plantas monocotiledóneas. La región promotora del gen *cry2Ab2* (gen de *B. thuringiensis* subs. Kurstaki), está formada por el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Escrofularia (P-FMV) y el primer intrón de la proteína 70 de choque térmico del maíz (gen I-*Hsp70*), la secuencia *cry2Ab2*, la región del péptido de tránsito al cloroplasto, de la subunidad de Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa del maíz, incluyendo el primer intrón (TSSSU-CTP), y la región 3' no traducida, codificante de la Nopalina Sintasa (T-*nos*) de *A. tumefaciens*, que termina la transcripción y proporciona la señal de poliadenilación. La segunda región, contiene la secuencia de expresión de la proteína NPTII (Neomicina fosfotransferasa II) junto con el promotor (P-E35S) del virus del Mosaico del Coliflor (CaMV 35S), y la región T-nos de *A. tumefaciens*, que termina la transcripción y proporciona la señal de poliadenilación. El gen *nptII* se utilizó como marcador de selección para el aislamiento y la regeneración de las plantas transgénicas. Una vez que las plantas transgénicas fueron regeneradas, el gen marcador de selección fue retirado por fitomejoramiento convencional, de tal forma que las líneas transgénicas únicamente contienen los genes *cry1A*.105 y *cry2Ab2*.

El evento de maíz MIR162 se desarrolló por transformación genética mediada por *A. tumefaciens* (cepa LBA4404) utilizando el plásmido binario pNOV1300 como vector de clonación. La replicación del vector pNOV1300 se hizo posible vía recombinación homóloga con otro vector aceptor que lleva un plásmido Ti desarmado, al cual se le quitó la sección del T-DNA. Para la transformación se utilizaron dos construcciones genéticas que se insertaron de manera consecutiva en el genoma del maíz. La primera inserción contiene la secuencia de expresión del gen *vip3Aa20* que codifica para la proteína insecticida Vip3Aa de *B. thuringiensis* (cepa AB88), tóxica para ciertos insectos lepidópteros, el cual se encuentra bajo el control del promotor del gen de la poliubiquitina de *Z. mays*, y el extremo 3' de poliadenilación la secuencia 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. La segunda inserción genética está constituida por el gen *pmi* de *E. coli* cepa K-12 regulada bajo el promotor del gen de la poliubiquitina de *Z. mays*, y la secuencia de la Nopalina Sintasa (NOS) de *A. tumefaciens* para generar una señal de poliadenilación. El gen *pmi* codifica para la proteína Fosfomanosa-isomerasa que cataliza la interconversión reversible de la manosa-6-fosfato y la fructosa-6-fosfato. En la construcción se utiliza como gen de selección de transformación.

El evento de maíz MON87419 fue desarrollado por transformación del maíz mediada por *Agrobacterium* utilizando el vector plásmido PV-ZMHT507801. El PV-ZMHT507801 tiene aproximadamente 14.6 kb largo y contiene dos ADN-T separados. El primer ADN-T (ADN-T I) contiene los casetes de expresión dmo y pat. El casete de expresión dmo contiene los siguientes elementos genéticos promotor del virus del rayado clorótico del maní de la familia caulimoviridae (PCISV), la secuencia líder 5' no traducida del gen Cab de *Triticum aestivum*, el intron Ract1 de *Oryza sativa*, la secuencia objetivo del cloroplasto CTP4 de Petunia

hybrida y la región no traducida 3' de la proteína de choque térmico 17 (Hsp17) de *Triticum aestivum*. El casete de expresión de pat contiene los siguientes elementos genéticos: Promotor Ubq, secuencia líder no traducida Ubq 5', y el intron Ubq de *Andropogon gerardii*, y la región no traducida 3' del gen Ara5 de *Oryza sativa*. El segundo ADN-T (ADN-T II) contiene el casete de expresión de cp4epsps. El casete de expresión de cp4epsps contiene los siguientes elementos genéticos: el promotor Ract1, la secuencia líder no traducida 5' del intron de *Oryza sativa*, la secuencia de direccionamiento del cloroplasto CTP2 de *Arabidopsis thaliana* y la región no traducida nos 3' de *Agrobacterium tumefaciens*. Durante la transformación, se insertaron ambos ADN-T, en el genoma del maíz. Por cruzamiento tradicional, segregación, selección y clasificación, se aislaron únicamente aquellas plantas que contienen los casetes de expresión dmo y pat (ADN-T I) pero que no contienen el casete de expresión cp4 epsps (ADN-T II). La región de la estructura PV-ZMHT507801, ubicada por fuera de los ADN-T, contiene dos orígenes de replicación para mantenimiento del vector plásmido en la bacteria (ori V, ori pBR322), un gen marcador seleccionable (aadA), y una secuencia de codificación para la proteína represora del primer (ROP) para mantenimiento del número de copias del vector plásmido en *Escherichia coli* (E. coli). Excepto por la posibilidad de que *S. maltophilia* cause infecciones en pacientes con compromiso de su sistema inmunológico, no existe evidencia de patogenicidad para humanos o animales, para ninguno de los organismos donantes de las secuencias codificadoras y no codificadoras de ADN presentes en MON87419.

El evento de maíz NK603 fue desarrollado mediante la inserción del gen CP4-*epsps* que codifica una versión de la enzima 5-sintasa enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS), que es tolerante al glifosato. El gen fue aislado de la bacteria *A. tumefaciens* cepa CP4 y se introdujo dentro del genoma del maíz utilizando la técnica de Biobalística. El ADN utilizado fue clonado en el plásmido PV-ZMGT32, el cual consistió en un fragmento de 6.7kb que contenía dos secuencias de expresión del gen cp4-*epsps*, el cual expresa la enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa. En la primera secuencia la expresión de CP4-EPSPS está regulada por el promotor de la Actina del arroz y su intrón asociado, y la región 3' (no traducible) del gen de la nopalina-sintasa (3'NOS) procedente de la misma bacteria. En la segunda secuencia, la expresión de CP4 EPSPS está bajo el control del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor, el intron de la proteína 70 de Choque térmico del maíz (Zm-*HSP70*) y la señal de terminación transcripcional del gen de la nopalina-sintasa (3'NOS). En ambos casos la translocación de la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto esta mediada por el péptido de transito al cloroplasto (CPT2, aislado de la EPSPS de *Arabidopsis thaliana*), cuya secuencia se incluyó en el constructo, en el extremo 5' de cada casete de expresión.

C. INFORMACION RELACIONADA CON LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1. Método usado para transformar la planta:

El maíz MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603 se desarrolló mediante el cruzamiento convencional de MON87427, MON89034, MIR162, MON87419 y NK603 producidos con el uso de ingeniería genética.

2. Diferencias del evento y Cultivar convencional:

En principio, el evento de maíz MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603 es sustancialmente equivalente al maíz convencional.

En términos generales, este evento de maíz, no presenta diferencias biológicas significativas con respecto a los maíces convencionales. Los estudios de características agronómicas y nutricionales, muestran que no habría diferencias significativas entre el evento conjunto, los eventos individuales y los testigos convencionales.

La gran diferencia se basa en la expresión de seis proteínas transgénicas, que fueron introducidas por el cruce de los cinco eventos transgénicos, las cuales son: CP4-EPSPS, Cry2Abs, Cry1A.105, Vip3Aa20, DMO y PAT, que le confieren resistencia al ataque de ciertos insectos lepidopteros, tolerancia a la aplicación de los herbicidas glufosinato de amonio, glifosato y dicamba.

3. Estabilidad genética y/o fenotípica del inserto

Análisis moleculares indican que los transgenes de cada uno de los eventos individuales (MON87427, MON89034, MIR162, MON87419 y NK603), se ha integrado de forma estable en el genoma del hibrido MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603.

Se realizaron análisis de *Southern Blot* o PCR para secuenciación usando tejido del evento MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603 y de tejidos de cada uno de los eventos individuales. Las bandas de hibridación y de PCR obtenidas fueron las esperadas según análisis previos. Todas las bandas observadas corresponden a las presentadas por el respectivo evento simple, lo que indica que los insertos se han integrado de forma estable en el híbrido.

En resumen, los análisis indican que cada uno de los insertos, presentes en cada uno de los eventos individuales, se han integrado de forma estable en el híbrido Maíz MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87419 x NK603.