

## SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN DOCUMENTO DE DECISIÓN

**Trigo (*Triticum aestivum* L.) genéticamente modificado IND-ØØ412-7 (OECD), que confiere tolerancia a sequía y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, presentado por el Instituto de Agrobiotecnología Rosario S.A.**

Sobre la base del análisis de la información presentada por el solicitante y del conocimiento científico disponible, los suscriptos, miembros de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) y de la Dirección de Biotecnología recomiendan dar por finalizada la Segunda Fase de Evaluación del trigo genéticamente modificado IND-ØØ412-7, concluyendo que los riesgos derivados de la liberación de este organismo vegetal genéticamente modificado (OVGM) al agroecosistema, en cultivo a gran escala, no difieren significativamente de los inherentes al cultivo de trigo no GM.

El trigo IND-ØØ412-7 ha sido ensayado a campo en Argentina desde 2007 hasta 2015 y para tal fin fueron solicitados y evaluados por la CONABIA nueve (9) permisos para experimentación y/o liberación confinada al medio agropecuario que han cumplido con la normativa vigente para los OVGM, y han sido autorizados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP).

El presente Documento de Decisión se aplica al trigo IND-ØØ412-7 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de este material con cualquier *Triticum aestivum* no GM obtenidos en forma convencional.

## **I. CARACTERIZACIÓN DEL ORGANISMO VEGETAL GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OVGM)**

**1. Nombres común y científico:** Trigo (*Triticum aestivum* L.)

**2. Denominación del evento:** Trigo IND-ØØ412-7

### **3. Fenotipo aportado por las modificaciones genéticas introducidas**

Tolerancia a sequía conferida por el producto de expresión del gen *HaHB4*. Tolerancia a herbicidas en base a glufosinato de amonio dado por el producto de expresión del gen *bar*.

#### **3.1. Descripción del herbicida**

El glufosinato es un herbicida no selectivo, sin acción residual, de amplio espectro, utilizado para el control de malezas latifoliadas y gramíneas en postemergencia.

Actúa inhibiendo la enzima cloroplástica glutamino sintetasa involucrada en la asimilación de amonio y la producción del aminoácido glutamina. La acumulación de amonio causa un rápido desacoplamiento de la fotofosforilación, así como inhibición de la fijación fotosintética de carbono y disrupción de la síntesis de aminoácidos.

#### **3.2. Mecanismo de acción de los productos de expresión**

##### **HAHB4**

Los estudios que condujeron a dilucidar el modo de acción de HAHB4 fueron realizados, mediante el análisis de su expresión en la planta de origen, *Helianthus annuus*, y mediante la expresión ectópica en *Arabidopsis*. Ensayos a nivel molecular, realizados para el trigo IND-ØØ412-7 indican que el fenotipo de tolerancia a estrés observado estaría asociado a la participación de HAHB4 en las vías de transducción de señales involucradas en la respuesta a estrés hídrico y salino. Una diversidad de mecanismos participan en la producción de metabolitos involucrados en el complejo proceso de respuesta a estreses bióticos y abióticos relacionados con HAHB4. Básicamente, estos metabolitos son los que intervienen en el proceso de senescencia (etileno), fotosíntesis (clorofila), síntesis de osmoprotectores

(poliaminas y glicin betaínas), y defensa frente a daños mecánicos y herbivoría (inhibidores de tripsina y compuestos volátiles). A su vez, éstos son sintetizados y/o están regulados por enzimas y factores de transcripción cuya expresión también está modificada por la expresión de HAHB4. Se sabe que este factor de transcripción interactúa directamente con al menos tres fitohormonas, ácido abscísico, etileno y jasmónico. En estas interacciones se basa gran parte de su mecanismo de acción.

En trigo IND-ØØ412-7, el ácido abscísico provoca una clara inducción de la transcripción de *HaHB4*. En este sentido, fenómenos directamente relacionados con el incremento en la síntesis de ácido abscísico, tales como sequía y salinidad, también provocan la inducción a nivel transcripcional de *HaHB4*. Otro de los inductores de la expresión de *HaHB4* es el etileno. Estudios previos muestran que, dependiendo de los niveles de expresión de HAHB4, la sensibilidad de las plantas al etileno disminuye y su síntesis, en ciertas situaciones, podría verse afectada. A partir de los resultados obtenidos en trigo IND-ØØ412-7, se postula que el nivel de HAHB4 alcanzado bajo estrés hídrico es suficiente para que la planta continúe fotosintéticamente activa bajo condiciones de sequía. Esto sería el resultado de una menor síntesis y/o sensibilidad al etileno, la inducción de la síntesis de osmoprotectores, y el retardo del cierre estomático temprano, entre otros factores asociados al factor de transcripción HAHB4.

En resumen, se ha observado que la expresión del gen *HaHB4* en el trigo IND-ØØ412-7, está positivamente regulada por estrés ambiental, como sequía o salinidad, resultando en una compleja respuesta en la que intervienen diversas rutas metabólicas. Los resultados obtenidos a partir de ensayos moleculares indicarían que el complejo mecanismo molecular de HAHB4 en el cultivo GM sería análogo al observado en las otras dos especies también ensayadas, *Helianthus annuus* y *Arabidopsis*.

## **PAT**

PAT está involucrada en la inactivación de glufosinato de amonio por acetilación, confiriendo tolerancia dicho herbicida y ha sido extensivamente utilizada en la modificación genética de cultivos. Su mecanismo de acción es bien conocido y ha sido evaluado

oportunamente en instancias de la solicitud de liberación comercial de diferentes eventos de maíz, soja y algodón, resultando en Documentos de Decisión favorables en todos los casos.

#### 4. Modificaciones genéticas introducidas

##### 4.1. Método de obtención del OVG: Biobalística

##### 4.2. Secuencias introducidas

Elemento genético	Descripción	Función
<i>prUbi-1</i>	Promotor del gen <i>Ubi-1</i> de maíz.	Promotor que conjuntamente con el <i>Ubi-1</i> Exón y <i>Ubi-1</i> Intrón dirige la expresión del de <i>HaHB4</i> y <i>bar</i> .
<i>Ubi-1</i> exón	Extremo 5' no traducido del exón del gen <i>Ubi-1</i> de maíz.	Exón que conjuntamente con el <i>prUbi-1</i> y <i>Ubi-1</i> Intrón dirige la expresión de <i>HaHB4</i> y <i>bar</i> .
<i>Ubi-1</i> intrón	Primer intrón del gen <i>Ubi-1</i> de maíz.	Intrón que conjuntamente con el <i>Ubi-1</i> Exón y <i>prUbi-1</i> dirige la expresión de <i>HaHB4</i> y <i>bar</i> .
<i>HaHB4</i> ( <i>Helianthus annuus</i> Homeobox 4)	Secuencia codificante del gen <i>HaHB4</i> de girasol ( <i>Helianthus annuus</i> ).	Su producto de expresión es el factor de transcripción HAHB4, perteneciente a la subfamilia HD-Zip I, el cual confiere tolerancia a sequía.
<i>Tnos</i>	Terminador de la transcripción de la nopalina sintasa.	Terminador de la transcripción del de <i>HaHB4</i> y <i>bar</i> .
<i>bar</i>	Secuencia codificante de la enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT), proveniente de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .	Su producto de expresión está involucrado en la inactivación de glufosinato de amonio por acetilación, confirmando resistencia a dicho herbicida.
<i>pBR322</i>	Origen de replicación derivado del plásmido pBR322.	Origen de replicación derivado del plásmido <i>pBR322</i> .
<i>bla</i>	Secuencia codificante de la $\beta$ -lactamasa de <i>E.coli</i> .	Su producto de expresión permite la selección de bacterias que incorporaron el plásmido mediante la utilización de antibióticos beta-lactámicos.

<i>prGbl1-1</i>	Secuencias parciales del promotor de globulina 7S de trigo.	Promotor que dirige la expresión de <i>gus</i> .
<i>gus</i>	Gen que codifica la enzima $\beta$ -glucuronidasa de <i>E.coli</i> .	Su producto de expresión es utilizado para detectar a las plantas transformadas por histoquímica, mediante un sustrato específico.
T35S CaMV	Terminador de la transcripción del virus mosaico de la coliflor.	Terminador de la transcripción del gen <i>gus</i> .

#### 4.3. Número de copias, integridad y/o rearrreglos dentro del inserto

Mediante *Southern blot* y secuenciación de nueva generación (del inglés *Next Generation Sequencing*, NGS), en conjunto con el análisis bioinformático para detectar las secuencias de

unión entre el inserto y el genoma de la planta (*Junction Sequence Analysis*, JSA), se determinó que los genes y las secuencias regulatorias insertadas (ver punto 3.3.) se encuentran formando parte de dos insertos que se comportan como un único locus en el genoma del trigo IND-ØØ412-7. Uno de ellos de 47.611 pb (inserto "largo") y otro de 20.418 pb (inserto "corto").

Como consecuencia de la utilización de la técnica de bombardeo con micropartículas para la transformación del trigo IND-ØØ412-7, se produjeron diversos rearrreglos de los elementos genéticos insertados, respecto de la construcción original presente en el vector de transformación. Estos rearrreglos incluyen deleciones, inserciones e inversiones.

A partir de los resultados de la secuenciación se determinó que el inserto largo contiene una copia funcional de *HaHB4* y tres copias funcionales del gen *bar* con sus respectivos elementos regulatorios. A su vez, dicho inserto posee varias copias no funcionales (Tabla). Además, presenta secuencias nucleotídicas parciales pertenecientes al esqueleto del vector de transformación.

Por su parte, el inserto corto consta de una copia completa no funcional del gen *HaHB4*, ocho copias del gen *bla* y una copia del gen *bar*, todas ellas incompletas y/o no funcionales (Tabla). Por otro lado, existen en este inserto, secuencias nucleotídicas parciales pertenecientes al esqueleto del vector de transformación.

Elemento genético	N° copias funcionales	N° copias no funcionales
<b>Inserto largo</b>		
<i>prUbi-1</i>	4	3 <sup>c</sup> ; 4 <sup>i</sup>
<i>Ubi-1</i> exón	3	3 <sup>c</sup>
<i>Ubi-1</i> intrón	4	2 <sup>c</sup> ; 3 <sup>i</sup>
<i>HaHB4</i>	1	1 <sup>i</sup>
<i>Tnos</i>	4	3 <sup>c</sup>
<i>bar</i>	3	3 <sup>c</sup> ; 1 <sup>i</sup>
<i>bla</i>	-	8 <sup>c</sup> ; 3 <sup>i</sup>
<i>prGbl1-1</i>	-	3 <sup>i</sup>
<i>gus</i>	-	1 <sup>i</sup>
<b>Inserto corto</b>		
<i>prUbi-1</i>	-	2 <sup>c</sup> ; 2 <sup>i</sup>
<i>Ubi-1</i> exón	-	2 <sup>c</sup>
<i>Ubi-1</i> intrón	-	4 <sup>i</sup>
<i>HaHB4</i>	-	1 <sup>c</sup>
<i>Tnos</i>	-	2 <sup>c</sup>

<i>bar</i>	-	1 <sup>c</sup>
<i>bla</i>	-	4 <sup>c</sup> ; 4 <sup>i</sup>
<i>prGbl1-1</i>	-	3 <sup>i</sup>
<i>gus</i>	-	3 <sup>i</sup>
T35S CaMV	-	1 <sup>i</sup>

c: copia completa; i: copia incompleta

#### 4.4. Regiones flanqueantes

Dada la complejidad del genoma de trigo, se utilizaron los servicios de la plataforma DArT (*Diversity Arrays Technology*) que permite identificar diferencias entre genomas de la misma especie. De esta forma se logró identificar que el locus, donde se produjo la inserción en el genoma de trigo IND-ØØ412-7, está localizado en el cromosoma 2D. Este cromosoma fue aislado por citometría de flujo (*chromosome sorting*) y utilizado para caracterizar la inserción. Mediante técnicas de *Southern blot*, NGS y JSA se determinó que existen cuatro regiones flanqueantes correspondientes a dos insertos que forman parte de un único locus.

Las secuencias flanqueantes de los insertos fueron contrastadas con la base de datos no redundante de NCBI. Los resultados indican que las inserciones se produjeron, para el caso del inserto corto en una región que contiene alta similitud con un retrotransposon, y para el inserto largo en una región altamente repetitiva del genoma de trigo. El análisis bioinformático no mostró evidencias de interrupción de genes o secuencias regulatorias endógenas biológicamente relevantes, en el sitio de inserción.

## **5. Detección del evento**

La presencia del evento IND-ØØ412-7 puede ser determinada experimentalmente mediante la técnica molecular de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) utilizando oligos específicos para el evento y analizando muestras que contenga ADN con un mínimo grado de integridad que permita su amplificación.

## **II. EVALUACIÓN DE RIESGO**

### **1. Estabilidad genética y fenotípica**

La estabilidad genética fue evaluada por medio de ensayos de PCR. Los estudios fueron realizados sobre 92 individuos de la progenie F2, obtenida a partir del cruzamiento de plantas homocigotas de trigo HB4 con la variedad comercial Baguette 17. Este análisis se llevó a cabo considerando las cuatro secuencias flanqueantes, así como las secuencias codificantes de *HaHB4*, *bar* y *bla* completas e incompletas, utilizando oligos específicos. Todas las plantas GM analizadas presentaron resultados consistentes para los tres genes y para las cuatro regiones de unión inserto-genoma. Estos resultados apoyan la conclusión de que la construcción IND-ØØ412-7 se comporta como un único locus dentro del genoma de trigo y se hereda de acuerdo con principios de herencia mendeliana.

La estabilidad fenotípica de tolerancia al herbicida glufosinato de amonio quedó evidenciada mediante ensayos de dosis respuesta en las generaciones T7, T8 y T9.

La estabilidad del fenotipo de tolerancia a sequía quedó demostrada mediante la evaluación del rendimiento en 11 sitios, seleccionados por presentar mayor probabilidad de sequía. El trigo IND-ØØ412-7 exhibió un aumento del rendimiento en aquellas localidades en las que se verificó mayor déficit hídrico durante los ensayos en comparación al trigo convencional variedad Cadenza del 17% y 16% para las generaciones T5 (5 sitios, año 2011) y T7 (6 sitios, año 2013) respectivamente.



## **2. Productos de expresión de las secuencias introducidas**

Durante las campañas 2012 y 2013 se llevaron a cabo ensayos a campo con el fin de realizar un estudio de expresión HAHB4 y PAT en 6 sitios distribuidos en 5 localidades de Argentina, las cuales representan regiones con diversas condiciones ambientales.

### **2.1. Proteína HAHB4:**

La proteína HAHB4 se expresa en concentraciones muy bajas, es por ello que se utilizó la técnica de cromatografía líquida seguida de espectrometría de masa dirigida para su detección. La puesta a punto se realizó utilizando HAHB4 recombinante producida en *Escherichia coli*. Se determinó que el límite de detección del método (LD) es de 0,01 ng de proteína por gramo de tejido fresco.

Teniendo en cuenta el límite de detección establecido, los resultados obtenidos sugieren que los niveles de HAHB4 en las muestras de trigo, provenientes del trigo IND-ØØ412-7, son menores a 0,01 ng/g de peso fresco

**Tabla 1: Detección de HAHB4**

### HAHB4 en plántulas de trigo estresadas, calculado como ng/g PF

Muestra Número	Tratamiento	% PF como proteína	fmoles HAHB4	pg HAHB4 <sup>1</sup>	ng HAHB4 / g Proteína <sup>2</sup>	ng HAHB4/ g PF <sup>3</sup>
wC(T1)1r1	WT 2-Hoja H2O Rep 1	0.56	0.0004	0.0090	0.13	0.001
wC(T1)1r2	WT 2-Hoja H2O Rep 2	0.50	0.0016	0.0335	0.48	0.002
wC(T1)2r1	WT 2-Hoja Mann Rep 1	0.54	0.0011	0.0234	0.33	0.002
wC(T1)2r2	WT 2-Hoja Mann Rep 2	0.57	0.0009	0.0185	0.26	0.002
wM(T1)1r1	Trans 2-Hoja H2O Rep 1	0.56	0.0000	0.0000	0.00	0.000
wM(T1)1r2	Trans 2-Hoja H2O Rep 2	0.65	0.0028	0.0577	0.82	0.005
wM(T1)2r1	Trans 2-Hoja Mann Rep 1	0.58	0.0063	0.1324	1.89	0.011
wM(T1)2r2	Trans 2-Hoja Mann Rep 2	0.68	0.0050	0.1038	1.48	0.010
wC(T2)1r1	WT 3-Hoja H2O Rep 1	0.74	0.0006	0.0136	0.19	0.001
wC(T2)1r2	WT 3-Hoja H2O Rep 2	0.76	0.0012	0.0256	0.37	0.003
wC(T2)2r1	WT 3-Hoja NaCl Rep 1	0.61	0.0003	0.0069	0.10	0.001
wC(T2)2r2	WT 3-Hoja NaCl Rep 2	0.64	0.0018	0.0382	0.55	0.003
wM(T2)1r1	Trans 3-Hoja H2O Rep 1	0.60	0.0021	0.0447	0.64	0.004
wM(T2)1r2	Trans 3-Hoja H2O Rep 2	0.83	0.0006	0.0133	0.19	0.002
wM(T2)2r1	Trans 3-Hoja NaCl Rep 1	0.71	0.0057	0.1195	1.71	0.012
wM(T2)2r2	Trans 3-Hoja NaCl Rep 2	0.66	0.0089	0.1869	2.67	0.018

<sup>1</sup> pg HAHB4 = fmoles HAHB4 x 20.927 (peso molecular de la proteína)

<sup>2</sup> ng de HAHB4/g proteína = (pg HAHB4 / 1000) / 0.000070 g (cantidad de proteína analizada).

<sup>3</sup> ng HAHB4/g PF = ng HAHB4/g proteína x (% PF como proteína/100)

PF: peso fresco; C: control; T: tratamiento; Rep (r): réplica; WT: Cadenza; Trans: evento IND-00412-7; Mann: Manitol 100 mM; H2O: agua; NaCl: NaCl 200 mM.

Fuente: INDEAR S.A.

Dado que el valor más alto obtenido (0.018ng HAHB4/g de peso fresco) se encuentra por encima del LD, se le puede asignar un valor numérico a la detección. Sin embargo, el error asociado es tan grande que el resultado obtenido no tiene el grado de precisión que se considera aceptable. Por lo tanto, se considera a la proteína HAHB4 detectable, no cuantificable.

Estos resultados se condicen con la característica de los factores de transcripción, como es el caso de HAHB4, los cuales se expresan en concentraciones extremadamente bajas.

## 2.2. Proteína PAT:

La concentración de PAT fue determinada mediante ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) en muestras de forraje (estadio R3/R4) y grano.

Los valores máximos obtenidos para el trigo IND-ØØ412-7 están dentro del rango reportado para otros eventos transgénicos ya desregulados (0,005 a 900 ug/g de peso fresco), por lo que se concluye que no presentan un riesgo a la seguridad ambiental (CERA, 2011).

**Tabla 2: Niveles de expresión de PAT**

Estadio	Tejido	Localidad	Material (ug/g PF ± EE)*	
			Trigo HB4	Trigo Cadenza
Macollaje	Hoja	D13	10,11 ± 1,17	0
		A13	10,17 ± 0,48	0
		F13	11,55 ± 0,94	0
		H13	6,51 ± 0,72	0
		P13	11,06 ± 1,31	0
		I13	4,28 ± 0,30	0
Encañazón	Hoja	D13	7,11 ± 0,62	0
		A13	6,82 ± 0,24	0
		F13	6,61 ± 0,49	0
		H13	5,82 ± 0,23	0
		P13	11,36 ± 0,67	0
		I13	5,36 ± 0,59	0
Espigazón	Raíz	D13	0,00	0
		A13	0,00	0
		F13	0,00	0
		H13	0,00	0
		P13	0,00	0
		I13	0,00	0
Espigazón	Tallo	D13	6,74 ± 0,65	0
		A13	8,72 ± 0,88	0
		F13	10,80 ± 0,71	0
		H13	6,59 ± 0,77	0
		P13	12,67 ± 0,66	0
		I13	5,36 ± 0,66	0
Madurez	Grano	D13	3,63 ± 0,50	0
		A13	3,79 ± 0,35	0
		F13	3,24 ± 0,32	0
		H13	2,11 ± 0,32	0
		P13	3,38 ± 0,40	0
		I13	1,78 ± 0,13	0

(\*) PF: Peso Fresco; EE: Error estándar

Fuente: INDEAR S.A.

### 3. Análisis del potencial tóxico o alergénico

#### 3.1. Productos de expresión:

##### HAHB4

La caracterización de la proteína HAHB4 expresada en el trigo IND-ØØ412-7 y las comparaciones de la secuencia de aminoácidos de ésta con las secuencias de proteínas

tóxicas o alergénicas conocidas, no muestran niveles de identidad que otorguen posibles efectos tóxicos o alergénicos.

Los resultados del ensayo de termoestabilidad realizados a 60, 75 y 90°C, sugieren que la proteína HAHB4 es estable a las temperaturas ensayadas.

Asimismo, estudios de digestibilidad de la proteína HAHB4 producidas en *E. coli*, mostraron que se digieren rápidamente en fluidos gástricos simulados.

Estos resultados tomados en conjunto conforman evidencia consistente para inferir que es altamente improbable que la proteína HAHB4 tenga características alergénicas o tóxicas.

### **PAT**

Mediante estudios bioinformáticos se comprobó que la secuencia de la proteína PAT, expresada en este evento, es equivalente a la proteína PAT presente en numerosos eventos GM que ya cuentan con aprobación comercial. Los estudios presentados oportunamente para esta proteína han demostrado que es altamente improbable que dicha proteína tenga características tóxicas o alergénicas.

### **3.2. Nuevos péptidos putativos**

Se realizó un estudio bioinformático para determinar posibles nuevos marcos de lectura abiertos (del inglés *Open Reading Frames*, ORFs) que pudieran codificar nuevos péptidos putativos. Estos ORFs determinados *in silico* son teóricos y no necesariamente implica que dichos péptidos teóricos se sinteticen en las plantas GM *in vivo*.

El análisis bioinformático se realizó dentro del inserto y en las regiones de unión entre el inserto y las secuencias 5' y 3' tomando al menos 200 bases de cada uno de sus flancos. Los marcos de lectura fueron obtenidos a partir del análisis de las secuencias nucleotídicas utilizando un programa desarrollado localmente empleando las herramientas bioinformáticas proporcionadas por BioPython. Se consideraron los péptidos que tuvieran 100 o más aminoácidos. A partir de los seis marcos de lectura posibles y todos los codones de iniciación y terminación encontrados, se generaron 19 péptidos putativos para el inserto "corto" y 48 para el inserto "largo".

La posible alergenicidad y/o toxicidad de cada uno de estos péptidos fue analizada utilizando distintas herramientas bioinformáticas.

La potencial alergenicidad fue examinada con la base de datos de acceso público FARRP, 2013 (Food Allergy Research and Resource Program, Department of Food Science and Technology, University of Nebraska). Las similitudes se analizaron comparando las secuencias contenidas en ventanas móviles de 8 y 80 aminoácidos. Ninguno de los péptidos putativos mostró una similitud  $\geq 35\%$  en tramos de 80 aminoácidos con los alérgenos

registrados en esa base de datos, ni identidades con epitopes alergénicos en las secuencias sucesivas de 8 aminoácidos.

Para analizar la posible toxicidad de los péptidos putativos, se utilizó la base de datos de toxinas animales (ATDB). Al alinear la secuencia aminoacídica de cada uno de los péptidos putativos con la de las toxinas de la base de datos utilizando el algoritmo BLASTP, no surgió ninguna homología relevante ( $E \text{ score} < 1 \times 10^{-5}$ ).

Se concluye que aún en el improbable caso de que cualquiera de los posibles ORFs teóricos resultaran traducidos, estos péptidos no presentan similitud de secuencia relevante con toxinas o alérgenos conocidos que sugieran riesgos asociados.

#### **4. Composición centesimal del OVG**

Se realizaron estudios composicionales comparativos del trigo IND-ØØ412-7 con su contraparte convencional Cadenza, siguiendo las recomendaciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD). Se determinaron los niveles de diversos componentes a partir de muestras de grano y forraje obtenidas de ensayos a campo realizados en 6 sitios representativos del cultivo en Argentina durante los años 2012 y 2013. Además, se incluyeron 5 variedades comerciales de referencia con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo de trigo.

Se determinaron así, los niveles de 43 componentes en muestras de grano a la madurez (proteínas, aminoácidos, lípidos, ácidos grasos, carbohidratos, ceniza, fibra, humedad,

minerales, vitaminas, y antinutrientes) y 10 componentes en muestras de forraje en macollaje (proteínas, lípidos, carbohidratos, ceniza, fibra, humedad y minerales).

Los datos obtenidos evidencian que si bien para algunos analitos se encontraron diferencias significativas, todos los valores obtenidos estuvieron dentro del rango de las variedades comerciales de referencia o de los valores reportados en la literatura científica o bien no fueron consistentes a través de los sitios en que se llevaron a cabo los ensayos. Por lo tanto, las diferencias observadas no fueron consideradas biológicamente relevantes.

A los fines del presente documento, estos resultados se consideran indicativos de la ausencia de efectos no esperados producto de la transformación genética.

## **5. Potencial para producir impactos en el agroecosistema**

### **5.1 Comportamiento agrofenotípico**

Además de los resultados mencionados en el punto II.1 sobre la tolerancia a sequía, se realizaron estudios a campo con el fin de evaluar la equivalencia agrofenotípica entre el trigo IND-ØØ412-7 y su contraparte convencional Cadenza. Se utilizaron variedades comerciales para generar el rango de referencia y se evaluaron las siguientes características: número de plantas por m<sup>2</sup>, número de espigas por m<sup>2</sup>, número de granos por espiga, peso de mil granos, peso hectolítrico, rendimiento, biomasa aérea total, índice de cosecha, estadio de crecimiento del cultivo según escala de Zadoks, altura y ancho del canopeo, adversidades abióticas y daño por enfermedades, durante las campañas 2012 y 2013 en 15 sitios representativos del cultivo en Argentina.

Los resultados evidenciaron un aumento significativo del rendimiento (5%) en el trigo IND-ØØ412-7 respecto a su contraparte convencional Cadenza. Sin embargo, el peso de mil granos y el peso hectolítrico fueron significativamente inferiores (5 y 2 % respectivamente). Estos parámetros se encontraron por debajo del rango de referencia, tanto para el evento como para su contraparte convencional. Esto se debe a la mejor adaptación de las variedades comerciales a las condiciones locales respecto a la variedad transformada.

A su vez, se realizó un estudio de la morfología y viabilidad del polen, en el cual no se encontraron diferencias significativas entre el trigo IND-ØØ412-7 y su contraparte convencional Cadenza, excepto el diámetro del grano de polen, en donde el trigo IND-ØØ412-7 presentó una leve disminución. Sin embargo, este parámetro se encontró dentro del rango de referencia.

Los resultados obtenidos demuestran que el trigo objeto de la presente solicitud tiene un comportamiento agronómico equivalente a su contraparte convencional, excepto por las diferencias asociadas a las características intencionalmente introducidas.

Asimismo, el trigo IND-ØØ412-7 no afecta la diversidad y abundancia de artrópodos de los distintos grupos funcionales que puedan estar presentes en el agroecosistema receptor, incluyendo organismos benéficos.

Al no existir hipótesis de riesgo asociadas a los restantes organismos que se hallan presentes en el agroecosistema local, no se considera necesaria la realización de estudios específicos para los mismos.

Se concluye que el trigo IND-ØØ412-7 no presenta un comportamiento agrofenotípico inesperado que pueda ser indicativo de efectos no intencionales producto de la transformación genética, o que pueda resultar en un impacto adverso sobre el agroecosistema.

## **5.2. Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación**

Se llevó a cabo un estudio de poder germinativo y dormición utilizando semillas muestreadas de diferentes sitios. Se aplicó el protocolo de la Asociación de Analistas Oficiales de Semillas (AOSA), el cual recomienda una temperatura constante de 20°C para evaluar germinación y un tratamiento previo a 5°C para que dicho estudio no sea afectado por la dormición. Se aplicó este protocolo con y sin el mencionado tratamiento previo. Adicionalmente se evaluaron 4 regímenes de temperatura: 10°C, 30°C, 10°C/20°C y 10°C/30°C. No se observaron diferencias significativas entre el trigo IND-ØØ412-7 y su contraparte convencional Cadenza para ninguna de las condiciones evaluadas.

Estos resultados indican que, en comparación con su contraparte convencional, el trigo IND-ØØ412-7 no tiene mayor capacidad de sobrevivir sin asistencia humana.

Se concluye que los genes cuya expresión determinan el fenotipo de tolerancia a sequía y a glufosinato de amonio, sólo confieren una ventaja cuando se lo expone a condiciones de estrés hídrico y/o al herbicida mencionado, sin ser ello suficiente para que adquiriera características de maleza.

### **5.3. Potencial para la transferencia horizontal o intercambio de genes del OVGGM con otros organismos**

La biología reproductiva del trigo IND-ØØ412-7 no es diferente a la del trigo no GM. Éste presenta un alto porcentaje de autogamia, aunque podría existir un cierto grado de polinización cruzada dependiendo de la densidad, el genotipo y las condiciones ambientales. Hasta el momento no existen en el país especies silvestres sexualmente compatibles con este cultivo, sin embargo, hay compatibilidad con especies cultivables de los géneros *Triticum* y *Triticale*. Si bien existe una probabilidad de introgresión genética alta para *T. aestivum*, moderada para *T. turgidum* y baja para *Triticale*, es necesario que ocurra floración sincronizada, proximidad entre

cultivos y condiciones climáticas adecuadas. Esto hace que, finalmente, la probabilidad de cruzamiento sea baja.

A partir de la literatura científica disponible hasta el momento se sabe que no existen casos de transferencia horizontal desde trigo hacia microorganismos, vectores virales o insectos y no existen razones para suponer que esta característica haya cambiado en el trigo IND-ØØ412-7.

Por otro lado, las características del trigo IND-ØØ412-7, al igual que cualquier otro trigo no GM, determinan que es improbable que pueda transferirse material genético desde los alimentos hacia los consumidores, o los microorganismos presentes en su tracto digestivo, como consecuencia de su ingesta.

Asimismo la acción degradadora de las enzimas digestivas sobre los ácidos nucleicos ingeridos con los alimentos y fundamentalmente la ausencia de elementos de conjugación,



transposición u otras formas de movilización que favorezcan la transferencia de genes desde el organismo en cuestión hacia otros organismos, hace que esto sea aún más improbable.

#### **5.4. Patogenicidad para otros organismos**

El trigo es reconocido como una planta no patógena para otros organismos, y esta característica no se encuentra alterada en el trigo GM presente en este documento.

Por otro lado, si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en trigo IND-ØØ412-7 provienen de fitopatógenos, no se encuentran presentes en el evento secuencias que confieran características patogénicas de los organismos de los que provienen, careciendo por lo tanto este evento de riesgos de patogenicidad.

#### **6. Recomendación**

En función de las características del trigo IND-ØØ412-7, subsecuente a la eventual obtención de la autorización para su comercialización y con el fin de retrasar la selección de biotipos de malezas resistentes al glufosinato de amonio, se recomiendan las siguientes prácticas:

- Rotar cultivos y herbicidas con diferentes mecanismos de acción.
- Identificar las malezas presentes y definir el/los herbicida/s más adecuados para su manejo.
- Seguir las instrucciones del marbete (dosis, momento de aplicación, precauciones respecto al uso, almacenamiento y preparación del producto)
- Realizar monitoreos para verificar la eficacia de control en las malezas. Evitar su reproducción por semilla o proliferación vegetativa.

Dentro de este marco, se aconseja al solicitante comunicar y difundir esta información a través de los canales de distribución, venta, jornadas, entre otros, así como también generar espacios de capacitación a productores y asesores para implementar dichas recomendaciones.

Ante una sospecha de aparición de malezas resistentes, se sugiere que el productor lo informe al solicitante a través de alguno de los canales de comunicación. Asimismo, una vez

confirmada la resistencia, se recomienda que el solicitante asista al productor proponiendo acciones de mitigación, cuyo fin sea el control y/o la eliminación de los biotipos de malezas resistentes y lo comunique a las agencias regulatorias pertinentes.