



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

## **SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN DOCUMENTO DE DECISIÓN**

**Cártamo (*Carthamus tinctorius L.*) genéticamente modificado con los eventos IND-1ØØØ3-4, IND-1ØØ15-7 y con la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7. Ambos eventos individuales y el evento acumulado expresan proquimosina bovina en semilla. El presente Documento de Decisión incluye a los cártamos genéticamente modificados (GM) IND-1ØØØ3-4, IND-1ØØ15-7 e IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de estos materiales con cualquier cártamo no GM. La solicitud fue presentada por la empresa INDEAR 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 acuerdan en dar por finalizada la Segunda Fase de Evaluación de los cártamos GM IND-1ØØØ3-4, IND-1ØØ15-7 e IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7. De esta evaluación se concluye que los riesgos de bioseguridad derivados de la liberación de los mencionados eventos GM al agroecosistema, no difieren significativamente de los inherentes al cultivo de cártamo no GM.

El cártamo IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 contiene la acumulación de los DOS (2) eventos de transformación individualmente denominados IND-1ØØØ3-4 e IND-1ØØ15-7 y fue obtenido mediante cruzamiento convencional de los parentales conteniendo cada uno de los eventos de transformación.

El cártamo IND-1ØØØ3-4 ha sido ensayado a campo en Argentina desde 2008 y el cártamo IND-1ØØ15-7 se ensayó desde 2012, mientras que el cártamo IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 se ensayó desde 2013. Para tal fin fueron evaluadas por la CONABIA SIETE (7), CUATRO (4) y TRES (3) solicitudes de permisos, respectivamente, para experimentación y/o liberación confinada al agroecosistema que han cumplido con la normativa vigente para los OVGm, y han sido autorizadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del ex – MAGyP y por la Secretaría de Agregado de Valor del MINSITERIO DE AGROINDUSTRIA.



Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor

El presente Documento de Decisión incluye a los cártamos GM IND-10003-4, IND-10015-7 e IND-10003-4 x IND-10015-7 y a toda la progenie derivada de los cruzamientos de estos materiales con cualquier cártamo no GM obtenido en forma convencional.

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

**1. Nombres común y científico:** Cártamo (*Carthamus tinctorius L.*)

**2. Denominación de los eventos:**

- IND-10003-4
- IND-10015-7
- IND-10003-4 x IND-10015-7

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

**Eventos IND-10003-4, IND-10015-7 e IND-10003-4 x IND-10015-7**

Tanto los eventos individuales IND-10003-4 e IND-10015-7, como el evento acumulado IND-10003-4 x IND-10015-7 poseen el gen *cym* de *Bos taurus*, que expresa la pro-quimosina bovina que es procesada y acumulada a su forma activa (quimosina) en el apoplasto del grano de cártamo. Los mencionados cártamo GM funcionan como herramienta biológica para la producción de quimosina, para ser utilizada en la industria quesera.

La presencia y actividad biológica de la quimosina bovina en granos de cártamo IND-10003-4 x IND-10015-7 quedó demostrada mediante determinación de la actividad coagulante de extractos de semillas de provenientes del cártamo IND-10003-4 x IND-10015-7.

**3.1 Mecanismo de acción de los productos de expresión**

**Eventos IND-10003-4, IND-10015-7 e IND-10003-4 x IND-10015-7**

La quimosina, no tiene función dentro de la planta de cártamo. Los eventos IND-10003-4, IND-10015-7 e IND-10003-4 x IND-10015-7 serán usados como fuentes de producción de quimosina. Esto se debe a que la quimosina, es una proteasa aspártica que



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

cliva de manera específica la unión peptídica entre la fenilalanina de la posición 105 y la metionina de la 106 de la kappa-caseína (k-caseína). De esta forma, induce la coagulación de las micelas de caseína de la leche para dar lugar a la cuajada, a partir de la cual se obtiene el queso.

#### **4. Modificaciones genéticas introducidas:**

##### **4.1. Método de obtención del OVGM**

##### **Eventos IND-10003-4 e IND-10015-7**

Los eventos IND-10003-4 e IND-10015-7 fueron obtenidos por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

##### **Acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7**

La acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7 fue obtenido por cruzamiento convencional de los eventos parentales IND-10003-4 e IND-10015-7.

##### **4.2. Secuencias introducidas**

##### **Eventos IND-10003-4 e IND-10015-7**

A continuación, se detalla la disposición original de las secuencias presentes en el ADN-T del plásmido pSBS2165 utilizado para la transformación de los eventos IND-10003-4 e IND-10015-7.



Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor

| Elemento genético      | Descripción   | Función  |
|------------------------|---|--|
| <b>ADN-T</b>           |   |  |
| <b>Borde derecho</b>   | Borde derecho del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i> .  | Interviene en la transferencia del ADN-T al genoma vegetal.  |
| <b>prPHA</b>           | Promotor de faseolina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto)   | Regula la expresión de la pro-quimosina de manera específica en semilla.   |
| <b>E2</b>              | Secuencia señal de la proteína taumatina E2 proveniente de <i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)                          | Dirige a la pro-quimosina al espacio apoplástico de la célula vegetal.   |
| <b>cym</b>             | Secuencia codificante del gen de la isoforma B de la pro-quimosina bovina proveniente de <i>Bos taurus</i> (bovinos). | Su producto de expresión, la pro-quimosina bovina no posee función en la planta.                                       |
| <b>TerPHA</b>          | Terminador de faseolina de <i>P. vulgaris</i> (poroto)  | Región 3' no traducible que regula la terminación de la transcripción.   |
| <b>prUBI</b>           | Promotor de ubiquitina de <i>Petroselinum crispum</i> (perejil)   | Regula la expresión del gen <i>pat</i> en forma constitutiva en plantas  |
| <b>pat</b>             | Secuencia codificante de la proteína PAT de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>                                     | Su producto de expresión, confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Se utiliza como factor de selección. |
| <b>terUBI</b>          | secuencia terminadora del gen de la ubiquitina de <i>P. crispum</i>   | Terminación de la expresión del gen <i>pat</i> PAT   |
| <b>Borde Izquierdo</b> | Borde izquierdo del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i> .  | Interviene en la transferencia del ADN-T al genoma vegetal.  |

<sup>1</sup>pr: Promotor, <sup>2</sup>ter: Secuencia de terminación de la transcripción.

#### 4.3. Número de copias, integridad y/o rearrreglos dentro de los insertos

##### Evento IND-10003-4

A partir de un análisis de *Southern blot*, se determinó que los genes y sus secuencias regulatorias, así como los elementos adicionales, se encuentran formando parte de un único inserto, el cual se comporta como un locus único.



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

Su integridad fue analizada mediante los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés polymerase chain reaction), Sanger y secuenciación masiva (NGS, por sus siglas en inglés Next Generation Sequencing), identificándose un rearrreglo que implica la duplicación de una región de 1064pb de la secuencia del promotor de faseolina *prPHA* dispuesta en sentido inverso, que carece de la región próxima al inicio de la transcripción por lo que no posee funcionalidad. Por otro lado, el promotor *prPHA* que dirige la expresión de *cym* presenta una delección de 541pb distales a la región de inicio de la transcripción que no afecta su funcionalidad.

Por último, el análisis de las secuencias correspondientes al esqueleto del plásmido pSBS2165 demostró que no se introdujo en el genoma de la planta ningún otro elemento del vector que estuviera ubicado por fuera de la región del ADN-T. La comprobación de ausencia de secuencias no deseadas del vector fue realizada mediante PCR específica.

#### **Evento IND-10005-7**

Para el evento IND-10015-7 los genes y sus secuencias regulatorias, así como los elementos adicionales, se encuentran formando parte de un único inserto, el cual se comporta como un locus único. Su integridad ha sido verificada experimentalmente mediante análisis de PCR y secuenciación.

El número de copias fue analizado mediante *Southern blot*. Los resultados de este análisis revelaron que el evento posee un único inserto compuesto por una única copia del ADN-T, la cual contiene todos los elementos genéticos en el orden esperado.

Por último, se confirmó la ausencia de secuencias estructurales del vector que no debían transferirse en el genoma del evento IND-10015-7, de la misma forma que para evento anterior.

#### **Acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7**

Se demostró, por medio de análisis de *Southern blot* y PCR secuencia específica y secuenciación, que durante la obtención del evento acumulado por cruzamiento convencional los insertos provenientes de los eventos parentales se mantuvieron íntegros, conservando el número de copias y su locus en el genoma.

#### **4.4. Regiones flanqueantes a los insertos**



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

Las regiones flanqueantes fueron determinadas mediante la técnica de PCR. El producto de dicha PCR fue secuenciado y analizado mediante la herramienta bioinformática BLAST (del inglés Basic Local Alignment Search Tool) en busca de homología entre las regiones flanqueantes y las secuencias nucleotídicas de la base de datos del NCBI (del inglés National Center for Biotechnology Information). Debido a la falta de un genoma completo de *C. tinctorious*, la búsqueda de homología contra las bases de datos de nucleótidos del NCBI arrojó como resultado la mayor identidad con el genoma de *Cynara cardunculus* var. *scolymus*, una especie cercanamente emparentada al *C. tinctorious*.

#### **Evento IND-10003-4**

Se identificaron las secuencias de ADN flanqueantes a los extremos 5' y 3' del inserto en el cártamo IND-10003-4 mediante análisis de TAIL-PCR para el flanco derecho y PCR oligo específica para el flanco izquierdo. El producto de PCR fue secuenciado y sometido a un análisis de BLAST. Esto permitió determinar que la inserción provocó una deleción de 68 pb y que la inserción se produjo en una región génica que codificaría para una proteína hipotética con función chaperona. Sin embargo, los resultados observados en los estudios de comportamiento agrofenotípico (Sección II.5.1.) y composición centesimal (Sección II.4) confirman la equivalencia agronómica entre la acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7, homocigota para la interrupción de la chaperona hipotética, y su contraparte convencional. Esto lleva a la conclusión de que es improbable que esta interrupción pueda resultar en un impacto adverso sobre el agroecosistema.

#### **Evento IND-10015-7**

Se identificaron las secuencias de ADN flanqueantes a los extremos 5' y 3' del inserto en el cártamo IND-10015-7 mediante análisis de TAIL-PCR. El producto de PCR fue secuenciado y sometido a un análisis de BLAST. Este análisis, permitió determinar que la inserción se produjo en una secuencia que presenta homología con un dominio conservado perteneciente a las proteínas de la súper-familia de las glucosidasas de *C. cardunculus*. Este resultado sugiere que la construcción podría estar interrumpiendo una región génica que codificaría para una hipotética beta-glucosidasa de cártamo. Estas enzimas hidrolizan los residuos terminales glucosa en diversos glicoconjugados, y están involucradas en la regulación del crecimiento, la respuesta a estrés, lignificación, degradación de celulosa y



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

defensa en la planta. Sin embargo, el ensayo de actividad beta-glucosidasa para el evento IND-10015-7, homocigota para la interrupción, no mostró diferencias significativas con respecto a su contraparte convencional. Sumado a ello, los resultados observados en los estudios de comportamiento agrofenotípico (Sección II.5.1.) y composición centesimal (Sección II.4) confirman la equivalencia agronómica entre la acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7, homocigota para la interrupción de la posible beta-glucosidasa, y su contraparte convencional. Esto lleva a la conclusión de que es improbable que esta interrupción pueda resultar en un impacto adverso sobre el agroecosistema.

#### **Acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7**

Las regiones de ADN flanqueantes a los extremos 5' y 3' de los insertos provenientes del cártamo IND-10003-4 e IND-10015-7 fueron comprobadas mediante análisis de PCR seguido de secuenciación. No se identificaron cambios con respecto a los eventos parentales.

### **5. Detección**

La presencia de cada uno de los eventos parentales puede ser determinada experimentalmente mediante PCR con oligonucleótidos específicos, utilizando muestras de semilla, grano, forraje o todo subproducto que contenga ADN de cártamo con un mínimo grado de integridad que permita su amplificación. Para el evento acumulado, el método se basa en la detección de la presencia simultánea de cada uno de los eventos parentales a partir de ADN extraído de una única muestra biológica.

## **II. EVALUACIÓN DE RIESGO**

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

#### **Eventos IND-10003-4, IND-10015-7 y acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7**

La estabilidad genética de los eventos IND-10003-4 e IND-10015-7 se verificó mediante estudios de PCR específica a lo largo de 3 generaciones (F4, F6 y F8).



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

Además, se compararon mediante una prueba de Chi-cuadrado las proporciones observadas con las esperadas de acuerdo con los principios mendelianos de herencia para 241 individuos de la generación F2, donde se evaluó la presencia de los eventos individuales por PCR con oligos específicos. Este análisis se llevó a cabo considerando las cuatro secuencias flanqueantes, dos para cada inserto proveniente de cada uno de los eventos parentales. Todas las plantas GM analizadas presentaron resultados consistentes para las cuatro regiones de unión inserto-genoma.

Estos resultados apoyan la conclusión de que las construcciones IND-10003-4 e IND-10015-7 analizadas a partir del evento acumulado IND-10003-4 X IND-10015-7, se comporta como un único locus dentro del genoma de cártamo y se heredan de acuerdo con principios de herencia mendeliana. Por otro lado, probada la integridad y conservación del sitio de inserción para los insertos segregantes a partir del evento acumulado, es posible inferir que los eventos individuales son genéticamente estables.

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

### **Acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7**

#### **Pro-quimosina**

Para realizar la determinación del nivel de expresión de pro-quimosina, se utilizó una metodología indirecta basada en la determinación de la actividad, o capacidad coagulante, de extractos de semilla madura y hoja en estado de roseta, provenientes de cártamo IND-10003-4 x IND-10015-7 de ensayos realizados en Bahía Blanca, Buenos Aires (BB), Montecristo, Córdoba (MC) y Villa Saboya, Buenos Aires (VS) durante la campaña 2014. Como control negativo, se realizó la determinación de actividad sobre extractos de cártamo no GM (contraparte convencional).





Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor

### Quimosina en semilla de cártamo SPC<sup>1</sup>

| Localidad <sup>2</sup> | IMCU/g semilla | mg quimosina/<br>g semilla <sup>3</sup> |
|------------------------|----------------|---|
| BB                     | 315 ± 5        | 2,99 ± 0,04                             |
| MC                     | 220 ± 6        | 2,02 ± 0,06                             |
| VS                     | 205 ± 17       | 1,88 ± 0,15                             |

1: promedio ± error estándar

2: BB: Bahía Blanca; MC: Montecristo; VS: Villa Saboya

3: calculado en función de la actividad específica de SPC = 109 IMCU/mg

SPC<sup>1</sup> Safflower Produced Chymosin

IMCU por sus siglas en inglés *International Milk Clotting Units*

Fuente: INDEAR S.A.

Tomando el valor de la actividad específica de la quimosina producida en cártamo, o SPC (del inglés Safflower Produced Chymosin), se realizó la conversión de los resultados de actividad coagulante a masa de quimosina por gramo de semilla de cártamo, siendo el nivel máximo medido de 2,99 mg. Por otro lado, debido probablemente a que la transcripción de la pro-quimosina se encuentra bajo la regulación de un promotor específico de semilla, no se detectó actividad en extractos de hoja de la acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7. Los extractos de hoja y semilla provenientes del control negativo (contraparte convencional, *Carthamus tinctorius* cv. Centennial) no mostraron actividad coagulante.

### PAT

A diferencia de la pro-quimosina, la expresión de PAT está bajo la regulación de un promotor constitutivo. El nivel de expresión de PAT fue determinado en hoja y grano, utilizando un enzimoimmunoensayo de captura específico.



Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor

#### Niveles de expresión de PAT

| Estadio | Tejido | Localidad <sup>1</sup> | Material<br>( $\mu\text{g/g PF} \pm \text{EE}$ ) <sup>2</sup> |                    |
|---------|--------|------------------------|---|--------------------|
|         |        |                        | Cártamo SPC <sup>3</sup>                                      | Cártamo Centennial |
| Roseta  | Hoja   | BB                     | 0,35 $\pm$ 0,12   | 0                  |
|         |        | MC                     | 0,89 $\pm$ 0,12   | 0                  |
|         |        | VS                     | 0,55 $\pm$ 0,26   | 0                  |
| Madurez | Grano  | BB                     | 12,24 $\pm$ 1,05  | 0                  |
|         |        | MC                     | 6,05 $\pm$ 1,33   | 0                  |
|         |        | VS                     | 7,95 $\pm$ 1,99   | 0                  |

1: BB: Bahía Blanca; MC: Montecristo; VS: Villa Saboya

2: PF: Peso Fresco; EE: Error estándar

3: promedio  $\pm$  error estándar

Fuente: INDEAR S.A.

Se detectó la presencia de proteína PAT tanto en extractos de hoja como de grano provenientes de la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 (SPC). Por otro lado, como se esperaba, no se detectó la presencia de la proteína PAT en las muestras de su contraparte convencional (*Carthamus tinctorius* cv. Centennial).

### 3. Análisis del potencial tóxico o alergénico

Con el objetivo de analizar posibles similitudes entre las secuencias de las proteínas introducidas con alérgenos conocidos, se llevaron a cabo las comparaciones recomendadas por la guía del Codex Alimentarius (2003). En primer lugar, se comparó la secuencia aminoacídica completa de la proteína, tomando como valor de referencia una identidad de secuencia superior al 35% en un segmento de al menos 80 aminoácidos usando el algoritmo FASTA. En segundo lugar, se utilizó un patrón de búsqueda de epítopes lineales cortos (8 aminoácidos) similares a los presentes en proteínas conocidas como alérgenos. Como comparador se utilizaron bases de datos construidas a partir de la recopilación de secuencias de proteínas alergénicas, o relacionadas a afecciones celíacas, disponibles en bases de datos de Alergen Online, base de datos actualizada al 2016. Por otro lado se analizó la similitud estructural con alérgenos utilizando la base de datos SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins, base de datos actualizada al 2013). Para el análisis del potencial tóxico, las secuencias peptídicas fueron contrastadas contra la base de datos de secuencias proteicas no redundantes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, base de datos actualizada al 2016) mediante el algoritmo BLASTp.



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

### **3.1. Productos de expresión:**

**Eventos IND-10003-4, IND-10015-7 y acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7**

#### **PAT**

Mediante estudios bioinformáticos se comprobó que las secuencias de las proteínas PAT, expresadas en los mencionados eventos, son equivalentes 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, alergénicas o puedan presentar algún riesgo para el agroecosistema. No existen razones para suponer que estas características hayan cambiado en los eventos de cártamo incluidos en el presente Documento.

#### **Pro-quimosina**

Mediante una comparación de secuencias peptídicas para la pro-quimosina producida en cártamo, fue demostrado que la misma presenta un 100% de homología con la pro-quimosina bovina, proveniente de *Bos taurus*, que posee una extensa historia de uso seguro en la fabricación de quesos. Los resultados del ensayo de termoestabilidad y estabilidad en fluido gástrico simulados (FGS) mostraron que la pro-quimosina producida en cártamo se comporta de manera análoga a la pro-quimosina bovina comercial. Sumado a ello el análisis bioinformático mostró que no existe similitud o identidad de secuencia entre la pro-quimosina con alérgenos o toxinas conocidas. Estos resultados aportan evidencias consistentes para inferir que es altamente improbable que la pro-quimosina producida en cártamo tenga características alergénicas, tóxicas o puedan presentar algún riesgo para el agroecosistema.

### **3.2. Nuevos péptidos hipotéticos**

Para el análisis de nuevos péptidos hipotéticos se realizó un estudio bioinformático para determinar posibles nuevos ORF (del inglés Open Reading Frame) tanto dentro del inserto como en las regiones de unión entre el inserto y las secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' del cártamo. Estos ORF determinados *in silico* son teóricos y no necesariamente implica que dichos péptidos teóricos se sinteticen en las plantas GM *in vivo*.



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

Los posibles ORF fueron obtenidos a partir del análisis de las secuencias nucleotídicas utilizando un programa desarrollado localmente empleando las herramientas proporcionadas por Biopython. Analizando los seis marcos de lectura posibles y todos los codones de iniciación y terminación encontrados a lo largo de las secuencias analizadas se identificaron 121 péptidos hipotéticos para el evento IND-1ØØ15-7 y 127 para el evento IND-1ØØØ3-4 de al menos 8 aminoácidos.

Los resultados de potencial alergenicidad y toxicidad muestran que, aún en el improbable caso de que cualquiera de los polipéptidos hipotéticos codificados por la secuencia de los insertos y la secuencia del ADN genómico flanqueante de cártamo resultaran traducidos, éstos no poseen similitud o identidad de secuencias con alérgenos, toxinas u otras proteínas con actividad biológica conocida. Por ende, no existen evidencias para inferir que éstas puedan resultar alergénicas, tóxicas o puedan presentar algún riesgo para el agroecosistema.

#### **4.Composición centesimal del OVGM**

##### **Acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7**

Se realizó un estudio composicional comparativo entre la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 y su contraparte convencional. Se determinaron los niveles de diversos componentes en muestras de forraje (en estadio fenológico de floración) y grano (en estadio fenológico de madurez), obtenidas de ensayos a campo realizados en 3 localidades de Argentina durante la campaña 2015/16. Además, con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo de cártamo, se incluyeron 5 variedades comerciales no GM de referencia.

Se determinaron los niveles de proximales (humedad, lípidos, proteínas, fibra cruda, carbohidratos y cenizas), aminoácidos, ácidos grasos, minerales, vitaminas y antinutrientes (traquelósido, matairesinol, rafinosa, saponinas y polifenoles) en muestras de grano. Asimismo, se midieron los niveles de proximales, fibra detergente ácida, fibra detergente neutra, calcio y fósforo en muestras de forraje.

Se realizó un análisis estadístico interlocalidades, en el cual se encontraron diferencias significativas para algunos analitos en muestras de grano y forraje entre la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 y su contraparte convencional. Sin



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

embargo, en ambos casos los valores promedios del evento estuvieron dentro del rango de las variedades comerciales y/o los rangos de la literatura científica. 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 que puedan resultar en un impacto adverso sobre el agroecosistema.

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

### **5.1. Comportamiento agrofenotípico**

#### **IND-10003-4 x IND-10015-7**

Se realizó un estudio agrofenotípico comparativo entre el evento IND-10003-4 x IND-10015-7 y su contraparte convencional en 3 localidades de Argentina durante la campaña 2014/15, bajo diversas condiciones ambientales. Además, con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural del cultivo de cártamo, se incluyeron 5 variedades comerciales no GM de referencia.

Los parámetros evaluados fueron: vigor de plántulas, días a emergencia, elongación de tallo, botón floral, floración y madurez, altura de planta en botón floral y madurez, vuelco, humedad del grano, stand final de plantas, rendimiento y susceptibilidad a plagas y enfermedades.

Se realizó un análisis estadístico interlocalidades, en el cual se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la humedad del grano de la acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7 (9,5%) respecto de su contraparte convencional (8,7%). Sin embargo, el valor promedio de esta característica se encontró dentro del rango registrado para las variedades de referencia, por lo tanto no es considerado biológicamente relevante.

Los resultados obtenidos demuestran que los eventos IND-10003-4, IND-10015-7 y de la acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7 objeto de la presente solicitud, exhiben un comportamiento agronómico equivalente a su contraparte convencional.



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

Por lo expuesto, se concluye que los eventos IND-1ØØØ3-4, IND-1ØØ15-7 y de la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 no presentan un comportamiento agrofenotípico inesperado que pueda resultar en un impacto adverso sobre el agroecosistema.

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

### **Acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7**

Se llevó a cabo un estudio de poder germinativo sobre las semillas de la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7, comparándolo con su contraparte convencional, utilizando el protocolo de la Asociación de Analistas Oficiales de Semillas (AOSA).

El poder germinativo de la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 (60,8%) presentó una disminución estadísticamente significativa respecto de su contraparte convencional (83,5%). Sin embargo, los valores medios de cada tratamiento se encontraron dentro del rango de las referencias comerciales. Por consiguiente, las diferencias observadas no son consideradas biológicamente relevantes.

Por otro lado, al comparar ambos tratamientos, la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 presentó un porcentaje de germinación similar.

Complementariamente, se realizó un ensayo de tetrazolio sobre semillas del mismo lote utilizado para el estudio de germinación con el fin de analizar la tasa de semillas viables. La acumulación de eventos presentó una disminución significativa en el porcentaje de viabilidad (66,8 %) respecto a su contraparte convencional (81%). Este resultado, junto con la ausencia de dormición demostrada en el estudio anterior, permite inferir que la menor germinación de la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 se debe a una menor viabilidad de las semillas.

Estos resultados indican que, en comparación con el cártamo convencional, los eventos IND-1ØØØ3-4, IND-1ØØ15-7 y la acumulación de eventos IND-1ØØØ3-4 x IND-1ØØ15-7 no tienen mayor capacidad de sobrevivir sin asistencia humana.

Se concluye que los genes cuya expresión determinan el fenotipo de expresión de pro-quimosina bovina en semilla no confieren una ventaja selectiva al cártamo GM ya que



*Ministerio de Agroindustria*  
*Secretaría de Agregado de Valor*

no se espera que la expresión de la mencionada proteína contribuya a que la planta adquiera característica de maleza.

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

La biología reproductiva de los eventos IND-10003-4, IND-10015-7 y la acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7 no es diferente a la del cártamo no GM. Si bien las únicas especies silvestres emparentadas que se encuentran en Argentina son *C. lanatus* y *C. leucochaetos*, su hibridación con *C. tinctorius* no produce progenie viable en condiciones naturales debido a diferencias en el número de cromosomas. Asimismo, se debe tener en cuenta que para que ocurra el cruzamiento entre cada una de dichas especies y *C. tinctorius*, es necesario que exista: sincronización floral, presencia de insectos polinizadores o viento durante período de receptividad estigmática y cercanía entre ambas especies.

A partir de la literatura científica disponible hasta el momento se sabe que no existen casos de transferencia horizontal desde cártamo hacia microorganismos, vectores virales o insectos. Por lo tanto, no existen razones para suponer que esta característica haya cambiado en los eventos IND-10003-4, IND-10015-7 y la acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7.

Por otro lado, las características de los eventos IND-10003-4, IND-10015-7 y la acumulación de eventos IND-10003-4 x IND-10015-7, al igual que cualquier otro cártamo 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**



*Ministerio de Agroindustria  
Secretaría de Agregado de Valor*

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

Por otro lado, si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en los eventos de cártamo provienen de fitopatógenos, no se encuentran presentes en dicho evento secuencias que confieran las correspondientes características patogénicas de los organismos de los que provienen, careciendo por lo tanto estos eventos de riesgos de patogenicidad.