



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN AGROECOLÓGICA DE POBLACIONES
FERALES BRASICÁCEAS CON RESISTENCIA A HERBICIDAS

CLAUDIO EZEQUIEL PANDOLFO

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2016

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre el 11 de octubre de 2011 y 15 de diciembre de 2015, bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Cantamutto y la co-dirección de la Dra. Mónica Poverene.

.....



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .../.../....., mereciendo la calificación de (.....).

A mi familia, presente y ausente

Una dedicatoria especial: a mi abuelo Alfonso, que nos dejó unos días después de la defensa de esta tesis. A su memoria, y la de mis abuelos Antonio, Carolina y Gloria. A ellos y a mis padres les debo lo que soy.

*“El universo es, como tú. Proteo.
Sombra, irás a la sombra que te aguarda
Fatal en el confín de tu jornada;
Piensa que de algún modo ya estás muerto.”*

A quien está leyéndome
J. L. Borges. *El otro, el mismo* (1964)

*“Silvestre rapum in arvis maxime nascitur, fruticosum,
semine candido, duplo maiore quam papaver.”*

Gayo Plinio Segundo *El viejo*
Naturalis Historiae Libro XX Cap. 10

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Cantamutto, director de esta tesis. Por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, dentro del cual pude desarrollar esta tesis. Por su guía constante, sus consejos, comentarios y por la corrección de este manuscrito.

A la Dra. Mónica Poverene, codirectora de esta tesis. Por su disponibilidad y asistencia. Por ofrecer sus conocimientos y su punto de vista para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Alejandro Presotto. Por sus comentarios, consejos y experiencia, y sobre todo por su amistad. Por colaborar en la corrección del manuscrito y en muchos de los ensayos.

A mi familia. A mi padre Mario Claudio Pandolfo, mi madre Elsa Serrano, mi hermana Estefanía Pandolfo y mi abuelo Alfonso Serrano. Por el apoyo constante, la compañía, la confianza y el amor.

A mi esposa, Zaydha. Por su amor y su paciencia infinita. Por su colaboración en algunos ensayos. Por no abandonar nunca la esperanza, ni siquiera cuando con el avance de esta tesis, mi espíritu descendía en la locura.

A Hachi. Parafraseando a Lord Byron, por poseer belleza sin vanidad, fortaleza sin insolencia, coraje sin ferocidad. Por poseer todas las virtudes del hombre y ninguno de sus vicios.

Al Dr. Mauricio Casquero. Compañero, colega y amigo. Por su inestimable compañía y amistad. Su presencia en la cátedra será siempre extrañada.

A la Dra. Soledad Ureta. Por sus consejos, sus aportes en la interpretación de algunos resultados y su colaboración siempre presta. Por su corazón de oro.

A la Ing. Agr. Marta Miravalles. Compañera, amiga y docente de raza, cuyas enseñanzas y consejos serán siempre atesorados.

A la Ing. Agr. Ivana Fernández. Compañera y amiga en este camino ríspido del posgrado. Por su compañía y colaboración.

A las jóvenes promesas: Ings. Agrs. Francisco Torres Carbonell, Boris Vercellino y Fernando Hernández. Por su compañerismo y fresca juventud. Por un futuro brillante.

A los compañeros del grupo de trabajo: Agustina Gutiérrez, Ana Mondón, Antonio Garayalde, Alicia Carrera. Por su agradable compañía y sus comentarios acertados.

A las Ings. Agrs. Adelina Larsen y Paola Fernández. Compañeras de grado y posgrado, amigas de la vida. Por su amistad, a pesar de la distancia.

A los tesinistas Andrés Kirzner, Irene Cibanal, Pablo Avale, Ignacio Uribe, Ignacio Barragué, Franco Ruiz y Juliana Erichs. Por su colaboración en algunos de los ensayos de esta tesis.

A los técnicos de las empresas Dow Agrosiences S.A. y BASF Argentina S.A. Ricardo Pavón, Daniel Rolón, Fernando Giachetti, Gastón Suardiaz, Juan Pablo Migasso, Ernesto Sakima, Fabricio Mock, Hernán Sánchez, Florencia Moreno y Natalia Paz. Por su colaboración y confianza.

A Ida Dossou, Brigitte Weston, Andrea Landes, Rosemberg Ramos-Gueto, Edith Bellemare y Maribel Riveiro de BASF S.A. y DNA Landmark. Por el análisis molecular de los biotipos de *Raphanus* y la interpretación de los resultados.

A la Ing. Agr. Noemí Fritz y a la Cámara Arbitral de Cereales de Bahía Blanca. Por el análisis de materia grasa y perfil de ácidos grasos del material estudiado.

A Florencia Galdeano, de la Universidad Nacional del Nordeste. Por el análisis de citometría de flujo de las poblaciones de *Brassica* y la interpretación de los resultados.

A los técnicos, ingenieros y empleados de los establecimientos agropecuarios en los cuales se encontraron algunas de las poblaciones estudiadas. Martín Herrera Vega, Sean Cameron, Nicolas Hansen, Ignacio Vazquez, Germana Bonavetti, Verónica Pugliese, Juan Jensen, familia Riesegaard, Damián Gopar y otros.

Al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur. Por facilitar las instalaciones donde se realizaron la mayor parte de los ensayos de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Por haber otorgado las becas de posgrado que permitieron la realización de esta tesis.

RESUMEN

Las brasicáceas son una importante familia vegetal distribuida en todo el mundo. *Brassica rapa* L. (nabo), *B. napus* L. (colza, canola) y *Raphanus sativus* L. (rábano, nabón) son especies anuales de esta familia, cultivadas desde hace siglos. *B. napus* se destaca por su elevada participación en la producción mundial de aceites comestibles. Las poblaciones ferales de estas especies son malezas en diversos ambientes agrícolas de clima templado, incluyendo Argentina.

Actualmente no se dispone de datos de estudios sistemáticos sobre flujo génico entre colza y especies silvestres emparentadas en Argentina, y la dispersión de biotipos de brasicáceas resistentes a herbicidas. Los objetivos de la presente tesis fueron actualizar la información sobre la naturalización y distribución de brasicáceas emparentadas con el cultivo de colza en la región pampeana argentina, y caracterizarlas morfológicamente. Asimismo, se propuso evaluar el flujo génico entre el cultivo de colza y la maleza emparentada *B. rapa*, y comprobar la transferencia de la resistencia a herbicidas desde cultivares con esa característica. Además, caracterizar poblaciones de *Raphanus* sp. resistentes a herbicidas AHAS y poblaciones ferales de *Brassica* sp. resistentes a glifosato. Evaluar en cada caso las condiciones agroecológicas de su emergencia, el origen de la resistencia y, en última instancia, diseñar medidas de control alternativo.

Los resultados de las exploraciones demostraron que Argentina mantiene su vigencia como centro de biodiversidad secundario de especies emparentadas con el cultivo de colza, con la presencia de poblaciones brasicáceas ampliamente distribuidas en la región pampeana. La caracterización de las diferentes especies puso de manifiesto las diferencias entre ellas y se observaron rasgos en algunas poblaciones de *B. rapa* y *R. sativus* que podrían inferir el origen feral de estas.

La presencia de plantas híbridas en cuatro poblaciones de *B. rapa* colectadas en cercanías de cultivos de colza fue confirmada mediante distintos métodos (morfología, fertilidad masculina, contenido de ADN, resistencia a herbicidas). El riesgo de impacto ambiental inherente al empleo de variedades de colza con resistencia a herbicidas fue real, aunque la baja fertilidad de los híbridos podría atenuar el efecto y reducir la dispersión de estos biotipos.

Se confirmó la presencia de poblaciones de *R. sativus* con resistencia a todas las

familias químicas de inhibidores de la AHAS. La secuenciación de las accesiones resistentes confirmaron un cambio puntual de aminoácido en el gen de la enzima AHAS, de triptofano a leucina. La experimentación mostró que existen otras alternativas para el control de los nabones resistentes a IMI en varias situaciones y cultivos.

Se detectaron poblaciones naturales de *B. napus* y *B. rapa* con resistencia transgénica a glifosato. Este descubrimiento podría sugerir que el carácter provino de cultivos de colza transgénica realizados de manera informal en el país o de individuos ingresados como contaminante de semilla, e involucraría procesos de endo y exoferalidad. Dos de las accesiones de *B. rapa* presentaron además resistencia a herbicidas inhibidores de la AHAS. La presencia de estas poblaciones presenta un panorama complejo que involucra aspectos de impacto ambiental por la liberación en ambientes naturales del transgen.

ABSTRACT

The Brassicaceae is an important plant family distributed worldwide. *Brassica rapa* L. (turnip, bird's rape), *B. napus* L. (oilseed rape, canola) and *Raphanus sativus* L. (radish) are annual Brassicaceae species cultivated for centuries. *B. napus* is one of the most important sources of vegetable oil. Feral populations of these species are weeds in many agricultural environments, including Argentina.

At present, there are no systematic studies on gene flow between oilseed rape and wild relatives and the spread of herbicide resistant Brassicaceae biotypes in Argentina. The objectives of this thesis were to update the information on naturalization and distribution of oilseed rape wild relatives in Argentina, and to characterize some of these populations. Also, to assess the gene flow between oilseed rape and *B. rapa*. In addition, to characterize *Raphanus* sp. AHAS-inhibiting resistant populations and *Brassica* sp. glyphosate resistant biotypes. To assess in each case the ecological conditions of its emergence, the origin of the resistance and, finally, to design alternative control strategies.

The exploration showed that Argentina remains as a secondary center of biodiversity of oilseed rape wild relatives. Brassicaceae populations are widely distributed in the Pampas. The characterization of the different species revealed differences between them and traits were observed in some populations of *B. rapa* and *R. sativus* that could infer a feral origin.

The presence of hybrid plants in four populations of *B. rapa* collected in the proximity of oilseed rape was confirmed by different methods (morphology, male fertility, DNA content and herbicide resistance). The environmental impact inherent of the use of herbicide resistant oilseed rape cultivars was real, but the low fertility of hybrids could mitigate the effect and reduce the spread of these biotypes.

The presence of AHAS-inhibiting *R. sativus* biotypes in Argentina was confirmed. The sequencing of the AHAS-resistant accessions confirmed a single amino acid change from tryptophan to leucine at position 574 in the AHAS gene. The assays showed that there are alternatives to control of AHAS-inhibiting resistant biotypes.

Brassica napus and *B. rapa* populations with transgenic glyphosate resistance were detected. Two of the *B. rapa* accessions also showed AHAS-inhibiting resistance. These findings suggested that glyphosate resistance might come from GM oilseed rape

crops cultivated illegally in the country or as a contaminant of seed, and implies gene flow between feral populations of GM *B. napus* and wild *B. rapa*. The presence of these biotypes presents a complex situation that involves environmental impact of the dispersion of a transgene in natural habitats.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del Director

ÍNDICE

PREFACIO.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	V
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABLAS.....	XVIII
ABREVIATURAS.....	XXIV
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Capítulo 1: DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE POBLACIONES NATURALES BRASICÁCEAS DE ARGENTINA.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN.....	50
Capítulo 2: FLUJO GÉNICO ENTRE EL CULTIVO DE COLZA (<i>Brassica napus</i>) Y LA MALEZA <i>B. rapa</i>.....	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
RESULTADOS.....	66
DISCUSIÓN.....	79
Capítulo 3: CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ENZIMA AHAS EN BIOTIPOS MALEZA DE <i>Raphanus sativus</i>.....	83
MATERIALES Y MÉTODOS.....	88

RESULTADOS.....	98
DISCUSIÓN.....	114
Capítulo 4: CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES FERALES DE <i>Brassica napus</i> CON RESISTENCIA TRANSGÉNICA A GLIFOSATO.....	119
MATERIALES Y MÉTODOS.....	125
RESULTADOS.....	131
DISCUSIÓN.....	145
Capítulo 5: CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES NATURALES DE <i>Brassica rapa</i> CON RESISTENCIA TRANSGÉNICA A GLIFOSATO Y RESISTENCIA A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ENZIMA AHAS.....	148
MATERIALES Y MÉTODOS.....	154
RESULTADOS.....	159
DISCUSIÓN.....	174
CONSIDERACIONES FINALES.....	177
REFERENCIAS.....	180
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.....	199
ANEXO DE IMÁGENES.....	204

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Distribución de las poblaciones de brasicáceas relevadas y colectadas durante los viajes de exploración (2008-2015). *Brassica rapa* (BR), *B. napus* (BN), *B. nigra* (BNI), *Raphanus sativus* (RS), *Sinapis arvensis* (SA) y *Eruca vesicaria* (EV)...34
- Figura 1.2: Análisis discriminante de las plantas de poblaciones de *Brassica rapa* (BR), *B. napus* (BN), *B. nigra* (BNI), *Raphanus sativus* (RS) y *Sinapis arvensis* (SA). Elipses alrededor de los grupos indican el 95% de predicción.....42
- Figura 1.3: Dendograma de agrupamiento de la progenie de poblaciones de *Brassica rapa*, *B. napus*, *B. nigra* y *Sinapis arvensis* utilizando 15 caracteres métricos y 13 caracteres categóricos medidos en un jardín común, basado en la distancia de Gower.....44
- Figura 1.4: Análisis de componentes principales de los rasgos morfológicos de la progenie de accesiones de *Brassica rapa* y *B. napus*.....45
- Figura 1.5: Dendograma de agrupamiento de la progenie de poblaciones de *Raphanus sativus* (RS) criadas en jardín común, utilizando 11 caracteres métricos y 6 caracteres categóricos, basado en la distancia de Gower.....47
- Figura 2.1: Floración simpátrica de la población de *Brassica rapa* BAL lindera a un cultivo de colza (*B. napus*) cv. Nexera 8450 durante la primavera de 2008 (arriba), y de la población ENE en 2013 (abajo).....60
- Figura 2.2: Detalle de la valva y el rostro de la silicua de la accesión de *B. rapa* de BAL (silicua izquierda en cada foto) bajo las condiciones de recolección (G0) y Nexera 8450 (silicua derecha en cada foto).....68
- Figura 2.3: Análisis discriminante de la progenie de poblaciones naturales de *Brassica rapa* (BR), variedades y poblaciones ferales de *B. napus* (BN), y plantas de poblaciones de *B. rapa* en contacto con cultivos de *B. napus*, clasificadas como normales (TBR) o fuera de tipo (FT). Elipses alrededor de los grupos indican el 99% de confianza.....72
- Figura 2.4: Contenido relativo de ADN en dos plantas FT de *Brassica rapa*, una de la población PIE (izq) y otra de BAL (der), determinada mediante citometría de flujo.....74
- Figura 2.5: Detalle de una hoja de la población de *Brassica rapa* BAL dos

generaciones después del contacto con Nexera 8450 (arriba izquierda). Arriba a la derecha se muestra la hoja de la población de *B. rapa* JUA. Abajo a la izquierda, la morfología de las plantas FT que se observaron en BAL, en comparación una hoja de *B. napus* cv. Nexera 8450 (abajo derecha).....78

Figura 3.1: Ubicación geográfica de las poblaciones de *Raphanus sativus* caracterizadas en los distintos ensayos.....89

Figura 3.2: Respuesta del biotipo de *Raphanus sativus* susceptible SDV (O) y de las accesiones resistentes BAL-1A (Δ), ERC (+), SJQ (x) y PIE-A (\diamond) a la aplicación de dosis crecientes de imazetapir (arriba) y metsulfurón-metil (abajo), expresada como porcentaje de supervivencia.....105

Figura 3.3: Respuesta del biotipo de *Raphanus sativus* susceptible SDV (O) y de las accesiones resistentes BAL-1A (Δ) y PIE-A (+) a la aplicación de dosis crecientes de imazetapir (arriba) y metsulfurón-metil (abajo), expresada como materia seca (mg pl^{-1})107

Figura 3.4: Regresión lineal entre el rendimiento (gr m^{-2}) de un girasol CL invadido con *Raphanus sativus* resistente a herbicidas inhibidores a la AHAS, y la cobertura de la maleza. $Y = 366,67 - 2,46y$ ($R^2 = 0,62$; $p < 0,0001$).....110

Figura 3.5: Gel mostrando los resultados del marcador CAPS Trp574Leu en tres individuos del biotipo susceptible SDV (RS1-1, RS1-2 y RS1-3) y tres de la accesión resistente BAL-1A (RS4-1, RS4-2 y RS4-3) de *Raphanus sativus*. El alelo del tipo silvestre es representado por el fragmento de 500 pb y el mutante por los dos fragmentos de 291 y 213 pb.....111

Figura 4.1: Distribución geográfica de los distintos sitios donde fueron halladas plantas ferales de *Brassica napus* con resistencia a glifosato.....134

Figura 4.2: Arriba: Ubicación de la población de *Brassica napus* GER en la primavera del 2012, en los sitios de exploración 1 y 2. Abajo: Vista de la población GER en el sitio 1. Se observan dos cohortes: plantas en emergencia al frente y en madurez en la parte posterior.....135

Figura 4.3: Caracterización química de los granos de la población feral de *Brassica napus* GER, de poblaciones naturales de *B. rapa* (5) y de variedades de colza *B. napus* (5). Ácidos grasos oleico, erúcico y materia grasa sobre sustancia seca (S.S.S.)

expresados como porcentaje, glucosinolatos como μ moles totales por gr de muestra en base 8,5%.....	138
Figura 4.4: Análisis de componentes principales (ACP) de accesiones de colza <i>Brassica napus</i> , poblaciones naturales de nabo <i>B. rapa</i> y de la población feral GER mediante siete parámetros cuantitativos medidos en plantas desarrolladas en su hábitat natural. Los vectores representan las variables estudiadas.....	139
Figura 4.5: Curvas de dosis-respuesta de la población feral de <i>Brassica napus</i> (GER) y una variedad de colza convencional BNC a la aplicación de un rango amplio de dosis de glifosato. Arriba expresada en porcentaje de supervivencia, abajo como materia seca. Cada punto representa la media de cuatro repeticiones conteniendo 10 plantas cada una.....	141
Figura 4.6: Resultados del test inmunológico. 3 individuos negativos de una variedad convencional de <i>Brassica napus</i> (izquierda), 6 individuos positivos correspondientes a la accesión GER (centro) y 5 individuos positivos de SMA (derecha).....	143
Figura 4.7: Patrón de bandas amplificadas con el primer RT73 para una variedad de colza convencional (calles 1-5) y para la población de <i>Brassica napus</i> feral GER (calles 6-9). Se incluyeron dos plantas de distintas poblaciones naturales de <i>B. rapa</i> (calles 10-11).....	143
Figura 5.1: Distribución geográfica de las accesiones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a glifosato LDU, BAL-R y MOR, y de la población susceptible (JUA) usada como control.....	161
Figura 5.2: Curvas de dosis-respuesta de una accesión de <i>Brassica rapa</i> resistente a glifosato (LDU) y otra susceptible (JUA), a la aplicación de un rango de dosis de glifosato. Expresada en porcentaje de supervivencia (arriba) y materia seca (abajo), cada punto representa la media de cuatro repeticiones de 10 plantas cada una.....	166
Figura 5.3: Curvas de dosis-respuesta de una accesión de <i>Brassica rapa</i> resistente a glifosato (LDU) y otra susceptible (JUA), a la aplicación de un rango de dosis de imazapir (arriba) y metsulfurón-metil (abajo). Expresada en porcentaje de supervivencia, cada punto representa la media de cuatro repeticiones conteniendo 10 plantas cada una.....	170
Figura 5.4: Resultados del test inmunológico confirmando la presencia del transgen de	

resistencia a glifosato en varias accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato (LDU, BAL-R y MOR), en contraste con un control negativo (JUA).....172

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1: Poblaciones naturales de brasicáceas argentinas utilizadas para la caracterización morfológica. Registro original de las poblaciones y nombre utilizado en otros capítulos de esta tesis (entre paréntesis).....	24
Tabla 1.2: Descriptores utilizados para la caracterización de las poblaciones brasicáceas evaluadas en jardín común. Adaptados de IBPGR, 1990.....	26
Tabla 1.3: Especies brasicáceas presentes en la Argentina según Martínez-Laborde (1999), consideradas malezas según distintas fuentes. Detalles de la biología de las especies, distribución en el territorio argentino y cruzamientos con el cultivo de colza (<i>B. napus</i>).....	31
Tabla 1.4: Número de poblaciones brasicáceas relevadas y accesiones colectadas en Argentina (2008-2015).....	35
Tabla 1.5: Número de poblaciones relevadas y accesiones brasicáceas colectadas durante los viajes de exploración realizados desde 2008, discriminados por provincias argentinas.....	35
Tabla 1.6: Entradas de especies brasicáceas en los herbarios de la Universidad de Buenos Aires (BAA) y en el Instituto de Botánica Darwinion (SI). Se detalla la cantidad de entradas totales por especie, las entradas correspondientes al territorio de la Argentina, la distribución por provincias argentinas, y la entrada más antigua de cada especie (entre paréntesis lugar, colector y registro original).....	36
Tabla 1.7: Caracteres métricos y categóricos de diversas poblaciones naturales de brasicáceas de la región pampeana (indicada en la tabla 1.1), observadas en tres años de ensayo en un jardín común en el Departamento de Agronomía (UNS).....	40
Tabla 1.8: Caracterización morfológica de poblaciones de <i>Brassica rapa</i> (BR), variedades y poblaciones ferales de <i>B. napus</i> (BN).....	43
Tabla 1.9: Caracterización morfológica de poblaciones de <i>Raphanus sativus</i> (RS) de Argentina evaluadas en un jardín común.....	46
Tabla 1.10: Frecuencia de color primario de pétalo en poblaciones de <i>Raphanus sativus</i> (RS).....	47

Tabla 1.11: Perfil ácido de granos de poblaciones naturales y cultivares de <i>Brassica rapa</i> , <i>B. napus</i> y de una población de <i>Sinapis arvensis</i> . MG: % de materia grasa sobre sustancia seca, GS: glucosinolatos totales en mmoles por gr de muestra en base 8,5%.....	49
Tabla 2.1: Condiciones del muestreo original (G0) de seis poblaciones de malezas brasicáceas colectadas tras la floración simultánea con distintos cultivares de colza (<i>Brassica napus</i>), incluyendo el cultivar IMI resistente Nexera 8450, y controles utilizados.....	59
Tabla 2.2: Herbicidas (Mallory-Smith y Retzinger, 2003) utilizados en el ensayo de resistencia y dosis comercial (X) del principio activo.....	64
Tabla 2.3: Morfología (medias \pm desvío estándar, n=10) de malezas brasicáceas (G0) observadas en las condiciones originales de los sitios de recolección durante la primavera de 2008.....	67
Tabla 2.4: Proporción de plantas fuera de tipo (FT) observadas en los distintos ensayos de caracterización morfológica. Entre paréntesis el número total de plantas evaluadas.....	70
Tabla 2.5: Caracterización morfológica de la progenie de poblaciones naturales de <i>Brassica rapa</i> (BR), variedades y poblaciones ferales de <i>B. napus</i> (BN), y plantas de poblaciones de <i>B. rapa</i> en contacto con cultivos de <i>B. napus</i> , clasificadas como normales (TBR) o fuera de tipo (FT).....	71
Tabla 2.6: Viabilidad del polen de la progenie de poblaciones de <i>Brassica rapa</i> en contacto con cultivos de <i>B. napus</i> , clasificadas como normales (TBR) o fuera de tipo (FT), de poblaciones naturales de <i>B. rapa</i> (BR), y de una variedad de <i>B. napus</i> (BNC)	73
Tabla 2.7: Respuesta a la aplicación de imazetapir a doble dosis comercial, en la segunda generación (G2; n=4470-9336) de malezas brasicáceas originadas bajo condiciones naturales de floración simultánea con colza (<i>Brassica napus</i>) cv. Nexera 8450.....	75
Tabla 2.8: Respuesta a la aplicación de doble dosis de distintos herbicidas inhibidores de la enzima AHAS de plantas de la accesión BAL de <i>Brassica rapa</i> en dos generaciones posteriores a la floración coincidente con colza (<i>Brassica napus</i>) cv.	

Nexera 8450.....	76
Tabla 2.9: Caracterización morfológica de la progenie de una población natural de <i>Brassica rapa</i> (JUA), una variedad de <i>B. napus</i> IMI resistente (BNR) y plantas de una población de <i>B. rapa</i> (BAL) que estuvo en contacto con un lote cultivado con colza (<i>B. napus</i>) cv. Nexera 8450. Las plantas de la accesión BAL resistieron la aplicación de imazetapir a doble dosis comercial y fueron clasificadas como normales (TBR) o fuera de tipo (FT).....	77
Tabla 3.1: Detalle de las accesiones de <i>Raphanus sativus</i> utilizadas en los ensayos.....	90
Tabla 3.2: Herbicidas (Mallory-Smith y Retzinger, 2003) utilizados en el ensayo de resistencia y dosis comercial (X) del principio activo.....	93
Tabla 3.3: Herbicidas alternativos para el control de las accesiones de <i>Raphanus sativus</i> resistentes a herbicidas AHAS y dosis comerciales evaluadas.....	97
Tabla 3.4: Supervivencia, expresada como porcentaje del control sin tratamiento (media \pm error estándar) de varias accesiones de <i>Raphanus sativus</i> y dos variedades de colza-canola (<i>Brassica napus</i>) (convencional BNC e IMI resistente BNR), a herbicidas aplicados a doble dosis comercial (2X).....	101
Tabla 3.5: Materia seca, expresada como porcentaje del control sin tratamiento (media \pm error estándar) de varias accesiones de <i>Raphanus sativus</i> y dos variedades de colza-canola (<i>Brassica napus</i>) (convencional BNC e IMI resistente BNR), a herbicidas aplicados a doble dosis comercial (2X).....	102
Tabla 3.6: Supervivencia de accesiones de <i>Raphanus sativus</i> a herbicidas que actúan sobre la AHAS aplicados a doble dosis comercial.....	103
Tabla 3.7: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la supervivencia de accesiones de <i>Raphanus sativus</i> resistentes (BAL-1A, ERC, SJQ y PIE-A) y susceptible (SDV) a la aplicación de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS. Se estimaron también los niveles comparados de resistencia.....	106
Tabla 3.8: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la materia seca remanente de biotipos de <i>Raphanus sativus</i> resistentes (BAL-1A y PIE-A) y susceptible (SDV) tras la aplicación de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS. Se estimaron también los niveles comparados de resistencia.....	108

Tabla 3.9: Parámetros reproductivos de la accesión de <i>Raphanus sativus</i> resistente a herbicidas PIE-A, hallada interfiriendo un cultivo de girasol CL en un lote agrícola. . .	109
Tabla 3.10: Efecto de la cobertura de la accesión de <i>Raphanus sativus</i> PIE-A resistente a herbicidas AHAS sobre los parámetros productivos de un girasol CL cultivado en el sudeste de la provincia de Buenos Aires.	109
Tabla 3.11: Variación en la secuencia del gen de la enzima acetohidroxiácido sintasa (subrayados) entre las accesiones de <i>Raphanus sativus</i> susceptibles y resistentes y las sustituciones de aminoácidos predichas (en negrita), que confieren resistencia a los herbicidas inhibidores de la AHAS.	111
Tabla 3.12: Supervivencia de dos accesiones de <i>R. sativus</i> resistentes a herbicidas AHAS (ERC y PIE-A) y otra susceptible (SDV) a la aplicación de herbicidas alternativos pre-emergentes a dosis comercial.	112
Tabla 3.13: Supervivencia de dos accesiones de <i>Raphanus sativus</i> resistentes a herbicidas AHAS (ERC y PIE-A) y otra susceptible (SDV) a la aplicación de herbicidas alternativos post-emergentes a dosis comercial.	113
Tabla 4.1: Condiciones de detección de plantas espontáneas o poblaciones ferales de <i>Brassica napus</i> con resistencia transgénica a glifosato (adaptado de Devos et al., 2012).	124
Tabla 4.2: Herbicidas utilizados en el ensayo de alternativas de control y dosis comercial (X) del principio activo.	130
Tabla 4.3: Descripción de las accesiones utilizadas en los ensayos de caracterización de las poblaciones ferales de <i>Brassica napus</i> resistentes a glifosato.	133
Tabla 4.4: Caracterización morfológica de la accesión feral de <i>Brassica napus</i> GER criada en el campo experimental del Departamento de Agronomía, comparada con poblaciones naturales de <i>B. rapa</i> y variedades comerciales de colza <i>B. napus</i>	137
Tabla 4.5: Supervivencia y materia seca de las accesiones de <i>Brassica napus</i> feral GER, SMA y REG y una variedad de colza convencional (BNC), a la aplicación de glifosato a doble dosis comercial, expresada como porcentaje del control.	140
Tabla 4.6: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la supervivencia de la accesión de <i>Brassica napus</i> resistente (GER) y una variedad de	

colza convencional (BNC) a la aplicación de glifosato, expresadas como porcentaje de supervivencia y materia seca. Se estimaron también los niveles comparados de resistencia.....	142
Tabla 4.7: Supervivencia de la población feral de <i>Brassica napus</i> GER y una variedad de colza convencional (BNC), a la aplicación de herbicidas alternativos al glifosato a dosis comercial.....	144
Tabla 5.1: Estudios de flujo génico entre variedades de <i>Brassica napus</i> transgénicas y poblaciones silvestres de <i>B. rapa</i>	153
Tabla 5.2: Herbicidas evaluados para el control químico de las accesiones de <i>Brassica rapa</i> con resistencia a glifosato y herbicidas AHAS.....	158
Tabla 5.3: Detalle de las condiciones agroecológicas de los sitios de colecta de las poblaciones de <i>Brassica rapa</i> utilizadas en los ensayos.....	160
Tabla 5.4: Caracterización morfológica de las accesiones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a glifosato LDU y BAL-R, comparadas con poblaciones naturales de <i>B. rapa</i> susceptibles y variedades de colza (<i>B. napus</i>).....	163
Tabla 5.5: Caracterización química de los granos de las accesiones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a herbicidas LDU y BAL-R, de poblaciones naturales de <i>B. rapa</i> susceptibles (5) y de variedades de colza <i>B. napus</i> (5). Ácidos grasos oleico, linoleico, linolénico, erúcico, gadoleico y materia grasa sobre sustancia seca (S.S.S.) expresados como porcentaje. GS: glucosinolatos (μmoles totales por g de muestra en base 8,5%).....	164
Tabla 5.6: Supervivencia y materia seca remanente de las accesiones de <i>Brassica rapa</i> JUA, BAL-R, LDU y MOR, a la aplicación de glifosato a doble dosis comercial, expresada como porcentaje del control.....	165
Tabla 5.7: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la supervivencia de la accesión de <i>Brassica rapa</i> resistente (LDU) y susceptible (JUA) a la aplicación de glifosato, expresadas como porcentaje de supervivencia y materia seca.....	167
Tabla 5.8: Supervivencia (expresada como porcentaje del control) y materia seca (expresada en mg pl^{-1}), de dos accesiones de <i>Brassica rapa</i> tras la aplicación de un rango de dosis de glifosato (dosis en kg e.a. ha^{-1}).....	167

Tabla 5.9: Supervivencia de las accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato BAL-R, LDU y MOR, y de la accesión susceptible JUA, a la aplicación de tres herbicidas inhibidores de la enzima AHAS a doble dosis comercial, expresada como porcentaje del control.....169

Tabla 5.10: Materia seca de las accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato BAL-R, LDU y MOR, y de la accesión susceptible JUA, a la aplicación de tres herbicidas inhibidores de la enzima AHAS a doble dosis comercial, expresada como porcentaje del control.....169

Tabla 5.11: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la supervivencia de la accesión de *Brassica rapa* resistente (LDU) y susceptible (JUA) a la aplicación de imazapir y metsulfurón-metil, expresadas como porcentaje de supervivencia. Se estimaron también los niveles comparados de resistencia.....171

Tabla 5.12: Resultados del test inmunológico para confirmar la presencia de la proteína CP4 EPSPS en accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato (LDU, BAL-R y MOR), en contraste con un control negativo (JUA).....171

Tabla 5.13: Supervivencia de una accesión de *Brassica rapa* resistente a glifosato y herbicidas inhibidores de la AHAS (LDU), a la aplicación de herbicidas alternativos.....173

Tabla 6.1: Accesiones de malezas de distintas especies brasicáceas con resistencia a herbicidas detectadas en la región pampeana argentina, origen de la resistencia y método de detección.....179

ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

a: anual

A260: absorbancia a 260 nm

A280: absorbancia a 280 nm

Ab: arbusto

Ac: ácido

AC: antes de Cristo

ACO: ancho de cotiledón

ACP: análisis de componentes principales

Ad: adventicia

AD: análisis discriminante

ADN: ácido desoxirribonucleico

Af: africana

AHAS: acetohidroxiácido sintetasa

AHI: ancho de hoja inferior

Ala: alanina

ALP: altura de planta

ALS: acetolactato sintetasa

Am: americana

ANOVA: análisis de la varianza

ANT: antocianinas

AP: antes del presenten

APS: abrazamiento del pecíolo de la hoja superior

Arg: arginina

ART: artificial

As: asiática

ASl: ancho de silicua

Asp: ácido aspártico

Av: avenida

AZU: *B. rapa* de Azul

b: bienal

b: pendiente de las curvas de dosis-respuesta

B3: roseta con 3 hojas desplegadas (escala CETIOM)

B4: roseta con 4 hojas desplegadas (escala CETIOM)

BAA: Herbario de la Universidad de Buenos Aires

BAI: Buenos Aires

BAL-1A: *R. sativus* agrestal de Balcarce (2008)

BAL-1B: *R. sativus* ruderal de Balcarce (2008)

BAL-2A: *R. sativus* agrestal de Balcarce (2009)

BAL-2B: *R. sativus* ruderal de Balcarce (2009)

BAL-3: *R. sativus* avance generacional de Balcarce (2010)

BAL-4: *R. sativus* agrestal de Balcarce (2011)

BAL: *B. rapa* agrestal de Balcarce

BC: backcrosses
BN: *Brassica napus*
BN0513: *B. napus* de General Villegas
BN1512: *B. napus* de Gonzales Chaves
BNC: *B. napus* convencional (cultivar Nexera 1700)
BNI: *Brassica nigra*
BNI0812: *B. nigra* de Lobería
BNI1408: *B. nigra* de Coronel Suárez
BNR: *B. napus* IMI resistente (cultivar Nexera 8450)
BR: *Brassica rapa*
BR0213: *B. rapa* de Energía
BR0308: *B. rapa* de Juárez
BR0313: *B. rapa* de Quequén
BR1012: *B. rapa* de Bariloche
BR1113: *B. rapa* de Sierra de la Ventana
BR1212: *B. rapa* de La Dulce
BR1213: *B. rapa* ruderal de Balcarce
BR1313: *B. rapa* agrestal de Balcarce
BSE: biomasa de semilla
C: cultivado
CAPS: cleaved amplified polymorphic sequence
CAT: Catamarca
CETIOM: Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains
CHA: Chaco
CHI: color de hoja inferior
CHP: color de hipocótilo
CHU: Chubut
CL: Clearfield
cm: centímetros
CO₂: dióxido de carbono
com. pers.: comunicación personal
CON: constricciones de las silicuas
CONABIA: Comisión Nacional de Biotecnología
COR: Córdoba
COS: Corrientes
CPE: color de pétalo
CRA: color de la raíz
CSE: color de la semilla
CSI: color de las silicuas inmaduras
CTA: color de tallo
cv: cultivares
d: límite superior de las curvas de dosis-respuesta
DAE: días a emergencia
DAPI: 4', 6-diamino-2-fenilindol
DC: después de Cristo

DFE: Distrito Federal (Ciudad Autónoma de Buenos Aires)
DFL: días a floración
DL50: dosis letal media
DMA: días a madurez
DPI: disposición de los pimpollos
DSI: disposición de las silicuas
e: punto de inflexión de las curvas de dosis-respuesta
e.a.: equivalente ácido
Ea: euroasiática
Ed: endémica
ENE: *B. rapa* de Energía
EPSPS: 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa
ERC: *R. sativus* de El Rinconcito (2010)
ERI: Entre Ríos
Eu: europea
EV: *Eruca vesicaria*
EVB: even flat fan for band spraying
F: forward
F1: inicio de floración (escala CETIOM)
F1: híbrido de primera generación
F2: descendientes de F1
FAO: Food and Agriculture Organization
FAUBA: Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires
FHI: forma de hoja inferior
FHS: forma de hoja superior
FOR: Formosa
FR: factor de resistencia
FRA: forma de la raíz
FSE forma de la semilla
FT: fuera de tipo
g: gramo
G0: generación original
G1: primera generación
G2: segunda generación
G5: estado de granos coloreados (escala CETIOM)
GER: *B. napus* agrestal de Germana
Gly: glicina
GM: genéticamente modificado
GR50: median growth rate
GS: glucosinolatos
H: hierba
h: hora
ha: hectárea
I: intermedio
IBPGR: International Board for Plant Genetics Resources

IHI: incisión de hoja inferior
IHS: incisión de hoja superior
IMI: imidazolinonas
INASE: Instituto Nacional de Semillas
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
JUA: *B. rapa* de Benito Juárez
JUJ: Jujuy
kg: kilogramo
km: kilómetro
L: litro
LDU: *B. rapa* agrestal de La Dulce
Leu: leucina
LHI: largo de hoja inferior
lm: longitud de malla
LPA: La Pampa
LPE: largo de pétalo
LPI: largo del pecíolo de la hoja inferior
LPS: largo del pecíolo de la hoja superior
LRI: La Rioja
LRO: largo del rostro de la silicua
LSI: largo de silicua
m: metros
M: molar
MAGyP: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
MEN: Mendoza
MG: materia grasa
mg: miligramo
MHI: margen de hoja inferior
MHS: margen de hoja superior
min: minuto
MIS: Misiones
mL: mililitro
mM: micromol
mm: milímetro
MOR: *B. rapa* agrestal de Morales
Na: nativa
NAT: natural
NEU: Neuquén
NEX1700: *B. napus* cultivar Nexera 1700 de Dow Agrosiences S.A.
NEX8450: *B. napus* cultivar Nexera 8450 de Dow Agrosiences S.A.
ng: nanogramo
nm: nanometro
NN: origen desconocido
NRP: número de ramificaciones principales
NSS: número de semillas por silicuas

OGM: organismo genéticamente modificado
OGTR: Office of Gene Technology Regulator
p: perenne
 p : probabilidad
p.a.: principio activo
P.C.: producto comercial
P1000: peso de mil semillas
pb: pares de bases
PCI: peso de cien semillas
PCR: *polymerase chain reaction*
PDS: fitoeno desaturasa
Pe: fósforo extractable
PHI: pubescencia de hoja inferior
PHS: pubescencia de hoja superior
PIE-A: *R. sativus* agrestal de Pieres (2011)
PIE-B: *R. sativus* ruderal de Pieres (2011)
PIE: *B. rapa* de Pieres
pl: planta
pmol: picomol
POST: post-emergente
PREE: pre-emergente
PRI: *R. sativus* de Coronel Pringles
Pro: prolina
PSI: pubescencia de las silicuas
PTA: pubescencia de tallo
PTB: pirimidiniltio-benzoatos
R: reverse
R4: vainas completamente desarrolladas en soja
REG: *B. napus* agrestal de El Regreso
RHI: partición de hoja inferior
RHS: partición de hoja superior
RN: ruta nacional
RNE: Río Negro
RP: ruta provinciales
RR: Roundup Ready
RRV: relación rostro valva
RS: *Raphanus sativus*
Rs: resistente
RS0108: *R. sativus* de Coronel Pringles
RS0208: *R. sativus* de Sierra de la Ventana
RS0211: *R. sativus* de Pieres
RS0408: *R. sativus* ruderal de Balcarce
RS0508: *R. sativus* agrestal de Balcarce
RS2113: *R. sativus* de Hilario Ascasubi
RS2113A: *R. sativus* de Hilario Ascasubi (flores amarillas)

RS2113B: *R. sativus* de Hilario Ascasubi (flores violetas)
S: silvestre
S.A.: Sociedad Anónima
SA: *Sinapis arvensis*
SA0411: *S. arvensis* de Pieres
SA0608: *S. arvensis* de Lobería
SA0812: *S. arvensis* de Necochea
SAGPyA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
SAL: Salta
SC: suspensión concentrada
SCR: Santa Cruz
SCT: sulfonilamino-carboniltriazolinonas
sd: sin datos
SDE: Santiago del Estero
SDV: *R. sativus* de Sierra de la Ventana (2008)
SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Ambiental
Ser: serina
SFE: Santa Fe
SI: Herbario del Instituto de Botánica Darwinion (San Isidro)
SIP: silicuas por inflorescencia principal
SJQ: *R. sativus* de San Joaquín (2010)
SJU: San Juan
SLU: San Luis
SMA: *B. napus* agrestal de San Mayol
ssp: subespecie
SSS: sobre sustancia seca
SU: sulfonilureas
Su: susceptible
T: transgresivo
TA: temperatura de *annealing*
TAE: solución *buffer* formada por Tris, acetato y EDTA
TBR: tipo *B. rapa*
TDF: Tierra del Fuego
THI: tamaño de hoja inferior
TJ: TeeJet
TRI: tricomas
TRP: triazolpirimidinas
Trp: triptofano
TUC: Tucuman
U: Woo Jang-choon
UNS: Universidad Nacional del Sur
UV: ultravioleta
VB XR: extended range flat sprays tips
W: watts
X: dosis comercial

x: variable dependiente
 μg : microgramo
 μL : microlitro
 μmol : micromol

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las malezas constituyen una de las principales limitantes para la agricultura. Desde su advenimiento, la agricultura ha creado nuevos nichos ecológicos en ambientes fuertemente disturbados, desplazando la flora nativa y facilitando el contacto entre especies geográficamente separadas. Esto condujo a la evolución de nuevas plantas adaptadas a ambientes profundamente modificados. En numerosos casos las malezas tuvieron una evolución paralela a la de los cultivos, con quienes incluso comparten progenitores (Harlan, 1992).

Las complejas relaciones entre las especies domesticadas, sus malezas asociadas y los parientes silvestres involucran procesos de intercambio genético en todos los sentidos. La hibridación entre especies emparentadas parece ser un mecanismo frecuentemente asociado a la generación de variabilidad para la emergencia de las principales especies cultivadas. Este proceso también habría conducido a la emergencia de nuevas especies invasoras y al aumento de la agresividad de algunas malezas (Ellstrand, 2003).

La palabra domesticación deriva del latín *domus*, casa, hogar. Domesticar significa, entonces, llevar a la casa. Una planta o animal domesticado es aquel que es llevado al hogar. Por hogar se entiende tanto la casa propiamente dicha, como el jardín, el huerto, el corral, el campo. Una *domus* es más que un espacio o territorio, es un zona íntimamente conocida y espiritualmente segura (Harlan, 1992).

El proceso de domesticación, que es un proceso evolutivo, está asociado a la pérdida de la capacidad de las especies de reproducirse en forma autónoma, con independencia de la actividad humana (Harlan, 1992). Si bien la mayor parte de las especies cultivadas han emergido a partir de la domesticación de formas silvestres, algunas de ellas, como la avena (*Avena sativa* L.) y el centeno (*Secale cereale* L.), evolucionaron a partir de especies previamente consideradas malezas (Vavilov, 1951; Harlan, 1992; Hancock, 2012).

El proceso inverso, denominado dedomesticación, implica que a partir de plantas domesticadas se desarrollen plantas capaces de formar poblaciones que persisten varios ciclos. Aquellas plantas resultantes de un proceso de dedomesticación son denominadas ferales (Gressel, 2005). Estas plantas ferales pueden tener dos orígenes. Algunas, como el centeno asilvestrado de California, son descendientes

directos de un cultivo (endoferalidad). Otras, como la remolacha silvestre europea, son descendientes de híbridos entre el cultivo y otra especie, generalmente silvestre (exoferalidad) (Gressel, 2005; Ellstrand et al., 2010).

Las brasicáceas o crucíferas (Brassicaceae) son una importante familia vegetal monofilética, que incluye 338 géneros y 3.709 especies, distribuidas ampliamente en los más diversos climas alrededor del mundo (Al-Shehbaz et al., 2006). Son especies cosmopolitas, presentando una distribución mundial, incluyendo todos los continentes excepto la Antártida. La mayor cantidad de géneros se encuentra en las zonas templadas del Hemisferio Norte, y su abundancia disminuye con la latitud. En los trópicos su distribución se ve reducida a zonas montañosas. El centro más importante de diversificación se encuentra en la región Irano-Turania (150 géneros y 900 especies), específicamente en las planicies de Turquía donde existe una extrema diversidad ecológica y geológica, por lo que se lo reconoce como el centro principal de origen. La zona del Mediterráneo constituye un centro secundario con 113 géneros y 630 especies. Las regiones Saharo-Sindiana y Norte América muestran una importante reducción en la diversidad de las especies de brasicáceas, que se acentúa en el hemisferio sur, en especial en Sudamérica (40 géneros y 340 especies) (Lysak y Koch, 2011; Koch y Kiefer, 2006).

La importancia económica y social de las crucíferas es destacada, por incluir especies que han sido cultivadas por siglos para la alimentación humana, como fuente de aceites industriales y comestibles, condimentos y productos hortícolas. El cultivo oleaginoso más importante de la familia es la colza canola (*Brassica napus* L.), mientras que como condimentos son utilizadas varias especies de mostazas, en especial *B. nigra* (L.) Koch, *B. juncea* (L.) Czernohorsky y *Sinapis alba* L. Muchas especies son importantes cultivos hortícolas, principalmente los derivados de *B. oleracea* L. (repollos, coles, repollitos de Bruselas, coliflor). Varios miembros de esta familia presentan un elevado valor potencial como recurso para cultivos con destino alimenticio, industrial, forraje o para la producción de biodiesel (por ejemplo *B. carinata* Braun, *Camelina sativa* [L.] Crantz, *Crambe abyssinica* [Fries] Prina, *Eruca vesicaria* [L.] Cav.). Una especie en especial (*Arabidopsis thaliana* [L.] Heynhold), ha sido estudiada y adoptada como “organismo modelo” en estudios de genética vegetal (Warwick, 2011).

Esta familia es también conocida por presentar especies con un alto poder invasor,

que interfieren en los cultivos más significativos de la humanidad. Se conocen más de 120 especies crucíferas que son malezas, varias de ellas son cosmopolitas y se presentan en los sistemas productivos de todo el mundo (por ejemplo *B. rapa* L., *Sinapis arvensis* L., *Thlaspi arvense* L., *Diplotaxis tenuifolia* [L.] de Candolle). Algunas de estas malezas forman complejos maleza-cultivo (*Raphanus sativus* L.–*R. raphanistrum* L.; *B. napus*–*B. rapa*) y son capaces de intercambiar genes (incluyendo transgenes) con las especies cultivadas bajo condiciones naturales (Warwick et al. 2003, 2008), aumentando su invasividad.

Las especies de esta familia presentan una arquitectura floral uniforme y altamente conservada en la mayoría de sus miembros, permitiendo distinguirla fácilmente de cualquier otra familia. Las flores presentan simetría bilateral, y cuentan en general con cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres tetradínamos y un ovario bicarpelar. Por el contrario, los frutos exhiben una enorme variabilidad interespecífica, siendo el carácter más importante usado en las clasificaciones taxonómicas clásicas. La estructura básica de los frutos consiste en una cápsula bivalvada, dividida longitudinalmente por un falso tabique en dos lóculos, generalmente dehiscentes. Sobre la base de la relación largo/ancho, los frutos son clasificados en silículas y silículas, aunque esta división no tiene ninguna implicancia filogenética (Lysak y Koch, 2011).

Recientes estudios sitúan el origen de las brassicáceas hace 37 millones de años, en el Eoceno, edad en la cual un clima cálido y húmedo dominaba en el planeta, con selvas tropicales extendiéndose por toda Europa y Asia. En ese ambiente, las crucíferas evolucionaron como un grupo de especies tropicales, al igual que las familias hermanas de las cleomáceas y caparáceas, con las cuales comparte centro de origen. Sin embargo, hacia el final del Eoceno se produjo un gran cambio climático, que llevó a una edad de hielo. Este enfriamiento de la superficie terrestre provocó la desaparición de numerosas especies animales y vegetales, y el desarrollo de un ambiente árido y frío. Este suceso coincide, contrariamente a lo esperado, con la máxima radiación de las especies crucíferas, y con la evolución de ciertos caracteres que permitieron la gran diversificación de esta familia (Couvreur et al., 2010). Estos caracteres están asociados a cambios en el sistema reproductivo, tiempos de floración, biología de la polinización y cambios en el hábito de vida (Franzke et al., 2011). Su adaptación contrasta con la de las cleomáceas y caparáceas, que sobrevivieron solo en zonas tropicales y cuya abundancia es muy inferior. Este gran

cambio climático obligó a las especies a adaptarse, migrar hacia latitudes inferiores o extinguirse (Couvreur et al., 2010).

Otro suceso importante en la evolución de las brassicáceas fueron las duplicaciones del genoma (*whole-genome duplications*). Análisis realizados sobre *A. thaliana* demostraron la ocurrencia de tres de estos fenómenos durante la historia evolutiva de estas especies. La más antigua de estas duplicaciones ocurrió al momento de la diversificación de las eudicotas (Eudicotyledoneae), la segunda en la divergencia de las caricáceas-brassicáceas, y la más reciente en el núcleo de las brassicáceas (hace 40 millones de años), coincidente con su radiación. Este hecho jugó un papel primordial en la diversificación de la familia. La poliploidía provee el material necesario para que actúe la selección, extendiendo la resiliencia a mutaciones deletéreas, incrementando la tasa de especiación y riqueza de especies, y otorgando ventajas adaptativas para colonizar ambientes inestables (Franzke et al., 2011).

Las brassicáceas evolucionaron y se diversificaron rápidamente impulsadas por estas dos circunstancias, una externa relacionada con el gran cambio climático del Mioceno que creó hábitats abiertos y secos, y nuevos nichos ecológicos; y la otra interna y genética, producto de la duplicación del genoma, que proveyó el material necesario para colonizar estos nuevos ambientes. Estos factores provocaron la gran tasa de radiación de las crucíferas, que es una de las mayores reportadas para plantas superiores (Franzke et al., 2011).

El ser humano reconoció la importancia de las brassicáceas como fuente de recursos desde el inicio mismo de la agricultura. Detalles sobre su antigüedad y domesticación han sido encontrados en referencias literarias de varias civilizaciones, yacimientos arqueológicos, taxonomía comparativa, distribución natural y evidencia citogenética. Desde el momento en que el hombre hizo uso de las especies de esta familia, su evolución se vio afectada y dirigida según los propósitos y el destino que los antiguos mejoradores decidieron darle. A partir de este punto, las especies siguieron caminos distintos. Mientras que las especies silvestres continuaron su evolución natural bajo la influencia del ambiente, las plantas que el ser humano tomó para su provecho fueron moldeadas y domesticadas por éste, creando una gran diversidad según el uso por el cual fueron seleccionándose. Incluso, algunas de estas especies tienen su origen en ambientes cultivados, no encontrándose en estado silvestre en ningún momento previo de su evolución. En cambio, algunas especies silvestres fueron adaptándose a

ambientes modificados por el hombre, sin ser cultivadas, aprovechando los hábitats favorables creados para el cultivo y manteniendo estrechas relaciones con las especies mejoradas, intercambiando material genético y compitiendo por los recursos (Gómez-Campo y Prakash, 1999).

Entre todas las especies de brasicáceas domesticadas, sin dudas las del género *Brassica* son las de mayor relevancia mundial. Este género comprende 35 especies, con número cromosómico variable entre 7 y 11. De estas, seis especies son cultivadas alrededor del mundo, y forman un complejo cuyas relaciones filogenéticas fueron descritas por el botánico coreano Woo Jang-choon (U Nagaharu), en lo que se conoce como el triángulo de "U". Las especies diploides *B. nigra* (BB, $2n=16$), *B. oleracea* (CC, $2n=18$) y *B. rapa* (AA, $2n=20$) descienden de un progenitor común con un número básico de cromosomas $x=6$. Tras su aparición, cruzas interespecíficas naturales entre ellas, seguidas de duplicación espontánea de cromosomas, dieron origen a las tres especies anfidiplóides: *B. napus* (AACC $2n=38$), *B. juncea* (AABB, $2n=36$) y *B. carinata* (BBCC, $2n=34$) (Gupta y Pratap, 2007; Allender y King, 2010; Iniguez-Luy y Federico, 2011; Prakash et al., 2012).

Una de las primeras especies de brasicáceas domesticadas, y una de las más importantes fue *B. rapa*. La forma silvestre de esta especie, de la cual se originaron las variedades cultivadas, ha habitado naturalmente toda la zona desde el Mediterráneo occidental hasta Asia central, donde aún está presente asociada a hábitats ruderales. Según evidencias halladas en antiguas escrituras sánscritas de la India, *B. rapa* ya estaba domesticada entre 3500 y 4000 años antes del presente, como un cultivo multipropósito. La primera referencia histórica proviene de la India, donde una variedad de *B. rapa* conocida como *sarson* es mencionada en la literatura sánscrita. Actualmente se reconocen dos grandes razas, con centros de origen independientes. El centro occidental, ubicado en la zona del Mediterráneo, dio origen a las formas oleaginosas cultivadas actualmente en Norteamérica y Europa, y a las formas de raíces engrosadas utilizadas como hortícolas. El centro oriental dio origen a las formas oleaginosas cultivadas principalmente en India y China, diferentes a las originadas en Europa, y a formas seleccionadas por sus hojas comestibles (col china, *pak choi*) (Appelqvist, 1972; Gómez-Campo y Prakash, 1999; Gupta y Pratap, 2007; Prakash et al., 2012).

Se considera que las formas de *B. rapa* seleccionadas por sus raíces e hipocótilo

engrosado fueron originadas en la zona del Mediterráneo. Semillas de esta especie han sido encontradas en sitios neolíticos de 10.000 años AP, y citas sobre su cultivo y propiedades alimenticias y medicinales son abundantes en la literatura griega y romana antigua. Plinio el Viejo (Gayo Plinio Segundo, 23-79 DC), por ejemplo, en su Historia Natural menciona extensamente esta especie, llamándola en latín *napus* y *rapa* indistintamente. Se cree que de estas formas hortícolas se seleccionaron las formas oleaginosas europeas, que comenzaron a cultivarse con ese destino en la Edad Media. Las primeras referencias escritas del cultivo de *B. rapa* oleaginoso en Europa datan del siglo XIV, momento a partir del cual su uso se difundió especialmente en los países del norte europeo, donde las fuentes de aceite vegetal (en especial de oliva) eran más reducidas. Su uso predominante fue como aceite para iluminación y los primeros cultivares comerciales se registraron en Holanda en el siglo XVI (Appelqvist, 1972; Reiner et al., 1995; Gómez-Campo y Prakash, 1999; Gupta y Pratap, 2007; Prakash et al., 2012).

Desde el siglo XVI se encuentran registros de su cultivo en Sudamérica, y en la zona del antiguo Perú se menciona que los nabos que se comercializaban en la Lima colonial eran cosechados directamente de los campos de trigo y de las acequias, donde crecían en forma sub-espontánea. El escape de cultivo parece haber sido general para estas especies en toda América, desde varios siglos atrás (Patiño, 1963). En nuestro país la importancia de *B. rapa* como maleza de cultivos es reconocida desde la década del '30 (Ibarra, 1937). Por la misma época se comenzaron a aprovechar las poblaciones naturales de nabo. Según Tenenbaum (1937), la abundancia de *B. rapa* como maleza de trigo y en especial de lino fue tal, que la sola separación de los granos de nabo pagaba el trabajo de limpieza y hasta el costo de la producción del cereal cosechado. Ese antecedente animó a los productores de aquellas épocas a intentar la siembra por separado, con un resultado económico superior al de la siembra de cereales. El grano de nabo se destinaba a la elaboración de aceite no comestible, y cotizó en la Bolsa de Cereales hasta la década del 60 (Pascale, 1976; Iriarte y Valetti, 2008).

Entre estas seis especies cultivadas de *Brassica*, la de mayor relevancia mundial actualmente es *B. napus* (colza), que se destaca por su elevada participación en la producción mundial de aceites comestibles. En 2012 se cosecharon más de 65 millones de toneladas de colza, sobre una superficie de 34 millones de hectáreas sembradas en todo el mundo. Esto hace del aceite de *B. napus* el tercero en

importancia, luego del de palma y soja (FAOSTAT, 2015).

Se considera que *B. napus* deriva de múltiples hibridaciones interespecíficas espontáneas entre *B. rapa* y la col (*B. oleracea*), ocurridas durante la Edad Media, cuando se las cultivaba en forma conjunta. Los primeros registros del cultivo de *B. napus* en Europa datan del siglo XVI, cuando se comenzó a utilizar como fuente de aceite (conocido como *raepoli*) para iluminación y fabricación de jabones. Junto con *B. rapa*, su cultivo se volvió popular en todo el norte de Europa, incluyendo Escandinavia, y para el siglo XVIII se había difundido hasta Inglaterra (Gómez-Campo y Prakash, 1999; Allender y King, 2010; Prakash et al., 2012).

En la segunda mitad del siglo XX, Canadá inició un destacado proceso de mejoramiento del cultivo de *B. napus*. Debido a los bloqueos y dificultades para el comercio marítimo durante la II Guerra Mundial, la disponibilidad de lubricantes marinos estaba restringido. Para superar esa restricción, el gobierno de Canadá decidió introducir el cultivo de *Brassica*, debido a que el alto nivel de ácido erúxico (ácido cis-13-decosenoico, 22:1, n-9) brinda a su aceite excelentes propiedades para la lubricación en condiciones de alta humedad y temperatura. El mejoramiento se inició utilizando germoplasma de *B. rapa* obtenido de Polonia, y de *B. napus* proveniente de empresas semilleras de Estados Unidos, donde se refería que las semillas de esa especie provenían de Argentina. Esto dio lugar a la denominación de tipo “argentino” y “polaco” para los cultivares de colza (Appelqvist, 1971; Busch et al., 1994; Thomas, 2003; Prakash et al., 2012).

Luego del final de la II Guerra Mundial, la producción de colza declinó rápidamente. El gobierno de Canadá decidió entonces destinar el cultivo de estas especies a la producción de aceite comestible, debido a la gran adaptabilidad a las condiciones climáticas de ese país norteamericano. Sin embargo, ese destino estaba restringido por los altos niveles de ácido erúxico en el aceite, un ácido graso insaturado de larga cadena que había demostrado ser tóxico en ratas. Este hecho había llevado a la Dirección Canadiense de Alimentos y Drogas a prohibir la comercialización del aceite de *B. napus* y *B. rapa* para consumo humano. Por otra parte, la presencia de glucosinolatos, metabolitos secundarios que al hidrolizarse dan lugar a productos tóxicos goitrogénicos, restringía el uso de la harina de extracción para la alimentación animal (Appelqvist, 1972; Busch et al., 1994; Prakash et al., 2012).

El mejoramiento de estas especies se enfocó a la obtención de variedades con bajos

valores de ambos compuestos tóxicos. En 1966 se desarrolló la primera variedad con bajo contenido de ácido erúxico (cv. Oro) y en 1967 se crearon los primeros cultivares (cv. Tower) con reducido contenido en glucosinolatos. Ambas características combinadas dieron origen a las variedades identificadas con el nombre comercial de “canola” (Canadian Oil Low Acid) o colza doble “00”. Para que un cultivar sea considerado como de calidad canola debe ajustarse a un estándar de calidad mundial que exige que los niveles de ácido erúxico sean menores al 2% y los de glucosinolatos menores a 20 μ moles por gramo de grano (Appelqvist, 1972; Busch et al., 1994). El sostenido mejoramiento genético de la colza continuó durante las décadas siguientes, y ha producido variedades resistentes a herbicidas, tanto transgénicas (a glifosato y glufosinato de amonio) como convencionales (resistentes a imidazolinonas) (Senior y Bavage, 2003).

La especie *B. napus* no se conoce en estado silvestre, hecho que refuerza las teorías de su origen en ambientes cultivados (Gupta y Pratap, 2007; Prakash et al., 2012). Sin embargo, debido a la significativa dehiscencia del fruto, durante la cosecha se pierden y quedan en el suelo cantidades considerables de semilla, que son transportadas por la maquinaria agrícola (Gulden et al., 2003b; Von der Lippe y Kowarik, 2007, Bailleul et al., 2012). Las semillas de *B. napus* tienen la capacidad de sobrevivir en el suelo y, bajo condiciones desfavorables, entrar en dormición secundaria para emerger posteriormente como plantas voluntarias. Estas comunidades pueden persistir más de cinco años, como poblaciones ferales (Crawley y Brown, 1995, Pessel et al., 2001; Simard et al., 2002; Gulden et al., 2003a; Lutman et al., 2003; Pivard et al., 2008).

Los voluntarios de *B. napus* son usuales en áreas de cultivo de colza-canola del oeste de Canadá y en los Estados Unidos, donde se la considera una maleza esporádica. En Canadá, la aparición de plantas voluntarias de *B. napus* ha aumentado en las últimas tres décadas, considerándose una de las 10 malezas más comunes para mediados de los '90 (Gulden et al., 2008; Simard et al., 2002). Poblaciones ferales de *B. napus* han sido detectadas en regiones del mundo donde el cultivo tiene gran difusión, incluyendo países de Europa, Estados Unidos y Canadá. Suelen desarrollarse en hábitats ruderales como espacios no cultivados, márgenes de los cultivos, vera de rutas, caminos, zanjas, vías férreas, obras en construcción, puertos, instalaciones de almacenamiento y procesamiento de granos y baldíos (Squire et al., 2011; Devos et al., 2012).

Otro grupo de especies brasicáceas de gran importancia son las pertenecientes al género *Raphanus*. Actualmente se considera que el género comprende dos especies básicas; *R. sativus* que integra todas las formas cultivadas, y *R. raphanistrum*, que crece en estado silvestre (Warwick y Anderson, 1999). *R. sativus* (rábano) es una planta euroasiática cultivada en todo el mundo por el valor alimenticio de sus raíces engrosadas (Kaneko et al., 2011). El origen del cultivo es muy remoto y aunque no ha sido elucidado por completo, las investigaciones recientes parecen indicar que fue domesticado independientemente en Europa y Asia (Warwick, 2011; Snow y Campbell, 2005). Reflejo de su antigüedad son las citas en los textos de Heródoto (484-424 AC), y las figuras encontradas en las paredes de 4000 años de las pirámides de Egipto. En el oriente, el rábano fue cultivado en el este de China hace más de 2000 años, y es allí donde su diversidad morfológica y culinaria es mayor (Snow y Campbell, 2005).

Las teorías propuestas para explicar el origen de *R. sativus* como cultivo incluyen la domesticación a partir de alguna de las subespecies de *R. raphanistrum* o por hibridización entre ellas (Lewis-Jones et al., 1982). Más recientemente, estudios moleculares han apuntado hacia eventos de domesticación múltiples e independientes, a partir de distintas poblaciones y subespecies de *Raphanus* silvestre (Yamagishi y Terachi, 2003; Yamane et al., 2005; Lü et al., 2008). El rábano cultivado presenta alta variabilidad morfológica y sus cultivares se clasifican en tres grupos botánicos: *oleiferus*, *caudatus* y *sativus*. Los tipos *sativus* han sido seleccionados por sus raíces engrosadas (var. *sativus* Saz., rábano chino del norte, hatsuka, rábano chico europeo; var. *hortensis* Becker, rábano chino del sur, rábano japonés; var. *niger* Pers., rábano negro español). En cambio, los cultivares de *caudatus* fueron mejorados para producir frutos largos y carnosos para su consumo en estado inmaduro (var. *caudatus* Hooker & Anderson, rábano cola de rata), y los *oleiferus* por su producción de semillas con altos niveles de aceite o para forraje (var. *chinensis*) (Rabbani et al., 1998; Kaneko et al., 2007; Lü et al., 2008).

El rábano fue uno de los primeros cultivos introducidos en América por los colonizadores españoles, hallándose menciones desde el siglo XVI. Ya en la época colonial se había vuelto sub-espontáneo e invadía suelos agrícolas (Patiño, 1963). En nuestro país aparece mencionado en el Almanaque de 1937 del Ministerio de Agricultura, donde es referido como maleza frecuente del trigo y lino (Ibarra, 1937). La forma asilvestrada o feral, conocida con el nombre vulgar de nabón, posee raíces más delgadas y ciclo corto, es una maleza usual en cultivos de cereales, oleaginosas y

hortícolas en la región pampeana argentina. El nabón crece principalmente en hábitats disturbados, como banquinas de rutas, caminos, vías de trenes, baldíos, y en suelos agrícolas (Parodi, 1964; Boelcke, 1967; Marzocca et al., 1976).

Raphanus raphanistrum por su parte es una maleza nociva a nivel mundial, reportada como tal para 45 cultivos en al menos 65 países (Blackshaw et al., 2002; Snow y Campbell, 2005; Warwick y Francis, 2005). Nativa de las costas del Mediterráneo (Europa, el Oriente Medio y el norte de África), se encuentra naturalizada en regiones templadas de los dos hemisferios. En especial, se encuentra ampliamente distribuida en Canadá, Estados Unidos, México y Australia (Warwick y Francis, 2005). La presencia de *R. raphanistrum* como maleza en la Argentina fue documentada por Parodi (1964), Boelcke (1967), Marzocca et al. (1976) quienes mencionaron que era una especie adventicia rara, circunscripta a la región noreste de la provincia de Buenos Aires. Martínez-Laborde (1999) localiza a la especie en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Entre Ríos, Misiones y Santa Fe. Se cree que *R. raphanistrum* ingresó a América traído como contaminante por los europeos. En Estados Unidos es mencionada como una maleza introducida entre 1820 y 1830 (Warwick y Francis, 2005).

En Argentina, el renovado interés por el cultivo de colza y la presión comercial para liberar variedades resistentes a herbicidas, ha promovido un fuerte interés en investigar el flujo génico desde el cultivo hacia las malezas crucíferas. Una evaluación de las posibles consecuencias del flujo génico entre colza GM y parientes silvestres realizada por CONABIA en 1996 llevó a la SAGPyA a denegar la solicitud de ensayo a campo con colza-canola resistente al herbicida glifosato. No obstante, se ha avanzado en la introducción de líneas no transgénicas con resistencia a herbicidas imidazolinonas (INASE, 2015).

El cultivo de variedades resistentes a herbicidas presenta el riesgo de transferencia de esa característica a especies silvestres emparentadas que constituyen importantes malezas. Ello podría aumentar la agresividad de estas malezas y dificultar su control (Devos et al., 2004, Warwick et al., 2008). El flujo génico y la introgresión exitosa de los caracteres de resistencia dependen de la coincidencia geográfica de los cultivos con sus parientes silvestres, de su compatibilidad sexual y tasa de hibridación. Las especies deben tener períodos de floración coincidentes, compartir polinizadores y encontrarse en un rango de dispersión de polen viable. Deben producirse híbridos

fértiles, y el gen debe transmitirse a través de sucesivas retrocruzas y estabilizarse en el genoma de las especies silvestres. Aunque la posibilidad de ocurrencia de estos eventos es real, la probabilidad es generalmente baja aunque varía con las especies y las circunstancias (Légère, 2005; Devos et al., 2009).

La probabilidad de transferencia de genes entre las distintas *Brassica* es relativamente alta debido a la compatibilidad cruzada de los miembros del triángulo de U (Hall et al., 2005). Numerosos estudios han demostrado que las cruzas interespecíficas pueden resultar en híbridos exitosos (FitzJohn et al., 2007, Devos et al., 2009). Las cruzas con mayor propensión al flujo génico estarían dadas por las que involucran a *B. rapa* y *B. napus* (Devos et al., 2009). De hecho, se ha confirmado la transferencia de resistencia a herbicidas a través de sucesivas generaciones (Snow et al., 1999), y la persistencia de dicha característica en poblaciones silvestres de *B. rapa*, más allá de seis años en ausencia de presión de selección con herbicida (Warwick et al., 2008).

La flora natural de Argentina contiene 68 géneros de la familia Brassicaceae, incluyendo *B. rapa* (nabo) y *R. sativus* (nabón), que son malezas invasoras en más de veinte provincias (Marzocca et al., 1976; Martínez-Laborde, 1999). En Argentina *R. sativus* ($x=9$) también se cultiva como hortaliza y forraje.

Otra posible vía de escape de los genes del cultivo son las plantas voluntarias (guachas) y las poblaciones ferales. Las poblaciones ferales suelen tener floración prolongada, en alta coincidencia con las especies silvestres. Estas características hacen de los voluntarios un componente importante del flujo génico, considerados corredores o puentes genéticos que facilitan el contacto entre especies (Pessel et al., 2001, Gruber & Claupein, 2007).

La aparición de resistencia a herbicidas en las malezas no sólo puede ocurrir a través de cruzamientos con cultivos seleccionados para resistir herbicidas. También puede originarse en un proceso evolutivo por el cual individuos resistentes debido a mutaciones espontáneas, inicialmente presentes a muy baja frecuencia en la población, incrementan su frecuencia debido a la selección. Un biotipo se considera resistente a un herbicida cuando posee la habilidad hereditaria de reproducirse tras la exposición a una dosis que para el biotipo silvestre es letal (Holt et al., 1993; Prather et al., 2000). La aparición de resistencia es un proceso evolutivo por el cual individuos resistentes debido a mutaciones espontáneas, inicialmente presentes a muy baja frecuencia en la población, incrementan su frecuencia debido a la selección. El

reiterado uso de herbicidas elimina a las plantas susceptibles, dejando que se reproduzcan sólo las resistentes (Prather et al., 2000).

La aparición de biotipos resistentes a los herbicidas ha sido comprobada en numerosas especies invasoras. En la Argentina se conocen a la fecha 16 casos de malezas resistentes, correspondientes a 10 especies distintas (Heap, 2015). En el sur de Brasil, Theisen (2008) confirmó la existencia de poblaciones de *R. sativus* con resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintetasa (AHAS). En Australia *R. raphanistrum* también ha desarrollado resistencia a los mismos herbicidas (Walsh et al., 2004). En esta especie existe el flujo génico entre cultivo y maleza, que podría haber aumentado la variabilidad de las poblaciones ferales (Snow et al., 2001; Ridley et al., 2008). Si bien los miembros de la familia Brassicaceae constituyen menos del 10% de los casos de malezas resistentes (Heap, 2015), su elevada capacidad de hibridación los tornaría altamente propensos a desarrollar resistencia a herbicidas.

Las hipótesis planteadas conjeturan que el flujo génico entre cultivos de colza (*B. napus*) con resistencia a herbicidas y poblaciones naturales de *B. rapa* podría implicar la transferencia de esa característica a la especie maleza. Es posible también que bajo las condiciones de campo se seleccionaran biotipos resistentes de malezas brasicáceas debido a aplicaciones reiteradas del mismo grupo de herbicidas en los distintos cultivos de la rotación. Algunas poblaciones de *R. sativus* presentarían resistencia cruzada a distintas familias de herbicidas inhibidores de la AHAS, mientras que ciertos biotipos de *B. rapa* y *B. napus* presentarían resistencia a glifosato. Esta tesis fue diseñada para generar información básica que permita inferir sobre los aspectos agroecológicos determinantes de la adquisición de resistencia a herbicidas por parte de malezas brasicáceas.

OBJETIVOS

General

El objetivo de esta tesis fue caracterizar taxonómica y agroecológicamente poblaciones naturales del género *Brassica* y *Raphanus* con resistencia a herbicidas.

Específicos

Objetivo 1: Actualizar la información sobre la naturalización y distribución de brasicáceas emparentadas con el cultivo de colza (*Brassica napus*) en la región pampeana argentina, y caracterizarlas morfológicamente.

Hipótesis 1: La región pampeana argentina presenta condiciones aptas para el desarrollo de poblaciones naturales de especies brasicáceas emparentadas con el cultivo de colza (*Brassica napus*). La caracterización de las poblaciones en un jardín común mostrará diferencias entre ellas, producto de los distintos orígenes y ambientes al cual se adaptaron. Algunas de estas características podrán servir para inferir el origen feral de estas poblaciones.

Objetivo 2: Detectar evidencias de flujo génico desde el cultivo de colza (*Brassica napus*) hacia poblaciones naturales de *B. rapa*, incluyendo la adquisición de resistencia a herbicidas desde variedades del cultivo con esa característica.

Hipótesis 2: El flujo génico entre cultivos de colza (*B. napus*) y poblaciones naturales de *B. rapa* es posible, y cuando las variedades implicadas presenten resistencia a herbicidas este carácter se transferirá a la maleza.

Objetivo 3: Caracterizar poblaciones de nabón (*Raphanus sp.*) resistentes a herbicidas AHAS, evaluar las condiciones agroecológicas de su emergencia y diseñar medidas de control alternativo.

Hipótesis 3: Los biotipos de *Raphanus sp.* presentarán resistencia cruzada a distintas familias de herbicidas inhibidores de la AHAS, que comparten el mismo sitio de acción, seleccionadas bajo las condiciones de campo debido a aplicaciones reiteradas del mismo grupo de herbicidas en los distintos cultivos de la rotación.

Objetivo 4: Caracterizar poblaciones ferales de *Brassica sp.* resistentes a glifosato, estableciendo el perfil de resistencia y determinando el origen de la misma, así como evaluar distintas medidas de control alternativo.

Hipótesis 4: Las poblaciones ferales de *Brassica* sp. presentarán resistencia a glifosato de origen transgénico, que podrá ser detectada mediante diversas técnicas.

Capítulo 1: DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE POBLACIONES NATURALES BRASICÁCEAS DE ARGENTINA

Las brasicáceas son una importante familia vegetal que reviste un interés especial debido a que incluye varias especies cultivadas, ornamentales y organismos modelos. La familia se encuentra distribuida ampliamente en los más diversos climas alrededor del mundo, abarcando todos los rincones del mundo, excepto la Antártida. La mayor distribución y abundancia de taxas ocurren en el hemisferio norte, sin embargo numerosos géneros son halladas en el hemisferio sur, varios de los cuales son endémicos en esas regiones (Lysak y Koch, 2011; Al-Shehbaz et al. 2006).

Entre las especies de brasicáceas de mayor relevancia mundial, *Brassica napus* L. (colza, canola) se destaca por su elevada participación en la producción mundial de aceites comestibles. Otra brasicácea utilizada a nivel mundial como oleaginosa y hortícola es *B. rapa* L., que presenta grupos definidos o subespecies, diferenciados por sus características morfológicas. El tipo oleífero es utilizado como colza-canola principalmente en el oeste de Canadá, donde se la conoce como *turnip rape* o “colza tipo polaco”. Otros grupos están formados por subespecies cultivadas por sus hojas (col china, *Pak-choi*, *Pet-sai*) o sus raíces carnosas (nabo) (Gómez-Campo y Prakash, 1999; Prakash et al., 2012).

Tanto *B. rapa* como *B. napus* son nativas de Eurasia. Según evidencias halladas en antiguas escrituras Sánscritas de la India, *B. rapa* ya estaba domesticada entre 3500 y 4000 años antes del presente (Appelqvist, 1972; Gupta y Pratap, 2007; Prakash et al., 2012). Por su parte, se considera que *B. napus* deriva de múltiples hibridaciones interespecíficas espontáneas entre *B. rapa* y la col (*B. oleracea* L.), ocurridas durante la Edad Media, cuando se las cultivaba en forma conjunta. Los primeros registros del cultivo de *B. napus* en Europa datan del siglo XVI, cuando se comenzó a utilizar como fuente de aceite (conocido como *raepoli*) para iluminación y fabricación de jabones (Gómez-Campo y Prakash, 1999; Allender y King, 2010; Prakash et al., 2012).

La forma silvestre de *B. rapa*, de la cual se originaron las variedades de nabo alimenticio y colza polaca, es una maleza altamente invasora de una gran cantidad de cultivos. En Argentina es una maleza común en cultivos de trigo y otros cereales de invierno. Se difunde como contaminante botánico de las semillas de los cereales y también persiste en los rastrojos. En los veranos lluviosos puede rebrotar luego de la cosecha de los cereales invernales. También puede afectar cultivos de girasol, maíz,

sorgo, montes frutales, huertas y alfalfares. Con frecuencia sus semillas se encuentran entre los cuerpos extraños o impurezas de la alfalfa (Parodi, 1964; Marzocca et al., 1976).

En nuestro país la importancia de *B. rapa* como maleza de cultivos es reconocida desde la década del 30 (Ibarra 1937). Según Tenenbaum (1937), la abundancia de *B. rapa* como maleza de trigo y de lino era tal, que la separación de los granos de nabo pagaba el trabajo de limpieza y el costo de la producción del cereal cosechado. Por la misma década se promovió el cultivo de la maleza por separado, con un resultado económico superior al de la siembra de cereales. El grano de nabo se destinaba a la elaboración de aceite no comestible, y cotizaba en la Bolsa de Cereales hasta la década del 60 (Pascale, 1976; Iriarte y Valetti, 2008).

En la segunda mitad del siglo XX, Canadá inició un destacado proceso de mejoramiento para lograr que el aceite de colza fuera comestible. Este uso estaba limitado por el ácido erúxico del aceite y los glucosinolatos en la harina de extracción. En 1966, Canadá desarrolló la primera variedad con bajo contenido de ácido erúxico y en 1967 se crearon los primeros cultivares con reducido contenido en glucosinolatos. Ambas características combinadas dieron origen a las variedades identificadas con el nombre comercial de "canola" (Canadian Oil Low Acid) (Appelqvist, 1972; Busch et al., 1994; Prakash et al., 2012).

La ecofisiología de las poblaciones naturales de *B. rapa* y *B. napus* no ha sido estudiada en profundidad, aunque los datos fisiológicos de las variedades domesticadas es abundante. En especial, lo referido al contenido de aceite y la proporción de los distintos ácidos grasos que lo componen. En cultivares primaverales de ambas especies se detallan contenidos totales de materia grasa de entre 40 y 45% (Gulden et al., 2008). La composición de los ácidos grasos determina el destino y uso de los aceites de *B. rapa* y *B. napus*. Para que un cultivar sea considerado como de calidad canola debe contener menos de 2% de ácido erúxico en el aceite y el contenido de glucosinolatos en la harina de extracción debe ser menor a los 30 $\mu\text{mol gr}^{-1}$ (Thomas, 2003; Gulden et al., 2008).

La contribución del recurso fitogenético de Argentina para la modernización del cultivo de colza-canola fue destacada. Durante la primera mitad del siglo pasado, el nabo (*B. rapa*), un agresivo invasor de los cultivos invernales, se convirtió en un recurso económico de exportación. El valor de esta maleza, que cotizaba en la Bolsa de

Cereales de Buenos Aires, se debía a que su aceite se empleaba como lubricante de motores a vapor, principal fuerza motriz utilizada en esas épocas (Pascale, 1976; Iriarte y Valetti, 2008).

Brassica rapa (nabo, nabo silvestre, colza polaca) es una hierba anual, de raíz pivotante delgada, aunque en algunas variedades cultivadas y en poblaciones ferales, la raíz puede estar engrosada. Posee tallos erguidos ramificados, de 0,3 a 1,5 m de altura, redondos, pruinosos, glabros o con tricomas. Las hojas basales son cortamente pecioladas, lirado-pinatífidas, dentadas, no persistentes. Las hojas superiores son lanceoladas, enteras y abrazadoras en la base. La pubescencia en las hojas es variable, las inferiores poseen pelos hispídos en la lámina, con la base bulbosa, dando la apariencia de puntos blancos sobre las hojas vistas desde arriba. Las de la parte superior pueden ser totalmente glabras. Racimos en los extremos de las ramas, con las flores superando los pimpollos, alargados durante la fructificación. Los pétalos son de color amarillo intenso, de unos 7-12 mm de longitud. Las silicuas se disponen a madurez de forma oblicuamente ascendente, miden de 4 a 7 cm de longitud, con un rostro delgado de 8-22 mm de longitud ($1/3$ - $1/2$ del largo de las valvas). Las semillas son globosas, castaño-rojizas a negras, de 1,2-1,5 mm (Parodi, 1964; Boelcke, 1967; Marzocca et al., 1976; Marzocca, 1995; Mulligan, 1995; Gulden et al., 2008).

Brassica napus (colza, canola) es una planta anual, ocasionalmente bienal, de profunda raíz pivotante y abundantes raíces secundarias. Posee tallos erectos y ramificados, que en condiciones favorables pueden alcanzar 1,6 m de altura. Hojas de color verde oscuro a glaucas, las basales lobuladas pecioladas, las del estrato medio poseen un pecíolo breve, y las superiores no poseen pecíolo y son abrazadoras. El nivel de abrazamiento de las hojas superiores es parcial en *B. napus*, lo cual la diferencia de *B. rapa*, que presenta abrazamiento total. La pubescencia es escasa en toda la planta. Flores amarillas, más claras y grandes que *B. rapa*, con pétalos de 10 a 12 mm de largo. Las flores abiertas no suelen superar los pimpollos. Las silicuas son de 6 a 8 cm de largo por 4 a 5 mm de ancho, conteniendo entre 10 y 30 semillas. Rostro delgado de 9-16 mm de longitud, de $1/5$ - $1/6$ del largo de las valvas. Semillas esféricas, castaño-rojizas a negruzcas de 1,8 a 2,7 mm, con un peso de 1000 que no supera los 4 gramos (Mulligan, 1995, Gulden et al., 2008).

Otra importante especie brasicácea es *Raphanus sativus* L. (rábano o nabón), una planta euroasiática cultivada en todo el mundo por el valor alimenticio de sus raíces

engrosadas. La forma asilvestrada o feral, de raíces más delgadas y ciclo corto, es una maleza común de cultivos de cereales, oleaginosas y hortícolas en la región pampeana argentina. El nabón crece principalmente en hábitats disturbados, como banquinas de rutas, caminos, vías de trenes, baldíos, y en suelos agrícolas (Parodi, 1964; Boelcke, 1967; Marzocca et al., 1976).

El rábano fue uno de los primeros cultivos introducidos en América por los colonizadores españoles, hallándose menciones desde el siglo XVI. Ya en la época colonial se había vuelto sub-espontáneo e invadía suelos agrícolas (Patiño, 1963). En nuestro país aparece mencionado en el Almanaque de 1937 del Ministerio de Agricultura, donde es referido como maleza frecuente del trigo y lino (Ibarra, 1937).

Raphanus sativus es una planta anual o bienal, de raíz pivotante gruesa, napiforme, blanquecina o coloreada. Posee tallos erectos, de 40-130 cm de altura, simples o ramificados, generalmente con pubescencia hispida en la parte inferior, y glabros y glaucos en la superior, desde verdes con tintes rojizos, hasta casi totalmente rojizo-violáceos. Las hojas son pecioladas, las inferiores y medias lirado-pinatipartidas a pinatisectas, de margen dentado, con 4-5 pares de folíolos laterales paulatinamente menores, con ancha base soldada al raquis. Las hojas medias y superiores son gradualmente más simples, a menudo glabras. Racimos terminales y axilares laxos de 10-50 flores. Flores con pétalos blancos, rosado-violáceos o liláceos, con nervaduras oscuras, de unos 20-23 x 7-8 mm. El fruto es una silicua gruesa, carnosa, oblongo-cónica, indehiscente, de hasta unos 8 cm de longitud, con la parte valvar muy breve, vana, semejando un pedicelo, y la parte estilar muy desarrollada, con las semillas incluidas en un tejido esponjoso y terminada en un rostro alargado cónico. Semillas grandes, ovadas, hasta 4 mm de longitud, con tegumento castaño-rojizo, reticulado (Boelcke, 1967; Marzocca et al., 1976; Hernández-Bermejo, 1993; Marzocca, 1994).

Otras especies brasicáceas relacionadas con el cultivo de colza, presentes en la flora natural argentina y con amplia difusión en la región pampeana son *B. nigra* (L.) Koch y *Sinapis arvensis* L. Ambas especies son citadas en nuestro país como malezas, normalmente encontradas a lo largo de bordes de caminos, vías férreas, áreas perturbadas, terrenos baldíos, campos y huertas (Marzocca et al., 1976).

Brassica nigra (mostaza negra) es una hierba anual, erguida, escasa a densamente hirsuta, al menos cerca de la base. Los tallos pueden tomar una altura de entre 30 y 200 cm de alto, usualmente ramificados. Las hojas basales son lirado-pinnatífidas a

pinnatipartidas con pecíolos de hasta de 10 cm de largo. Las hojas superiores son similares a las basales pero reducidas hacia el ápice y menos divididas, sésiles o casi sésiles pero no auriculadas, ovado-elípticas a lanceoladas. Los pedicelos fructíferos son erectos, adpresos al tallo, rectos. Las flores presentan pétalos amarillos, de 7-11 x 3-4,5 mm. Los frutos son erecto-ascendentes, adpresos al tallo, cuadrangulares, de 1-2,5 x 2-3 mm; valvas notablemente aquilladas por la nervadura central, con 4-10 semillas. El rostro de las silicuas es linear, sin semillas, de 2-5 mm de largo, angosto. Las semillas son castañas a negras, de 1,2-1,5 mm de diámetro, comúnmente reticuladas, minutamente alveoladas (Parodi, 1964; Boelcke, 1967; Marzocca et al., 1976).

Sinapis arvensis (mostaza silvestre) también es una hierba anual de tallos simples o ramificados de 20-100 cm de alto, hirsutos o hispídos. Ramas oblicuamente ascendentes, generalmente con una mancha rojiza en la axila. Las hojas son escasamente pubescentes, lirado pinnatífidas y con 1-4 lóbulos laterales a cada lado, a veces no divididas. Los pecíolos de las hojas inferiores son de 1-4 cm de largo, los de las hojas superiores son cortos, rara vez subsésiles. Pedicelos fructíferos ascendentes o suberectos. Los pétalos son de color amarillo brillantes, obovados, de 0,9-1,2 cm x 4-6 mm. Las silicuas pueden ser glabras o pubescentes, lineares, de 2 a 4,5 cm x 2,5 a 3,5 mm, con 8-16 semillas. El rostro o segmento terminal de las silicuas es cónico, de 1 a 1,6 cm de largo, recto o curvado hacia arriba, 1-seminado. Semillas castaño-rojizas a negras, globosas, de 1,5-2 mm de diámetro (Parodi, 1964; Boelcke, 1967; Marzocca et al., 1976).

Si bien históricamente la colza en Argentina presenta fuertes fluctuaciones en su importancia relativa, la demanda de aceites para biodiesel ha despertado un nuevo interés por su cultivo. El mercado local cuenta con más de 30 cultivares comerciales (INASE, 2015). Sin embargo no hay disponibles variedades transgénicas debido a las restricciones que implica la existencia de parientes silvestres naturalizados (SAGPyA, 1997). El empleo de colza transgénica o mutantes resistentes a herbicidas, podría contribuir a mejorar la competitividad del cultivo. Frente a este posible escenario resulta imprescindible conocer el estado de la difusión de los parientes silvestres sexualmente compatibles con la colza, si la floración es coincidente y si existen polinizadores comunes.

Los objetivos fueron actualizar la información sobre la naturalización y distribución de

brasicáceas emparentadas con el cultivo de colza (*Brassica napus*) en la región pampeana argentina, y caracterizarlas morfológicamente. Como hipótesis de trabajo se planteó que la región pampeana argentina presenta condiciones aptas para el desarrollo de poblaciones naturales de brasicáceas emparentadas con el cultivo de colza (*Brassica napus*). La caracterización de las poblaciones en un jardín común mostrará diferencias entre ellas, producto de los distintos orígenes y ambientes al cual se adaptaron. Algunas de estas características podrán servir para inferir el origen feral de estas poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Distribución geográfica

Entre 2008 y 2014 se realizaron quince misiones de exploración para ubicar las especies de interés, principalmente en la región pampeana argentina, incluyendo las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Córdoba. También se visitaron esporádicamente las provincias de Entre Ríos, Tucumán, Salta, Mendoza y Río Negro. Las misiones se realizaron a través de rutas nacionales, provinciales y caminos vecinales.

La presencia de malezas brasicáceas fue documentada considerando las condiciones de aparición y la morfología de las plantas, priorizando la presencia de las especies *B. rapa*, *B. napus* y *R. sativus*. En algunos casos, en especial en poblaciones combinadas, también se reveló la presencia de las especies *B. nigra*, *Sinapis arvensis*, *Hirschfeldia incana*, *Rapistrum rugosum* y *Capsella bursa-pastoris*. Cada caso fue georeferenciado con un posicionador satelital (GPS Garmin eTrex vista Hcx), mapas provinciales y el software Google Maps (2014).

Se realizaron observaciones de los componentes del hábitat de cada caso, con énfasis en la flora acompañante. Para determinar el nivel poblacional de las especies se utilizó una escala semi-cuantitativa desarrollada por Domin-Krajina (Mueller-Dombois y Ellenberg, 1974). Los registros históricos del manejo agrícola de aquellos lotes en los cuales se hallaron malezas brasicáceas fueron provistos por los responsables técnicos de los establecimientos.

La composición de la flora natural de Argentina fue provista por Martínez-Laborde (1999). La importancia histórica de cada especie se estimó de acuerdo a la inclusión en fuentes especializadas en control de malezas (Parodi, 1964; Boelcke, 1967; Marzocca et al., 1976; Marzocca, 1994; CASAFE, 2007).

Se observaron ejemplares depositados en los herbarios de la Universidad de Buenos Aires (BAA) y del Instituto Darwinion (SI), correspondientes a los géneros *Brassica* y *Raphanus*. Se recolectaron datos de cada registro, tomando fecha, colector, hábitat y ubicación geográfica.

Caracterización morfológica

En el campo experimental se caracterizaron plantas de un grupo de accesiones de

Brassica rapa, *B. napus*, *B. nigra*, *Raphanus sativus* y *Sinapis arvensis* a partir de semilla recolectada bajo condiciones naturales. La caracterización fue realizada en un jardín común en el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS), (38°41'46"S, 62°14'55"O), durante tres ciclos, incluyendo los años 2011, 2013 y 2014.

El estudio constó de ocho poblaciones de *Brassica rapa* (nabo), cuatro cultivares o poblaciones de *B. napus* (colza), dos de *B. nigra* (mostaza negra), tres de *S. arvensis* (mostaza silvestre) y siete de *R. sativus* (nabón) (Tabla 1.1). En estos ensayos se incluyeron como controles accesiones de *B. carinata* (mostaza Etíope), *B. rapa* ssp. *rapa* (nabo cultivado), *B. napus* var. *napobrassica* (nabicol, colinabo o rutabaga), *B. oleracea* var. *viridis* (berza), *B. oleracea* convar. *acephala* var. *gongylodes* (colirrábano, kholrabi), *Eruca vesicaria* ssp. *sativa* (rúcula), *Eruca vesicaria* ssp. *vesicaria* (roqueta o rúcula silvestre), pero no formaron parte de los análisis. Las poblaciones de *B. rapa* recolectadas en hábitats con contacto con el cultivo de colza (*B. napus*) y presentaban evidencias de flujo génico e hibridación también fueron excluidas en el análisis.

Las plantas se criaron en bandejas multicelda con sustrato comercial Growmix (Multipro) bajo condiciones de invernáculo con luz natural, riego diario y a temperatura de 20-25°C. En el estado de B4 de la escala CETIOM (Arnoud, 1989), en el mes de junio, las plantas fueron trasplantadas al campo experimental, bajo un marco de plantación de 0,3 x 0,5 m.

Las plantas fueron caracterizadas durante todo su ciclo utilizando 48 descriptores, 22 cuantitativos y 26 cualitativos, aceptados internacionalmente (IBPGR, 1990) (Tabla 1.2). Se siguió la fenología utilizando la escala de estados de desarrollo desarrollada para la especie *B. napus* por el CETIOM, considerando las fechas de inducción (C2), inicio de floración (F1) y madurez (G5).

A madurez, las plantas fueron cosechadas y almacenadas a temperatura ambiente en el laboratorio. Bajo estas condiciones se determinaron los caracteres de silicua y semilla, incluyendo largo y ancho de silicua, largo de rostro, número de semillas por silicua y biomasa de las semillas. Este último carácter se obtuvo sobre un *bulk* de cada población, pesando la biomasa de cinco repeticiones de 100 semillas.

Se utilizó un diseño en bloques incompletos, debido a que no todos los tratamientos estuvieron presentes en todos los bloques. Se consideraron los años de evaluación

como bloques, las especies o poblaciones de brassicáceas como tratamientos y los valores de planta individual como repeticiones. Los datos cuantitativos fueron analizados mediante ANOVA y las medias fueron comparadas con el test de Tukey ($p < 0,05$). Los datos cualitativos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se realizó análisis discriminante (AD) basándose en datos cuantitativos y cualitativos, análisis de componentes principales (ACP) para los datos cuantitativos, y dendograma de agrupamiento basado en la distancia de Gower. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2015).

Tabla 1.1: Poblaciones naturales de brasicáceas argentinas utilizadas para la caracterización morfológica. Registro original de las poblaciones y nombre utilizado en otros capítulos de esta tesis (entre paréntesis).

Especie	Registro	Localidad cercana	Año	Habitat	Otros datos	Colectores
<i>Brassica rapa</i>	BR0308 (JUA)	Juárez (BA)	2008	Camino entre Juárez y Tandil. Bajo inundable.	Población pura. Plantas uniformes, gran tamaño.	Presotto, Cantamutto.
<i>Brassica rapa</i>	BR1012	Bariloche (RN)	2012	Banquina Av. Bustillo Km 3, margen del lago Nahuel Huapi.		Pandolfo.
<i>Brassica rapa</i>	BR1612 (LDU)	La Dulce (BA)	2012	Dentro de lote de soja. Establecimiento El Diez.		Presotto
<i>Brassica rapa</i>	BR0213	Energía (BA)	2013	Banquina de RP 228.		Cantamutto.
<i>Brassica rapa</i>	BR0313	Quequén (BA)	2013	Borde de alambrado lindero a cebada.	Población mixta con <i>R. sativus</i> .	Cantamutto.
<i>Brassica rapa</i>	BR1113	S. Ventana (BA)	2013	Banquina de ruta.		Cantamutto.
<i>Brassica rapa</i>	BR1213	Balcarce (BA)	2013	Banquina de camino vecinal.	Población muy extensa, junto con <i>B. nigra</i> .	Pandolfo, Cantamutto.
<i>Brassica rapa</i>	BR1313 (BAL-R)	Balcarce (BA)	2013	Dentro de lote de soja. Establecimiento San Juan.		Pandolfo, Cantamutto.
<i>Brassica napus</i>	BN8450 (BNR)	-	2010	Variedad Nexera 8450.	Dow Agrosience S.A.	-
<i>Brassica napus</i>	BN1700 (BNC)	-	2010	Variedad Nexera 1700.	Dow Agrosience S.A.	-
<i>Brassica napus</i>	BN0513	Villegas (BA)	2013	Banquina de ruta, en un bajo.	Voluntarios de un cultivo.	Cantamutto.
<i>Brassica napus</i>	BN1512 (GER)	Chaves (BA)	2012	Dentro de lote agrícola. Establecimiento La Germana.		Pandolfo, Presotto, Ureta, Poverene, Cantamutto.

Continuación Tabla 1.1

Espece	Registro	Localidad cercana	Año	Habitat	Otros datos	Colectores
<i>Raphanus sativus</i>	RS0108 (PRI)	Pringles (BA)	2008	Borde de lote agrícola.		Presotto, Ureta, Cantamutto.
<i>Raphanus sativus</i>	RS0208 (SDV)	S. Ventana (BA)	2008	Borde de lote agrícola.		Presotto, Ureta, Cantamutto.
<i>Raphanus sativus</i>	RS0408 (BAL-1B)	Balcarce (BA)	2008	Borde de lote agrícola. Establecimiento San Juan.		Presotto, Cantamutto.
<i>Raphanus sativus</i>	RS0508 (BAL-1A)	Balcarce (BA)	2008	Dentro de lote agrícola. Establecimiento San Juan.		Presotto, Cantamutto.
<i>Raphanus sativus</i>	RS0211 (PIE-A)	Pieres (BA)	2011	Dentro de lote agrícola.		Pandolfo, Presotto, Cantamutto.
<i>Raphanus sativus</i>	RS2113	H. Ascasubi (BA)	2013	Campo Experimental de la EEA INTA Hilario Ascasubi.	Población con flores amarillas y violetas.	Pandolfo, Renzi.
<i>Brassica nigra</i>	BNI1408	Suárez (BA)	2008	Banquina de ruta.	Plantas de gran altura.	Presotto, Cantamutto.
<i>Brassica nigra</i>	BNI0812	Necochea (BA)	2012	Banquina RP 88.	Población mixta de <i>B. rapa</i> , <i>S. arvensis</i> , <i>H. incana</i> .	Pandolfo, Presotto, Cantamutto.
<i>Sinapis arvensis</i>	SA0608	Lobería (BA)	2008	Banquina sobre RN 227 km 35, camino Pieres-Lobería.		Presotto, Cantamutto.
<i>Sinapis arvensis</i>	SA0411	Pieres (BA)	2011	Banquina de ruta, sobre el borde de un lote de colza.	Una planta aislada.	Pandolfo, Presotto, Cantamutto.
<i>Sinapis arvensis</i>	SA0812	Necochea (BA)	2012	Banquina RP 88.	Población mixta con <i>B. rapa</i> , <i>B. nigra</i> , <i>H. incana</i> .	Pandolfo, Presotto, Cantamutto.

Tabla 1.2: Descriptores utilizados para la caracterización de las poblaciones brasicáceas evaluadas en jardín común. Adaptados de IBPGR, 1990.

Sigla	Descriptor	Tipo	Detalle
Caracteres de plántula			
ACO	Ancho cotiledón	Métrico	Ancho de cotiledón (cm).
CHP	Color hipocótilo	Categórico	Color del hipocótilo: 1 Blanco, 2 Verde pálido, 3 Verde, 4 Rosa, 5 Rojo, 6 Violeta.
ANT	Antocianinas	Categórico	Antocianinas en plántula: 0 Ausencia, 1 Hipocótilo, 2 Hipocótilo y pecíolo, 3 Hipocótilo, pecíolo y hoja.
Caracteres de planta			
ALP	Altura planta	Métrico	Altura de la planta (cm) a madurez.
NRP	Número de ramificaciones	Métrico	Número de ramificaciones del tallo principal.
CTA	Color de tallo	Categórico	Color principal del tallo: 1 Verde claro, 2 Verde, 3 Verde oscuro, 4 Rojo o verde púrpura, 5 Rojo o púrpura.
PTA	Pubescencia de tallo	Categórico	Pubescencia del tallo: 0 Glabro, 1 Muy escasa, 3 Escasa, 5 Intermedia, 7 Abundante.
Caracteres de hoja: medidos en la hoja mayor del sector inferior y superior del tallo.			
LHI	Largo hoja inferior	Métrico	Largo (cm) de hoja inferior.
AHI	Ancho hoja inferior	Métrico	Ancho (cm) de hoja inferior.
THI	Tamaño hoja inferior	Métrico	Tamaño (cm ²) de hoja inferior: largo x ancho.
LPI	Largo pecíolo hoja inferior	Métrico	Largo (cm) del pecíolo de la hoja inferior.
FHI	Forma hoja inferior	Métrico	Forma de hoja inferior: 1 Orbicular, 2 Elíptica, 3 Obovada, 4 Espatulada, 5 Ovada, 6 Lanceolada, 7 Oblonga.
MHI	Margen hoja inferior	Categórico	Margen de hoja inferior: 0 Entero, 1 Crenado, 2 Dentado, 3 Serrado, 4 Ondulado, 5 Doblemente dentado.
IHI	Incisión hoja inferior	Categórico	Incisión o división de la hoja inferior: 1 Entera, 2 Sinuada, 3 Lirada, 4 Lacerada.
RHI	Partición hoja inferior	Categórico	Nivel de partición de las hojas inferiores: 1 Pinnatilobada, 2. Pinnatifida, 3 Pinnatipartida, 4 Pinnatisecta.
CHI	Color hoja inferior	Categórico	Color de hoja inferior: 1 Verde amarillo, 2 Verde claro, 3 Verde, 4 Verde oscuro, 5 Verde púrpura, 6 Púrpura, 7 Glauco.
PHI	Pubescencia hoja inferior	Categórico	Pubescencia de la hoja inferior: Idem PTA.
TRI	Tricomas	Categórico	Presencia o ausencia de tricomas en las hojas inferiores: 0 Ausencia, 1 Presencia
FHS	Forma hoja superior	Categórico	Idem FHI.

Continuación Tabla 1.2

Sigla	Descriptor	Tipo	Detalle
MHS	Márgenes hoja superior	Catagórico	Idem MHI.
IHS	Incisiones hoja superior	Catagórico	Idem IHI.
RHS	Partición hoja superior	Catagórico	Idem RHI.
PHS	Pubescencia hoja superior	Catagórico	Idem PHI.
LPS	Largo peciolo hoja superior	Métrico	Idem LPI.
APS	Abrazamiento peciolo hoja superior	Catagórico	Abrazamiento del peciolo de la hoja superior: 0 Peciolo presente, 1 Sésil, no abrazador, 2 Apenas abrazador (< ½), 3 Intermedio (> ½), 4 Totalmente abrazador.
Caracteres de inflorescencia: medidos sobre la inflorescencia principal.			
CPE	Color de pétalo	Catagórico	Color principal del pétalo: 1 Blanco, 2 Amarillo pálido, 3 Amarillo, 4 Amarillo anaranjado, 5 Rosa, 6 Rojo, 7 Violeta.
LPE	Largo de pétalo	Métrico	Largo (cm) del pétalo.
DPI	Disposición pimpollos	Catagórico	Disposición de los pimpollos con respecto a las flores abiertas: 1 Bajo flores abiertas, 2 Mismo nivel que flores abiertas, 3 Sobre flores abiertas.
CSI	Color silicuas inmaduras	Catagórico	Color de las silicuas inmaduras: 1 Verde amarillo, 2 Verde, 3 Verde rojizo, 4 Verde púrpura, 5 Púrpura.
PSI	Pubescencia silicuas	Catagórico	Pubescencia de las silicuas inmaduras: Idem PTA.
DSI	Disposición silicuas	Catagórico	Actitud de las silicuas a la madurez: 1 Muy adpresas al tallo, 2 Adpresas al tallo, 3 Erectas (45°), 4 Horizontales, 5 Colgantes.
SIP	Silicuas por inflorescencia	Métrico	Número de silicuas maduras por inflorescencia principal.
Caracteres de silicua			
LSI	Largo silicua	Métrico	Largo (cm) de la silicua, desde la base hasta el final del rostro.
ASI	Ancho silicua	Métrico	Ancho (cm) de la silicua.
LRO	Largo rostro	Métrico	Largo (cm) del rostro de la silicua.
LVA	Largo valva	Métrico	Largo (cm) de la valva de la silicua: largo de silicua - largo de rostro.
RRV	Relación rostro valva	Métrico	Relación entre el largo del rostro y el de las valvas.
COS	Constricciones silicua	Catagórico	Constricciones de las silicuas: 3 Sin constricciones, 5 Superficie ondulada entre las semillas, 7 Constricciones profundas.

Continuación Tabla 1.2

Sigla	Descriptor	Tipo	Detalle
NSS	Número de semillas por silicua	Métrico	Numero de semillas por silicua.
PCI	Peso de cien semillas	Métrico	Peso (g) de 100 semillas tomadas del conjunto de la población.
BSE	Biomasa de semilla	Métrico	Peso (mg) de cada semilla.
FSE	Forma de semilla	Catagórico	Forma de la semilla: 1 Linear, 2 Oblonga, 3 Elíptica, 4 Ovada, 5 Obovada, 6 Oval, 7 Esférica.
CSE	Color de semilla	Catagórico	Color principal de la semilla madura: 1 Amarilla, 2 Amarillo castaña, 3 Amarillo clara, 4 Marrón, 5 Marrón oscura, 6 Marrón colorada, 7 Roja, 8 Negro azulada, 9 Negro grisácea.
Caracteres de raíz			
FRA	Forma de raíz	Catagórico	Forma de raíz en la sección longitudinal: 1 No engrosada, 2 Triangular, 3 Cilíndrica, 4 Elíptica, 5 Esférica, 6 Elíptica transversa, 7 Triangular inversa, 8 Bulbosa apical, 9 Cornada, 10 Ramificada.
CRA	Color de raíz	Catagórico	Color principal del exterior de la raíz: 1 Blanco, 2 Amarillo, 3 Verde, 4 Rosa, 5 Rojo, 6 Violeta, 7 Bronce, 8 Marrón, 9 Negro.
Caracteres fenológicos			
DAE	Días a emergencia	Métrico	Días a emergencia.
DFL	Días a floración	Métrico	Días a floración, 50% de la población en F1.
DMA	Días a madurez	Métrico	Días a madurez, 50% de la población en G5.

Caracterización química de las semillas

En una muestra de granos de poblaciones de *B. rapa*, *B. napus* y *S. arvensis* obtenida en el hábitat natural se determinó el perfil ácido. Como control se emplearon granos de variedades de colza (*B. napus*). La materia grasa se determinó mediante resonancia magnética nuclear y el perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa. Los análisis fueron realizados en la Cámara Arbitral de Cereales de Bahía Blanca.

RESULTADOS

En la flora natural de la República Argentina existen registradas 68 géneros de la familia Brassicaceae, 33 nativos y 35 adventicios. Entre las especies nativas, sólo 2 de 167 han sido clasificadas como malezas, mientras que entre las adventicias, 29 de 65 especies son consideradas malezas. Entre ellas *Lepidium*, *Sisymbrium*, *Brassica*, *Diplotaxis*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Rapistrum*, *Hirschfeldia* y *Capsella* son considerados los géneros más importantes, con especies ampliamente distribuidas en el territorio nacional. Se incluyen a tres especies del género *Brassica*: *B. juncea* (L.) Czernohorsky, *B. nigra* y *B. rapa*, todas sexualmente compatibles con *B. napus* (Devos et al., 2009). La primera de ellas es citada como maleza en solo dos de las cuatro fuentes consultadas, mientras que *B. nigra* y *B. rapa* son reconocidas como malezas en todos los casos (Tabla 1.3). *B. rapa* y *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik son las especies brasicáceas de mayor distribución en el territorio de la Argentina, registrándose poblaciones en 23 de 24 distritos argentinos. Otras especies de gran dispersión en el país son *Raphanus sativus*, *Hirschfeldia incana* (L.) Lagr.-Fossat, *Rapistrum rugosum* (L.) All., *Diplotaxis tenuifolia* L., *Eruca vesicaria* (L.) Cav., *Sisymbrium irio* L., y varias especies de *Lepidium*.

En las misiones de estudio se registraron cerca de 50 poblaciones naturales de *B. rapa*, además de otras brasicáceas como *B. napus*, *B. nigra*, *S. arvensis*, *H. incana*, *R. rugosum* y *R. sativus* (Figura 1.1, Tabla 1.4). Los registros fueron tomados en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Tucumán, Córdoba, La Pampa y Río Negro (Tabla 1.5). Se hallaron ejemplares aislados y poblaciones naturales de *B. rapa* floreciendo en las cuatro estaciones del año. En la provincia de Buenos Aires se registraron poblaciones de *B. nigra* y *S. arvensis* en floración primaveral. Las poblaciones ferales de *B. napus* mostraron una distribución restringida en la región explorada. Se observaron voluntarios de colza en bordes de caminos con intensa circulación de transportes de granos en tres provincias (Córdoba, Buenos Aires y Río Negro), en forma aislada y sin generar poblaciones persistentes.

El carácter cosmopolita de *B. rapa* también se constató en los registros de muestras de los herbarios de la Universidad de Buenos Aires y del Instituto de Botánica Darwinion (Tabla 1.6). La mayor cantidad de entradas correspondió a la especie *B. rapa*, y el ejemplar más antiguo fue de principios del siglo XX. Entre las entradas de *B. napus*, los registros más antiguos fueron *a posteriori* reclasificados como *B. rapa*, o no

contaban con material suficiente para realizar una determinación taxonómica adecuada. Las restantes muestras correspondieron a individuos cultivados o voluntarios.

La misma situación se observó entre las entradas de *Raphanus raphanistrum* L. Se registraron doce entradas para esta especie, siete de la provincia de Buenos Aires, tres de Capital Federal, una de Tucumán y una de Chaco. La mayor parte de los registros de esta especie en el territorio argentino correspondían a clasificaciones incorrectas con la especie *R. sativus*, o el material colectado no era suficiente para una clasificación adecuada. Dos muestras habían sido reclasificadas como *R. sativus* (una de Buenos Aires y otra de Tucumán). Sólo tres muestras, todas de la zona de Campana, provincia de Buenos Aires, correspondían efectivamente a esta especie. La presencia de *R. raphanistrum* como maleza en la Argentina fue documentada por Parodi (1964), Boelcke (1967), Marzocca et al. (1976) quienes mencionaron que era una especie adventicia rara, circunscripta a la región noreste de la provincia de Buenos Aires. Martínez-Laborde (1999) localiza a la especie en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Entre Ríos, Misiones y Santa Fe. En los viajes de exploración realizados desde 2008 no se ha logrado hallar individuos de la especie, incluso en lugares mencionados por la bibliografía y en los registros de herbario, como Campana.

Brassica juncea estuvo pobremente representada entre las entradas depositadas en los herbarios, con sólo seis registros. En los viajes de colecta realizados no se encontró ninguna población de esta especie.

Tabla 1.3: Especies brasicáceas presentes en la Argentina según Martínez-Laborde (1999), consideradas malezas según distintas fuentes. Detalles de la biología de las especies, distribución en el territorio argentino y cruzamientos con el cultivo de colza (*B. napus*).

Especie	Nombre	Maleza en ¹					Biología					Cruzamientos y avance observado		
		64	67	76	94	07	Hábito ²	Estatus ³	Altura	Distribución ⁴	Nivel ⁵	Modo ⁶	Fuente	
<i>Alyssum alyssoides</i> L.	Alyssum	x			x		H a	Ad Eu	0-500	BAI, CHU, LPA, MEN, NEU, RNE, SCR		sd		
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern. & Cosson	Mostaza de la India		x	x	x		H a	Ad As	0-500	BAI, COR, ERI, LPA, MIS, SAL, SJU		F1, F2, BC1	NAT ART	Bing et al. 1996 Devos et al. 2009
<i>Brassica napus</i> L.	Colza						H a	Ad Eu	0-1500	ERI, JUJ				
<i>Brassica nigra</i> (L.) W.D.J. Koch	Mostaza negra	x	x	x	x	x	H a	Ad Eu	0-500	BAI, CAT, CHA, CHU, COR, RNE, SAL, SFE		F1 BC1	ART	Devos et al. 2009 FitzJohn et al. 2007
<i>Brassica rapa</i> L.	Nabo	x	x	x	x	x	H a	Ad As	0-3500	BAI, CAT, CHA, CHU, COR, COS, DFE, ERI, JUJ, LPA, LRI, MEN, MIS, NEU, RNE, SAL, SCR, SDE, SFE, SJU, SLU, TDF, TUC		F1, F2, BC1	NAT ART	Jørgensen y Andersen 1994 Devos et al. 2009
<i>Camelina alyssum</i> (Mill.) Thell.	Paletilla	x	x	x	x		H a	Ad Ea	0-2000	BAI, SFE		Sd		
<i>Camelina microcarpa</i> Andr. ex DC.		x	x				H a	Ad Ea	0-500	BAI, CHU, LPA, MEN, NEU, RNE		Sd		
<i>Camelina sativa</i> (L.) Crantz	Nabo francés	x	x	x	x	x	H a	Ad Ea	0-500	BAI, COR, LPA, SFE		No		FitzJohn et al. 2007
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik.	Bolsa de pastor	x	x	x	x	x	H a	Ad Ea	0-3800	BAI, CAT, CHU, COR, COS, DFE, ERI, FOR, JUJ, LPA, LRI, MEN, MIS, NEU, RNE, SAL, SCR, SDE, SFE, SJU, SLU, TDF, TUC		No		FitzJohn et al. 2007
<i>Cardamine hirsuta</i> L.	Berro cimarrón		x		x		H a	Ad Eu	0-2000	BAI, CHU, ERI, LPA, NEU, RNE, SAL, SJU, TUC		Sd		
<i>Descurainia argentinia</i> O.E. Schulz	Altamisa colorada	x	x	x		x	H a	Ed	0-1500	BAI, CHU, COR, LPA, LRI, MEN, RNE, SAL, SFE, SJU, SLU		sd		

Continuación Tabla 1.3

Especie	Nombre	Maleza en ¹					Biología					Cruzamientos y avance observado		
		64	67	76	94	07	Hábito ²	Estatus ³	Altura	Distribución ⁴	Nivel ⁵	Modo ⁶	Fuente	
<i>Diploaxis muralis</i> (L.) DC.	Diploaxis del muro	x	x	x	x		H a	Ad Eu	0-700	BAI, CAT, CHU, COR, LPA, MEN, NEU, RNE, SJU	F1 BC1	ART	Devos et al. 2009 FitzJohn et al. 2007	
<i>Diploaxis tenuifolia</i> (L.) DC.	Flor amarilla	x	x	x		x	H p	Ad Eu	0-1000	BAI, CAT, CHU, COR, DFE, LPA, MEN, NEU, RNE, SCR, SFE, SJU, SLU	F1	ART	Devos et al. 2009	
<i>Eruca vesicaria</i> (L.) Cav.	Rúcula	x	x	x		x	H a	Ad Eu	0-1000	BAI, CAT, CHU, COR, COS, ERI, FOR, JUJ, LPA, LRI, MEN, NEU, RNE, SAL, SDE, SFE, SJU, SLU, TUC	sd			
<i>Erysimum repandum</i> L.		x	x	x			H a	Ad Eu	0-500	BAI, CHU, LPA, MEN, NEU, RNE, SCR	sd			
<i>Hirschfeldia incana</i> (L.) Lagr.-Fossat	Mostacilla	x	x	x		x	H b	Ad Eu	0-2000	BAI, CHU, COR, COS, ERI, FOR, JUJ, LPA, MEN, NEU, RNE, SAL, SCR, SDE, SFE, SJU, SLU, TUC	F1, F2, BC1	NAT, ART	Lefol et al. 1996 Devos et al. 2009	
<i>Lepidium appelianum</i> Al-Shehbaz		x		x			H p	Ad As	300-1600	CHU, NEU, RNE	sd			
<i>Lepidium bonariense</i> L.	Mastuerzo loco		x	x	x	x	H b	Na	0-2500	BAI, CHA, CHU, COR, COS, DFE, ERI, JUJ, LPA, MEN, MIS, RNE, SAL, SDE, SFE, SJU, SLU, TUC	sd			
<i>Lepidium chalepense</i> L.		x		x			H p	Ad As	-	COR, MEN, NEU, RNE, SLU	sd			
<i>Lepidium didymimum</i> L.	Mastuerzo	x	x	x	x	x	H a	Ad Eu	0-1000	BAI, CAT, CHA, COR, COS, DFE, ERI, FOR, JUJ, LPA, LRI, MEN, MIS, SAL, SCR, SDE, SFE, SJU, SLU, TDF, TUC	sd			
<i>Lepidium draba</i> (L.) Desv.	Wancy	x	x	x	x		H p	Ad As	0-2600	BAI, CHU, LPA, MEN, NEU, RNE, SCR, SFE, SLU, TDF	sd			
<i>Neslia paniculata</i> (L.) Desv.		x	x	x			H a	Ad Ea	0-500	BAI, NEU, RNE, SFE	sd			

Continuación Tabla 1.3

Especie	Nombre	Maleza en ¹					Biología					Cruzamientos y avance observado			
		64	67	76	94	07	Hábito ²	Estatus ³	Altura	Distribución ⁴			Nivel ⁵	Modo ⁶	Fuente
<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Rábano	x	x	x	x	x	H b	Ad Eu	0-1100	BAI, CHA, ERI, MIS, SFE			F1, F2, BC1	NAT, ART	Warwick et al. 2003, Devos et al. 2009
<i>Raphanus sativus</i> L.	Nabón	x	x	x	x	x	H b	Ad As	0-2000	BAI, CAT, CHU, COR, COS, ERI, JUJ, LPA, LRI, MEN, MIS, NEU, RNE, SAL, SCR, SFE, SJU, SLU, TDF, TUC			F1	NAT	Ammitzboll y Jørgensen 2006
<i>Rapistrum rugosum</i> (L.) All.	Mostacilla	x	x	x	x	x	H a	Ad Ea	0-2000	BAI, COR, COS, DFE, ERI, FOR, JUJ, LPA, MEN, MIS, NEU, RNE, SAL, SCR, SDE, SFE, SJU, SLU, TDF, TUC			sd		
<i>Sinapis alba</i> L.	Mostaza blanca						H a	Ad Eu	0-500	BAI, TDF			F1 BC1	ART	FitzJohn et al. 2007
<i>Sinapis arvensis</i> L.	Mostaza silvestre	x	x	x	x	x	H a	Ad Eu	0-500	BAI, COR, ERI, RNE, TDF			F1	NAT ART	Leckie et al. 1993 Devos et al. 2009
<i>Sisymbrium altissimum</i> L.	Nabo chileno		x	x	x	x	H a-b	Ad Eu	0-1600	BAI, CHU, LPA, LRI, MEN, NEU, RNE, SCR			sd		
<i>Sisymbrium irio</i> L.	Mostacilla	x	x	x	x	x	H a	Ad Eu	0-3500	BAI, CAT, CHA, CHU, COR, COS, DFE, ERI, FOR, JUJ, LPA, LRI, MEN, MIS, NEU, RNE, SAL, SCR, SJU, SLU, TDF, TUC			No		FitzJohn et al. 2007
<i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop.	Erísimo	x	x	x	x	x	H a	Ad Eu	0-900	BAI, CAT, CHU, COR, ERI, JUJ, LPA, LRI, MEN, NEU, RNE, SAL, SCR, SJU, SLU, TDF, TUC			sd		
<i>Sisymbrium orientale</i> L.			x				H a	Ad Eu	0-3500	BAI, CHU, ERI, JUJ, LPA, MEN, NEU, RNE, SAL, SCR, SJU, SLU			sd		
<i>Thlaspi arvense</i> L.	Carraspique	x		x	x	x	H a	Ad Ea	0-100	BAI, CHU, RNE, SCR			sd		

¹Maleza descrita en: 64=Parodi (1964); 67=Boelcke (1967); 76=Marzocca et al. (1976); 94=Marzocca (1994); 07=CASAFE (2007). ²Hábito: H=hierba; S=arbusto; a=anual; b=bienal; p=perenne. ³Estatus: Ad=adventicia; Ed=endémica; Na=Nativa; As=Asiática; Eu=Europea; Ea=Euroasiática; Af=Africana; Am=Americana. ⁴Provincias donde ha sido hallada, según Martínez-Laborde 1999. ⁵Nivel generacional alcanzado en los cruzamientos observados: F1; F2; retrocruzas (BC); No=no logrado; sd=sin datos. ⁶Tipo de cruzamiento: ART=artificial; NAT=natural.

Figura 1.1: Distribución de las poblaciones de brasicáceas relevadas y colectadas durante los viajes de exploración (2008-2015). *Brassica rapa* (BR), *B. napus* (BN), *B. nigra* (BNI), *Raphanus sativus* (RS), *Sinapis arvensis* (SA) y *Eruca vesicaria* (EV).

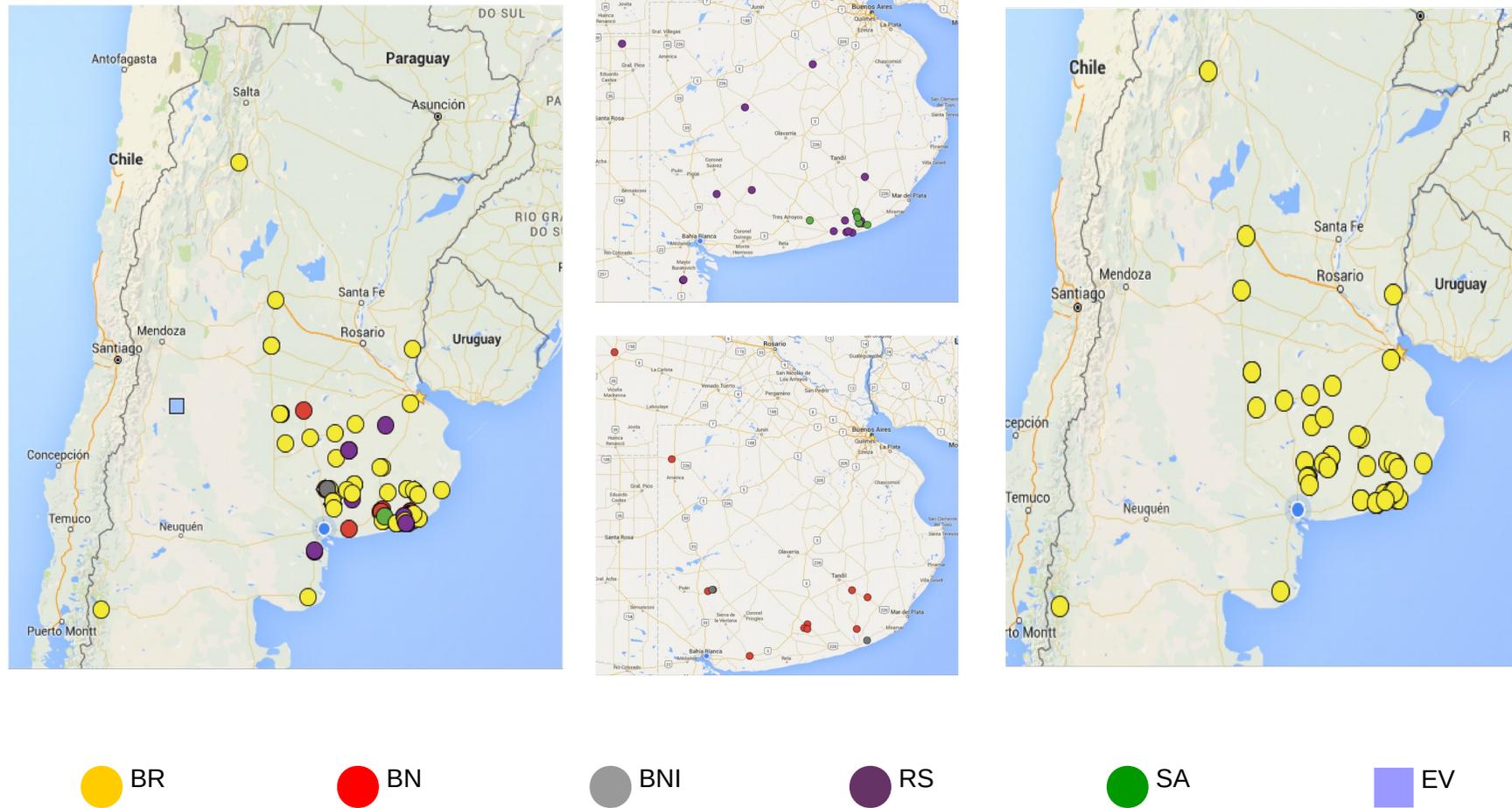


Tabla 1.4: Número de poblaciones de brasicáceas relevadas y accesiones colectadas en Argentina (2008-2015).

Especie	Poblaciones	Accesiones
<i>Brassica rapa</i>	49	69
<i>Brassica napus</i>	10	21
<i>Raphanus sativus</i>	17	27
<i>Sinapis arvensis</i>	5	9
<i>Hirschfeldia incana</i>	5	6
<i>Rapistrum rugosum</i>	4	4
<i>Brassica nigra</i>	3	3
<i>Eruca vesicaria</i>	1	2
<i>Brassica oleracea</i>	-	2
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	1	1
<i>Brassica carinata</i>	-	1
<i>Raphanus raphanistrum</i>	-	1

Tabla 1.5: Número de poblaciones relevadas y accesiones brasicáceas colectadas durante los viajes de exploración realizados desde 2008, discriminados por provincias argentinas.

Provincia	Poblaciones	Accesiones
Buenos Aires	85	134
La Pampa	4	4
Córdoba	2	3
Entre Ríos	1	1
Tucumán	1	1
Río Negro	1	1
Mendoza	1	1

Tabla 1.6: Entradas de especies brasicáceas en los herbarios de la Universidad de Buenos Aires (BAA) y del Instituto de Botánica Darwinion (SI). Se detalla la cantidad de entradas totales por especie, las entradas correspondientes al territorio de la Argentina, la distribución por provincias argentinas, y la entrada más antigua de cada especie (entre paréntesis lugar, colector y registro original).

Especie	Entradas	Argentina	Provincias	Entrada más antigua
<i>Brassica rapa</i>	173	153	BAI 56, DFE 7, CAT 3, CHA 1, CHU 4, COR 4, COS 11, ERI 33, IMA 3, JUJ 16, LPA 1, LRI 2, MEN 2, SAL 4, SCR 3, SFE 2, TDF 1.	1903 (Río Corcovado, Chubut. Illín 124).
<i>Brassica napus</i>	14	11	BAI 7, DFE 1, CHA 1, ERI 1, RNE 1.	1907 (FAUBA, Capital Federal. Hicken 528).
<i>Brassica juncea</i>	11	6	BAI 2, DFE 1, ERI 3.	1964 (Entre Ríos. Sorarú 87).
<i>Brassica nigra</i>	68	42	BAI 26, DFE 4, CHA 2, CHU 1, COR 2, COS 1, JUJ 1, LRI 1, RNE 2, SAL 1, SJU 1.	1863 (Buenos Aires. Isern 8284).
<i>Brassica oleracea</i>	7	3	DFE 1, CAT 1, COR 1.	1897 (Palermo, Capital Federal. Hicken 233).
Otras <i>Brassica</i>	49	20	BAI 8, DFE 1, CHU 1, JUJ 6, SCR 1, TUC 3.	1919 (Chañar Pozo, Tucumán. Venturi 385).
<i>Raphanus sativus</i>	109	92	BAI 41, DFE 6, CHU 1, COR 5, COS 6, ERI 16, JUJ 5, MIS 1, RNE 1, SAL 2, SLU 1, SCR 3, SFE 1, SJU 3.	1906 (Buenos Aires. Hauman).
<i>Raphanus raphanistrum</i>	24	12	BAI 7, DFE 3, CHA 1, TUC 1.	1897 (Capital Federal. Hicken).
Otros <i>Raphanus</i>	16	11	BAI 7, DFE 2, COR 2.	1913 (Ituzaingó, Buenos Aires. Holmberg 10441).

Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de las especies de brasicáceas colectadas puso de manifiesto las diferencias fenotípicas entre ellas (Tabla 1.7). Los caracteres taxónomicamente relevantes que presentaron diferencias significativas entre las especies fueron el ancho de cotiledón, el largo y nivel de abrazamiento de las hojas superiores, el color de pétalo y disposición de los pimpollos y los caracteres de silicua: largo y ancho, largo del rostro, y relación rostro/valva.

Brassica rapa se distinguió por sus hojas inferiores de color verde claro a intenso, con pubescencia intermedia y la presencia de pelos híspidos con la base engrosada. Las hojas de la sección superior del tallo presentaron un grado de abrazamiento entre intermedio y total, que en general permitió diferenciarla de *B. napus*, cuyo nivel de abrazamiento fue menor. Las flores fueron de color amarillo intenso, con los pimpollos al mismo nivel o por debajo de las flores abiertas, lo que daba a la inflorescencia un aspecto compacto. Las silicuas se distinguieron por su largo rostro en relación al largo de las valvas, y las semillas fueron esféricas y de color negro intenso.

Las accesiones de *B. napus* se destacaron por presentar plantas de mayor tamaño con respecto a *B. rapa*, por la ausencia de pelos y la coloración verde glauca de todas sus hojas. Las flores de esta especie fueron de mayor tamaño que las de *B. rapa*, con pétalos de color amarillo pálido y con los pimpollos por encima de las flores abiertas. La inflorescencia en plena floración tomó una apariencia extendida. Las silicuas fueron en general más grandes que las de *B. rapa*, pero con un rostro mucho menor. No se observaron diferencias significativas en el número de semillas por silicua entre estas dos especies, aunque la biomasa de semilla fue mayor en *B. napus*.

La caracterización de las accesiones de *B. nigra* remarcó las grandes diferencias existentes entre ésta y las otras dos especies del género *Brassica* estudiadas. Las plantas de *B. nigra* presentaron una gran altura, superando 1,3 m. Esta característica es distintiva de la especie, que en ambientes naturales puede alcanzar alturas superiores a los 2,5 m. El tamaño de hoja fue menor comparada con las otras especies de *Brassica*, y la pubescencia general de la planta en hojas y tallos fue también un carácter distintivo. Las hojas superiores fueron sésiles o con un pecíolo muy breve, pero nunca abrazadoras. Las silicuas dispuestas de forma fuertemente adpresas al tallo, se diferenciaron en todas sus características. Fueron de menor tamaño (1,3 cm), con un rostro apenas distinguible y con un número bajo de semillas.

Estas sin embargo, esféricas y de color negro, no presentaron diferencias en morfología o biomasa con respecto a las semillas de *B. rapa*.

Sinapis arvensis se diferenció por el aspecto general de la planta. Las accesiones de esta especie presentaron individuos profusamente pubescentes. El tallo presentó como color principal el púrpura, a diferencia de las otras especies caracterizadas cuyo tallo fue principalmente verde, aunque la presencia de antocianinas en el tallo en distintos niveles fue una constante en todas las especies. En el caso de *Sinapis*, la coloración purpúrea fue más intensa en la axila de tallos y hojas. Las hojas superiores presentaron en todos los casos pecíolo breve. Las flores fueron de color amarillo pálido y las silicuas se dispusieron de forma adpresa al tallo, pero no tan fuertemente como en *B. nigra*. Las silicuas presentaron un tamaño menor a *B. rapa* y *B. napus*, pero mayor a *B. nigra*, y una característica distintiva fue la presencia de semilla en el rostro. La forma, color y biomasa de las semillas no se diferenció de *B. rapa* y *B. nigra*.

Finalmente, *R. sativus* fue fácilmente distinguible del resto de las especies. Presentó las hojas de mayor tamaño entre todas las especies evaluadas, y pubescencia intermedia en toda la planta. Los pétalos florales fueron también los de mayor tamaño, con una coloración violácea y en menor medida blanca. Las silicuas indehiscentes fueron de gran tamaño, en especial el ancho fue significativamente distinto al resto de las especies. La cantidad de semillas por silicua fue baja pero la biomasa fue significativamente mayor al resto de las especies estudiadas. Por otra parte el color y forma de las semillas fue distintivo.

El análisis discriminante (Figura 1.2) diferenció las distintas especies evaluadas. El error de clasificación de las especies fue cero, siendo todos los individuos correctamente clasificados dentro de cada especie. El análisis de conglomerados de las poblaciones de *Brassica* y *Sinapis* (Figura 1.3) mostró que las poblaciones se separaron en dos grandes conjuntos, uno abarcando las especies de *B. rapa* y *B. napus* y otro englobando a *B. nigra* y *S. arvensis*. Dentro de estos conjuntos las accesiones se dividieron en subconjuntos formados por poblaciones de cada especie. Entre las accesiones de *B. rapa* todas las poblaciones fueron similares, sin encontrarse asociaciones referidas al origen de cada una de ellas, exceptuando la población BR1012 que provino de Bariloche, Río Negro, y se separó del resto. El habitat de origen de esta población fue totalmente distinto al de las demás accesiones evaluadas, todas originadas en la provincia de Buenos Aires. Las accesiones de *B.*

napus se dividieron en dos subconjuntos, uno incluyó las dos variedades comerciales evaluadas y una población feral, y por el otro se separó la accesión BN0513, originada de voluntarios de un cultivo que no fue cosechado en el norte de la provincia de Buenos Aires.

El análisis de componentes principales, con el 69,6 de la varianza retenida en los dos primeros autovectores, separó claramente a *B. rapa* de *B. napus* (Figura 1.4). También diferenció la población BR1012 del resto de las accesiones de *B. rapa* como se había observado en el análisis de conglomerados.

Las accesiones de *B. rapa* mostraron diferencias significativas solo en el tamaño de órganos vegetativos, altura de planta, número de ramificación y silicuas por inflorescencia (Tabla 1.8). También se observó variabilidad en algunos caracteres categóricos como el abrazamiento de las hojas superiores, que varió entre intermedio y total, o en la forma de raíz. Este carácter presentó diferencias significativas entre las accesiones, algunas presentaron raíces engrosadas en casi todos sus individuos, y en otras poblaciones el carácter estuvo ausente. Las accesiones de *B. napus* fueron más uniformes entre sí, observándose diferencias sólo en caracteres métricos como tamaño de planta y hojas, ramificaciones, tamaño de silicuas y número de granos.

Las accesiones de *R. sativus* fueron muy similares entre sí. Se diferenciaron en algunos caracteres métricos como número de silicuas por inflorescencia o en la biomasa de semilla (Tabla 1.9). El análisis de conglomerados de las poblaciones de *Raphanus* mostró que estas se agruparon en dos subconjuntos, uno de los cuales incluyó las accesiones RS2113A y RS2113B (Figura 1.5). Ambas fueron originadas en una población que presentaba algunos rasgos que se alejaban de la descripción taxonómica de la especie, en especial la gran variabilidad en el color de pétalo. Además, se diferenciaron de las demás accesiones en algunos caracteres como la altura de planta y la pubescencia de las hojas.

Las poblaciones de *R. sativus* presentaron en una alta proporción de plantas con flores violetas. La frecuencia de estas se ubicó entre 1,00 y 0,97 para la mayoría de las accesiones evaluadas (Tabla 1.10). La proporción de plantas con flores blancas fue de 0,03 en algunas accesiones. Las únicas excepciones observadas fueron en las accesiones RS2113A y RS2113B, que presentaron mayor proporción de flores blancas y rosas o bronce. La accesión RS2113A presentó un individuo con pétalos de color amarillo-rosado.

Tabla 1.7: Caracteres métricos y categóricos de diversas poblaciones naturales de brasicáceas de la región pampeana (indicadas en la tabla 1.1), observadas en tres años de ensayo en un jardín común en el Departamento de Agronomía (UNS).

Caracteres	<i>Brassica rapa</i>	<i>Brassica napus</i>	<i>Brassica nigra</i>	<i>Sinapis arvensis</i>	<i>Raphanus sativus</i>
	Nabo	Colza	Mostaza negra	Mostaza silvestre	Nabón
Ancho cotiledón (cm)	1,69 c	1,98 b	1,20 e	1,51 d	2,37 a
Color hipocótilo	5,8 a	5,9 a	6,0 a	5,8 a	5,3 b
Antocianinas	2,2 b	1,8 c	1,6 c	1,8 c	3,0 a
Altura de planta (cm)	78,8 d	111,7 b	134,8 a	96,4 c	111,3 b
Ramificaciones principales (n)	9,8 c	12,0 ab	13,4 a	11,6 b	12,4 ab
Color tallo	2,0 b	2,0 b	4,0 a	4,0 a	2,0 b
Pubescencia tallo	0,0 d	0,0 d	1,9 b	7,0 a	1,1 c
Ancho hoja inferior (cm)	9,9 b	9,9 b	7,5 c	7,7 c	16,9 a
Largo hoja inferior (cm)	20,4 bc	20,9 b	16,4 cd	15,7 d	31,7 a
Tamaño hoja inferior (cm ²)	220,8 b	223,3 b	129,2 b	125,6 b	547,5 a
Largo peciolo inferior (cm)	4,1 a	4,4 a	3,6 ab	2,2 c	3,0 bc
Forma hoja inferior	2,4 d	3,0 b	2,7 c	4,2 a	3,0 b
Márgenes hoja inferior	1,9 b	1,9 b	2,8 a	2,0 ab	1,6 c
Incisiones hoja inferior	3,0 a	3,0 a	3,0 a	2,7 b	3,0 a
Partición hoja inferior	3,9 a	3,4 b	3,4 b	4,0 a	4,0 a
Color hoja inferior	2,3 d	6,1 a	3,5 b	3,0 c	3,1 c
Pubescencia hoja inferior	4,4 c	0,0 d	7,0 a	5,7 b	4,2 c
Tricomas hoja inferior	0,8 a	0,0 b	1,0 a	0,0 b	0,0 b
Forma hoja superior	5,8 a	6,0 a	3,1 c	4,9 b	2,0 d
Márgenes hoja superior	0,6 b	2,0 a	2,3 a	2,0 a	2,0 a
Incisiones hoja superior	1,3 c	0,6 d	3,0 a	2,0 b	2,0 b
Partición hoja superior	0,3 c	0,0 c	2,4 a	0,0 c	1,0 b
Pubescencia hoja superior	0,2 c	0,0 c	1,9 b	1,3 b	3,0 a
Largo peciolo superior (cm)	0,0 d	0,0 d	2,0 a	0,7 c	1,5 b
Abrazamiento hoja superior	3,4 a	1,8 b	0,8 c	0,0 c	0,0 c
Color pétalos	3,0 b	2,0 c	2,3 c	2,0 c	6,9 a
Largo pétalos (mm)	9,3 d	12,2 b	9,6 d	10,8 c	18,5 a
Disposición pimpollos	1,1 c	3,0 a	3,0 a	1,6 c	2,6 b
Color silicuas inmaduras	2,0	2,0	2,0	2,0	2,1

Continuación Tabla 1.7

Caracteres	<i>Brassica rapa</i>	<i>Brassica napus</i>	<i>Brassica nigra</i>	<i>Sinapis arvensis</i>	<i>Raphanus sativus</i>
	Nabo	Colza	Mostaza negra	Mostaza silvestre	Nabón
Silicuas inflorescencia principal (n)	36,6 ab	38,3 a	40,4 a	31,4 b	34,3 ab
Disposición silicuas	3,0 b	4,0 a	1,7 c	2,6 c	3,0 b
Pubescencia silicuas	0,0 b	0,0 b	0,0 b	5,0 a	0,0 b
Largo silicua (cm)	4,8 b	5,8 a	1,3 d	2,8 c	5,6 a
Ancho silicua (cm)	0,35 c	0,40 b	0,17 e	0,28 d	0,60 a
Largo rostro (cm)	1,3 a	1,0 b	0,2 c	1,0 b	-
Relación rostro/valva	0,39 b	0,21 c	0,22 c	0,62 a	-
Constricciones	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	4,6 a
Semillas por silicua (n)	18,5 a	18,3 a	5,8 c	9,1 b	6,3 c
Biomasa semilla (mg sm ⁻¹)	1,22 c	3,17 b	1,14 c	1,41 c	6,56 a
Forma semilla	7,0 a	7,0 a	7,0 a	7,0 a	4,0 b
Color semilla	8,0 a	6,1 b	7,5 a	8,0 a	6,0 c
Forma raíz	1,6 a	1,0 b	1,0 b	1,0 b	1,5 a
Color raíz	1,0 b	1,0 b	1,0 b	1,0 b	2,5 a
Días a floración (días)	87,6 ab	89,6 ab	101,8 a	85,5 b	84,7 b

Dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

Figura 1.2: Análisis discriminante de las plantas de poblaciones de *Brassica rapa* (BR), *B. napus* (BN), *B. nigra* (BNI), *Raphanus sativus* (RS) y *Sinapis arvensis* (SA). Elipses alrededor de los grupos indican el 95% de predicción.

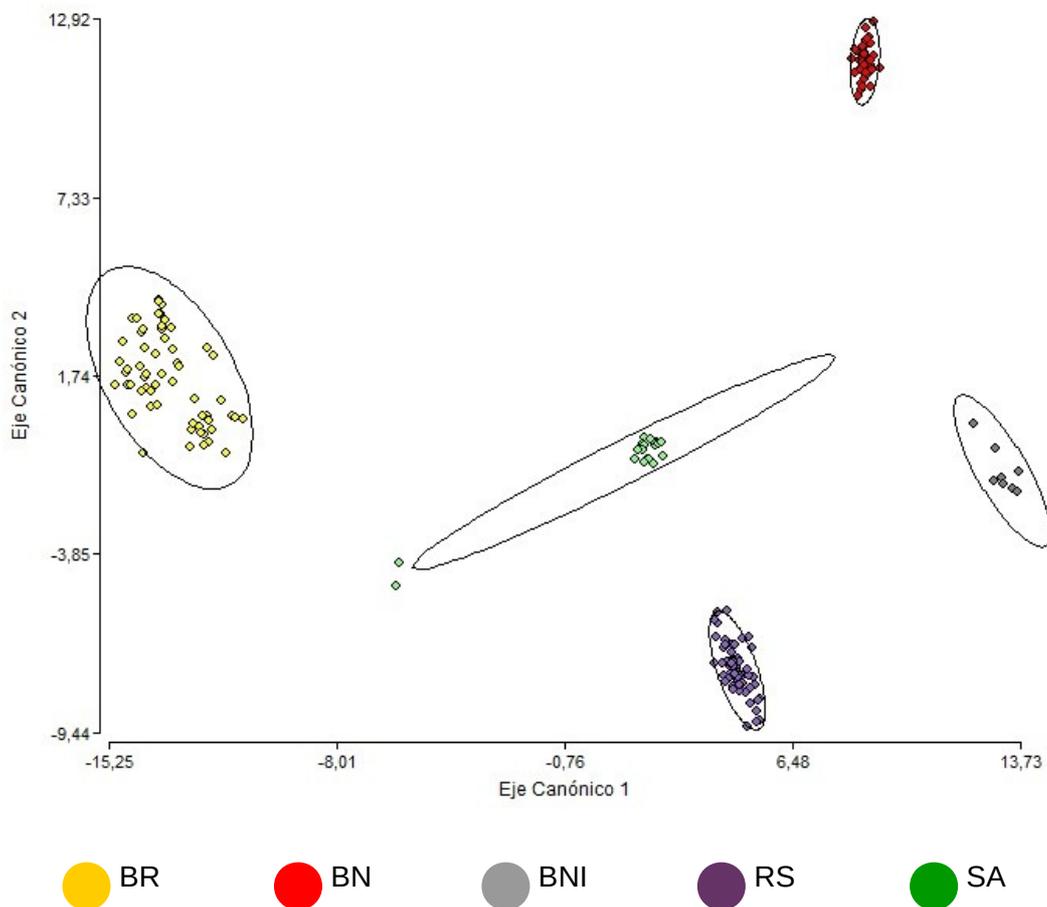


Tabla 1.8: Caracterización morfológica de poblaciones de *Brassica rapa* (BR), variedades y poblaciones ferales de *B. napus* (BN).

Caracteres	BR0308	BR1012	BR1612	BR0213	BR0313	BR1113	BR1213	BR1313	BN8450	BN1700	BN0513	BN1512
Ancho cotiledón (cm)	1,79 b	1,85 b	1,83 b	1,83 b	1,91 b	1,80 b	1,57 c	1,79 b	2,29 a	2,20 a	2,37 a	2,23 a
Altura de planta (cm)	85,3 cd	81,1 ce	82,2 ce	67,8 e	74,2 ce	85,8 c	70,1 de	74,8 ce	114,8 a	105,1 b	85,8 c	103,5 b
Ramificaciones principales (n)	11,7 ac	12,2 ab	9,7 be	7,6 de	9,8 be	10,2 be	8,6 ce	7,6 e	14,2 a	10,8 bd	12,9 ab	9,9 be
Tamaño hoja inferior (cm ²)	304,0 ab	333,2 a	242,2 ad	77,8 d	135,5 bd	165,2 ad	171,2 ad	133,0 bd	266,8 ac	93,1 cd	334,9 a	198,4 ad
Color hoja inferior	2,0 b	2,0 b	2,0 b	2,0 b	2,0 b	2,0 b	2,0 b	2,0 b	7,0 a	7,0 a	7,0 a	7,0 a
Pubescencia hoja inferior	5,0 a	4,7 a	3,8 a	4,1 a	3,3 a	3,4 a	4,1 a	3,2 a	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
Tricomas	1,0 a	0,9 a	0,7 a	1,0 a	0,5 ab	1,0 a	0,7 a	0,7 a	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
Abrazamiento hoja superior	3,4 ab	3,0 b	3,7 ab	3,8 ab	3,8 ab	3,8 ab	3,9 a	4,0 a	2,0 c	2,0 c	2,0 c	2,0 c
Color pétalos	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	2,0 b	2,0 b	2,0 b	2,0 b
Largo pétalos (cm)	8,3 f	9,9 de	10,0 de	8,4 f	10,5 cd	8,8 ef	10,4 d	10,2 d	12,0 ab	11,9 ac	11,2 bd	12,9 a
Disposición pimpollos	1,0 b	1,0 b	1,0 b	1,0 b	1,0 b	1,0 b	1,0 b	1,0 b	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
Silicuas inflorescencia ppal (n)	35,7 ab	41,8 a	40,9 a	21,4 b	41,5 a	35,6 ab	34,0 ab	31,2 ab	41,6 a	46,5 a	43,7 a	41,3 a
Largo silicua (cm)	4,4 c	4,9 bc	4,6 c	4,7 c	5,1 bc	5,1 bc	4,5 c	4,6 c	6,5 a	4,5 c	4,9 bc	5,5 b
Largo rostro (cm)	1,4 a	1,3 ab	1,2 ab	1,5 a	1,4 a	1,2 ab	1,2 ab	1,3 ab	1,0 bc	1,3 ab	1,2 ab	1,1 ac
Relación rostro valva	0,57 a	0,35 bc	0,48 ab	0,49 ab	0,40 bc	0,31 cd	0,37 bc	0,39 bc	0,18 d	0,45 ac	0,18 d	0,32 cd
Semillas por silicua (n)	28,5 a	14,3 cd	15,5 cd	16,1 cd	19,8 bc	14,7 cd	20,1 bc	18,7 bd	23,6 ab	11,7 d	14,7 cd	19,2 bc
Biomasa semilla (mg sm ⁻¹)	1,29 e	0,78 g	1,60 d	1,01 f	0,78 g	1,35 e	1,02 f	1,23 e	3,65 a	3,45 bc	3,30 c	3,51 ab
Color semilla	8,0 a	8,0 a	8,0 a	8,0 a	8,0 a	8,0 a	8,0 a	8,0 a	3,0 b	8,0 a	8,0 a	8,0 a
Forma raíz	2,0 a	2,0 a	1,6 ab	1,2 b	1,5 ab	1,6 b	1,1 b	1,0 b	1,0 b	1,0 b	1,0 b	1,0 b

Dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

Figura 1.3: Dendrograma de agrupamiento de la progenie de poblaciones de *Brassica rapa*, *B. napus*, *B. nigra* y *Sinapis arvensis* utilizando 15 caracteres métricos y 13 caracteres categóricos medidos en un jardín común, basado en la distancia de Gower.

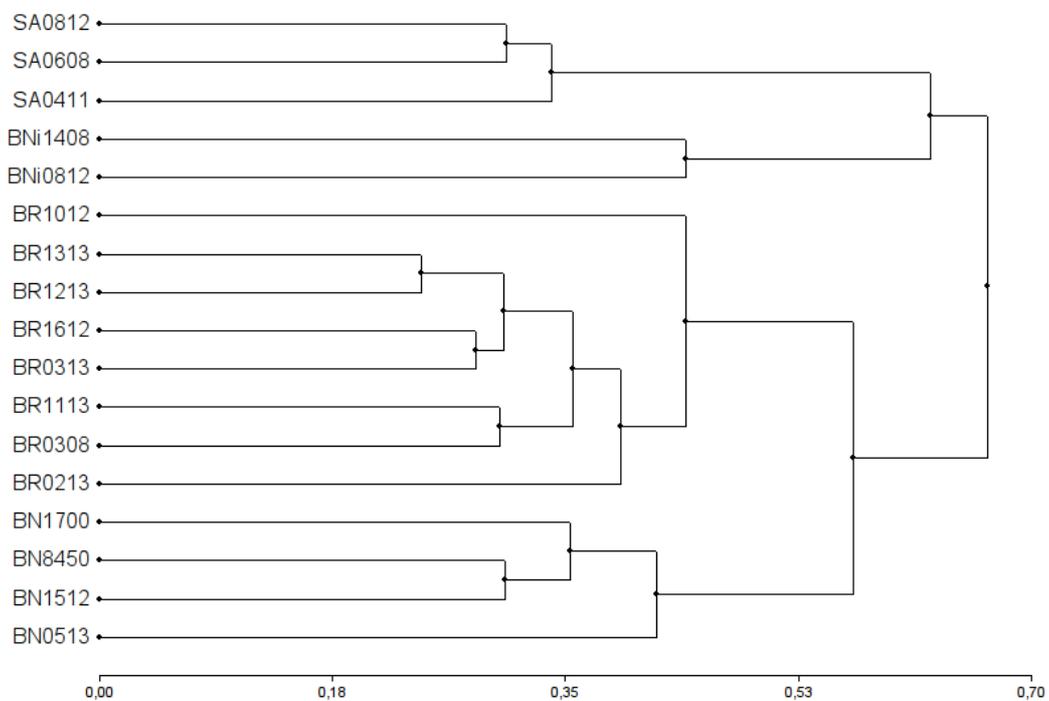
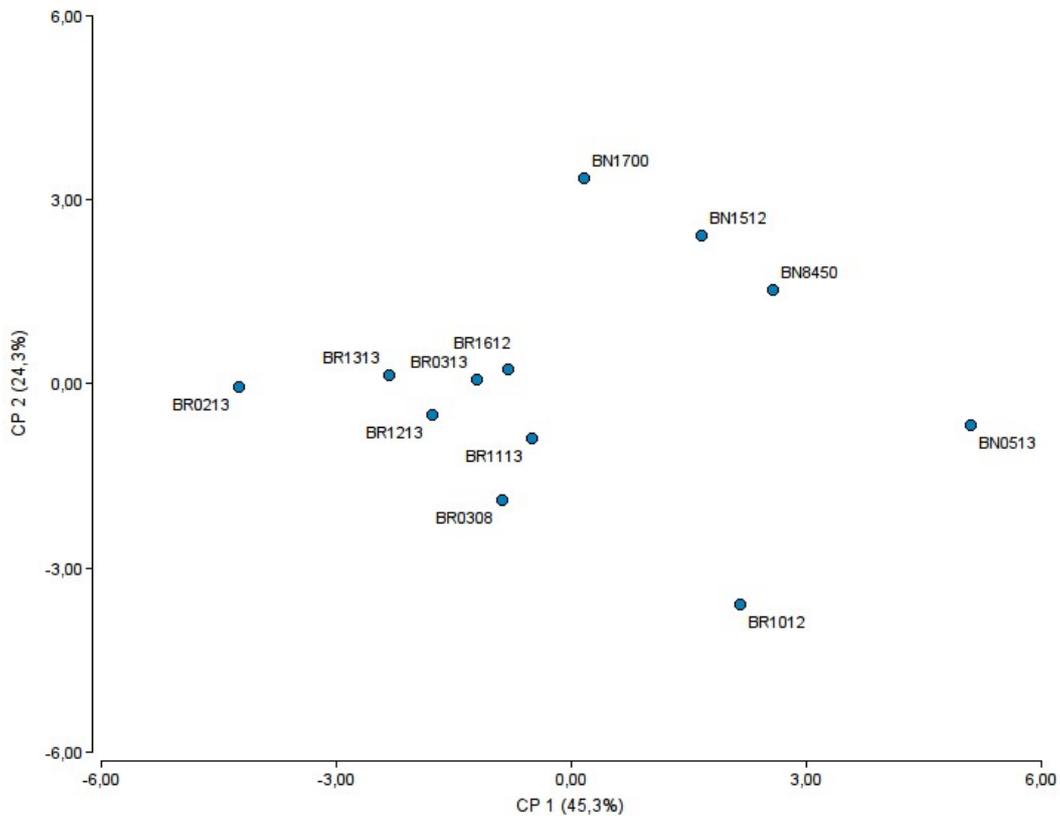


Figura 1.4: Análisis de componentes principales de los rasgos morfológicos de la progenie de accesiones de *Brassica rapa* y *B. napus*.



Parámetros: ACO=ancho de cotiledón; ALP=altura de planta a madurez; NRP=número de ramificaciones principales; AHI=ancho hoja inferior; LHI=largo hoja inferior; THI=tamaño hoja inferior; LPI=largo pecíolo hoja inferior; LPE=largo del pétalo; SIP=silicuas en inflorescencia principal; LSI=largo de silicua; ASI=ancho de silicua; LRO=largo del rostro de la silicua; RRV=relación rostro valva; NSS=número de semillas por silicua.

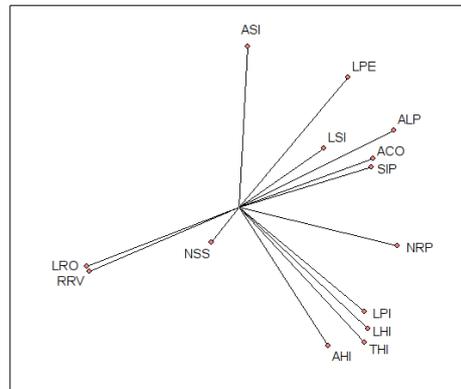


Tabla 1.9: Caracterización morfológica de poblaciones de *Raphanus sativus* (RS) de Argentina evaluadas en un jardín común.

Caracteres	RS0108	RS0208	RS0408	RS0508	RS0211	RS2113A	RS2113B
Ancho cotiledón (cm)	2,7 a	2,3 b	2,3 b	2,3 b	2,3 b	2,1 b	2,1 b
Altura de planta (cm)	118,8 a	113,0 a	114,4 a	113,9 a	119,5 a	91,1 b	108,1 a
Ramificaciones principales (n)	12,6	12,6	12,0	12,8	13,1	12,5	13,1
Tamaño hoja inferior (cm ²)	614,3	547,2	576,2	615,7	474,7	535,2	469,1
Color hoja inferior	3,0 a	2,6 b	3,0 a	2,6 b	2,9 ab	3,0 a	3,0 a
Pubescencia hoja inferior	4,8 b	4,5 b	4,7 b	4,4 b	4,8 b	6,0 a	6,0 a
Color pétalos	7,0	6,8	7,0	6,8	7,0	5,4	6,3
Largo pétalos (mm)	20,8	19,8	20,4	20,9	20,7	19,9	20,4
Silicuas inflorescencia ppal (n)	30,9 bc	22,8 cd	24,6 bd	29,3 bd	33,0 ab	20,6 d	39,7 a
Largo silicua (cm)	6,3 a	5,6 ab	6,0 ab	5,2 b	5,1 b	5,4 ab	5,6 ab
Ancho silicua (cm)	0,65 ab	0,62 ac	0,68 a	0,58 c	0,56 bc	0,56 c	0,46 d
Constricciones	4,4 cd	4,6 bc	3,9 d	5,0 ac	5,2 ab	5,1 ac	5,4 a
Semillas por silicua (n)	6,7 ab	6,8 a	6,9 a	6,5 ab	6,6 ab	5,8 ab	5,5 b
Biomasa semilla (mg sm ⁻¹)	9,0 ab	7,7 c	9,3 ab	9,2 ab	8,8 b	9,6 a	8,8 b
Forma raíz	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Color raíz	5,5	4,0	4,5	4,5	4,5	3,0	4,0

Dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

Figura 1.5: Dendrograma de agrupamiento de la progenie de poblaciones de *Raphanus sativus* (RS) criadas en jardín común, utilizando 11 caracteres métricos y 6 caracteres categóricos, basado en la distancia de Gower.

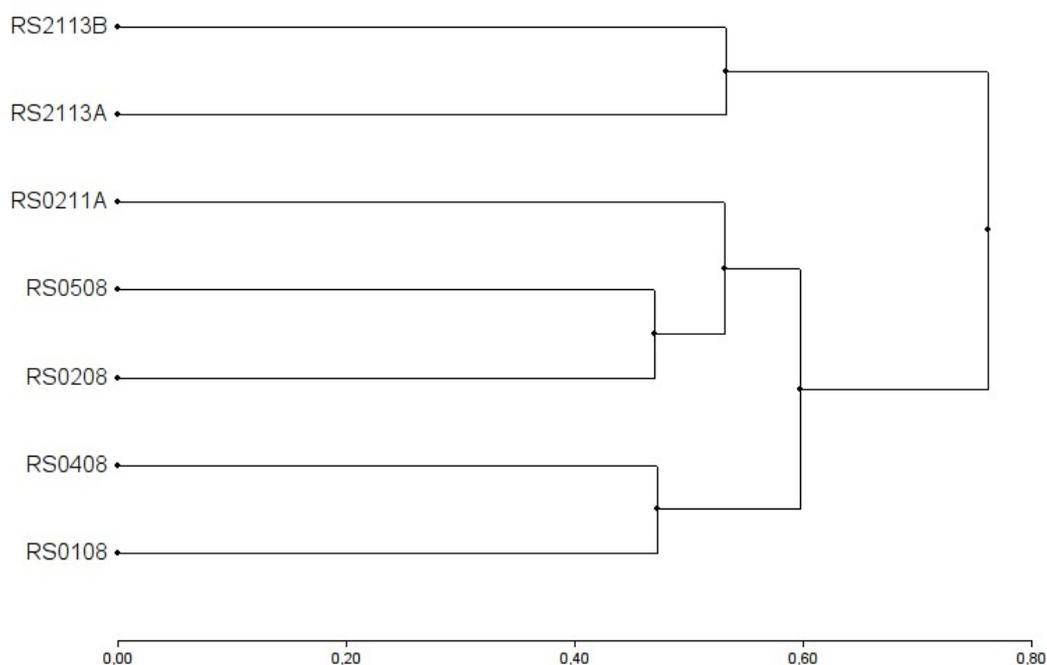


Tabla 1.10: Frecuencia de color primario de pétalo en poblaciones de *Raphanus sativus* (RS).

Accesión	Color primario de pétalo (frecuencia)			
	Violeta	Blanco	Rosa	Amarillo
RS0108	1,00	0,00	0,00	0,00
RS0208	0,97	0,03	0,00	0,00
RS0408	1,00	0,00	0,00	0,00
RS0508	0,97	0,03	0,00	0,00
RS0211	1,00	0,00	0,00	0,00
RS2113A	0,72	0,16	0,09	0,03
RS2113B	0,58	0,21	0,21	0,00

Caracterización química

El análisis de una muestra de poblaciones naturales brasicáceas realizado mostró que el contenido de aceite de los granos de algunas poblaciones de *B. rapa* alcanzó concentraciones análogas al de variedades comerciales de colza (Tabla 1.11). Por su parte, el contenido de ácido erúxico (22:1) y glucosinolatos fue elevado en todas las accesiones de *B. rapa*. Los biotipos ferales de *B. napus* mostraron un contenido de materia grasa, perfil ácido y contenido de glucosinolatos que impidió descartar que derivan de variedades mejoradas de colza-canola. Solo una población de *B. napus* mostró un alto contenido de glucosinolatos, lo que se consideró una evidencia de introgresión con poblaciones naturales de nabo silvestre (*B. rapa*). En los cultivares forrajeros analizados se observaron valores elevados de ácido erúxico y glucosinolatos.

Tabla 1.11: Perfil ácido de granos de poblaciones naturales y cultivares de *Brassica rapa*, *B. napus* y de una población de *Sinapis arvensis*. MG: % de materia grasa sobre sustancia seca, GS: glucosinolatos totales en μ moles por gr de muestra en base 8,5%.

Código	Especie	Localidad	Origen	MG	Ac. oleico	Ac. linoleico	Ac. linolénico	Ac. erúcico	GS
BR0508	<i>B. rapa</i>	Balcarce	Población	41,9	24,8	13,8	7,0	37,8	39,0
BR1108	<i>B. rapa</i>	Pantanosa	Población	33,4	-	-	-	43,3	58,7
BR1308	<i>B. rapa</i>	Pigüe	Población	36,0	16,0	14,4	8,6	44,6	38,1
BR06/0709	<i>B. rapa</i>	Balcarce	Población	37,4	14,0	13,0	10,3	47,6	28,6
BR0213	<i>B. rapa</i>	Energía	Población	37,6	15,2	14,0	9,6	45,9	34,1
BR0313	<i>B. rapa</i>	Quequén	Población	41,1	15,3	13,0	9,5	46,9	36,8
BR1113	<i>B. rapa</i>	S. Ventana	Población	35,6	15,2	14,4	9,9	44,5	24,6
BR1213	<i>B. rapa</i>	Balcarce	Población	29,1	11,8	17,2	10,5	44,8	31,3
BR1913	<i>B. rapa</i>	C. Barón	Población	40,9	16,4	14,0	9,1	42,9	27,7
BR0414B	<i>B. rapa</i>	La Dulce	Población	33,1	12,3	13,8	11,9	47,7	39,9
BRGG13	<i>B. rapa</i>	-	Cultivar forrajero	42,9	12,7	14,9	9,8	46,3	34,0
BNMCH10	<i>B. napus</i>	Mar Chiquita	Voluntarios en borde	46,7	77,5	11,6	1,3	0,8	6,1
BN1512	<i>B. napus</i>	Chaves	Maleza	41,7	58,2	22,6	10,7	0,1	14,2
BN1712	<i>B. napus</i>	San Mayol	Maleza	40,0	38,7	17,6	11,4	13,5	14,5
BN0113	<i>B. napus</i>	Dorrego	Lote	37,0	58,6	21,8	11,1	0,1	8,8
BN0513	<i>B. napus</i>	Gral. Villegas	Voluntarios banquina	43,1	59,7	22,7	8,3	0,0	5,5
BN8450	<i>B. napus</i>	-	Cultivar oleaginoso	44,9	78,0	12,4	1,5	0,0	3,6
BNNN13	<i>B. napus</i>	-	Cultivar oleaginoso	50,8	65,0	17,7	7,7	0,4	2,7
BNG013	<i>B. napus</i>	-	Cultivar forrajero	43,8	16,1	14,5	10,5	40,9	23,8
BNWA13	<i>B. napus</i>	-	Cultivar forrajero	44,5	14,7	14,2	10,1	46,0	27,6
SA0811	<i>S. arvensis</i>	Lobería	Población	30,0	15,0	16,5	15,9	29,0	44,9

DISCUSIÓN

Los resultados de las exploraciones demostraron que Argentina mantiene su vigencia como centro de biodiversidad secundaria de especies emparentadas con el cultivo de colza. Las poblaciones brasicáceas se encuentran ampliamente distribuidas en la región pampeana, en ambientes aptos para el cultivo de *B. napus*. Extensas poblaciones de *B. rapa* fueron halladas en todo el centro-sur de la provincia de Buenos Aires. Esta zona es coincidente con el área de mayor difusión del cultivo de colza. En la provincia de Buenos Aires se sembró en la última década aproximadamente el 60% de la superficie total nacional de colza (MAGyP, 2015). La incipiente difusión de variedades con resistencia a herbicidas imidazolinonas en esta zona implica un riesgo de flujo génico con las poblaciones naturales brasicáceas, y la incorporación del rasgo de resistencia en las malezas emparentadas.

Una característica de suma importancia para determinar la probabilidad y tasa de cruzamientos entre las especies está referida a la sincronía de los estados reproductivos en poblaciones adyacentes. En general, la colza puede florecer desde septiembre a noviembre, mientras que muchas malezas comienzan su floración en agosto (OGTR, 2002). Sin embargo, la variación de este fenómeno en la flora natural es muy grande y depende de las condiciones ambientales. En los relevamientos realizados se encontró poblaciones naturales de *B. rapa* floreciendo en las cuatro estaciones (meses de enero, febrero, marzo, julio, septiembre y octubre). Estas coincidencias geográficas y de período floral confirman el alto riesgo de flujo génico que existe entre ellas.

La caracterización de las diferentes especies brasicáceas evaluadas en jardín común puso de manifiesto las diferencias entre ellas, en congruencia con los datos taxonómicos bibliográficos. Las similitudes observadas entre *B. nigra* y *S. arvensis*, que se hicieron patentes en el análisis de conglomerados, es congruente con la historia evolutiva de esas especies. Ambas especies han sido tradicionalmente consideradas íntimamente emparentadas, lo que ha sido probado por diversas investigaciones, incluyendo estudios de proteínas, citológicos, genéticos y morfológicos. Su cercanía es reflejada por los altos niveles de apareamiento de sus cromosomas. Ambas especies comparten distribución geográfica, y no han desarrollado barreras fuertes de aislamiento reproductivo (Prakash et al., 2012).

Las variaciones entre las accesiones de cada especie fue menor. Se encontró

variabilidad entre las poblaciones de *B. rapa*, tanto en caracteres métricos como categóricos. Estos podrían estar correlacionados con la adaptación de las poblaciones a los distintos ambientes en los cuales fueron halladas. Una accesión originaria de la zona andina patagónica se diferenció del resto de las poblaciones pertenecientes a la región pampeana.

También se observaron rasgos en algunas poblaciones de *B. rapa* que podrían inferir el origen feral de estas. En especial, el engrosamiento de la raíz y los altos niveles de materia grasa de los granos indican un posible origen en el escape de cultivos de nabo. De acuerdo a las referencias bibliográficas de época colonial, el escape de plantas de nabo cultivado parece haber sido general en toda América, desde varios siglos atrás. En el siglo XVI se menciona que algunas poblaciones crecían en forma sub-espontánea en cultivos de trigo y acequias (Patiño, 1963). En nuestro país la importancia de *B. rapa* como maleza de cultivos es reconocida desde la década del 30 (Ibarra, 1937). Por la misma época se comenzaron a aprovechar las poblaciones naturales de nabo debido a su abundancia de como maleza de trigo y lino, sus niveles de materia grasa, y el valor de su aceite con destino industrial (Tenenbaum, 1937).

En un estudio realizado utilizando distintas accesiones de *B. rapa*, Crouch et al. (1995) compararon la diversidad genética de formas cultivadas, silvestres y maleza de la especie. Entre estas accesiones se incluyeron cultivares oleaginosos europeos y norteamericanos (ssp. *oleifera*), variedades de raíz engrosada (ssp. *rapifera*), dos cultivares asiáticos seleccionados por sus hojas (ssp. *chinensis*), otro europeo cultivado por sus inflorescencias (ssp. *italica*), junto con cinco accesiones de *B. rapa* silvestre o asilvestrada (ssp. *sylvestris*) de distintas partes del mundo, incluyendo una accesión argentina. Los resultados mostraron que dos de las accesiones silvestres, incluyendo la de Argentina y otra de California, se agruparon junto con los cultivares, en especial con aquellos de la ssp. *rapifera*. Los autores demostraron que las accesiones de América correspondían a escapes recientes de cultivo, dado que las verdaderas formas silvestres de *B. rapa* se restringen a Europa y Asia. Estos resultados son congruentes con lo observado en la caracterización morfológica de las distintas poblaciones naturales de *B. rapa* utilizadas en este capítulo, y reafirman la hipótesis de que las poblaciones argentinas corresponden a formas ferales escapadas desde la introducción del cultivo de las formas hortícolas en el país.

La caracterización de las poblaciones de *R. sativus* mostró en gran medida la similitud

existente entre ellas y la presencia de rasgos inherentes a las formas cultivadas, que también podrían indicar el origen feral de estas poblaciones. El rábano fue uno de los primeros cultivos introducidos en América por los colonizadores españoles, hallándose menciones desde el siglo XVI (Patiño, 1963). Diversos autores consideran que las poblaciones invasoras de *R. sativus*, presentes en zonas templadas de América, Europa y Asia, corresponden a formas endo o exoferales derivadas del rábano domesticado (Panetsos y Baker, 1967; Snow y Campbell, 2005; Theisen, 2008; Kaneko et al., 2011). Entre las poblaciones naturales de *Raphanus* argentinas se observaron caracteres como la raíz engrosada, silicuas globosas y corchosas con poca constricción entre las semillas, que permanecen en la planta por largo tiempo posterior a la madurez, y semillas de gran tamaño y biomasa. Todas estas características las asemejaron al ancestro cultivado.

La presencia de una población de *R. sativus* originaria del sur de la provincia de Buenos Aires, con algunos caracteres taxonómicamente adjudicados a *R. raphanistrum* podría estar indicando la existencia de un proceso de hibridación e introgresión entre las dos especies; en especial, la amplia variabilidad en el color de los pétalos, incluyendo bronce, rosa y amarillo. Las flores de *R. sativus* pueden ser violetas, blancas y en ocasiones rosas, pero nunca amarillas. Este carácter, conferido por la presencia de pigmentos carotenoides, es típico de la especie *R. raphanistrum* (Panetsos y Baker, 1967; Irwin y Strauss, 2005). Sin embargo, las raíces engrosadas y la ausencia de constricciones totales en las silicuas de las plantas de esta población son caracteres propios de la especie *R. sativus*.

La presencia de *R. raphanistrum* como maleza en la Argentina fue documentada por Parodi (1964), Boelcke (1967), Marzocca et al. (1976) y Martínez-Laborde (1999). Los herbarios SI y BAA registran doce ejemplares, pero sólo tres de ellos correspondían indudablemente a esa especie. Estos registros pertenecían todos a la zona de Campana, provincia de Buenos Aires, recogidos en la década del 40. Se menciona en las notas de las entradas que las plantas poseían flores amarillas, y convivían con plantas de *R. sativus* de flores violetas. Sin embargo, en ninguna de las más de quince misiones de exploración realizadas en la región pampeana fue posible hallar poblaciones naturales de esta especie, ni siquiera en la zona de Campana. Es probable que estas poblaciones hayan desaparecido por disturbio humano, en una zona que es en la actualidad predominantemente urbana. También es posible que se hayan introgresado totalmente en las poblaciones de *R. sativus* presentes en la zona.

El flujo génico entre *R. sativus* y *R. raphanistrum* ha sido documentado en poblaciones invasoras de California, en las cuales la hibridación ha conducido a la desaparición de las especies parentales. Mediante estudios genéticos, se ha concluido que todas las poblaciones de rábano feral de California tienen origen híbrido. La hibridación aumentó la supervivencia y producción de descendencia, incrementando su variabilidad genética y plasticidad fenotípica, lo que le ha permitido invadir un amplio rango de ambientes (Panetsos y Baker, 1967; Ridley et al., 2008; Ridley y Ellstrand, 2008). Algunos de estos trabajos afirman que los cultivares de *R. sativus* no tendrían la capacidad de formar poblaciones ferales exitosas por si mismos, sin flujo génico con *R. raphanistrum*. Para la dispersión de biotipos endoferales se requerirían mutaciones específicas y una fuerte presión de selección para reducir la frecuencia de rasgos deletéreos provenientes del cultivo, como la floración demorada y las raíces engrosadas, que son caracteres poligenéticos (Panetsos y Baker, 1967; Campbell y Snow, 2009).

Estos resultados confirman la amplia variabilidad y distribución geográfica de las poblaciones brasicáceas relacionadas con cultivos en el territorio nacional. Se pone de manifiesto las complejas relaciones entre los biotipos cultivados y las poblaciones naturales que han estado en contacto en nuestro país desde hace más de cien años. Estas relaciones han incluido procesos de flujo génico, hibridación y endo y exoferalidad, que han conferido a alguno de estos biotipos una mayor capacidad invasiva y que a futuro limitan la difusión de modernas tecnologías de cultivo, como la resistencia a herbicidas. Se observaron rasgos de las formas domesticadas en las poblaciones naturales argentinas de *B. rapa* y de *R. sativus*, por lo cual el posible origen feral de las mismas no puede ser descartado.

Capítulo 2: FLUJO GÉNICO ENTRE EL CULTIVO DE COLZA (*Brassica napus*) Y LA MALEZA *B. rapa*

Los procesos de intercambio genético entre las especies domesticadas, sus malezas asociadas y parientes silvestres, suele ser un mecanismo frecuentemente asociado a la generación de variabilidad. Este proceso estaría involucrado en la emergencia de las principales especies cultivadas, pero también habría conducido a la aparición de especies invasoras (Ellstrand, 2003).

El uso de cultivos resistentes a herbicidas presenta el riesgo de transferencia de esa característica a especies silvestres emparentadas que constituyen importantes malezas (Devos et al., 2004, Warwick et al., 2008). El flujo génico y la introgresión exitosa de los caracteres de resistencia dependen de una serie de eventos cuya probabilidad es generalmente baja, aunque varía con las especies. Se requiere coincidencia geográfica de los cultivos con sus parientes silvestres, compatibilidad sexual entre ellos y períodos de floración coincidentes. Deben producirse híbridos fértiles, y el gen debe transmitirse a través de sucesivas retrocruzas y estabilizarse en el genoma de las especies silvestres (Légère 2005, Devos et al. 2009).

Brassica rapa L. y *B. napus* L. son dos especies anuales de la familia de las brasicáceas, cultivadas desde hace siglos como hortícolas u oleaginosas (Gupta y Pratap, 2007; Prakash et al., 2012). En especial, *B. napus* (colza) se destaca por su elevada participación en la producción mundial de aceites comestibles (FAOSTAT, 2015). La forma silvestre de *B. rapa*, de la cual se originaron las variedades de nabo alimenticio y colza polaca, es una maleza altamente invasora de una gran cantidad de cultivos alrededor del mundo. En Argentina es una maleza común en cultivos de trigo y otros cereales de invierno de la región pampeana (Parodi, 1964; Marzocca et al., 1976).

La probabilidad de transferencia de genes entre las distintas especies del género *Brassica* es relativamente alta debido a la compatibilidad cruzada de los miembros del triángulo de "U" (Hall et al., 2005). Esta teoría describe que las tres especies diploides *B. nigra* (L.) Koch (BB, $2n=16$), *B. oleracea* L. (CC, $2n=18$) y *B. rapa* (AA, $2n=20$), mediante cruas interespecíficas naturales entre ellas, dieron origen a tres especies anfidiplóides: *B. napus* (AACC $2n=38$), *B. juncea* (L.) Czernohorsky (AABB, $2n=36$) y *B. carinata* Braun (BBCC, $2n=34$) (Gupta y Pratap, 2007; Allender y King, 2010; Iniguez-Luy y Federico, 2011; Prakash et al., 2012).

Brassica rapa y *B. napus* son las crucíferas que han mostrado la mayor propensión al flujo génico (Brown et al., 1995; Landbo et al., 1996; Wilkinson et al., 2003; Allainguillaume et al., 2006). Si bien la frecuencia de hibridación entre estas dos especies es generalmente menor al 7% (Jørgensen & Andersen, 1994, Wilkinson et al., 2003, Allainguillaume et al., 2006), puede superar el 56% cuando *B. rapa* es el parental femenino y se encuentra aislada entre plantas de *B. napus* (Warwick et al., 2003; Devos et al., 2009). Esto podría deberse a que *B. rapa* posee genes de autoincompatibilidad que obligan a la fecundación cruzada mientras que por el contrario *B. napus* puede autofecundarse con facilidad (Bateman, 1955; Cuthbert & McVetty, 2001). La crucea en el sentido opuesto estaría limitada por mecanismos esporofíticos en *B. napus* que limitan el crecimiento del polen de *B. rapa* (Hauser et al., 1997).

Las limitaciones a la hibridación recíproca entre las dos especies no parecen ser muy fuertes (Hauser et al., 1998). En condiciones naturales existen indicios de introgresión progresiva, con producción de híbridos triploides, recombinación entre los genomas de *B. rapa* y *B. napus*, intercambio de cloroplastos y pérdida del genoma proveniente de *B. oleracea* (Hansen et al., 2001; 2003). Por este mismo mecanismo, en *B. oleracea* silvestre se ha comprobado la introgresión del genoma de *B. rapa* luego de la crucea interespecífica (Ford et al., 2006).

Los híbridos emergentes de la crucea entre *B. napus* y *B. rapa* pueden ser reproductivamente tan exitosos como sus progenitores (Hauser et al., 1998). Suelen presentar características morfológicas similares a *B. rapa* y segregar para los caracteres de autocompatibilidad (Warwick et al., 2003), por lo que los genes de resistencia a herbicidas podrían permanecer en las poblaciones silvestres de forma encubierta. De hecho, se ha confirmado la transferencia de resistencia a herbicidas a través de sucesivas generaciones (Snow et al., 1999), y la persistencia de dicha característica en poblaciones silvestres de *B. rapa*, más allá de seis años en ausencia de presión de selección con herbicida (Warwick et al., 2008).

El número y la naturaleza de los cromosomas tienen gran importancia para la transmisión de los genes, debido a que pueden contribuir al aislamiento genético. Esto es consecuencia de la segregación meiótica irregular, reducida recombinación y selección postcigótica. La especie *B. napus* fue originada por la hibridación espontánea entre *B. rapa* y *B. oleracea* y contiene el juego cromosómico diploide

completo proveniente los dos genomas parentales. Por lo tanto, *B. napus* (AACC) y *B. rapa* (AA) comparten un juego de cromosomas haciendo del cruzamiento interespecífico un evento común (Jørgensen y Anderesen, 1994; Snow et al., 1999).

A nivel internacional hace dos décadas que se cuenta con variedades de *B. napus* resistentes a herbicidas. Los eventos transgénicos registrados actualmente incluyen colza resistente a glifosato, glufosinato y bromoxinil. Las variedades resistentes a glifosato son actualmente cultivadas en Canadá, Estados Unidos, Australia, Japón y Chile (en este último caso, sólo para exportación de semilla) (James, 2012). La colza resistente a imidazolinonas se desarrolló en 1987 usando métodos de mejoramiento tradicional y fue liberada al mercado por primera vez en Canadá en 1996. Esta variedad y otras fueron desarrolladas por la empresa CYNAMID (luego adquirida por BASF) y ahora se las denomina Clearfield® o CL (Tan et al., 2005; Krato et al., 2012).

Debido al posible flujo génico, un pedido de autorización para el cultivo de variedades transgénicas en Argentina fue denegado por recomendación de la Comisión Nacional de Biotecnología Agropecuaria (SAGPyA, 1997). Otras variedades con resistencia a herbicidas de la familia de las imidazolinonas, generadas a partir de una mutación inducida, han comenzado a utilizarse recientemente bajo la tecnología CL (INASE, 2015).

El modo de acción de la familia de herbicidas de las imidazolinonas consiste en la inhibición de la enzima acetohidroxiácido sintetasa (AHAS) esencial en el proceso de síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada en la planta (valina, leucina e isoleucina). Si bien no presentan la misma estructura química que las sulfonilureas, comparten el mismo sitio de acción y algunas propiedades, como el comportamiento en el suelo y la baja toxicidad en los mamíferos (Shaner y O'Connor, 1991).

La colza CL fue generada mediante cultivo de tejidos que se obtuvieron de microsporas de variedades de colza canadienses, posteriormente tratadas con mutagénicos químicos. A partir de embriones haploides, mediante el uso de colchicina, se obtuvieron plantas doble haploides (Swanson et al, 1989). Se generaron dos líneas (PM1 y PM2), de las que derivan todas las variedades de colza resistente a imidazolinonas. PM1 contiene una mutación en el codón 653 (cambio de serina a asparagina), que le confiere resistencia a imidazolinonas. El factor de resistencia en la línea PM2, asociado a una mutación puntual en el codón 574 (cambio de triptófano a leucina), es marcadamente mayor y confiere resistencia a sulfonilureas y otros

inhibidores de la enzima AHAS. El nivel de resistencia es mayor cuando las dos mutaciones de cada alelo se encuentran presentes (Tan et al., 2005; Krato et al., 2012).

La posible liberación para el uso público de variedades de colza (*B. napus*) resistentes a imidazolinonas (IMI) motivó a la realización de una evaluación del riesgo ambiental sobre el empleo de esta tecnología. La flora natural de Argentina contiene 68 géneros de la familia Brassicaceae, incluyendo *B. rapa* (nabo) y *Raphanus sativus* L. (nabón), que son malezas invasoras en más de veinte provincias (Marzocca et al., 1976; Martínez-Laborde, 1999). En Argentina *R. sativus* ($x=9$) también se cultiva como hortaliza y forraje, mientras que el nabo argentino, posiblemente una mezcla de dos especies (Oms y Tort, 1959), constituyó el germoplasma utilizado para la obtención de las variedades de colza conocidas como “tipo argentino” (*B. napus*). Si bien la colza-canola también comprende formas mejoradas de *B. rapa*, en la actualidad sólo *B. napus* está difundida como cultivo en Argentina (Iriarte y Valetti, 2008).

Para evaluar el impacto de esta tecnología se estudió la posibilidad de flujo génico entre el cultivo de colza y la maleza *B. rapa*, bajo condiciones naturales argentinas. Los objetivos fueron detectar evidencias de flujo génico desde el cultivo de colza (*Brassica napus*) hacia poblaciones naturales de *B. rapa*, incluyendo la adquisición de resistencia a herbicidas desde variedades del cultivo con esa característica. Las hipótesis fueron que el flujo génico entre cultivos de colza (*B. napus*) y poblaciones naturales de *B. rapa* es posible, y cuando las variedades implicadas presenten resistencia a herbicidas este carácter se transferirá a la maleza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Entre 2008 y 2013 se localizaron cuatro lotes sembrados con variedades comerciales de colza, que presentaban dentro o en la proximidad (<10 m) poblaciones naturales de *B. rapa*. En todos los casos se comprobó la floración simpátrica entre las poblaciones y el cultivo (Tabla 2.1). Se realizaron observaciones de la flora de los lotes y el entorno, y se caracterizaron las poblaciones de *B. rapa* mediante la escala semi-cuantitativa desarrollada por Domin-Krajina (Mueller-Dombois y Ellenberg, 1974). Al momento de madurez se tomaron muestras de silicuas de las poblaciones.

Uno de estos lotes, relevado durante la primavera de 2008, se encontraba sembrado con la variedad de colza Nexera 8450. Este cultivar presenta resistencia a herbicidas imidazolinonas. El lote se encontraba ubicado en cercanías de la localidad de Balcarce, en el establecimiento San Juan. En este establecimiento se ubicaron tres lotes de cultivo de colza cv. Nexera 8450 y uno de cv. Gospel. Los lotes de colza presentaban muy buen estado agronómico y presencia de *Brassica rapa* en los bordes, con una alta densidad de malezas. Se constataron las condiciones de floración simultánea cultivo-maleza (Figura 2.1).

Durante la misma primavera de 2008 se identificaron otros dos lotes de colza cv. Nexera 8450, con malezas brasicáceas en la cercanía. Sin embargo, en estos lotes no se hallaron poblaciones de *B. rapa*, sino de *Raphanus sativus*. Con el objetivo de evaluar el posible flujo con otra especie brasicácea se recolectaron silicuas de esta maleza. Uno de los lotes se ubicó en Coronel Pringles, en proximidades de Krabbe. En dicho lote se delimitó un sector de 20 x 20 m que fue excluido de la aplicación de herbicidas, dentro del cual se observó alta densidad de *R. sativus*. El otro lote se ubicó sobre la ruta provincial 76, en proximidades del arroyo "El Pantanoso", cercano a la zona de Sierra de la Ventana. El lote presentaba numerosas plantas de *R. sativus* y mostacillas (varias especies) sobre una angosta franja de terreno (<2 m) lindera al alambrado. Sobre el lateral sudoeste del lote se delimitó una franja que fue excluida de la aplicación del herbicida. Allí se permitió la floración y fructificación de las malezas.

Como control se ubicó una población de *B. rapa* sin contacto con cultivos de colza, sobre el margen este de la RP 74, entre Juárez y Tandil. La población se encontraba muy extendida (n >1000) en un bajo inundable, en un área no cultivada.

Tabla 2.1: Condiciones del muestreo original (G0) de seis poblaciones de malezas brasicáceas colectadas tras la floración simultánea con distintos cultivares de colza (*Brassica napus*), incluyendo el cultivar IMI resistente Nexera 8450, y controles utilizados.

Accesión	Origen	Año	Especie	Cultivar cercano	Posición	Tamaño
BAL	Balcarce	2008	<i>Brassica rapa</i>	Nexera 8450 IMI resistente	Grupos continuos en el perímetro del cultivo y tanques de agua para hacienda.	<50
PRI	Coronel Pringles	2008	<i>Raphanus sativus</i>	Nexera 8450 IMI resistente	Dispersas dentro del lote en un sector excluido de la aplicación de herbicida.	>50
SDV	Sierra de la Ventana	2008	<i>Raphanus sativus</i>	Nexera 8450 IMI resistente	Aisladas en un lateral del lote excluido de la aplicación del herbicida.	<10
AZU	Azul	2011	<i>Brassica rapa</i>	N.N. Convencional	Grupo aislado de plantas en la esquina de un lote de colza.	10-50
PIE	Pieres	2011	<i>Brassica rapa</i>	N.N. Convencional	Unas pocas plantas aisladas en el borde entre un cultivo de colza y un camino interno.	<50
ENE	Energía	2013	<i>Brassica rapa</i>	N.N. Convencional	Extenso grupo de plantas sobre alambrado perimetral y banquina de la RP 228.	>1000
Controles						
JUA	Benito Juárez	2008	<i>Brassica rapa</i>	-	Densa población en un bajo no cultivado, aislada de cultivos de colza.	>50
BNR	NEX8450	2008	<i>Brassica napus</i>	-	Semilla comercial cv. Nexera 1700, de Dow.	-
BNC	NEX1700	2010	<i>Brassica napus</i>	-	Semilla comercial cv. Nexera 1700, de Dow.	-

Figura 2.1: Floración simpátrica de la población de *Brassica rapa* BAL lindera a un cultivo de colza (*B. napus*) cv. Nexera 8450 durante la primavera de 2008 (arriba), y de la población ENE en 2013 (abajo).



Avance generacional

Para evaluar la segunda generación (G2) luego del contacto con Nexera 8450, las plantas de la primera generación (G1) se cultivaron en la primavera de 2009. Los plantines fueron criados a partir de la semilla original (G0) en bandejas plásticas de 200 celdas de 2 cm de diámetro y 12 cm³ de capacidad, rellenas con sustrato profesional en base a turba (Grow Mix® Terrafertil). En cada celda se colocaron 3-4 semillas.

Las plantas fueron transplantados al campo experimental en el estado de B2-B3 de la escala CETIOM (Arnoud, 1989). Se utilizaron 800 a 1200 individuos por accesión. La accesión BAL se mantuvo completamente aislada utilizando una jaula con malla para exclusión de insectos de 10,0 m de frente, 12,0 m de lado y 2,8 m de altura. Para favorecer la polinización se colocaron larvas de dípteros en sitios protegidos del interior de la jaula, constándose la emergencia de los adultos dentro de la semana siguiente. Las accesiones de *R. sativus* PRI y SDV, y de *B. rapa* JUA se localizaron a campo abierto en un sector aislado de otras brasicáceas (>300 m) y su polinización fue efectuada por agentes naturales.

Caracterización de las poblaciones en contacto con variedades de colza

Se caracterizó en el campo experimental la progenie de cuatro poblaciones de *Brassica rapa*, colectadas bajo condiciones naturales en las cercanías de lotes de colza (BAL, AZU, PIE y ENE). En todos los casos la floración simpátrica del cultivo y la maleza fue comprobada en los sitios originales. Como controles se utilizaron ocho poblaciones naturales de *B. rapa* y cuatro accesiones de *B. napus* (dos cultivares y dos poblaciones ferales).

La caracterización fue realizada en un jardín común en el departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS), (38°41'46"S, 62°14'55"O), durante dos ciclos, incluyendo los años 2013 y 2014. Las poblaciones fueron sembradas en bandejas multicelda con sustrato comercial (Grow Mix® Terrafertil) y criadas en invernáculo con luz natural, riego diario y a temperatura de 20-25°C. En el estado de B4, en el mes de junio, las plantas fueron trasplantadas al campo experimental, bajo un marco de plantación de 0,3 x 0,5 m.

Las plantas fueron caracterizadas utilizando 41 descriptores, 17 cuantitativos y 24 cualitativos, aceptados internacionalmente, especificados en el Capítulo 1 (IBPGR,

1990). Se utilizó un diseño en bloques incompletos, teniendo en cuenta los valores de la planta individual como repeticiones y los años de evaluación como bloques. Las distintas poblaciones de *B. rapa* se agruparon en un grupo denominado BR, y las de *B. napus* como BN. La progenie de las poblaciones de *B. rapa* colectadas tras el contacto con el cultivo *B. napus* fueron a su vez clasificadas y agrupadas en normales (TBR) y fuera de tipo (FT). Los datos cuantitativos fueron analizados mediante ANOVA y las medias fueron comparadas con el test de Tukey ($p < 0,05$). Los datos cualitativos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se realizó análisis discriminante (AD) basándose en datos cuantitativos y cualitativos. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2015).

Viabilidad del polen

La viabilidad del polen fue estimada en la progenie de las accesiones BAL, AZU, PIE y ENE, que fueron criadas en el campo experimental del Departamento de Agronomía durante el 2015. Las poblaciones fueron sembradas en bandejas multicelda con sustrato comercial (Grow Mix® Terrafertil) y criadas en invernáculo con luz natural, riego diario y a temperatura de 20-25°C. En el estado B4, en el mes de julio, las plantas fueron trasplantadas al campo experimental. Se obtuvieron aproximadamente 100 plantas de cada población. Como control se utilizaron dos poblaciones naturales de *B. rapa* (BR) y una variedad comercial de colza cv. Nexera 1700 (BN).

Se evaluó la viabilidad del polen de todas las plantas FT observadas en cada población. Además se tomaron 5 plantas normales (TBR) al azar dentro de cada población, 5 de dos poblaciones naturales de *B. rapa* (BR) sin contacto con cultivos de colza y 5 del cultivar de *B. napus* Nexera 1700 (BNC). De cada planta se tomó polen de 3 flores, evaluándose en total entre 350 y 1050 granos de polen por planta.

Los granos de polen fueron teñidos en una solución constituida por 10 mL de etanol, 1 mL de solución de 1% de verde de malaquita en 95% de etanol, 50 mL de agua destilada, 25 mL de glicerol, 5 g de fenol, 5 g de hidrato cloral, 5 mL de solución 1% de fucsina en agua, 0,5 mL de solución de 1% G naranja en agua y 1-4 mL de ácido acético glacial (Alexander, 1969). La viabilidad fue calculada como porcentaje del polen teñido por esta solución.

Citometría de flujo

Se realizó un estudio de citometría de flujo para determinar el contenido de ADN y

estimar el nivel de ploidía en 16 individuos identificados como FT en los ensayos de caracterización morfológica, de tres poblaciones de *B. rapa* en contacto con el cultivo *B. napus*. La intensidad de fluorescencia de los núcleos teñidos con DAPI se analizó con el citómetro de flujo PA II Partec (Partec, Münster, Alemania). El contenido de ADN de cada individuo se determinó a partir de muestras de tejido de hoja fresca siguiendo las recomendaciones del manual del Partec kit CySatin UV Precise P 05-5002. Una cantidad de 0,5 cm² de material vegetal se colocó en placas de Petri, junto con una cantidad similar de tejido de los controles. Después de la adición del *buffer* de extracción (0,5 mL), el tejido se cortó con una hoja de afeitar. Tras una incubación de 2 min, las muestras se filtraron a través de una malla de nylon de 50 μ m directamente al tubo de muestra, al que se añadió 1,5 mL de la solución de tinción DAPI (4 6-diamidino-2-fenilindol). La mezcla se incubó durante 2 min más a temperatura ambiente y se analizó. Los niveles de ploidía se estimaron en relación a los picos de ADN en las muestras y el patrón interno.

Respuesta al imazetapir

Se evaluó la respuesta al herbicida imazetapir en los descendientes de segunda generación (G2) de la población BAL, que había estado en contacto con un cultivo de colza (*B. napus*) con resistencia a herbicidas imidazolinonas (cv. Nexera 8450). La aplicación del herbicida imazetapir a doble dosis comercial ($X=100$ g p.a. ha⁻¹=1 L P.C. ha⁻¹) se realizó a los 34 días de la siembra, en el estado B2-B3. Se utilizó un equipo portátil presurizado con aire comprimido a presión constante (50 kg cm⁻²), provisto de una pastilla pulverizadora TJ 8004 EVB. El ancho de labor fue 0,84 m. Se trabajó a una velocidad de 3,8 km h⁻¹, aplicando un caudal de 205 L ha⁻¹ de agua con alquil aril poliglicol éter como coadyuvante (Canaplus 1050®) a razón de 0,05%.

En total se evaluaron 110.000 individuos, sobre los que realizaron observaciones periódicas. La supervivencia se evaluó cinco semanas después de la pulverización utilizando una escala de daño visual, de acuerdo al siguiente detalle: 1 = sin daño, 2 = 25% daño, 3 = 50% daño, 4 = 75% daño, 5 = muerte de plantas (adaptado de Moss et al., 1999; Hashem et al., 2001). Se consideraron supervivientes a aquellas plantas cuyo ápice no había sufrido daño (Walsh et al., 2004). La respuesta fue expresada como porcentaje de supervivencia.

El diseño empleado fue completamente al azar con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por una bandeja (200 celdas), excepto los controles de

colza que fueron de media bandeja en cada caso (100 celdas). Para el análisis estadístico los valores fueron transformados mediante la fórmula

$$y = \arcsen(x + 0,5)^{1/2} \text{ [Ecuación 1]}$$

y las medias se compararon por prueba de Tukey, con el software estadístico Infostat.

En otro ensayo, se evaluaron herbicidas de las cinco familias químicas de inhibidores de la AHAS (Tabla 2.2) en las dos generaciones de la accesión BAL. Como control susceptible se utilizó el biotipo JUA. Los herbicidas fueron aplicados a doble dosis comercial (2X) al estado B3-B4, usando un equipo de aplicación de presión constante equipado con pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB), a 1,45 km h⁻¹ y calibrado para aplicar 202 L ha⁻¹.

Las plantas fueron criadas en bandejas de 10 celdas de 15 mL a razón de dos plantas por celda, con sustrato comercial (Grow Mix® Terrafertil). Las bandejas se mantuvieron en invernadero a 20 ± 5 °C, se regaron dos veces por día y se fertilizaron con una mezcla comercial líquida (Chase LI®, grade 5-3-3).

La supervivencia se evaluó cuatro semanas después de la pulverización, de igual forma que en el ensayo anterior. Cada bandeja fue considerada una unidad experimental. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas.

Tabla 2.2: Herbicidas (Mallory-Smith y Retzinger, 2003) utilizados en el ensayo de resistencia y dosis comercial (X) del principio activo.

Principio activo	Familia química	Nombre comercial	Cultivo	Formulación p.a.	Dosis pa. (g ha ⁻¹)
Imazapir	Imidazolinona	Clearsol	Girasol CL	304 g kg ⁻¹	80,0
Clorimurón	Sulfonilurea	Backup	Soja, Pasturas	250 g kg ⁻¹	15,0
Diclosulam	Triazolpirimidina	Spider	Soja (barbecho)	840 g kg ⁻¹	33,6
Flucarbazone-sódico	Sulfonilamino-carboniltriaolinona	Everest	Trigo	700 g kg ⁻¹	49,0
Bispiribac-sódico	Pirimidiniltio-benzoato	Nominee	Arroz	400 g L ⁻¹	40,0

Caracterización de las plantas resistentes

Un grupo de plantas (15) de la accesión BAL que sobrevivieron la aplicación de herbicidas del ensayo de respuesta al imazetapir de la G2 fueron trasplantadas en macetas de 1,5 L, en una mezcla de suelo y sustrato. Las plantas fueron caracterizadas utilizando descriptores aceptados internacionalmente (IBPGR 1990). Como controles se usaron plantas de la variedad de colza IMI resistente Nexera 8450 (BNR), de la variedad convencional Nexera 1700 (BNC) y del biotipo susceptible JUA. Los individuos de BAL fueron a su vez identificados como fuera de tipo (FT) si presentaban ≥ 2 rasgos de *B. napus*, y analizados por separado. Las observaciones morfológicas cuantitativas fueron realizadas en las plantas individuales criadas en el invernadero, y comparadas en un diseño completamente al azar, utilizando el software estadístico Infostat.

RESULTADOS

Caracterización *in situ*

Los parámetros morfológicos medidos *in situ* utilizando una muestra representativa de individuos (n=10), confirmaron la determinación taxonómica de las malezas halladas en contacto con colza cv. Nexera 8450 (Tabla 2.3). Las accesiones de *B. rapa* JUA y BAL presentaban elevada fecundidad, con más de 800 silicuas por planta. Las silicuas presentaban un rostro fino (Figura 2.2), que era proporcionalmente largo (>20% del largo total), característica inherente a la especie (Mulligan, 1995).

La accesión de *R. sativus* PRI se encontraba en un stand de alta densidad (79 ± 39 pl m^{-2}) compitiendo con plantas de cultivo de colza cv. Nexera 8450 y era de menor porte que el de la accesión SDV, cuyas plantas se hallaban dispersas en una franja sin cultivar, dentro de un ambiente más favorable (Tabla 2.3). En respuesta a las condiciones agroecológicas bajo las que se desarrollaron, las plantas de colza cv. Nexera 8450 también mostraron variación entre los sitios de estudio, siendo Balcarce el ambiente que produjo las plantas de mayor porte, aunque eran escasamente ramificadas, posiblemente debido a que estaban dispuestas a una mayor densidad (> 40 pl m^{-2}).

Tabla 2.3: Morfología (medias \pm desvío estándar, n=10) de malezas brasicáceas (G0) observadas en las condiciones originales de los sitios de recolección durante la primavera de 2008.

Accesión	Planta			Silicua			
	Altura (cm)	Número de ramas	Número de silicuas	Largo (cm)	Rostro (cm)	Relación rostro/silicua	Peso semilla (mg)
BAL	93 \pm 7	3,2 \pm 1,6	803 \pm 291	5,3 \pm 0,4	1,2 \pm 0,2	0,23 \pm 0,02	16
JUA	119 \pm 7	2,9 \pm 2,5	933 \pm 512	6,5 \pm 0,4	0,9 \pm 0,8	0,27 \pm 0,02	17
BNR	151 \pm 5	1,0 \pm 0,0	185 \pm 27	7,2 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	0,18 \pm 0,02	42
PRI	41 \pm 7	7,4 \pm 1,6	28 \pm 9	--	--	--	76
SDV	74 \pm 10	7,5 \pm 1,9	214 \pm 105	--	--	--	50

Figura 2.2: Detalle de la valva y el rostro de la silicua de la accesión de *B. rapa* de BAL (silicua izquierda en cada foto) bajo las condiciones de recolección (G0) y Nexera 8450 (silicua derecha en cada foto).



Caracterización morfológica de poblaciones de *B.rapa* en contacto con *B. napus*

En los descendientes de las cuatro poblaciones de *B. rapa* colectadas en contacto con cultivos de *B. napus* se observaron plantas fuera de tipo (FT), que se diferenciaron a simple vista del resto de las plantas de la población (TBR). Estas últimas eran indistinguibles de plantas de poblaciones puras de *B. rapa* (BR). Las plantas FT en cambio eran visualmente similares a individuos de *B. napus* (BN). La proporción de plantas FT observadas en los distintos ensayos de caracterización fue de entre 7,5% hasta el 44,1%, según la población y el número de individuos evaluados (Tabla 2.4).

Se detectaron diferencias altamente significativas entre BN, BR y FT para 23 de los 40 caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos evaluados mediante ANOVA y la prueba de Kruskal-Wallis. Las plantas FT presentaron cuatro caracteres intermedios entre BR y BN, 12 caracteres similares a BN, uno similar a BR, y seis caracteres transgresivos (Tabla 2.5). El alto de planta, número de ramificaciones principales, color de las hojas inferiores, pubescencia y ausencia de tricomas en las hojas, grado de abrazamiento de las hojas superiores, color y tamaño de pétalos, disposición de pimpollos, número y disposición de las silicuas en la inflorescencia principal, largo del rostro de la silicua y forma de la raíz fueron similares a BN. Entre estos rasgos, el color glauco de las hojas, el abrazamiento mínimo en las hojas superiores no pecioladas y la disposición de los pimpollos por sobre las flores abiertas son caracteres taxonómicos importantes en la diferenciación de las especie *B. napus* y *B. rapa*.

Las plantas FT tuvieron hojas más grandes (ancho, largo y superficie) que las plantas de BN y BR. También el ciclo a floración fue más extenso que para BR y BN, siendo BR las más precoces (96 días) y BN más tardías (104 días), pero sin diferenciarse significativamente entre ellas. En cambio, el largo de las silicuas y el número de semillas llenas por silicua fue menor en los individuos FT que en BN y BR. Esto estaría relacionado con el origen híbrido de estas plantas que ocasionaría problemas de fecundación y reducción de la fertilidad.

El largo del rostro y la relación rostro/valva en BR estuvieron comprendidos entre los valores de 1,0 a 1,7 cm y 0,33 a 0,50 citados para *B. rapa*, y entre 0,8-1,0 cm y 0,14-0,25 en BN, congruentes con los citados para *B. napus* (Mulligan, 1995). En las plantas FT, el valor de la relación rostro/valva fue intermedio entre las dos especies (0,29), diferenciándose de ambas. Otro carácter taxonómico que fue intermedio en las plantas FT fue la biomasa de las semillas que se ubicó en 1,44 mg sm⁻¹, mientras que

en BR fue de 1,12 mg sm⁻¹ y 3,50 mg sm⁻¹ en BN.

Un rasgo de interés que diferenció las poblaciones de BR de los otros grupos de plantas fue la forma de raíz. En las plantas de BR se observó generalmente un engrosamiento de este órgano vegetal, que le confería una forma triangular, con la base fuertemente engrosada y afinándose hacia el extremo. Este carácter se observó con menor frecuencia en las plantas FT, que no se diferenciaron de BN, cuya raíz no presentó engrosamiento.

El análisis discriminante diferenció los grupos BN, BR, TBR y FT (Figura 2.3). Sólo el 6% de los individuos FT fueron clasificados como BN, ninguno fue clasificado como BR o TBR. El 15% de las plantas TBR fueron clasificadas como BR y el 12% de los individuos BR se clasificaron como TBR, mostrando solapamiento y mayor variabilidad entre estos dos grupos. El error de clasificación de las accesiones de *B. napus* fue cero, siendo todos los individuos clasificados como BN. Esto comprueba que si bien las plantas FT son clasificadas de esta forma por la presencia de ciertos caracteres que las asemejan al cultivo *B. napus*, la caracterización real las separa tanto de BR como de BN. Por lo tanto, las plantas FT serían producto de la hibridación interespecífica entre las dos especies y no de contaminación física de semilla.

Tabla 2.4: Proporción de plantas fuera de tipo (FT) observadas en los distintos ensayos de caracterización morfológica. Entre paréntesis el número total de plantas evaluadas.

Accesión	Proporción de plantas fuera de tipo		
	2013	2014	2015
BAL	22,9% (35)	31,0% (34)	8,0% (100)
AZU	11,4% (35)	12,0% (25)	7,5% (106)
PIE	17,1% (35)	26,5% (34)	8,7% (103)
ENE	-	44,1% (34)	18,5% (92)

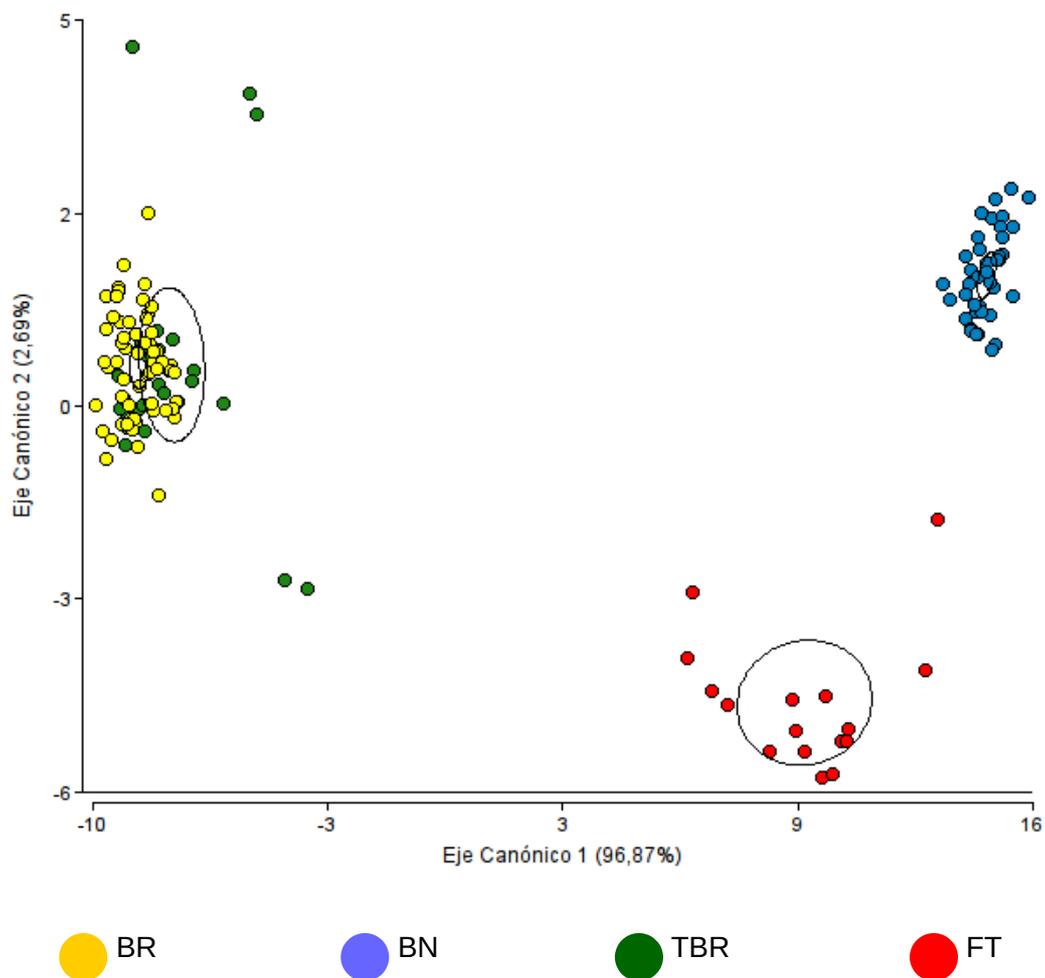
Tabla 2.5: Caracterización morfológica de la progenie de poblaciones naturales de *Brassica rapa* (BR), variedades y poblaciones ferales de *B. napus* (BN), y plantas de poblaciones de *B. rapa* en contacto con cultivos de *B. napus*, clasificadas como normales (TBR) o fuera de tipo (FT).

Caracteres	BR	TBR	FT	BN	Caracter en FT
Ancho cotiledón (cm)	1,8 b	1,8 b		2,3 a	-
Altura de planta (cm)	78,8 b	84,2 b	116,7 a	111,7 a	C
Ramificaciones principales (n)	9,8 b	10,0 b	12,1 a	12,0 a	C
Ancho hoja inferior (cm)	9,9 b	9,7 b	12,9 a	9,9 b	T+
Largo hoja inferior (cm)	20,4 b	19,7 b	33,3 a	20,9 b	T+
Tamaño hoja inferior (cm ²)	220,8 b	204,0 b	449,7 a	223,3 b	T+
Largo peciolo inferior (cm)	4,1 ab	3,4 b	4,9 a	4,4 a	C
Color hoja inferior	2,0 b	2,1 b	5,1 a	7,0 a	C
Pubescencia hoja inferior	4,2 a	4,7 a	1,1 b	0,0 c	I
Tricomas hoja inferior	0,8 a	0,7 a	0,1 b	0,0 b	C
Márgenes hoja superior	0,0 b	0,1 b	0,4 b	2,0 a	I
Color pétalos	3,0 a	3,0 a	2,1 b	2,0 b	C
Largo pétalos (mm)	9,9 c	10,6 b	12,7 a	12,6 a	C
Disposición pimpollos	1,0 b	1,1 b	2,9 a	3,0 a	C
Silicuas inflorescencia ppal (n)	35,6 b	41,1 ab	47,9 a	43,3 a	C
Disposición silicuas	3,0 b	3,0 b	4,0 a	4,0 a	C
Largo silicua (cm)	4,8 b	4,8 b	3,6 c	5,7 a	T-
Ancho silicua (cm)	0,4 ab	0,4 ab	0,3 b	0,4 a	S
Largo rostro (cm)	1,3 a	1,4 a	0,8 b	1,0 b	C
Relación rostro/valva	0,37 a	0,41 a	0,29 b	0,22 c	I
Semillas por silicua (n)	19,5 a	20,1 a	7,3 b	18,0 a	T-
Biomasa semilla (mg sm ⁻¹)	1,12 c	0,99 c	1,44 b	3,50 a	I
Forma raíz	1,6 a	1,2 b	1,3 b	1,0 b	C
Días a floración	95,5 b	93,3 b	124,3 a	103,5 b	T+

Dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

*I: intermedio, C: cultivado (*Brassica napus*), S: silvestre (*Brassica rapa*), T: transgresivo.

Figura 2.3: Análisis discriminante de la progenie de poblaciones naturales de *Brassica rapa* (BR), variedades y poblaciones ferales de *B. napus* (BN), y plantas de poblaciones de *B. rapa* en contacto con cultivos de *B. napus*, clasificadas como normales (TBR) o fuera de tipo (FT). Elipses alrededor de los grupos indican el 99% de confianza.



Viabilidad del polen

La totalidad de las plantas FT presentaron viabilidad del polen reducida, de entre 60 y 73%. En cambio, el polen de las plantas normales (TBR) de las poblaciones con evidencias de flujo génico fue totalmente viable. De igual forma, los controles de *B. rapa* y *B. napus* presentaron 100% de viabilidad del polen (Tabla 2.6). Los valores más extremos de reducción de viabilidad del polen en plantas FT estuvo cercano al 30%.

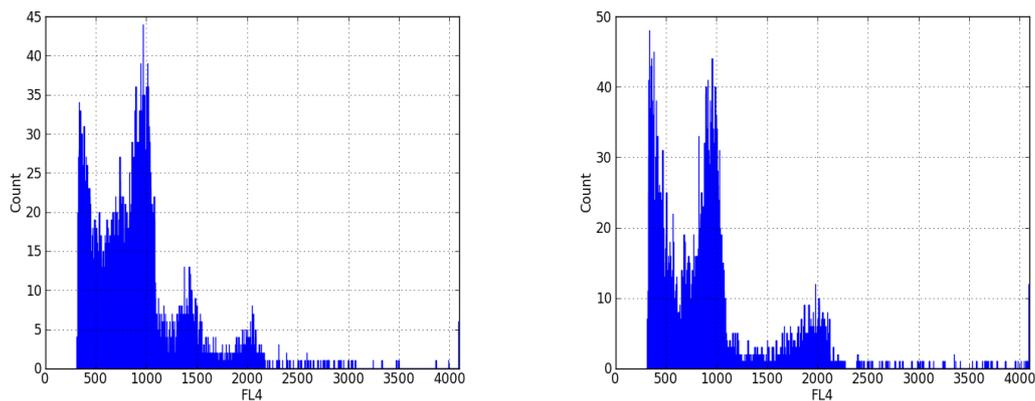
Tabla 2.6: Viabilidad del polen de la progenie de poblaciones de *Brassica rapa* en contacto con cultivos de *B. napus*, clasificadas como normales (TBR) o fuera de tipo (FT), de poblaciones naturales de *B. rapa* (BR), y de una variedad de *B. napus* (BNC).

Accesión	Viabilidad del polen	
	TBR	FT
BAL	100,0 ± 0,0	68,6 ± 4,4 (29,0-92,7)
AZU	100,0 ± 0,0	60,9 ± 3,2 (31,9-85,6)
PIE	100,0 ± 0,0	73,2 ± 2,1 (41,8-87,1)
ENE	100,0 ± 0,0	61,1 ± 1,6 (33,8-81,0)
BNC	100,0 ± 0,0	
BR	100,0 ± 0,0	

Citometría de flujo

De 14 individuos FT analizados mediante citometría de flujo, 10 fueron confirmados como híbridos de primera generación (F1). Estos individuos pertenecían a tres poblaciones distintas de *B. rapa* (BAL, PIE y AZU), colectadas en situación simpátrica con el cultivo de colza (*B. napus*). Los resultados de las restantes plantas no fueron conclusivos debido a la mala calidad del ADN de las muestras. Los picos de ADN diferenciaron claramente las especies puras utilizadas como control y las plantas FT (Figura 2.4). Las muestras de los individuos FT mostraron picos intermedios entre *B. napus* ($2n=38$, AACC) y *B. rapa* ($2n=20$, AA).

Figura 2.4: Contenido relativo de ADN en dos plantas FT de *Brassica rapa*, una de la población PIE (izq) y otra de BAL (der), determinada mediante citometría de flujo.



Respuesta al imazetapir

En la evaluación de la segunda generación (G2) luego del contacto con Nexera 8450 se observó que las dos accesiones de *R. sativus* fueron muy afectadas por el imazetapir aplicado al doble de la dosis comercial (2X), de un modo similar al observado en la población de *B. rapa* sin contacto con colza (JUA). La supervivencia de estas accesiones fue nula (Tabla 2.7). La efectividad de las condiciones de aplicación pudo constatarse en el control susceptible de colza cv. Nexera 1700 (BNC).

La G2 de BAL mostró un nivel de resistencia a la aplicación de imazetapir en doble dosis cercano al 30% de supervivencia. Este valor fue estadísticamente distinto al control resistente (BNR), cuya supervivencia fue del 100%, y también se diferenció de los controles susceptibles (BNC y JUA) y de las accesiones de *R. sativus* (Tabla 2.7).

Las dos generaciones de la población BAL presentaron plantas resistentes a todos los principios activos evaluados, correspondientes a las cinco familias de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS (Tabla 2.8). Los niveles de resistencia general de la población fueron bajos, entre 3 y 25%, en algunos tratamientos sin diferenciarse significativamente del control susceptible JUA. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las dos generaciones de BAL evaluadas.

Tabla 2.7: Respuesta a la aplicación de imazetapir a doble dosis comercial, en la segunda generación (G2; n=4470-9336) de malezas brasicáceas originadas bajo condiciones naturales de floración simultánea con colza (*Brassica napus*) cv. Nexera 8450.

Especie	Accesión	Supervivencia
<i>B. napus</i>	BNR	100,0 ± 0,0 a
	BNC	0,0 ± 0,0 c
<i>B. rapa</i>	BAL	28,1 ± 5,7 b
	JUA	0,0 ± 0,0 c
<i>R. sativus</i>	PRI	0,0 ± 0,0 c
	SDV	0,0 ± 0,0 c

Dentro de la columna las medias con la misma letra no difieren según prueba de Tukey (p <0,05).

Tabla 2.8: Respuesta a la aplicación de doble dosis de distintos herbicidas inhibidores de la enzima AHAS de plantas de la accesión BAL de *Brassica rapa* en dos generaciones posteriores a la floración coincidente con colza (*Brassica napus*) cv. Nexera 8450.

Principio activo	JUA	BAL G1	BAL G2
Imazapir	0,0 ± 0,0	9,1 ± 5,8	5,0 ± 2,9
Clorimurón	0,0 ± 0,0 b	21,9 ± 7,2 ab	25,0 ± 7,8 a
Diclosulam	0,0 ± 0,0	26,9 ± 11,3	16,9 ± 4,9
Flucarbazone	0,0 ± 0,0 b	10,8 ± 0,8 a	6,3 ± 3,0 ab
Bispiribac	0,0 ± 0,0	8,8 ± 3,2	3,1 ± 2,4

Dentro de cada fila, las medias con la misma letra no difieren según prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Fenotipo de las plantas resistentes

Las plantas FT de la accesión BAL, sobrevivientes a la aplicación de imazetapir, se distinguieron por su morfología de la accesión de *B. rapa* JUA (Tabla 2.9). Además, algunas características diferenciaron estas plantas también del cultivar de *B. napus* BNR, como el largo de silicua, que fue menor en las plantas FT.

El color de las hojas, el grado de abrazamiento de las hojas del estrato superior y la disposición de los pimpollos de las plantas FT no se diferenciaron de *B. napus*. La relación rostro/valva fue intermedia entre las dos especies consideradas. Adicionalmente, el elevado grado de aborto de ramas fructíferas y mortandad observada en estas plantas indicarían que se trataba de plantas anormales. Las plantas FT mostraron durante su crecimiento mortandad de ramas reproductivas y aborto de frutos.

Por su parte, un grupo de plantas sobrevivientes a la aplicación de imazetapir en la población BAL presentó una morfología similar a la de la población control de *B. rapa* JUA. Estas plantas (TBR) no se diferenciaron de JUA en caracteres morfológicos distintivos como color de hoja, pubescencia, abrazamiento de las hojas superiores, color de pétalos y disposición de pimpollos, relación rostro/valva y biomasa de semilla.

Tabla 2.9: Caracterización morfológica de la progenie de una población natural de *Brassica rapa* (JUA), una variedad de *B. napus* IMI resistente (BNR) y plantas de una población de *B. rapa* (BAL) que estuvo en contacto con un lote cultivado con colza (*B. napus*) cv. Nexera 8450. Las plantas de la accesión BAL resistieron la aplicación de imazetapir a doble dosis comercial y fueron clasificadas como normales (TBR) o fuera de tipo (FT).

Descriptor	JUA	BAL		BNR
		TBR	FT	
Altura de planta (cm)	67,6 a	47,6 b	55,1 ab	70,4 a
Ramificaciones principales (n)	3,6 a	2,5 ab	1,3 bc	1,1 c
Ancho hoja inferior (cm)	4,8 a	2,9 b	2,3 b	3,2 b
Largo hoja inferior (cm)	10,7 a	6,9 bc	5,7 c	9,5 ab
Tamaño hoja inferior (cm ²)	53,8 a	25,7 b	14,2 b	31,4 ab
Color hoja inferior	2,0 b	2,0 b	3,9 a	7,0 a
Pubescencia hoja inferior	2,1 a	1,1 ab	0,0 b	0,0 b
Abrazamiento hoja superior	2,0 a	1,9 a	1,0 b	1,0 b
Color pétalos	3,0 a	3,0 a	2,4 b	2,0 b
Largo pétalos (mm)	11,3 ab	9,8 b	12,3 a	12,9 a
Disposición pimpollos	1,0 b	1,0 b	2,8 a	3 a
Largo silicua (cm)	5,6 a	4,5 b	3,7 b	6,5 a
Largo rostro (cm)	2,1 a	1,6 b	1,0 c	1,2 c
Relación rostro/valva	0,60 a	0,59 a	0,39 b	0,24 c
Disposición silicuas	3,0 b	3,1 b	3,8 a	4,0 a
Semillas por silicua (n)	11,2 b	10,8 b	5,4 b	18,5 a
Biomasa semilla (mg sm ⁻¹)	2,52 b	2,17 b	3,42 a	3,46 a
Días a floración	139,0 c	154,3 b	172,1 a	171,3 a

Dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

Figura 2.5: Detalle de una hoja de la población de *Brassica rapa* BAL dos generaciones después del contacto con Nexera 8450 (arriba izquierda). Arriba a la derecha se muestra la hoja de la población de *B. rapa* JUA. Abajo a la izquierda, la morfología de las plantas FT que se observaron en BAL, en comparación una hoja de *B. napus* cv. Nexera 8450 (abajo derecha).



B. rapa BAL



B. rapa JUA



B. rapa BAL-FT



B. napus BNR

DISCUSIÓN

Las poblaciones de *B. rapa* colectadas en cercanías de cultivos de colza *B. napus* presentaron plantas que pudieron caracterizarse morfológicamente como fuera de tipo y que evidenciaron la hibridación entre ambas especies. Estas plantas fuera de tipo presentaron varios caracteres similares al parental *B. napus*, otros caracteres fueron intermedios entre las dos especies y un par de caracteres fueron transgresivos, como se ha observado en otras especies (Rieseberg y Carney, 1998). La proporción de plantas FT encontradas en las poblaciones de *B. rapa* (que varió entre 8 y 44%, según las condiciones de ensayo y la accesión), fue similar a los valores de hibridación entre ambas especies encontrado en condiciones naturales (Jørgensen y Andersen, 1994; Halfhill et al., 2002; Warwick et al., 2003).

La producción de silicuas y semillas fue notablemente menor en las plantas FT. Las cruzas interespecíficas suelen resultar en progenie que exhibe una reducida fertilidad y las semillas producidas son generalmente más pequeñas que el promedio de la colza cultivada (Liu et al., 2013). Sin embargo, Bing et al. (1996) y Wei y Darmency (2008) han encontrado que híbridos entre *B. napus* y *B. rapa* poseen semilla de tamaños variables. Esto fue observado en las plantas FT de todas las poblaciones estudiadas, cuya biomasa de semilla presentó valores intermedios entre *B. napus* y *B. rapa*. Si bien las dos especies de *Brassica* están cercanamente relacionadas y comparten un juego de cromosomas, las cruzas interespecíficas suelen resultar en progenie que exhibe reducida fertilidad. Esto se debe principalmente a fallas en el desarrollo del endosperma, caracterizadas por la presencia de núcleos y nucléolos alargados. Esta es la causa principal del aborto temprano de embriones y el desarrollo de semillas vacías o poco llenas (Brown y Brown, 1996).

En la primera generación de cruzamientos controlados entre *B. rapa* y variedades comerciales de *B. napus*, Hansen et al. (2001), hallaron elevada homogeneidad, signos de heterosis y predominio de la morfología de *B. napus*. Con el avance generacional se observó la aparición del fenotipo de *B. napus*, *B. rapa* y plantas con morfología transgresiva, muy pubescentes y aberraciones reproductivas. Estas mismas características fueron observadas en individuos de una población natural mixta, de comprobada hibridación e introgresión, donde se hallaron plantas con caracteres aberrantes y, notablemente, muchos individuos de morfología típica de *B. rapa*, pero con hojas cerosas de color verde-azuladas (glaucas) típicas de *B. napus*.

La viabilidad del polen en todas las plantas FT fue reducida, menor al 70% en promedio, con valores tan bajos como 30% en algunos individuos. Esta baja fertilidad masculina en plantas FT se condice con la observada en híbridos entre *B. napus* y *B. rapa* (Hauser et al., 1998; Pertl et al., 2002; Warwick et al., 2003; Allainguillaume et al., 2006). Esto confirmaría que los individuos FT observados en las cuatro poblaciones de *B. rapa* estudiadas serían producto de la hibridación entre las dos especies. También explicaría la baja producción de silicuas y semillas en estas plantas.

Estos resultados fueron confirmados por el estudio de citometría de flujo, que comprobó que la mayor parte de las plantas caracterizadas morfológicamente como fuera de tipo presentaban valores de ADN intermedios entre las dos especies. La efectividad de este método para la detección de híbridos entre *B. napus* y *B. rapa* ha sido probada en numerosas ocasiones (Wilkinson et al., 2000; Leflon et al., 2006; Allainguillaume et al., 2006; Aono et al., 2011).

Bajo las condiciones en que se evaluó la respuesta al imazetapir en dos generaciones siguientes al contacto con colza cv. Nexera 8450, la accesión BAL presentó plantas con resistencia a altas dosis del herbicida imazetapir (2X). Esta resistencia, si bien fue baja en forma general (entre el 10 y el 30%), confirmó que la resistencia a herbicidas puede pasarse del cultivo a la maleza emparentada. Las plantas que resistieron la aplicación del herbicida presentaron una morfología variable, encontrándose plantas similares al parental *B. rapa*, como otras FT. Esto implicaría que los niveles de hibridación serían mayores de los que pueden detectarse sólo con la identificación morfológica de individuos FT. Algunos individuos híbridos presentarían una morfología similar a *B. rapa* que los harían indistinguibles de la población silvestre. Esto ha sido observado en otros estudios, algunos afirmando que la totalidad de los híbridos presentan morfología similar a *B. rapa* (Warwick et al., 2003). Otros estudios han encontrado caracteres intermedios en los híbridos e incluso aberraciones (Hansen et al., 2001; Aono et al., 2011).

La presencia de plantas resistentes a las cinco familias AHAS evidenciaría el flujo con la variedad de colza Nexera 8450, IMI resistente. De acuerdo a Tan et al. (2005), todas las variedades de colza con resistencia a imidazolinonas presentan la mutación Trp574Leu en el gen de la enzima AHAS. Esta mutación, presente en el genoma A compartido por *B. napus* y *B. rapa*, confiere resistencia a las 5 familias químicas de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS.

Por otra parte se observó un leve aumento de la resistencia entre las dos generaciones de la accesión BAL para algunos herbicidas. En el avance generacional realizado bajo condiciones de aislamiento en el campo experimental, se observaron cambios en la uniformidad fenotípica dentro de la accesión, con la presencia de plantas FT, y una proporción de plantas que no florecieron. Dado que esta generación se cultivó utilizando una fecha de siembra primaveral, la falta de inducción pudo deberse al incumplimiento de requerimientos de vernalización. En el estado de roseta las plantas que no se indujeron poseían rasgos de *B. napus*, como el color de sus hojas, que eran glaucas. Debido a que la accesión BAL fue colectada en cercanías de dos cultivares de colza, uno con resistencia a herbicidas imidazolinonas (Nexera 8450) y otro convencional, de ciclo invernal (Gospel), esta fracción de plantas sin inducir podrían ser híbridos con ese cultivar invernal. Al no alcanzar los requerimientos de vernalización y no florecer, estas plantas no aportaron polen para la generación de la G2. Por su parte, la fracción de plantas inducidas tampoco mostró una absoluta concordancia con los descriptores de *B. rapa*, dado que también presentaron plantas FT, probablemente producto de la hibridación con el cultivar de colza primaveral con resistencia a herbicidas.

Las poblaciones de nabón (*Raphanus sativus*) mostraron una consistente uniformidad fenotípica en las tres generaciones observadas. En las dos accesiones evaluadas se constató elevada susceptibilidad al herbicida en las dos generaciones luego del contacto con Nexera 8450, y fueron muy afectadas por la aplicación de imazetapir a doble dosis comercial.

Como consecuencia de lo antedicho emerge que el riesgo de flujo génico entre el cultivo de colza (*B. napus*) y el nabo silvestre (*B. rapa*), y la posible transferencia de la resistencia a herbicidas a esta maleza es altamente probable. La presencia de plantas híbridas en las cuatro poblaciones de *B. rapa* evaluadas fue confirmada mediante distintos métodos (morfología, fertilidad masculina, contenido de ADN, resistencia a herbicidas). El riesgo de impacto ambiental inherente al empleo de variedades de colza con resistencia a herbicidas es real, aunque la baja fertilidad de los híbridos podría atenuar el efecto y reducir la dispersión de estos biotipos.

Todos los cultivares de colza disponibles en Argentina pertenecen a la especie *B. napus* y el cultivo de variedades transgénicas está prohibido. No obstante, desde hace un par de años se comercializan líneas no transgénicas con resistencia a herbicidas

imidazolinonas (CL) (INASE, 2015). El riesgo ambiental no es distinto en cultivos genéticamente modificados que en cultivos obtenidos por mejoramiento convencional (Senior y Bavage, 2003). Esta situación y el riesgo comprobado de flujo génico con la maleza *B. rapa* requiere un uso responsable de estas variedades, de los herbicidas empleados y del sistema de producción.

Capítulo 3: CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ENZIMA AHAS EN BIOTIPOS MALEZA DE *Raphanus sativus*

El rábano o rabanito (*Raphanus sativus* L.) es una especie herbácea, dicotiledonea, anual u ocasionalmente bienal, usualmente cultivada por sus raíces comestibles. Es una especie autoincompatible de polinización cruzada obligada, generalmente entomófila (Hernández Bermejo, 1993; Snow y Campbell, 2005; Kaneko et al., 2011).

El género *Raphanus* comprende dos especies básicas: *R. sativus* engloba todas las formas botánicas cultivadas mientras que *R. raphanistrum* L. es el antecesor silvestre, que crece en forma natural en diversas regiones del planeta. Ambas especies son diploides, con nueve pares de cromosomas y pueden hibridarse entre sí (Warwick y Anderson, 1999).

Raphanus sativus no ha sido hallado en estado silvestre. Se considera que es el producto de la domesticación de *R. raphanistrum* (Gómez-Campo y Prakash, 1999; Warwick, 2011). Esta última es una de las malezas más agresivas a nivel mundial, reportada en más de 45 cultivos en al menos 65 países (Blackshow et al., 2002; Snow y Campbell, 2005; Warwick y Francis, 2005). Nativa de las costas del Mediterráneo (Europa, el Oriente Medio y el norte de África), se encuentra naturalizada en regiones templadas de los dos hemisferios (Warwick y Francis, 2005). La presencia de *R. raphanistrum* como maleza en la Argentina ha sido documentada por diversas fuentes (Parodi, 1964; Boelcke, 1967; Marzocca et al., 1976; Martínez-Laborde, 1999), como una especie adventicia rara.

Se considera que las poblaciones de *R. sativus* que crecen en forma natural corresponden a formas endo o exoferales derivadas del biotipo domesticado por escapes del cultivo. El nabón es una especie invasora muy perjudicial en zonas templadas de Sudamérica, incluyendo Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Chile, México y Estados Unidos (Panetsos y Baker, 1967; Snow y Campbell, 2005; Theisen, 2008; Kaneko et al., 2011). Poblaciones ferales de *R. sativus* han sido descritas también en Europa y Asia oriental (Hernández Bermejo, 1993; Kaneko et al., 2011).

En Argentina, *R. sativus* es una maleza muy común de cultivos de cereales, oleaginosas y hortícolas de la región pampeana, reconocida desde la década de 1930 (Ibarra, 1937). Se encuentra presente como adventicia en 20 provincias (siendo

excepciones las provincias de Santiago del Estero, Formosa y Chaco) (Martínez-Laborde, 1999) y en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, se encuentra particularmente presente hallándose como maleza en casi la mitad de los cultivos de trigo relevados en el sur de la provincia de Buenos Aires, entre 2004 y 2005 (Scursoni et al., 2014). La interferencia de *R. sativus* en soja fue evaluada en Brasil, y se demostró que la presencia de entre 42 y 50 plantas m⁻² provocó una caída del rendimiento cercana al 15% (Fleck et al., 2006; Bianchi et al., 2011).

El nabón crece principalmente en hábitats disturbados, como los márgenes de los caminos, y en suelos agrícolas. Es una maleza anual que se propaga por semilla, con una raíz pivotante gruesa blanquecina o a veces coloreada. Su ciclo es invernal, con nacimientos concentrados en mayo, y florece y fructifica desde primavera hasta principios del otoño. Las semillas del nabón aparecen como impurezas de los granos de cereales y oleaginosas (Parodi, 1964; Boelcke, 1967; Marzocca et al., 1976). Con base en observaciones propias, hemos podido comprobar que si las condiciones son favorables, puede desarrollar un ciclo estival con plántulas naciendo durante la primavera y principios del verano y floreciendo en otoño. Esto ha sido observado también por algunos autores para *R. raphanistrum*. Al igual que *R. sativus*, esta especie es descrita como anual de ciclo otoño-invernal, pero ha sido comprobada su emergencia tanto en otoño-invierno como en primavera-verano, actuando como una especie facultativa (Mekenian y Willemsen, 1975; Malik, 2009).

En distintas regiones del planeta las dos especies de *Raphanus* han desarrollado resistencia a herbicidas. Se han hallado biotipos de *R. raphanistrum* con resistencia cruzada a distintos herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en Australia, Sudáfrica y Brasil, y con resistencia múltiple a herbicidas de distinto modo de acción (incluyendo inhibidores AHAS, hormonales, inhibidores de la enzima PDS e inhibidores del fotosistema II), también en Australia (Walsh et al., 2001; Hashem et al., 2001; Smit y Cairns, 2001; Walsh et al., 2004; Costa y Rizzardi, 2014). Recientemente se ha sumado en esta especie la resistencia a glifosato (Ashworth et al., 2014).

En nuestro continente, Theisen (2008) confirmó la existencia de un biotipo de *R. sativus* resistente a herbicidas en el sur de Brasil. En esa región, donde predomina el sistema de labranza cero, se impulsó el empleo de cultivos de cobertura para mejorar la eficiencia del sistema. En particular el nabo forrajero (*R. sativus* var. *oleiferus*) se

difundió con ese propósito. Con el tiempo, comenzaron a aparecer plantas voluntarias que se dispersaron y formaron poblaciones ferales de *R. sativus* que reemplazaron a las de *R. raphanistrum*. A partir de 2001, algunas de estas poblaciones ferales comenzaron a escapar al control químico, hasta comprobarse la existencia de resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS (metsulfurón, clorimurón, cloransulam e imazetapir). En 2011, un caso similar fue denunciado en Chile (Heap, 2015).

La enzima AHAS, también conocida como ALS, es la primera enzima común en la biosíntesis de los aminoácidos ramificados valina, leucina e isoleucina. Cinco familias químicas de herbicidas actúan inhibiendo la AHAS: las sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolpirimidinas (TRP), sulfonilamino-carboniltriiazolinonas (SCT) y pirimidiniltio-benzoatos (PTB). Los herbicidas inhibidores de la AHAS son usados globalmente debido a su baja dosis de aplicación, baja toxicidad, bajo impacto ambiental, selectividad, alta efectividad y residualidad (Duggleby y Pang, 2000; Tan y Medd, 2002; Duggleby et al., 2008).

Las malezas resistentes a este tipo de herbicidas han sido seleccionadas por el uso repetido y prolongado de los mismos, en cultivos de cereales, soja, arroz, forestales, y en las banquinas de carreteras, caminos secundarios, vías de ferrocarril (Heap, 1997). La resistencia a estos compuestos fue denunciada por primera vez en 1987 en una población de lechuga silvestre en 1987, sólo 5 años tras la introducción de la primer SU (Primiani et al., 1990). Desde ese momento, ha habido un crecimiento sostenido en el número de malezas resistente a AHAS que a nivel mundial supera las diez docenas de casos. En la actualidad se conocen más de 150 especies de malezas resistentes a herbicidas inhibidores de la AHAS, más que a cualquier otro grupo de herbicidas (Heap, 2015).

Estas malezas resistentes poseen variantes de la AHAS con baja afinidad a los herbicidas, conferida por una o varias mutaciones puntuales en el gen que codifica la enzima, y mantienen la producción de los aminoácidos mencionados aún en presencia del activo (Holt et al., 1993; Tan y Medd, 2002; Yu et al., 2003). A la fecha se conocen 26 sustituciones de aminoácidos en 8 sitios del gen de la enzima AHAS que confieren resistencia a herbicidas en malezas. Estos son Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Arg377, Trp574, Ser653 y Gly654 (numeración de los aminoácidos basada en la secuencia de la AHAS de *Arabidopsis thaliana* L.), cuatro de ellos (subrayados)

identificados en biotipos de *R. raphanistrum* (Tranel y Wright, 2002; Tan y Medd, 2002; Yu et al., 2012; Yu y Powles, 2014; Tranel et al., 2015).

El conocimiento de los factores internos y externos que posibilitan la aparición de resistencia permite diseñar medidas para mitigar el incremento de biotipos nocivos. Se recomienda que las medidas de manejo reduzcan la presión de selección y que los herbicidas actúen sobre distintos sitios de acción, aunque esto podría no ser suficiente en el caso de malezas con resistencia múltiple. Se requiere un manejo integrado incluyendo técnicas de control no químicas, monitoreos y estudios de la dinámica poblacional a campo, para comprender los factores que determinan la tasa evolutiva, especialmente la eficiencia reproductiva y el flujo génico (Holt et al., 1993; Prather et al., 2000; Walsh y Powles, 2007).

La probabilidad de emergencia de malezas con resistencia cruzada a varios herbicidas aumenta en los ambientes donde se emplean principios activos con el mismo sitio de acción. Este es el caso de los herbicidas SU e IMI, que actúan sobre la AHAS (Tan et al., 2005). El metsulfurón es un herbicida SU de muy bajo costo que se utiliza en el país desde hace más de una década, al igual que el imazapir, que es una IMI intensamente utilizada para soja antes que irrumpiera en el mercado la variante RR, con resistencia transgénica a glifosato (Leguizamón, 2009). En nuestro país, el empleo masivo de herbicidas con el mismo sitio de acción podría propiciar la emergencia de biotipos resistentes.

En la actualidad, el metsulfurón es el herbicida residual más utilizado para el control temprano de malezas en trigo (Leguizamón, 2009). Las sulfonilureas muestran un amplio rango de persistencia en el suelo, dependiendo del pH, la temperatura y la composición edáfica. La vida media del metsulfurón en el suelo ha sido calculada entre 20 y 80 días (Walker et al., 1989; James et al., 1995; Rouchaud et al., 1999), inicialmente concentrada en los primeros 2 cm del suelo, y descendiendo progresivamente hasta los 10 cm. Estos datos fueron corroborados para las condiciones argentinas por Bedmar et al. (2006), quienes encontraron persistencias de entre 38 y 51 días para suelos de Balcarce, cercanos a donde fueron halladas poblaciones de nabón resistentes. Esta degradación progresiva del metsulfurón en el suelo coincide con los nacimientos tardíos de nabón a fines de primavera y principios del verano, observados tanto en ambientes ruderales como en cultivos avanzados de cereales.

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un cultivo oleaginoso tradicional en Argentina, con un área sembrada promedio en la última década de 2 millones de ha y una importante participación en el mercado internacional (De la Vega et al., 2007; FAOSTAT, 2015). Las malezas son una de las limitaciones más importantes para la producción de girasol, teniendo en cuenta que la disponibilidad de herbicidas selectivos es reducida, en especial en sistemas de labranza cero. Los herbicidas post-emergentes disponibles para girasol son en su mayoría gramínicidas para el control de especies monocotiledóneas. El desarrollo de híbridos de girasol con resistencia a herbicidas imidazolinonas permitió ampliar el control de malezas, incluyendo especies dicotiledóneas (Tan et al., 2005; Sala et al., 2012). Los cultivares de girasol resistentes a herbicidas imidazolinonas son comercializados en el país desde 2003, bajo la marca comercial Clearfield, y esta tecnología es actualmente utilizada en más del 45% del área sembrada con girasol (BASF, 2014).

En 2008, una población de nabón que resistió la aplicación de imazapir fue hallada en un campo del SE de la provincia de Buenos Aires, donde se había cultivado una variedad de colza-canola con resistencia a herbicidas IMI. Entre fines de 2010 y principios de 2011 varios cultivos de girasol con resistencia a IMI de la misma región resultaron severamente invadidos por poblaciones de *R. sativus*, que no fueron controladas por el imazapir. Los productores alertaron a técnicos de la empresa de agroquímicos BASF Argentina S.A. de esta situación. Dado que en Argentina la tecnología CL en girasol es relativamente nueva, la resistencia a IMI fue inesperada, y ocasionó un serio impacto económico. Adicionalmente, estos episodios imprevistos de falta de control del nabón podrían afectar la validez de la técnica CL.

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar las poblaciones de nabón (*Raphanus* sp.) resistentes a herbicidas AHAS, evaluar las condiciones agroecológicas de su emergencia y diseñar medidas de control alternativo. Se hipotetiza que los biotipos de *Raphanus* sp. presentarán resistencia cruzada a distintas familias de herbicidas inhibidores de la AHAS, que comparten el mismo sitio de acción, seleccionadas bajo las condiciones de campo debido a aplicaciones reiteradas del mismo grupo de herbicidas en los distintos cultivos de la rotación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y sitios de recolección

Durante 2008 se colectaron plantas de un pequeño grupo de *R. sativus* resistente a herbicidas AHAS, consideradas la generación inicial (G0) de la accesión BAL-1A (Tabla 3.1). Estas plantas se hallaron finalizando la floración dentro de un lote de colza resistente a IMI que había recibido una dosis comercial de imazetapir (n.c. Pivot), ubicado en el SE de la provincia de Buenos Aires, en cercanías de la localidad de Balcarce (Figura 3.1). En ese mismo momento se tomaron muestras de la población de *R. sativus* ubicada en el borde del alambrado del lote, que se consideró la G0 de la accesión BAL-1B. En la primavera siguiente se tomaron muestras de una población de *R. sativus* dentro del lote invadido, cultivado con trigo, y de las plantas del borde del alambrado, consideradas las accesiones BAL-2A (dentro) y BAL-2B (fuera del lote). Lo mismo se realizó dos años después, pero sólo se recogieron semillas de plantas dentro del lote (BAL-4).

Se realizaron observaciones de la flora del lote invadido y su entorno durante cuatro primaveras sucesivas, mediante la escala semi-cuantitativa desarrollada por Domin-Krajina (Mueller-Dombois y Ellenberg, 1974). Los registros históricos del manejo agrícola del lote fueron provistos por los responsables técnicos del establecimiento (Herrera Vega, com. pers.).

En 2010, dos accesiones de *R. sativus* de difícil control fueron halladas en lotes cercanos a la localidad de Necochea (ERC y SJQ). Otra población de *R. sativus* resistente a herbicidas se encontró en 2011, formando una extensa población dentro de un cultivo de girasol CL, en un establecimiento de Pieres (PIE-A), partido de Lobería (Buenos Aires). Estas poblaciones fueron reportadas a técnicos de la empresa química BASF Argentina S.A., por los productores (Migasso y Sakima, com. pers.). La semilla de las plantas de *R. sativus* colectadas dentro del lote dio origen a la accesión denominada PIE-A. Se cosechó semilla de las plantas que crecían en los sectores no cultivados del lote, próximos al alambrado perimetral (PIE-B).

Como control susceptible se utilizó el biotipo SDV colectado en Sierra de la Ventana, al SO de la provincia de Buenos Aires, en un sitio en el cual no se registraban aplicaciones de herbicidas. Al momento de la toma de muestras, la población del biotipo SDV tenía un tamaño medio ($n > 300$ plantas) y se extendía en la banquina de

la ruta provincial 76.

Las semillas de todas las accesiones fueron separadas de las silicuas a mano o mediante el uso de un mortero, con mínimo daño. Fueron limpiadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta su uso.

Se realizó la multiplicación controlada de la accesión BAL-1A para originar la accesión G1 denominada BAL-3. Para ello las plantas G0 ($n > 300$) se criaron en sustrato profesional en base a turba (Grow Mix® Terrafertil) en bandejas plásticas con 200 celdas de 12 cm³. Luego de un mes de cría los individuos fueron trasplantados al campo experimental (Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur) en el estado 1.2 a 1.3, según la escala decimal propuesta por Madafiglio et al. (1999). La G1 estuvo constituida por más de 300 plantas y se mantuvo completamente aislada de otros *Raphanus* mediante una malla para exclusión de insectos dispuesta en una jaula de 10,0 m x 12,0 m x 2,8 m. Para favorecer la polinización, semanalmente se liberaron dípteros polífagos en el interior de la jaula. La semilla cosechada sobre las plantas G1 se almacenó en condiciones similares a la G0.

Figura 3.1: Ubicación geográfica de las poblaciones de *Raphanus sativus* caracterizadas en los distintos ensayos.

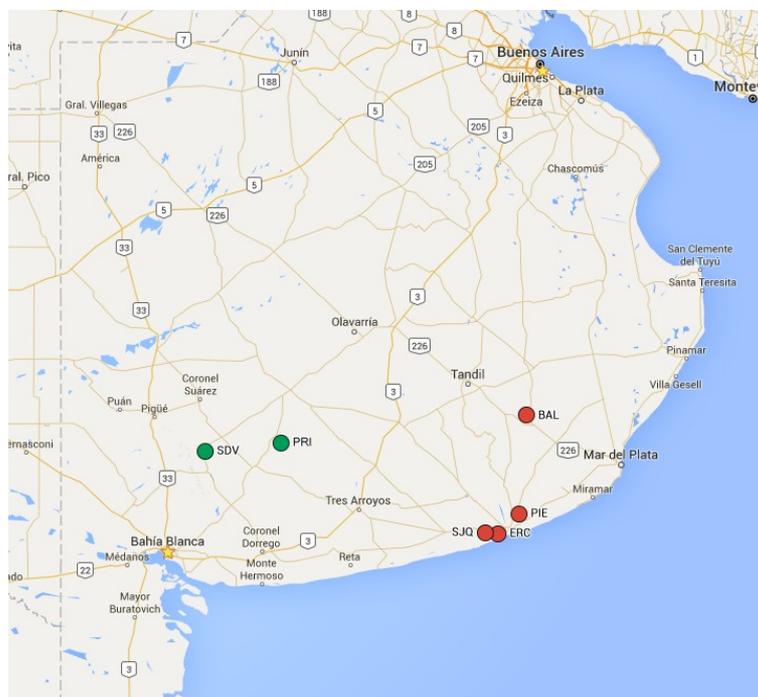


Tabla 3.1: Detalle de las accesiones de *Raphanus sativus* utilizadas en los ensayos.

Código	Origen	Lugar de recolección	Año
BAL-1A	Balcarce	Establecimiento San Juan. Dentro de un cultivo de colza IMI resistente.	2008
BAL-1B	Balcarce	Establecimiento San Juan. Borde de un cultivo de colza IMI resistente.	2008
BAL-2A	Balcarce	Establecimiento San Juan. Dentro de un cultivo de trigo, siguiente a colza IMI resistente.	2009
BAL-2B	Balcarce	Establecimiento San Juan. Borde de cultivo de trigo.	2009
BAL-3	Balcarce	Avance generacional de BAL-1A en jaula de exclusión de insectos en campo experimental.	2010
BAL-4	Balcarce	Establecimiento San Juan. Dentro de un cultivo de trigo.	2011
ERC	Necochea	Establecimiento El Rinconcito. Dentro de un lote agrícola en barbecho.	2010
SJQ	Necochea	Establecimiento San Joaquín. Dentro de un lote agrícola en barbecho.	2010
PIE-A	Pierres	Establecimiento La Holandesa. Dentro de un cultivo de girasol CL.	2011
PIE-B	Pierres	Establecimiento La Holandesa. Borde de un cultivo de girasol CL.	2011
SDV	Sierra de la Ventana	Banquina de la RP 75 en un sector sin selección por herbicidas.	2008

Screening de la resistencia

Se evaluó la respuesta a seis herbicidas de cuatro familias químicas y tres sitios de acción distintos en cinco accesiones de *R. sativus* (SDV, BAL-1A, ERC, SJQ y PIE-A). Los herbicidas utilizados fueron dos IMI (imazetapir e imazamox), dos sulfonilureas (metsulfurón e iodosulfurón), 2,4-D y glifosato. Como controles se utilizaron dos variedades de colza-canola, una convencional (cv. Nexera 1700, de Dow Agrosiences S.A.) (BNC) y otra con resistencia a IMI (cv. Nexera 8450) (BNR).

Las plantas se criaron en macetas de 15 cm de diámetro, a razón de 10 individuos por maceta, bajo condiciones controladas en invernadero con dos riegos diarios, en una mezcla de suelo más sustrato (75% suelo, 25% sustrato Grow Mix® Terrafertil). Durante el desarrollo del ensayo se aplicó un fertilizante grado 5-3-3 (Chase LI 533) a razón de 10 L ha⁻¹ y aplicaciones periódicas de imidacloprid al 35% (Punto 35 Gleba, SC, 0,5 mL ha⁻¹).

La aplicación de los herbicidas fue realizada a los 53 días de la emergencia, a doble dosis comercial, cuando las plantas estaban en el estado de roseta (1.3-1.4) mediante un equipo experimental provisto con una pastilla Teejet 8004 EVB. Se trabajó a una velocidad de 4 km h⁻¹ con un caudal de 188,33 L ha⁻¹ y se utilizó tensioactivo no iónico (Sandowett®, alquil aril poliglicol éter 50%) a razón de 0,25%. Luego de la aplicación, se excluyó el riego durante 24 h para evitar el lavado del principio activo.

La supervivencia se evaluó cinco semanas después de la pulverización utilizando una escala de daño visual, de acuerdo al siguiente detalle: 1 = sin daño, 2 = ≤ 25% daño, 3 = 26 - 75% daño, 4 = > 75% daño, 5 = muerte de plantas (adaptado de Moss et al., 1999; Hashem et al., 2001). La respuesta fue expresada como porcentaje de supervivencia y las accesiones se designaron resistentes si el 20% de los individuos sobrevivían a la aplicación del herbicida, como fue descrito por Moss et al. (1999). Cada maceta fue considerada una unidad experimental. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. Posteriormente, se cosechó el material aéreo vivo y se lo secó en estufa a 40 °C hasta peso constante.

La supervivencia de plantas y la acumulación de biomasa se calcularon como porcentaje sobre el control sin tratamiento. La materia seca viva remanente también fue expresada como porcentaje del control sin tratamiento. Los datos fueron transformados por la *Ecuación 1* para el ANOVA con el paquete estadístico Infostat (Di

Rienzo et al., 2015). Las medias se compararon empleando el test de Tukey.

$$y = \arcsen (x + 0,5)^{1/2} \text{ [Ecuación 1]}$$

Evaluación de la resistencia a 5 familias de herbicidas inhibidores de la AHAS

Se evaluaron herbicidas de las cinco familias químicas de inhibidores de la AHAS (Tabla 3.2). El material vegetal evaluado comprendió las accesiones de PIE y BAL colectadas en sucesivos años, incluyendo aquellas halladas en los bordes de los lotes. Las plantas fueron criadas en bandejas de 10 celdas de 15 mL a razón de dos plantas por celda, con sustrato comercial (Grow Mix® Terrafertil). Las bandejas se mantuvieron en invernadero a 20 ± 5 °C, se regaron dos veces por día y se fertilizaron con una mezcla comercial líquida (Chase LI®, grade 5-3-3).

Los herbicidas fueron aplicados a doble dosis comercial (2X) al estado 1.3-1.4, usando un equipo de aplicación de presión constante equipado con pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB), a $1,45 \text{ km h}^{-1}$ y calibrado para aplicar 202 L ha^{-1} .

La supervivencia se evaluó cuatro semanas después de la pulverización, de igual forma que en los ensayos anteriores. Cada bandeja fue considerada una unidad experimental. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas.

Tabla 3.2: Herbicidas (Mallory-Smith y Retzinger, 2003) utilizados en los ensayos de resistencia y dosis comercial (X) del principio activo.

Familia química	Principio activo	Nombre comercial	Formulación p.a.	Dosis g ha⁻¹
Imidazolinonas	Imazapir	Clearsol	304 g kg ⁻¹	80,0
	Imazetapir	Pivot	700 g kg ⁻¹	100,0
	Imazamox	Sweeper	700 g kg ⁻¹	49,0
Sulfonilureas	Metsulfurón-metil	Genérico	600 g kg ⁻¹	6,0
	Iodosulfurón	Hussar	53 g kg ⁻¹	3,2
	Clorimurón	Backup	250 g kg ⁻¹	15,0
Triazolpirimidinas	Diclosulam	Spider	840 g kg ⁻¹	33,6
	Flumetsulam	Preside	120 g L ⁻¹	36,0
Sulfonilamino-carboniltriaolinonas	Flucarbazone-sódico	Everest	700 g kg ⁻¹	49,0
Pirimidiniltio-benzoatos	Bispiribac-sódico	Nominee	400 g L ⁻¹	40,0
Glicinas	Glifosato (Sal isopropilamina)	Roundup	480 g L ⁻¹	1440
Fenoxis	2,4-D (Sal)	Genérico	602 g L ⁻¹	602

Dosis-respuesta

Se evaluó la respuesta de las accesiones a un rango de dosis de imazetapir y metsulfurón, correspondientes a 0, 1/25, 1/10, 1/5, 1/2, 1, 2, 5, 10 30 y 50 veces la dosis comercial (100 g ha⁻¹ para imazetapir y 6 g ha⁻¹ para metsulfurón-metil). Los herbicidas se aplicaron a los 29 días de la emergencia, cuando las plantas estaban en el estado 1.4 a 1.6. Se utilizó un equipo para experimentación provisto con una pastilla Teejet 8004 VB XR. Se trabajó a una velocidad de 4,5 km h⁻¹ con un caudal de 183,7 L ha⁻¹ de agua más tensioactivo no iónico (Sandowett®, alquil aril poliglicol éter 50%) al 0,25%. Luego de la aplicación, se excluyó el riego durante 24 h para evitar el lavado del principio activo.

Las plantas se criaron en invernadero con fotoperíodo natural, 20 ± 5 °C y dos riegos

diarios. El manejo de la nutrición mineral y sanidad de las plantas se realizó de la misma forma que el ensayo de evaluación general, más nitrato de amonio a razón de 50 kg ha⁻¹. La supervivencia y la acumulación de biomasa seca aérea se evaluaron a los 27 días del tratamiento, del mismo modo que en el ensayo de caracterización de la resistencia. El ensayo de dosis-respuesta fue repetido en dos años distintos.

Las datos fueron ajustados mediante regresiones no lineales a modelos log-logísticos con tres parámetros, Weibull tipo 1 y Weibull tipo 2 y se confeccionaron las curvas de dosis-respuesta, utilizando el paquete drc (dose response curves) del programa estadístico R 3.2.2 (R Core Team, 2015). Mediante esta técnica se estimaron los valores de DL₅₀ (dosis de herbicida requerida para matar el 50% de los individuos de un biotipo) y GR₅₀ (dosis de herbicida requerida para reducir en un 50% la biomasa de los individuos de un biotipo). El grado de resistencia de las poblaciones fue definido mediante el cálculo de un factor de resistencia dado por el cociente entre los valores de DL₅₀ y GR₅₀ de la población resistente y los de la población susceptible.

La ecuación del modelo logístico utilizada fue:

$$Y = d / 1 + \exp \{b [\log(x) - \log(e)]\} \text{ [Ecuación 2]}$$

La ecuación del modelo Weibull tipo 1 utilizada fue:

$$Y = d (\exp \{-\exp [b(\log(x) - \log(e))]\}) \text{ [Ecuación 3]}$$

La ecuación del modelo Weibull tipo 2 utilizada fue:

$$Y = d [1 - \exp (-\exp \{b [\log(x) - \log(e)]\})] \text{ [Ecuación 4]}$$

donde Y es el porcentaje de supervivencia o la materia seca remanente, e representa el punto de inflexión de la curva, d es el límite superior de la curva, b describe la pendiente alrededor de e , y x (variable independiente) es la dosis de herbicida. El límite inferior fue fijado en 0 (3 parámetros), asumiendo que a altas dosis todas las plantas mueren (Seefeldt et al., 1995; Nielsen et al., 2004; Knezevic et al., 2007).

Base molecular de la resistencia

Plantas de las accesiones resistentes BAL-1A, ERC, SJQ y PIE-A fueron criadas en condiciones controladas de invernadero, como fue descrito en los ensayos de resistencia. Se incluyó como controles la accesión susceptible SDV y dos poblaciones más de zonas sin selección con herbicidas (PRI y LPA). Se tomaron hojas jóvenes de

10 plantas de cada accesión y fueron secadas mediante silica gel, en bolsas plásticas tipo ziploc. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de DNA Landmarks en Canadá para su análisis molecular.

El ADN de los individuos fue extraído siguiendo el protocolo interno de DNA Landmarks. La concentración del ADN de las muestras fue medida mediante fluorescencia de Hoescht, y la calidad de las muestras se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los primers WR122F y W653R (Yu et al., 2012) fueron usados para amplificar la región del gen de la enzima AHAS que contiene todas las potenciales mutaciones que confieren resistencia a herbicidas. El producto de ~1720 pbs obtenido por estos primers cubrió más del 90% de la secuencia que codifica la enzima AHAS en *Arabidopsis thaliana* L. y el 100% de la secuencia codificante conservada en especies vegetales. El producto de PCR de ~1720 pbs fue corrido en gel de agarosa, y las bandas de interés fueron purificadas usando el kit Zymoclean y disueltas en 2X 8 µL de agua. Los productos purificados de la PCR fueron analizados mediante el secuenciador Sanger en ABI3730xl. Los datos de la secuencia bruta fueron ensamblados usando el software Staden Package Sequence, y la secuencia fue alineada utilizando el software BioEdit. El gen de la enzima AHAS de *A. thaliana* (AT3G48560; AY042819) usado como referencia para la alineación y el de *R. raphanistrum* (AJ344986), fueron tomados de NCBI.

Un marcador CAPS para la mutación Trp574Leu fue evaluado en tres individuos susceptibles (SDV) y tres resistentes (BAL-1A). Los primers usados fueron WA574F y WA653R (Yu et al., 2012). Una alícuota de 1µL del producto de la PCR de cada muestra fue inicialmente comprobado en gel de agarosa al 1%. Luego los productos de la PCR fueron digeridos con la enzima de restricción MfeI, y los productos digeridos fueron analizados en gel de agarosa al 2%. Los productos de 504 pbs de la PCR, amplificados usando los primers WA574F y WA653R, fueron secuenciados para confirmar los resultados del marcador CAPS. Los productos amplificados por la PCR fueron analizados mediante el secuenciador Sanger. Las secuencias obtenidas fueron alineadas usando el software Staden Package Sequence.

Interferencia a campo

La evaluación se realizó en el sitio donde fue hallada la accesión PIE-A, en el partido

de Lobería (Buenos Aires) dentro de un cultivo de girasol Clearfield®, que presentaba sectores invadidos por *R. sativus*, que había sobrevivido a la aplicación de imazapir. La interferencia sobre el cultivo fue estimada cuando el girasol había superado la madurez fisiológica y estaba próximo a madurez comercial. Se delimitaron áreas con niveles de invasión contrastante para estimar los parámetros reproductivos de la maleza y se demarcaron parcelas de 1 m² (n=33) ubicadas al azar sobre una transecta de 400 m. Se evaluó la densidad del cultivo, de la maleza y se estimó la cobertura mediante un sistema semi-cuantitativo. Sobre el cultivo se determinó el diámetro de capítulo, el número, peso y biomasa de los granos y se estimó el rendimiento por unidad de superficie (rendimiento = plantas m⁻² X peso granos planta⁻¹). Se realizó análisis de componentes principales (ACP) y regresión lineal mediante el software estadístico Infostat.

Control químico con herbicidas alternativos

Se exploró la utilidad de nueve herbicidas alternativos para el control de las poblaciones resistentes (Tabla 3.3). Los herbicidas utilizados comprendieron activos recomendados para el cultivo de girasol, con modos de acción y espectro de control diferentes al de las IMI. Los herbicidas pre-emergentes se evaluaron en macetas de 15 cm de diámetro rellenas con el suelo del hábitat natural de la accesión (5,82% MO; pH 5,7; 33,4 ppm Pe; textura franca), en las que se sembraron 25 semillas por unidad experimental. Los herbicidas post-emergentes se aplicaron en diez plantas criadas en macetas del mismo tamaño rellenas con una mezcla que contenía 75% de suelo y 25% de sustrato comercial (Grow Mix® Terrafertil).

Se aplicó la dosis recomendada (X) usando un equipo de CO₂ a presión constante, con pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB), velocidad de 1,54 km h⁻¹ y caudal de 185 L ha⁻¹. En el caso de los pre-emergentes, la aplicación fue realizada inmediatamente tras la siembra de las semillas en las macetas. Estas fueron regadas inmediatamente antes y después de la aplicación, evitando percolación. Luego se excluyó el riego por 24 hs. De esta forma se propició la incorporación de los activos pero evitando que sean lavados. La aplicación de herbicidas post-emergentes fue realizada al estado 1.3-1.4, 21 días tras la emergencia de las plantas. La supervivencia de las plantas se evaluó 35 días después del tratamiento y los datos se expresaron como porcentaje del control sin herbicida, de la misma forma que en los ensayos de resistencia. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. Análisis de

ANOVA y comparación de medias (test Tukey) fueron realizados con el software Infostat.

Tabla 3.3: Herbicidas alternativos para el control de las accesiones de *Raphanus sativus* resistentes a herbicidas AHAS y dosis comerciales evaluadas.

Herbicida	Familia química	Nombre comercial	Momento de aplicación	Formulación p.a.	Dosis g ha⁻¹
Acetocloro	Cloroacetamida	Harness	Pre-emergente	900 g L ⁻¹	1125
S-Metolacloro		Dual Gold	Pre-emergente	960 g L ⁻¹	960
Prometrina	Triazina	Gesagard 50	Pre-emergente	500 g L ⁻¹	1000
Sulfentrazone	Triazinona	Authority	Pre-emergente	500 g L ⁻¹	200
Diflufenican	Piridin carboxamida	Brodal	Pre-emergente	500 g L ⁻¹	125
Flurocloridona	Otra	Defender	Pre-emergente	250 g L ⁻¹	313
Aclonifen	Triazol	Prodigio	Post-emergente	600 g L ⁻¹	480
Benazolin	Benzotiazol	Dasen	Post-emergente	500 g L ⁻¹	300

RESULTADOS

Ambiente

En la primavera de 2008 la accesión resistente BAL-1A formaba un pequeño grupo de menos de 50 plantas, dentro de un lote de colza-canola (*Brassica napus*) cv. Nexera 8450 (resistente a imidazolinonas). El grupo estaba dispuesto en un parche semicircular (<5 m²) ubicado a menos de 50 m del borde NE de un lote de formato cuadrangular de aproximadamente 40 ha y eran las únicas malezas presentes en el mismo. En el borde del lote, en el sector lindero al alambrado perimetral sin cultivar, existía una comunidad de crucíferas que se hallaba en floración, ocupando un parche semirectangular de 800 m². En esta comunidad *Hirschfeldia incana* (L.) Lagr.-Foss. alcanzaba 40-50% de cobertura, mientras que *Brassica rapa* L. y *R. sativus* (BAL-1B) estaban también presentes, pero con <30% de cobertura.

Al año siguiente el lote se encontraba cultivado con trigo y también mostraba la presencia de individuos de *R. sativus* (BAL-2A) en estado de floración-fructificación. En este caso las plantas estaban dispuestas en forma dispersa en todo el lote a más de 200 m en todos los sentidos respecto al parche observado en 2009. En 2009 el cultivo de trigo había recibido una aplicación de metsulfurón-metil a razón de 7 g ha⁻¹. La situación se repitió durante la primavera de 2011, pero la cantidad estimada de individuos fue menor a 100. En las dos observaciones se constató la presencia de plantas de *R. sativus* en la comunidad vegetal natural del borde el sector no laboreado del lote. En 2011 predominaba *H. incana*, con 50-75% de cobertura, mientras que *R. sativus* alcanzaba <10% de cobertura.

Antes de 2008, la rotación de cultivos básica del lote era trigo-soja, registrándose sólo la siembra de un cultivo de girasol en la década previa. El registro de herbicidas utilizados incluía a tres SU pero ninguna aplicación de herbicidas IMI. En toda la década, el sistema productivo se encontraba bajo siembra directa, predominando el empleo de barbecho químico con glifosato y 2,4-D. El control de malezas en trigo se efectuaba con dicamba y metsulfurón, y la soja RR era tratada con glifosato. No se registraban aplicaciones de herbicidas SU durante dos años consecutivos.

Por su parte la accesión resistente PIE-A afectaba más de 30 ha del lote de girasol CL. Se observaron sectores con cobertura de la maleza casi total. En este caso, sobre los alambrados del lote bajo cultivo las plantas de *R. sativus* eran escasas. Dentro del

cultivo la densidad de la maleza fue en promedio de 11 pl m⁻², con valores máximos de 55 pl m⁻² en los sectores más infestados. El nabón no afectó la densidad del cultivo, la superficie individual media fue 0,08 m² planta⁻¹ y la producción alcanzó alrededor de 3000 semillas planta⁻¹. Bajo esas condiciones, el aporte al banco del suelo fue mayor a 10.000 semillas m⁻².

Screening de la resistencia

Cerca de la totalidad las plantas de las accesiones ERC, SJQ y PIE-A sobrevivieron al tratamiento con doble dosis comercial de imazetapir e imazamox, diferenciándose ($p < 0,05$) de SDV y BNC, que fueron completamente controladas (Tabla 3.4). Estas tres accesiones de *R. sativus* y la colza IMI resistente (BNR) mostraron una respuesta similar a la aplicación de estos herbicidas. BAL-1A en cambio, mostró una respuesta intermedia, que se diferenció ($p < 0,05$) tanto de los biotipos susceptibles como de las otras accesiones resistentes.

La supervivencia de BAL-1A, ERC, SJQ y PIE-A a la aplicación de metsulfurón-metil a doble dosis comercial fue de entre 46 y 70%, diferenciándose de SDV y los cultivares de colza, que fueron completamente controlados. La supervivencia a iodosulfurón fue cercana a 100% en ERC, SJQ, PIE-A y la colza BNR, pero en BAL-1A se observó una menor supervivencia (87%), diferenciándose del biotipo susceptible y las otras accesiones resistentes. El glifosato y el 2,4-D causaron completa mortalidad en todas las accesiones (Tabla 3.4).

La respuesta observada en la materia seca acumulada fue similar, aunque las diferencias fueron menos marcadas (Tabla 3.5). En general, y para todos los herbicidas evaluados, las accesiones ERC, SJQ y PIE presentaron los valores más elevados de materia seca acumulada, diferenciándose del biotipo susceptible SDV. En cambio, BAL-1A presentó valores intermedios con respecto a las demás accesiones, en algunos casos no diferenciándose del control SDV.

Resistencia a las 5 familias de herbicidas AHAS

La accesión de *R. sativus* BAL-1A mostró elevada resistencia a todos los herbicidas inhibidores de la AHAS, y fue significativamente diferente al biotipo control SDV, cuya supervivencia fue menor al 10% (Tabla 3.6). Más del 75% de las plantas de BAL-1A sobrevivieron a los tratamientos aplicados, excepto con clorimurón, que redujo la supervivencia al 45%. En cambio, la accesión BAL-1B fue susceptible a los cinco

activos probados, sin diferenciarse del biotipo susceptible SDV. Similar situación se observó con las accesiones colectadas en los mismos sitios al año siguiente. En este caso, la supervivencia de las plantas originadas dentro del lote (BAL-2A) fue incluso mayor, resultando superior al 85% en todos los tratamientos. La supervivencia de las plantas del borde del lote (BAL-2B) fue menor al 20% y no se diferenció del control susceptible ni de BAL-1B. En esta accesión se observó una tendencia al aumento de la resistencia, que se manifestó en la aparición de algunas plantas que no fueron afectadas por los herbicidas. Las plantas de las generaciones multiplicadas en el campo experimental (BAL-3) o dentro del lote (BAL-4), también mostraron elevados valores de supervivencia, demostrándose así la heredabilidad del carácter. El biotipo PIE-A presentó elevada resistencia a los herbicidas, superando el 80% en todos los tratamientos. También las plantas del borde del lote donde se generó el estallido poblacional (PIE-B) tuvieron mayor supervivencia que el control susceptible, no inferior al 57%, sin alcanzar el nivel de resistencia de la población encontrada dentro del lote (PIE-A). Sólo se diferenciaron estadísticamente, los tratamientos con diclosulam y bispiribac, que causaron mayor fitotoxicidad a las plantas de PIE-B.

Tabla 3.4: Supervivencia, expresada como porcentaje del control sin tratamiento (media \pm error estándar) de varias accesiones de *Raphanus sativus* y dos variedades de colza-canola (*Brassica napus*) (convencional BNC e IMI resistente BNR), a herbicidas aplicados a doble dosis comercial (2X).

Herbicida	Accesión						
	SDV	BAL-1A	ERC	SJQ	PIE-A	BNC	BNR
	Supervivencia (%)						
Imazetapir	0,0 \pm 0,0 c	66,9 \pm 4,3 b	98,8 \pm 0,7 a	99,4 \pm 0,6 a	100,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 c	100,0 \pm 0,0 a
Imazamox	0,0 \pm 0,0 c	86,9 \pm 4,3 b	99,4 \pm 0,6 a	100,0 \pm 0,0 a	100,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 c	100,0 \pm 0,0 a
Metsulfuron-metil	0,0 \pm 0,0 b	56,9 \pm 11,2 a	46,9 \pm 3,7 a	70,6 \pm 8,1 a	59,4 \pm 12,0 a	0,0 \pm 0,0 b	7,5 \pm 7,5 b
Iodosulfurón	0,0 \pm 0,0 c	87,5 \pm 4,8 b	98,1 \pm 1,2 a	98,8 \pm 0,7 a	100,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 c	97,5 \pm 1,0 a
2,4-D (Sal)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Glifosato	3,8 \pm 2,4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	2,5 \pm 2,5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

Para cada herbicida, letras diferentes indican diferencias según Tukey para $p < 0,05$.

Tabla 3.5: Materia seca, expresada como porcentaje del control sin tratamiento (media \pm error estándar) de varias accesiones de *Raphanus sativus* y dos variedades de colza-canola (*Brassica napus*) (convencional BNC e IMI resistente BNR), a herbicidas aplicados a doble dosis comercial (2X).

Herbicida	Accesión						
	SDV	BAL-1A	ERC	SJQ	PIE-A	BNC	BNR
	Supervivencia (%)						
Imazetapir	13,5 \pm 2,8 d	47,4 \pm 5,3 bc	98,4 \pm 3,9 a	90,9 \pm 5,1 a	73,9 \pm 4,3 ab	29,0 \pm 9,7 cd	89,9 \pm 6,9 a
Imazamox	31,5 \pm 3,5 c	65,3 \pm 2,0 b	96,6 \pm 3,8 a	95,8 \pm 3,5 a	96,4 \pm 6,0 a	34,9 \pm 5,0 c	105,0 \pm 7,0 a
Metsulfuron-metil	13,8 \pm 5,6 c	58,6 \pm 14,5 abc	107,8 \pm 8,0 a	87,1 \pm 5,4 a	69,0 \pm 3,6 ab	31,6 \pm 5,5 bc	93,1 \pm 20,2 a
Iodosulfurón	41,9 \pm 6,4 d	66,4 \pm 6,8 cd	106,6 \pm 3,0 ab	107,7 \pm 11,5 a	74,0 \pm 9,1 bcd	43,3 \pm 2,5 d	85,6 \pm 8,3 abc
2.4-D	0,0 \pm 0,0	1,8 \pm 1,1	3,8 \pm 3,8	5,8 \pm 2,2	0,4 \pm 0,2	4,9 \pm 4,9	0,0 \pm 0,0
Glifosato	2,5 \pm 1,7	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	2,8 \pm 2,8	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

Para cada herbicida, letras diferentes indican diferencias según Tukey para $p < 0,05$.

Tabla 3.6: Supervivencia de accesiones de *Raphanus sativus* a herbicidas que actúan sobre la AHAS aplicados a doble dosis comercial.

Accesión	BAL-1A	BAL-2A	BAL-3	BAL-4	PIE-A	BAL-1B	BAL-2B	PIE-B	SDV
Habitat	Dentro del cultivo (agrestal)				Borde de cultivo (ruderal)				Control
p.a.	Supervivencia (media ± EE %)								
Imazapir	82,5 ± 4,8 a	91,3 ± 7,2 a	75,6 ± 8,2 a	79,1 ± 14,1 a	90,0 ± 10,0 a	0,0 ± 0,0 b	6,9 ± 4,7 b	67,5 ± 8,5 a	0,0 ± 0,0 b
Clorimurón	45,6 ± 7,0 b	85,6 ± 11,3 a	70,6 ± 1,2 ab	90,6 ± 5,4 a	83,8 ± 11,4 a	6,3 ± 2,2 c	8,8 ± 2,4 c	79,4 ± 7,8 a	8,8 ± 3,0 c
Diclosulam	76,8 ± 11,5 ab	86,9 ± 7,7 ab	76,9 ± 12,4 ab	98,1 ± 1,2 a	87,2 ± 6,6 ab	5,0 ± 2,3 c	18,8 ± 7,7 c	57,5 ± 9,2 b	6,9 ± 1,2 c
Flucarbazone	79,4 ± 7,4 a	90,6 ± 5,4 a	85,0 ± 5,0 a	92,3 ± 5,0 a	89,8 ± 4,7 a	0,0 ± 0,0 b	3,8 ± 2,2 b	74,4 ± 8,7 a	0,0 ± 0,0 b
Bispiribac	80,6 ± 10,2 ab	92,5 ± 4,3 a	69,1 ± 3,9 ab	78,3 ± 6,0 ab	87,5 ± 1,8 ab	0,0 ± 0,0 c	7,5 ± 4,3 c	65,0 ± 9,3 b	0,0 ± 0,0 c

Para cada herbicida, letras diferentes indican diferencias según Tukey para $p < 0,05$.

Dosis-respuesta

Los ensayos de dosis-respuesta revelaron que las accesiones BAL-1A, ERC, SJQ y PIE-A fueron altamente resistentes al imazetapir (Figura 3.2), con más del 60% de supervivencia a cinco veces la dosis comercial (500,0 g p.a. ha⁻¹). En contraste, la población susceptible SDV fue completamente controlada a media dosis comercial. La DL₅₀ de esta población fue de 0,14 g p.a ha⁻¹, mientras que para BAL-1A, ERC, SJQ y PIE-A los valores de DL₅₀ fueron superiores a 700,0 g ha⁻¹. Los factores de resistencia de estas accesiones se ubicaron entre 5000 y más de 26000 (Tabla 3.7).

Las accesiones ERC, SJQ y PIE-A mostraron una resistencia intermedia a la aplicación de metusfurón-metil (Figura 3.2), aunque la supervivencia fue superior al 20% incluso a 5X (30,0 g p.a. ha⁻¹). En contraste, la supervivencia de SDV fue reducida más del 99% con sólo 1/5 de la dosis comercial (1,2 g p.a. ha⁻¹). La supervivencia de BAL-1A a 5 veces la dosis comercial fue de 12%, un valor intermedio entre las accesiones altamente resistentes y el control susceptible. Los valores de DL₅₀ de las accesiones BAL-1A, ERC, SJQ y PIE-A fueron de 3,32; 5,51; 7,49 y 17,97 g p.a ha⁻¹ respectivamente, indicando un factor de resistencia de entre 25-138 con respecto a SDV, cuya DL₅₀ fue de 0,13 g p.a ha⁻¹.

Los resultados de este análisis fueron similares a los obtenidos a partir de la materia seca (Figura 3.3). Para imazetapir, se estimaron valores de GR₅₀ para las accesiones BAL-1A y PIE de 1253,78 y 3103,32 g ha⁻¹ respectivamente, implicando factores de resistencia superiores a 2000 y 5000 respecto al biotipo susceptible SDV, cuyo GR₅₀ fue de 0,58 g ha⁻¹ (Tabla 3.8). Para el caso de metsulfurón-metil, las curvas de dosis-respuesta mostraron valores de GR₅₀ menores a los obtenidos con imazetapir, de forma congruente a lo observado con la variable supervivencia. Estos valores fueron de 8,26 y 31,23 para BAL-1A y PIE g ha⁻¹ respectivamente, y de sólo 0,18 g ha⁻¹ para SDV. Esto representó un aumento de la resistencia de estas accesiones de 46 y 175 veces.

Figura 3.2: Respuesta del biotipo de *Raphanus sativus* susceptible SDV (O) y de las accesiones resistentes BAL-1A (Δ), ERC (+), SJQ (x) y PIE-A (\diamond) a la aplicación de dosis crecientes de imazetapir (arriba) y metsulfurón-metil (abajo), expresada como porcentaje de supervivencia.

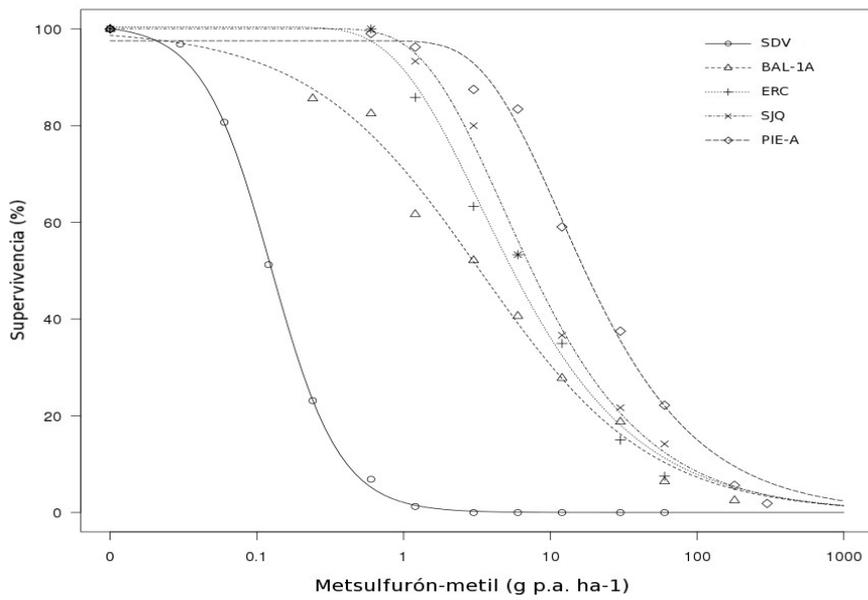
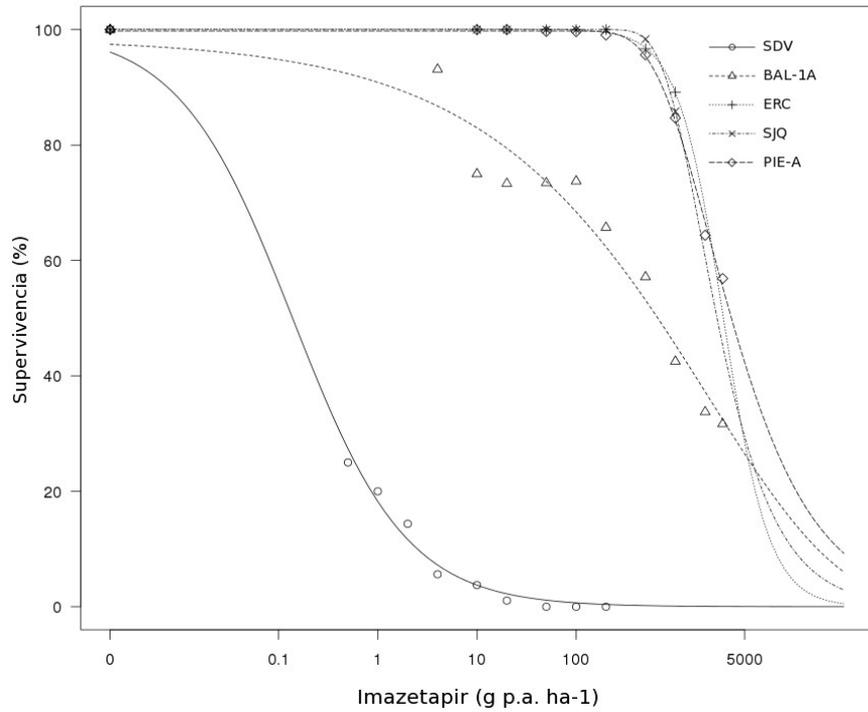


Tabla 3.7: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la supervivencia de accesiones de *Raphanus sativus* resistentes (BAL-1A, ERC, SJQ y PIE-A) y susceptible (SDV) a la aplicación de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS. Se estimaron también los niveles comparados de resistencia.

Herbicida	Accesión	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	DL ₅₀	FR
Imazetapir	SDV	0,76	99,98	0,14	0,14	
	BAL-1A	0,33	98,47	2179,20	712,94	>5000
	ERC	1,88	100,11	3055,06	3055,06	>21000
	SJQ	-1,07	100,00	1870,80	2634,30	>18000
	PIE-A	-0,75	99,77	2273,29	3696,80	>26000
Metsulfurón-metil	SDV	1,86	100,98	0,13	0,13	
	BAL-1A	0,75	99,96	3,32	3,32	25,54
	ERC	-0,74	100,40	3,35	5,51	42,38
	SJQ	-0,79	100,10	4,72	7,49	57,62
	PIE-A	-0,83	97,54	11,54	17,97	138,23

Parámetros: *b*=pendiente de las curvas alrededor de *e*, *d*=límite superior de las curvas, *e*=punto de inflexión de las curvas, DL₅₀=dosis requerida para reducir en un 50% la supervivencia de las plantas, FR=factor de resistencia (DL₅₀ Rs/DL₅₀ Su).

Figura 3.3: Respuesta del biotipo de *Raphanus sativus* susceptible SDV (O) y de las accesiones resistentes BAL-1A (Δ) y PIE-A (+) a la aplicación de dosis crecientes de imazetapir (arriba) y metsulfurón-metil (abajo), expresada como materia seca (mg pl^{-1}).

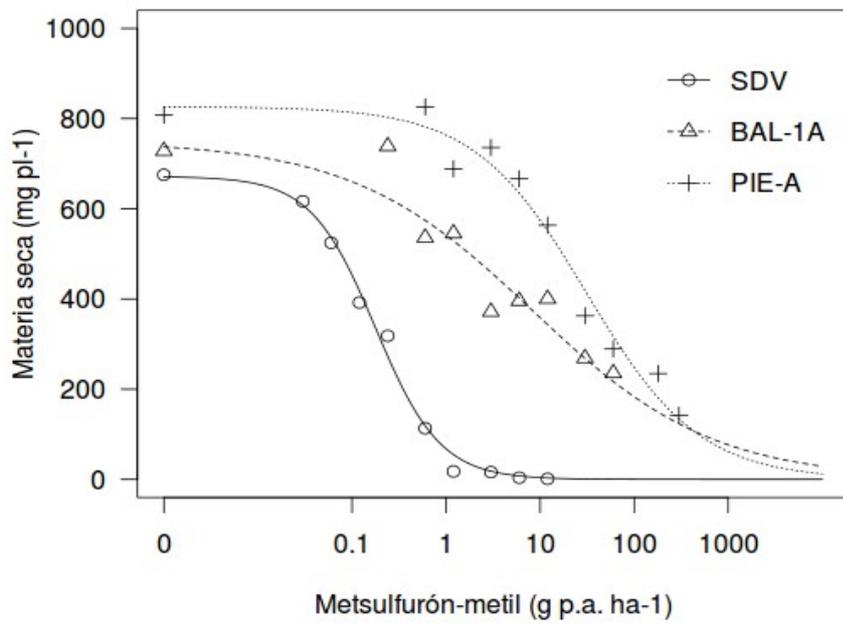
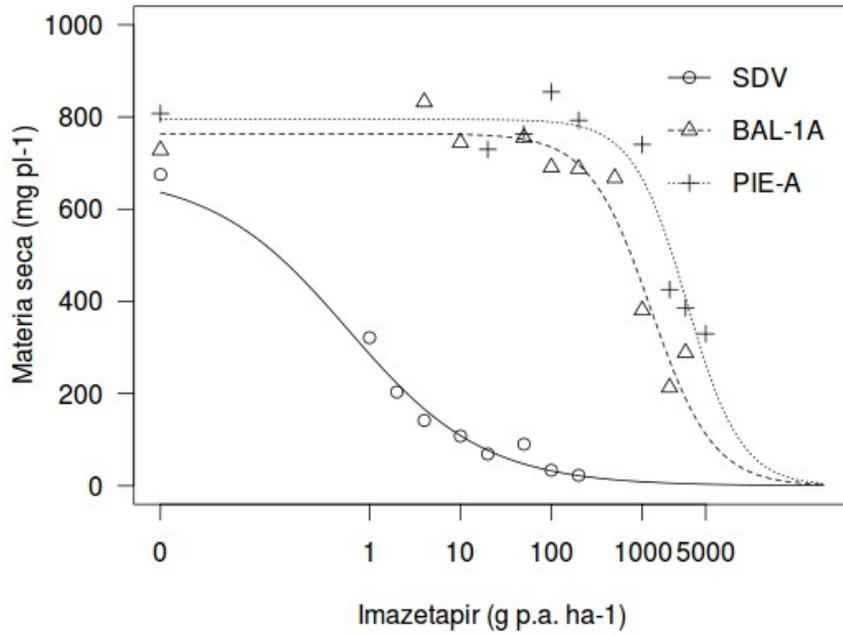


Tabla 3.8: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la materia seca remanente de biotipos de *Raphanus sativus* resistentes (BAL-1A y PIE-A) y susceptible (SDV) tras la aplicación de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS. Se estimaron también los niveles comparados de resistencia.

Herbicida	Accesión	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>e</i> (GR ₅₀)	FR ^a
Imazetapir	SDV	0,58	676,64	0,58	
	BAL-1A	1,27	763,80	1253,78	2154,7
	PIE-A	1,46	794,60	3103,32	5333,1
Metsulfurón-metil	SDV	1,27	671,47	0,18	
	BAL-1A	0,45	749,44	8,26	46,4
	PIE-A	0,73	826,18	31,23	175,4

Parámetros: *b*=pendiente de las curvas alrededor de *e*, *d*=límite superior de las curvas, *e*=punto de inflexión de las curvas, GR₅₀=dosis requerida para reducir en un 50% la materia seca de las plantas, FR=factor de resistencia (GR₅₀ Rs/GR₅₀ Su).

Interferencia

Cada planta de *R. sativus* produjo hasta 2925 semillas (Tabla 3.9), y ocupó una superficie media de 0,08 m², sin afectar la densidad del cultivo. La cobertura de *R. sativus* aumentó junto con la densidad de la maleza, superando el 60% con 10 pl m⁻². El análisis de componentes principales mostró que el rendimiento del cultivo disminuyó conforme aumentó la densidad y cobertura de *R. sativus*. Con más de 75% de cobertura, el número de granos por capítulo del girasol se redujo más del 30% y la producción por planta más de 55% (Tabla 3.10). Ello ocasionó una merma en el rendimiento del girasol superior a 65%. La regresión entre densidad de maleza y rendimiento del cultivo fue altamente significativa ($r=0,79^{**}$), prediciendo que por cada aumento en un 1% de cobertura de *R. sativus* el rendimiento del girasol se redujo 24,6 kg ha⁻¹ (Figura 3.4).

Tabla 3.9: Parámetros reproductivos de la accesión de *Raphanus sativus* resistente a herbicidas PIE-A, hallada interfiriendo un cultivo de girasol CL en un lote agrícola.

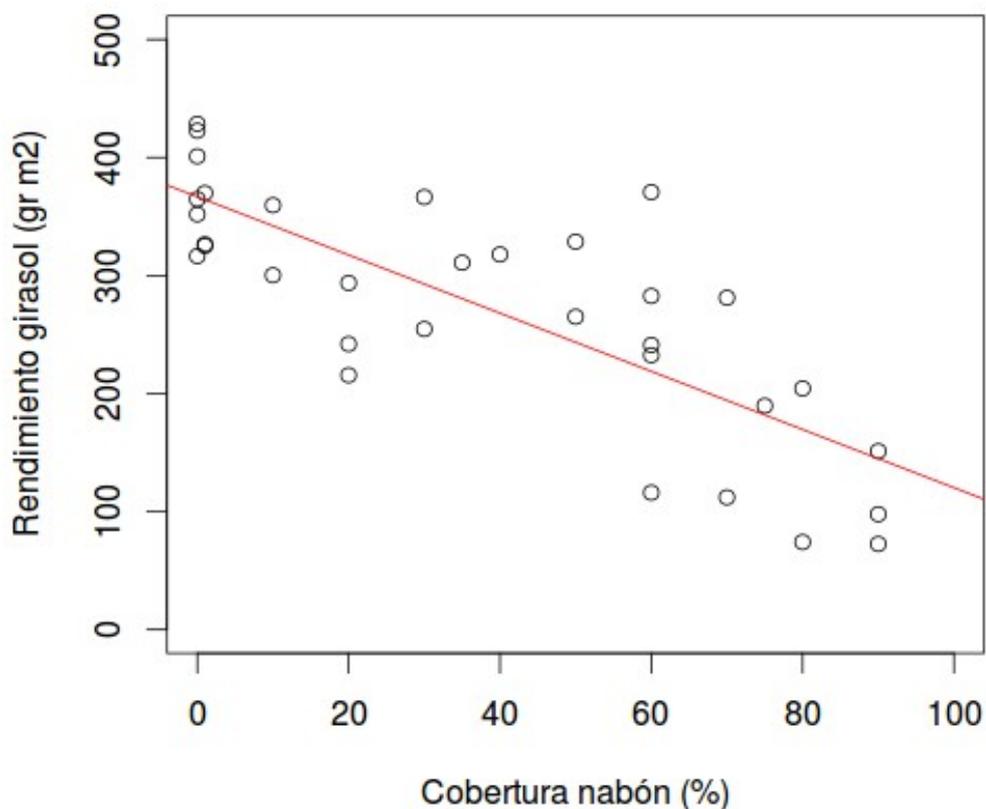
Parámetros	Mínimo	Media	Máximo
Plantas m ⁻²	0	11	55
Largo silicua	2,5	5,1	8,2
Silicuas pl ⁻¹	37,0	119,6	756,0
Silicuas m ⁻²	158,0	1994,9	3070,0
Semillas silicua ⁻¹	3,0	6,0	11,0
Semillas pl ⁻¹	115,1	891,5	2924,9
Semillas m ⁻²	879,2	4472,3	10220,3
Biomasa de semilla (mg sm ⁻¹)	4,1	7,4	11,1
Rendimiento g pl ⁻¹	0,9	6,8	20,4
Rendimiento g m ⁻²	4,2	34,0	76,6

Tabla 3.10: Efecto de la cobertura de la accesión de *Raphanus sativus* PIE-A resistente a herbicidas AHAS sobre los parámetros productivos de un girasol CL cultivado en el sudeste de la provincia de Buenos Aires.

Cobertura maleza (%)	REDUCCIÓN POR INTERFERENCIA (%)					
	Densidad (pl m ⁻²)	Diámetro de capítulo (cm)	Granos pl ⁻¹	P1000 (g)	Rendimiento (g pl ⁻¹)	Rendimiento (g m ⁻²)
1-25	13	7 b	7 b	7 b	12 b	20 c
25-50	3	6 b	7 b	11 ab	18 b	19 c
50-75	10	16 b	24 ab	9 ab	27 ab	40 b
>75	4	33 a	45 a	24 a	57 a	68 a

Para cada columna, letras diferentes indican diferencias según Tukey para p <0,05.

Figura 3.4: Regresión lineal entre el rendimiento (gr m^{-2}) de un girasol CL invadido con *Raphanus sativus* resistente a herbicidas inhibidores a la AHAS, y la cobertura de la maleza. $Y = 366,67 - 2,46x$ ($R^2 = 0,62$; $p < 0,0001$).



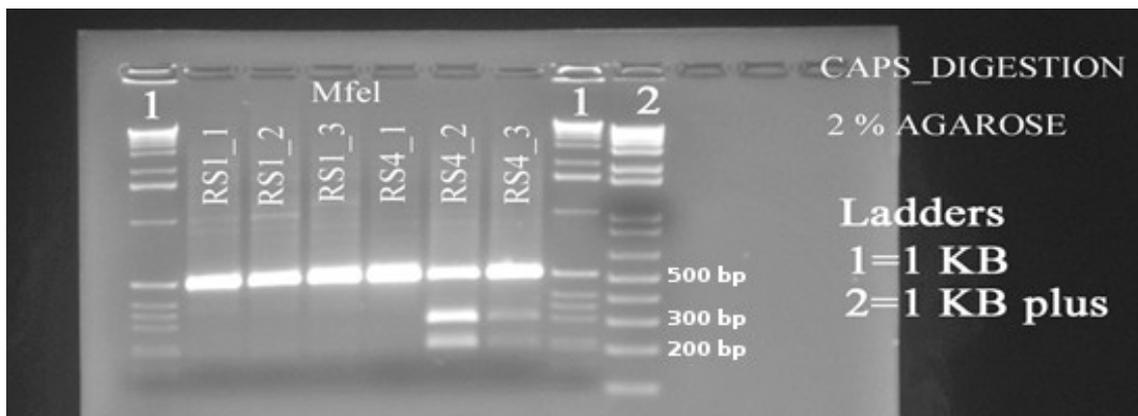
Base molecular de la resistencia

Se confirmó la presencia de la mutación Trp574Leu en plantas de todas las accesiones de *R. sativus* caracterizadas como resistentes a herbicidas AHAS (Tabla 3.11). Esta mutación ha sido registrada mundialmente en 27 especies distintas con resistencia a las cinco familias químicas de inhibidores de la enzima AHAS, incluyendo *R. raphanistrum* (Yu et al., 2012; Tranel et al., 2015). En una de las accesiones caracterizadas la mutación se presentó en forma heterocigota, y algunas plantas presentaban el genotipo silvestre, en forma congruente con la segregación para este rasgo observada en los ensayos de resistencia. La accesión más invasora fue homocigota para esta mutación (Figura 3.5).

Tabla 3.11: Variación en la secuencia del gen de la enzima AHAS (subrayados) entre las accesiones de *Raphanus sativus* susceptibles y resistentes y las sustituciones de aminoácidos predichas (en negrita), que confieren resistencia a los herbicidas inhibidores de la AHAS.

Biotipo	Plantas analizadas (n)	1270, Codón	574, Residuo
SDV	3	TGG	Trp
PRI	4	TGG	Trp
LPA	9	TGG	Trp
BAL-1A	6	<u>TIG</u>	Leu
ERC	3	<u>TIG</u>	Leu
SJQ	3	<u>TIG</u>	Leu
PIE	9	<u>TIG</u>	Leu

Figura 3.5: Gel mostrando los resultados del marcador CAPS Trp574Leu en tres individuos del biotipo susceptible SDV (RS1-1, RS1-2 y RS1-3) y tres de la accesión resistente BAL-1A (RS4-1, RS4-2 y RS4-3) de *Raphanus sativus*. El alelo del tipo silvestre es representado por el fragmento de 500 pb y el mutante por los dos fragmentos de 291 y 213 pb.



Control químico con herbicidas alternativos

A dosis comercial, ninguno de los herbicidas pre-emergentes evaluados logró completo control de las accesiones de *R. sativus* (Tabla 3.12). La mezcla de acetocloro y flurocloridona tuvo un control mayor al 80%. Sulfentrazone mostró un nivel de control similar de ERC y PIE-A, pero no fue tan efectivo en el control de SDV, cuya supervivencia fue cercana a 40%. Los herbicidas del grupo de las cloroacetamidas (s-metolacloro y acetocloro) no controlaron bien los nabones, al igual que la prometrina. De forma similar, diflufenican mostró una supervivencia entre 75% y 39%, siendo más eficiente para controlar PIE-A. Aunque la flurocloridona tuvo un comportamiento intermedio (entre 50 y 65%), la mezcla con acetocloro produjo buen control (entre 6-18% de supervivencia).

Los dos herbicidas post-emergentes fueron altamente efectivos en el control de las accesiones de *R. sativus* (Tabla 3.13). Aclonifen solo y en mezcla con imazapir causó mortalidad total. Por otra parte, benazolin produjo un gran daño en las plantas pero dejó tejido vivo remanente, con posibilidades de rebrote. La mezcla con imazapir, evitó este problema en SDV, accesión susceptible a este activo, pero no así en ERC y PIE-A, con resistencia ya probada.

Tabla 3.12: Supervivencia de dos accesiones de *Raphanus sativus* resistentes a herbicidas AHAS (ERC y PIE-A) y otra susceptible (SDV) a la aplicación de herbicidas alternativos pre-emergentes a dosis comercial.

Herbicida	SDV	ERC	PIE-A
	Supervivencia (media \pm EE %)		
Acetocloro	93,1 \pm 7,6 a	95,0 \pm 2,9 a	94,9 \pm 3,6 a
S-Metolacloro	98,2 \pm 3,9 a	93,8 \pm 2,4 a	97,8 \pm 4,6 a
Prometrina	91,2 \pm 2,8 a	61,3 \pm 14,2 ab	56,7 \pm 8,6 b
Diflufenican	75,8 \pm 2,2 ab	77,2 \pm 4,6 ab	39,0 \pm 4,6 bc
Flurocloridona	50,6 \pm 6,5 bc	40,6 \pm 14,8 bc	65,7 \pm 7,6 b
Sulfentrazone	44,0 \pm 10,6 bc	17,2 \pm 5,8 c	15,4 \pm 6,7 c
Acetocloro + Flurocloridona	18,7 \pm 9,5 c	6,9 \pm 2,5 c	17,4 \pm 4,4 c

Para cada accesión, letras diferentes indican diferencias según Tukey para $p < 0,05$.

Tabla 3.13: Supervivencia de dos accesiones de *Raphanus sativus* resistentes a herbicidas AHAS (ERC y PIE-A) y otra susceptible (SDV) a la aplicación de herbicidas alternativos post-emergentes a dosis comercial.

Herbicida	SDV	ERC	PIE-A
Supervivencia (media \pm EE %)			
Aclonifen	0,0 \pm 0,0 b	0,0 \pm 0,0 b	0,0 \pm 0,0 b
Benazolin	10,0 \pm 3,5 a	8,8 \pm 2,4 a	10,0 \pm 2,0 a
Imazapir + Aclonifen	0,0 \pm 0,0 b	0,0 \pm 0,0 b	0,0 \pm 0,0 b
Imazapir + Benazolin	0,0 \pm 0,0 b	8,0 \pm 2,6 a	9,9 \pm 1,3 a

Para cada accesión, letras diferentes indican diferencias según Tukey para $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Los ensayos de caracterización de la resistencia demostraron que todas las accesiones estudiadas presentaron resistencia cruzada a principios activos con el mismo modo de acción. Los ensayos de dosis-respuesta confirmaron que la resistencia era muy elevada para imazetapir e intermedia para metsulfurón-metil. Para el caso de la accesión PIE-A, se demostró que fue resistente a 10 principios activos distintos de 5 familias químicas de inhibidores de la enzima AHAS: imazapir, imazetapir, imazamox, metsulfurón-metil, iodosulfurón, clorimurón, diclosulam, flumetsulam, flucarbazone-sódico y bispiribac-sódico. Por otra parte, las cinco accesiones resistentes a inhibidores AHAS, fueron altamente susceptibles a glifosato y 2,4-D a dosis comerciales. Estos herbicidas podrían utilizarse en el barbecho de cultivos o en soja RR y cereales, respectivamente.

La secuenciación de las accesiones resistentes confirmó un cambio puntual de aminoácido en el gen de la enzima AHAS, de triptofano a leucina. Ha sido demostrado previamente que esta substitución (Trp574Leu) resulta en altos niveles de resistencia a herbicidas IMI y SU (así como a TRP y PTB), en diversas malezas, incluyendo *R. raphanistrum*. La presencia de esta mutación en poblaciones resistentes de *R. sativus*, asociada a resistencia a herbicidas de las 5 familias químicas de inhibidores AHAS no había sido reportada previamente.

La accesión BAL-1A presentó un menor nivel de resistencia, y en los ensayos se observó segregación del carácter de resistencia en las plantas de esta población. Esta población fue observada por primera vez formando un pequeño grupo de plantas dentro de un lote con una larga historia de cultivos y uso de herbicidas. Esto podría atribuirse a un evento mutacional reciente. La secuenciación de esta población demostró que presenta individuos heterocigotas para esta mutación e individuos con el genotipo silvestre (susceptibles).

Bajo condiciones de campo, la accesión BAL no aumentó su densidad ni se dispersó geográficamente, debido probablemente al uso de herbicidas alternativos, como 2,4-D y glifosato. Se demostró también que la extensa población de *R. sativus* dispuesta en una franja no sembrada del margen del lote, sobre el límite con un establecimiento vecino, pudo haber constituido un refugio de alelos de susceptibilidad. Esta población fue altamente susceptible a todos los herbicidas evaluados, a diferencia de las plantas halladas en el lote que sobrevivieron a la aplicación de los mismos compuestos. Esta

situación se repitió en dos cohortes sucesivas, confirmándose que las plantas de *R. sativus* del borde del cultivo sin pulverizar, eran susceptibles a los herbicidas inhibidores de la AHAS. Ello podría explicar la limitada difusión de la accesión resistente de Balcarce.

En el caso de la accesión de Pieres, que tomó un carácter invasor pronunciado y produjo importantes pérdidas en el cultivo, las escasas plantas que se hallaron en los bordes no cultivados del lote presentaban un perfil de resistencia similar a las que crecieron dentro del lote. Esto podría deberse a la alta presión de selección ejercida por la aplicación de herbicidas tanto dentro del lote como en los bordes del mismo.

Ha sido propuesto que los refugios de malezas susceptibles podrían retrasar la evolución de la resistencia a herbicidas (Beckie, 2006). Mediante simulaciones, Richter et al. (2002) encontraron que para la emergencia de un biotipo resistente se requerían 15 generaciones de aplicaciones consecutivas del mismo herbicida si el biotipo susceptible se confinaba a los bordes del cultivo. Los individuos susceptibles del refugio podrían diluir la proporción de alelos de resistencia en la población a través de flujo génico o actuando como una barrera contra el aumento en la frecuencia de plantas resistentes.

Sin embargo, en otros casos los mismos autores consideran que los refugios de malezas susceptibles no serían efectivos debido a que el control del carácter de resistencia suele ser dominante (Beckie, 2006). Así, existe un efecto antagónico entre el flujo génico desde el hábitat desfavorable (áreas sin tratamiento) que retrasa la evolución de la resistencia en el hábitat favorable y desde el área favorable hacia el desfavorable, incrementando la frecuencia del alelo de resistencia en este área, y disminuyendo la eficacia del refugio.

Esto podría explicar la tendencia al aumento de la resistencia observada en las plantas del borde del cultivo al año siguiente al descubrimiento del biotipo, y la aparición en esa población de algunos individuos totalmente resistentes a los herbicidas AHAS. Los modelos de genética de poblaciones sugieren que la dispersión de la resistencia será siempre retrasada por un ambiente heterogéneo. La presencia de un hábitat desfavorable contribuye a la selección negativa de un alelo ventajoso como el de la resistencia a herbicidas. El destino de ese alelo dependerá del balance entre la aplicación de herbicidas que favorezcan la resistencia y la capacidad de mantenimiento del gen de resistencia en áreas o años sin tratamiento (Richter et al.,

2002; Roux y Reboud, 2007, Roux et al. 2008).

El establecimiento y destino de estas plantas resistentes dependerá también del costo de adaptación o *fitness* de las mismas. Cuando un alelo de resistencia a herbicidas confiere un costo adaptativo podría prevenir la fijación de este carácter en la población de la maleza. En el caso de resistencia conferida por mutaciones puntuales en el gen de la enzima sobre la cual actúa el herbicida, estos cambios podrían resultar en una reducción en la actividad enzimática y/o en la afinidad por el sustrato. Esto implicaría un costo biológico que podría poner en desventaja a las plantas resistentes por sobre las silvestres, en un ambiente sin presión de selección por el herbicida. Esto ha sido observado en algunos casos de resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS. Sin embargo, para algunas substituciones de aminoácidos específicas no se han observado reducciones en la actividad enzimática (Vila-Aiub et al., 2009). En el caso específico de la mutación Trp-574-Leu, presente en los biotipos de *R. sativus* caracterizados en este capítulo, se ha observado tanto reducción en la actividad enzimática como el efecto contrario, es decir actividad enzimática superior en biotipos resistentes. En el caso de biotipos de *R. raphanistrum* se observó actividad enzimática reducida en el biotipo homocigota para la mutación Trp-574-Leu, pero ningún efecto negativo sobre el crecimiento o la capacidad competitiva de estas plantas (Yu et al., 2010; Li et al., 2012).

La magnitud de la resistencia a diferentes herbicidas inhibidores de la AHAS puede variar ampliamente entre las substituciones de aminoácidos de la enzima. En biotipos resistentes a SU, la resistencia a un activo no está necesariamente vinculada a resistencia cruzada a todos los miembros de esa familia química de compuestos (Tranel y Wright, 2002). Esta situación podría explicar las diferencias observadas en los niveles de resistencia a distintos activos que inhiben la enzima AHAS.

La residualidad en el suelo del metsulfurón no supera los 90 días desde la aplicación (Walker et al. 1989; James et al, 1995; Rouchaud et al., 1999; Bedmar et al., 2006), degradándose progresivamente y en dos etapas diferenciadas, con una etapa inicial de pérdida rápida en los primeros 15 días seguida por una etapa de equilibrio y lenta disipación en el suelo (Donald, 1990). Esta degradación coincide con los nacimientos tardíos de *R. sativus* en primavera y principios del verano, que han sido observados hacia el final del ciclo de los cultivos de cereales.

Podría asumirse que a medida que el metsulfurón pierde su efectividad en el suelo, las

semillas de *R. sativus* seleccionadas por resistencia intermedia a este herbicida comienzan a germinar a mediados de primavera. Estas plantas permanecen en forma de roseta mientras los cereales de invierno completan su ciclo, sin ser percibidas como una preocupación por parte de los productores. Esto fue propuesto de forma similar por Richter et al. (2002), quienes afirman que el aumento de un biotipo resistente a campo ocurre de forma escalonada. Usualmente, las malezas resistentes no son percibidas por el productor hasta que el 30% de las plantas en un lote son resistentes. Sólo cuando se alcanza cierta frecuencia de individuos resistentes se produce la multiplicación explosiva y la dispersión espacial del biotipo. En el caso estudiado, como la maleza fue seleccionada por resistencia intermedia a sulfonilureas y además presentó resistencia cruzada a imidazolinonas, constituyó una seria complicación en los cultivos subsiguientes, especialmente cuando se implantaron aquellos desarrollados bajo la tecnología CL, como el girasol. Esto afectaría gravemente la validez de la tecnología CL que se basa en el empleo de estos herbicidas.

La experimentación mostró que existen otras alternativas para el control de los nabones resistentes a IMI en varias situaciones y cultivos. La mezcla de acetoclor y flurocloridona, que produjo la mayor mortandad de las accesiones puede aplicarse en pre-emergencia del girasol y maíz. La residualidad de esta mezcla herbicida permitiría controlar los nacimientos posteriores hasta 90 días. La aplicación de sulfentrazone fue igualmente efectiva, y representaría otra opción para el control en pre-emergencia de girasol. A pesar de esto, el espectro de control registrado para este herbicida no incluye brasicáceas (CASAFE, 2007; Vigna et al., 2014), y debería analizarse su real efectividad a campo. Ensayos realizados en la zona del sudeste bonaerense en girasol bajo labranza cero mostraron un pobre control de *R. sativus* con la aplicación de sulfentrazone a dosis similares a las utilizadas en esta tesis (Istilart, 2005). Utilizada sola, la flurocloridona no resultó efectiva, comprobándose así un efecto sinérgico en la mezcla con acetoclor. Tampoco fueron efectivos el acetoclor, el s-metolaclo y la prometrina, aunque esto se corresponde con el espectro de control de estos herbicidas y a que fueron aplicados por separado cuando lo usual es utilizar mezclas con otros principios activos (CASAFE, 2007; Vigna et al., 2014). Las aplicaciones de post-emergencia con aclonifen y benazolin fueron muy efectivas y podrían ser recomendables.

Como resultado de esta investigación, en colaboración con ensayos desarrollados por técnicos de BASF Argentina S.A., se lograron los primeros avances para un planteo

alternativo que mejoró el control de las poblaciones de *R. sativus* resistentes a herbicidas AHAS. Los resultados de las investigaciones permitieron elaborar una serie de recomendaciones, en las que se incluyó el uso de la mezcla acetoclor + flurocloridona como pre-emergente en planteos con girasol CL, atrazina en maíz, y la combinación de glifosato junto para barbechos de soja, que fueron divulgadas por los técnicos de BASF. Los primeros resultados a campo mostraron una mitigación del problema en los lotes altamente invadidos por estas poblaciones.

Se confirma así la presencia de poblaciones de *R. sativus* con resistencia a todas las familias químicas de inhibidores de la AHAS. Los alelos de resistencia a estos herbicidas están presentes en la diversidad de las poblaciones de *R. sativus* argentinas. La difusión de cultivos IMI resistentes y la intensificación en la aplicación de herbicidas inhibidores de la AHAS han resultado en altas presiones de selección. Una apropiada rotación de herbicidas y un aumento en la diversidad de los agroecosistemas son indispensables para minimizar la ocurrencia y dispersión de estas poblaciones.

Capítulo 4: CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES FERALES DE *Brassica napus* CON RESISTENCIA TRANSGÉNICA A GLIFOSATO

Entre las especies brasicáceas de mayor relevancia mundial, *Brassica napus* L. (colza) se destaca por su elevada participación en la producción mundial de aceites comestibles. En 2012 se cosecharon más de 65 millones de toneladas de colza, sobre una superficie de 34 millones de hectáreas sembradas en todo el mundo. Esto hace del aceite de *B. napus* el tercero en importancia, luego del de palma y soja (FAOSTAT, 2015).

Brassica napus es una de las seis especies de *Brassica* cultivadas, cuyas relaciones filogenéticas fueron descritas mediante el triángulo de "U". Según esta teoría, *B. napus* es un híbrido natural entre la col (*B. oleracea* L.) y el nabo (*B. rapa* L.), originado probablemente en el Mediterráneo, donde convivían ambas especies. Su origen es consecuencia de múltiples hibridaciones interespecíficas espontáneas entre *B. rapa* y *B. oleracea* cultivadas en cercanías una de la otra durante la edad media. La ausencia de poblaciones naturales de *B. napus* silvestres apoya la teoría del origen en ambientes cultivados (Gupta y Pratap, 2007; Allender y King, 2010; Iniguez-Luy y Federico, 2011; Prakash et al., 2012).

Los primeros registros del cultivo de *B. napus* en Europa datan del siglo XVI, cuando se comenzó a utilizar como fuente de aceite (conocido como *raepoli*) para iluminación y fabricación de jabones. Debido a la similitud con *B. rapa*, que fue la primera especie domesticada, las citas más antiguas resultan dudosas. Existen referencias del uso del aceite de *B. rapa* en antiguas escrituras sánscritas de la India, entre 3500 y 4000 años antes del presente. Sin embargo, el uso generalizado de *B. napus* como especie oleaginosa comenzó a inicios del siglo XVII. A partir de la revolución industrial, se reconoció al aceite de *B. napus* como un excelente lubricante, lo cual produjo un fuerte incremento del área del cultivo, que reemplazó paulatinamente a *B. rapa* (Appelqvist, 1972; Gupta y Pratap, 2007; Prakash et al., 2012).

En la segunda mitad del siglo XX, Canadá inició un destacado proceso de mejoramiento con el objetivo de que el aceite de colza fuera apto para el consumo humano y animal. Este uso estaba originalmente limitado por la elevada concentración de ácido erúxico en el aceite y glucosinolatos en la harina de extracción. El ácido erúxico (*cis*-1,3-decasenoico, 22:1, *n*-9) es un compuesto característico del aceite de especies brasicáceas, y constituye cerca del 50% de la composición de ácidos grasos

totales. En estudios sobre animales se ha demostrado que el aceite de colza con altos niveles de ácido erúxico interfiere en la conductancia miocárdial y el sistema vascular periférico, acorta los tiempos de coagulación de la sangre, aumenta los niveles de colesterol y provoca degeneración cardíaca (Ahuja y Banga, 1993). Debido a estos estudios, la comercialización para consumo humano de aceite de colza con elevados niveles de erúxico fue restringido en Canadá (Busch et al., 1994). Los glucosinolatos, por su parte, son metabolitos secundarios característicos de las especies brasicáceas, presentes en los tejidos vegetativos y en las semillas. Están involucrados en la protección de las plantas contra los ataques de plagas de insectos, actuando como toxinas o repelentes. Sus productos de descomposición, los tiocianatos, isotiocianatos y nitrilos son indeseados en dietas animales. Afectan la absorción de la yodina por la glándula tiroidea afectando el desarrollo de los animales alimentados con harinas ricas en estos compuestos, y reducen la palatabilidad y la eficiencia de ganancia de peso de los alimentos (Agnihotri et al., 2007).

El mejoramiento iniciado en Canadá para la obtención de variedades de colza con bajos niveles de estos tóxicos, se realizó utilizando accesiones de *B. napus* proveniente de Argentina y de *B. rapa* de Polonia. Es por esta razón que surgió la denominación de tipo "argentino" y "polaco" para las dos especies de colza. En 1966 se desarrolló la primera variedad de *B. napus* con bajo contenido de ácido erúxico, conocida como Oro, y en 1967 se crearon los primeros cultivares de *B. napus* con reducido contenido en glucosinolatos. Ambas características combinadas dieron origen a las variedades identificadas con el nombre comercial "canola" (Canadian Oil Low Acid), por presentar menos de 2 % de ácido erúxico y 20 μ moles de glucosinolatos por gramo de grano. Estos valores representan el estándar de calidad internacional para identificar a las variedades de canola o colza doble cero "00", y son aceptados en todo el mundo, incluida la Argentina (Appelqvist, 1972; Busch et al., 1994; Iriarte y Valletti, 2008; Prakash et al., 2012).

El sostenido mejoramiento de la colza continuó durante los años '90 con la aparición en el mercado de los primeros híbridos y el avance de nuevas tecnologías para el cultivo. Entre estas, se destaca la aplicación de biotecnología en el desarrollo de variedades transgénicas, que incorporaron genes de resistencia a herbicidas. Los eventos registrados incluyen colza resistente a glifosato, glufosinato y bromoxinil. Las variedades resistentes a glifosato son actualmente cultivadas en Canadá, Estados Unidos, Australia, Japón y Chile (en este último caso, sólo para exportación de semilla)

(Iniguez-Luy y Federico, 2011; James, 2012).

En nuestro país, el nabo (*B. rapa*), una maleza agresiva de los cultivos, fue aprovechado durante la década del '40 para elaborar aceite no comestible, cotizando en la Bolsa de Cereales (Tenenbaum, 1937). A partir de la renovación del interés provocado por el mejoramiento canadiense, instituciones gubernamentales y educativas impulsaron la introducción y evaluación de las variedades mejoradas de colza (*B. rapa* y *B. napus*). Sin embargo, debido a los recurrentes problemas de comercialización, almacenamiento y procesamiento, el cultivo no se desarrolló en el país como se esperaba (Pascale, 1976; Iriarte y Valetti, 2008). A pesar de cierto interés renovado durante la década de 1990, en la actualidad la superficie bajo cultivo no supera las 100.000 hectáreas (MAGyP, 2015).

Los cultivares comerciales de colza actualmente disponibles en Argentina corresponden solamente a la especie *B. napus* (Iriarte y Valetti, 2008; INASE, 2015). En nuestro país el cultivo de variedades transgénicas está prohibido debido a las restricciones que implica la presencia de poblaciones naturales con las cuales puede haber flujo genético. En 1996, una evaluación de las posibles consecuencias del flujo genético entre colza GM y parientes silvestres de los géneros *Brassica*, *Diplotaxis*, *Hirschfeldia*, *Raphanus* y *Sinapis* realizada por la Comisión Nacional de Biotecnología (CONABIA) llevó a la Secretaria de Agricultura, Pesca y Alimentación a denegar la solicitud de ensayo a campo con colza resistente al herbicida glifosato (Evento GT73), destinada a producción de semilla para ser reexportada a Canadá (Resolución N° 228 del 11 de abril de 1997). Esta resolución fue ratificada por el Servicio Nacional de Sanidad Ambiental en 2007, mediante la resolución 305 que prohíbe la importación de colza portadora de eventos transgénicos no autorizados para su producción y comercialización en la República Argentina (SAGPyA, 1997; SENASA, 2007).

Se considera que *B. napus* no existe en estado silvestre (Gupta y Pratap, 2007; Prakash et al., 2012). Sin embargo, suelen producirse escapes de plantas de los cultivos de colza que llegan a formar poblaciones persistentes (Devos et al., 2012). Debido a la significativa dehiscencia de las silicuas, las semillas de *B. napus*, se pierden antes o durante la cosecha y quedan en el banco del suelo. También existe dispersión de propágulos hacia regiones distantes por el tráfico de maquinaria agrícola y pérdidas durante el transporte, lo que es potenciado por el escaso tamaño de la semilla (Gulden et al., 2003b; Von der Lippe y Kowarik, 2007, Bailleul et al., 2012).

Las semillas de *B. napus* tienen la capacidad de sobrevivir en el suelo y, bajo condiciones desfavorables, entrar en dormición secundaria para emerger posteriormente como plantas voluntarias (Simard et al., 2002; Gulden et al., 2003a; Gulden et al., 2004). Las comunidades de plantas voluntarias pueden persistir más de cinco años, como poblaciones ferales (Crawley y Brown, 1995, Pessel et al., 2001; Lutman et al., 2003; Pivard et al., 2008; Devos et al., 2012). Las poblaciones ferales de *B. napus* aparecen frecuentemente en regiones del mundo donde el cultivo tiene gran difusión, como en varios países de Europa, Estados Unidos y Canadá (Squire et al., 2011; Devos et al., 2012). También aparecen en hábitats ruderales, espacios no cultivados como márgenes de los cultivos, vera de rutas, caminos, zanjas, vías férreas, obras en construcción, puertos, instalaciones de almacenamiento, de procesamiento de granos y baldíos (Devos et al., 2012).

En regiones donde se cultiva intensamente la colza se ha observado que la persistencia de las poblaciones ferales de *B. napus* bajo condiciones semi-naturales puede ser de más de ocho años. Esas poblaciones poseen dormición de las semillas y germinación escalonada. Aunque el origen de estas poblaciones ferales ha sido adjudicado al aporte de semillas desde los cultivos y el transporte, también ha sido probado que la persistencia en el banco de semillas del suelo podría ser responsable de al menos la mitad del establecimiento y persistencia de estas poblaciones, sugiriendo así su capacidad de auto-reclutamiento. Estas poblaciones ferales suelen tener períodos de floración prolongados, que posibilitan la coincidencia con especies silvestres. Estas características hacen de las poblaciones ferales una fuente importante para el flujo génico, formando corredores o puentes que facilitan el contacto entre las especies. Este hecho cobra más relevancia cuando se trata de poblaciones ferales de *B. napus* modificada genéticamente (con resistencia a herbicidas, por ejemplo) (Pessel et al., 2001; Gruber y Claupein, 2007).

En regiones donde el cultivo de colza transgénica está autorizado, como en Canadá y Estados Unidos, suelen aparecer plantas espontáneas o poblaciones ferales de *B. napus* genéticamente modificadas (Tabla 4.1) (Yoshimura et al., 2006; Schafer et al., 2011; Knispel y McLachlan, 2010; Devos et al., 2012). Ello también se ha observado en regiones donde no estaban autorizadas, como en Japón, Bélgica y Suiza. Allí se encontraron en zonas portuarias, caminos y vías férreas, posiblemente debido a la dispersión de propágulos por el manipuleo y transporte de granos importados (Saji et al., 2005; Aono et al., 2006; Schoenenberger y D'Andrea, 2012; Devos et al., 2012;

Hecht et al., 2014).

Los test de detección de resistencia a glifosato transgénica, que están basados en la expresión de la proteína CP4 EPSPS, son reconocidos debido a su alta precisión. Han sido utilizados para la detección de flujo génico entre colza-canola y sus parientes silvestres, dispersión y persistencia de colza-canola en puertos y caminos, e incluso para determinar la presencia de la proteína en alimentación humana (Ash et al., 2003; Aono et al., 2006; Warwick et al., 2008; Kawata et al., 2009; Aono et al., 2011; Londo et al., 2011). Estos test son considerados rápidos, sencillos, económicos y a su vez, muy útiles en la detección de la proteína CP4 EPSPS en materias primas como hojas y semillas de cultivos y productos para la alimentación humana y animal (Van den Bulcke et al., 2007).

En 2012, técnicos de una empresa de agroquímicos encontraron algunas poblaciones de *Brassica* sp. que no podían ser controladas con glifosato en cultivos de soja RR del sudeste de la provincia de Buenos Aires. Debido a la prohibición del cultivo de colza con resistencia transgénica a glifosato en el país, la presencia y pertenencia taxonómica de estos biotipos resultaron dudosos.

Los objetivos de este capítulo fueron caracterizar las poblaciones ferales de *Brassica* sp. resistentes a glifosato, realizar la clasificación taxonómica de las accesiones, determinar el perfil de resistencia y el origen de la misma, y evaluar distintas medidas de control alternativo. La hipótesis es que las poblaciones ferales de *Brassica* sp. presentarán resistencia a glifosato de origen transgénico, que podrá ser detectada mediante diversas técnicas.

Tabla 4.1: Condiciones de detección de plantas espontáneas o poblaciones ferales de *Brassica napus* con resistencia transgénica a glifosato (adaptado de Devos et al., 2012).

País	Región	Hábitat	Estatus de la colza RR	Período	Referencia
Bélgica	Wallonia	Márgenes de cultivos y banquinas de caminos.	Prohibido el cultivo, permitido el uso directo y procesamiento (1997).	2007-2008	Devos et al. (2012).
		Zonas portuarias.		Sin mención	Devos et al. (2012).
Canadá	Sur de Manitoba.	Márgenes de cultivos y banquinas de caminos cercanos.	Permitido el cultivo (1995), el uso directo y procesamiento (1994).	2004-2006	Knispel et al.(2008).
		Banquinas de caminos y vías ferroviarias, zonas portuarias.		2005	Yoshimura et al. (2006).
Japón	Distrito de Kanto.	Zonas portuarias, banquinas de caminos y orillas de ríos.	Permitido el cultivo (2006), el uso directo y procesamiento (2001).	2004	Saji et al. (2005).
		Zonas portuarias, banquinas de caminos y orillas de ríos.		2005	Aono et al. (2006).
		Zonas portuarias y banquinas de caminos.		2004-2007	Kawata et al. (2009).
		Banquina de camino (ruta 51).		2005-2007	Nishizawa et al. (2009).
Estados Unidos	North Dakota.	Banquinas de caminos.	Permitido el cultivo (1999), el uso directo y procesamiento (1995).	2010	Schafer et al. (2010).
Suiza	Suiza y Principado de Liechtenstein	Vías ferroviarias.	Prohibido el cultivo, permitido el uso directo y procesamiento (1997).	2011-2012	Schoenenberger y D'Andrea (2012).
		Zonas de industrias oleaginosas, vías ferroviarias, zonas portuarias.		2011-2012	Hecht et al. (2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cría

En 2012, en campos del SE de la provincia de Buenos Aires, partido de Adolfo Gonzales Chaves se halló una población de *Brassica* sp. (**GER**) que no podía ser controlada con dosis comerciales de glifosato. La presencia de estas plantas fue denunciada por los productores a técnicos de la empresa de agroquímicos BASF Argentina S.A. (Migasso y Mock, com. pers.). La población conformaba extensos grupos en barbechos y cultivos de soja RR, donde no había sido controlado por el herbicida. A partir de ese hallazgo, a fines de 2012 mediante exploraciones de campo y entrevistas con productores se detectaron otras poblaciones de *Brassica* sp. que también presentaban resistencia a glifosato en otros establecimientos del partido de Tres Arroyos (**SMA** y **REG**).

Cada uno de los sitios en los que se hallaron las plantas de *Brassica* sp. con probable resistencia a glifosato se numeró cronológicamente. Se tomaron datos poblacionales mediante la escala semi-cuantitativa desarrollada por Domin-Krajina (Mueller-Dombois y Ellenberg, 1974). Los registros históricos del manejo agrícola del lote fueron provistos por los productores y/o responsables técnicos de los establecimientos.

Para todos los ensayos, salvo que se indique lo contrario, la progenie de las accesiones fue criada en macetas de 15 cm de diámetro, en una mezcla de suelo y sustrato (Grow Mix® Terrafertil), a razón de 10 plantas por maceta. Las macetas se mantuvieron bajo condiciones controladas en invernadero, con dos riegos diarios. Se aplicó un fertilizante líquido grado 5-3-3 (Chase LI 533) y urea a razón de 10 L ha⁻¹ y 50 kg ha⁻¹ respectivamente. Además se realizaron aplicaciones periódicas de imidacloprid al 35% (Punto 35 Gleba, SC, 0,5 mL ha⁻¹), para el control de pulgón ceniciento de las coles (*Brevicoryne brassicae*).

Caracterización morfológica y química

Se tomaron datos morfológicos de los individuos de la accesión GER. La progenie de los individuos sobrevivientes a la aplicación del herbicida en el campo fue sembrada y criada en el campo experimental del Departamento de Agronomía. Se tomaron datos taxonómicos para identificar la especie de acuerdo a las fuentes bibliográficas (Mulligan, 1995; Gulden et al., 2008). Como control se emplearon plantas de tres variedades comerciales de colza (*B. napus*) y ocho poblaciones naturales de nabo

silvestre (*B. rapa*) de la misma región bajo estudio, sin resistencia a glifosato.

Las poblaciones fueron sembradas en bandejas multicelda con sustrato comercial Growmix (Multipro) y criadas en invernáculo con luz natural, riego diario y a temperatura de 20-25 °C. En el estado de B4 de la escala CETIOM (Arnoud, 1989), en el mes de julio, las plantas fueron trasplantadas al campo experimental, bajo un marco de plantación de 0,3 x 0,5 m. Se utilizaron descriptores cuantitativos y cualitativos desarrollados por el Comité Internacional de Recursos Genéticos Vegetales, desarrollados en el capítulo 1 (IBPGR, 1990). Los datos cuantitativos fueron analizados mediante ANOVA y las medias fueron comparadas con el test de Tukey ($p < 0,05$). Los datos cualitativos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para todos los análisis se utilizó el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2015).

En una muestra de granos colectados en el hábitat natural se realizó la determinación del perfil ácido. Como control también se emplearon granos de variedades de colza (*B. napus*) y de poblaciones naturales de nabo silvestre (*B. rapa*). La materia grasa se determinó mediante resonancia magnética nuclear y el perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa. Los análisis fueron realizados por la Cámara Arbitral de Cereales de Bahía Blanca. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y comparación de medias (test Tukey) utilizando el software Infostat. Junto con los datos morfológicos se realizó un análisis de componentes principales (ACP), utilizando el software mencionado.

Caracterización de la resistencia

Se evaluó la resistencia a glifosato de las accesiones GER (Sitio 1), SMA (sitio 7) y REG (sitio 8), mediante un ensayo de *screening*. Se aplicó glifosato (sal amónica, formulado al 39,6%) a doble dosis comercial ($X=1,29$ kg e.a. $ha^{-1}=3,7$ L P.C. ha^{-1}). Como control se empleó la variedad de colza Nexera 1700 (BNC). La aplicación fue realizada al estado B3-B4, 42 días luego de la emergencia de las plantas, usando un equipo de CO₂ a presión constante, con pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB), velocidad de 1,54 km h^{-1} y caudal de 127 L ha^{-1} . La supervivencia se evaluó cuatro semanas después de la pulverización utilizando una escala de daño visual, de acuerdo al siguiente detalle: 1 = sin daño, 2 = $\leq 25\%$ daño, 3 = 26 - 75% daño, 4 = $> 75\%$ daño, 5 = muerte de plantas (adaptado de Moss et al, 1999). La respuesta fue expresada como porcentaje de supervivencia y las accesiones se designaron

resistentes si el 20% de los individuos sobrevivían a la aplicación del herbicida (Moss et al., 1999). A los 40 días posteriores al tratamiento se cortó todo el material vivo remanente y se llevó a estufa a 60°C hasta peso constante, para calcular la materia seca. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. Análisis de ANOVA y comparación de medias (test Tukey) fueron realizados con el software Infostat. Para el análisis de los resultados, los valores expresados en porcentaje fueron transformados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y = \arcsen (x + 0,5)^{1/2} \text{ [Ecuación 1]}$$

Se caracterizó la resistencia de la accesión GER a glifosato mediante un ensayo de dosis-respuesta. Se aplicó un rango de dosis del herbicida glifosato (sal amónica, formulado al 39,6%), correspondientes a 1/10, 1/5, 1/2, 1, 2, 5, 10, 15 y 30 veces la dosis comercial ($X=1,29 \text{ kg e.a. ha}^{-1}=3,7 \text{ L P.C. ha}^{-1}$). Como control se empleó la variedad de colza Nexera 1700 (BNC), a la cual se le aplicó las dosis 1/50, 1/20, 1/10, 1/5, 1/2, 1, 2, 5 y 10 X. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. El ensayo fue repetido en dos años. La supervivencia se evaluó cuatro semanas después de la pulverización de la misma forma que en el ensayo de *screening*. Se calculó también la materia seca de las plantas, cortando todo el material vivo remanente y secándolo en estufa hasta peso constante. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión log-logístico no lineal con tres parámetros. Las curvas de dosis-respuesta se realizaron utilizando el paquete drc del software estadístico R3.2.2 (R Core Team, 2015). Se estimó la dosis requerida para matar el 50% de las plantas (DL_{50}). Este valor fue utilizado para calcular el factor de resistencia (FR), que se definió como la relación entre las DL_{50} de los biotipos resistente y susceptible ($DL_{50} \text{ R} / DL_{50} \text{ S}$). La ecuación del modelo log-logístico utilizada fue:

$$Y = d / 1 + \exp \{b [\log(x) - \log(e)]\} \text{ [Ecuación 2]}$$

donde Y fue la supervivencia expresada en porcentaje, e la DL_{50} , d el coeficiente correspondiente al límite superior de la curva, b la pendiente de la curva alrededor de e , y x (variable independiente) la dosis del herbicida (Seefeldt et al. 1995; Nielsen et al. 2004; Knezevic et al. 2007; Ritz, 2010).

Detección del transgen mediante test inmunológico

Para confirmar la presencia del transgen de resistencia a glifosato se utilizó un *kit* comercial (QuickStik™ Kit for Roundup Ready® Canola Leaf & Seed) diseñado para

detectar la expresión de la proteína CP4 EPSPS en los tejidos. Esta proteína, diferente a la sintetizada por la planta, proviene de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* y reduce la afinidad entre el herbicida y el complejo enzima-sustrato, lo que permite que la enzima EPSPS catalice normalmente las reacciones de síntesis de aminoácidos aromáticos (Arregui y Puricelli, 2008; Green, 2009; Feng et al., 2010).

Se utilizaron hojas frescas de 9 plantas de GER que se encontraban en condiciones de invernáculo, en B2 y una semilla de la misma accesión. En el caso de SMA se muestrearon 5 semillas. El control negativo fue la variedad de colza-canola Nexera 1700 (BNC) de la cual se muestreó una semilla y hojas de cuatro plantas. Como controles positivos se utilizaron semillas de una variedad de soja Roundup Ready® (DM4612) y un híbrido de maíz Roundup Ready® (ARV2180). Si bien el *kit* es específico para colza-canola, se consideró que como la soja y maíz Roundup Ready® presentan el mismo evento, deberían expresar la proteína CP4 EPSPS.

El procedimiento de análisis realizado siguió los siguientes pasos. Se cortaron dos discos de hojas por individuo utilizando la tapa de un tubo eppendorf de 1,5 mL, y se colocaron dentro del mismo. En el caso de usar semillas, se colocó una semilla por tubo. Luego se colocó un pilón plástico dentro de cada tubo y se machacó el material (hoja o semilla) durante 20-30 segundos. Se agregó el buffer de extracción dentro de cada tubo (700 µL para hoja y 350 µL para semilla). Se repitió el segundo paso para mezclar el tejido con el buffer y posteriormente se descartó el pilón plástico. Se colocó una banda dentro de cada tubo y luego de cinco minutos se procedió a realizar la interpretación.

Base molecular de la resistencia

Se analizó la presencia del transgén de resistencia a glifosato, mediante la detección del evento GT73, basada en el Protocol RT73-Community Reference Laboratory for GMO Food and Feeds (Mazzara et al., 2007). Los primers utilizados amplifican un producto de 108 pb que comprende la región recombinante entre la construcción transgénica y el genoma de la colza. Como control positivo y para identificar la pertenencia taxonómica de las especies, se utilizó el marcador microsatélite BRMS005, específico del genoma A de *Brassica*.

Se colectaron hojas frescas de 6 plantas de la accesión GER y 5 de la colza-canola Nexera 1700 (BNC), criadas al efecto en condiciones controladas en el invernadero.

Las extracciones de ADN genómico se realizaron mediante un método rápido (Doyle y Doyle, 1987). El ADN genómico obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro, leyendo absorbancia a longitudes de onda de 260 (A260) y 280 nm (A280). Para determinar la calidad de ADN se utilizó la relación A260/A280. La concentración de ADN se calculó utilizando la siguiente fórmula: [ADN] = A260 x factor de dilución x 50 ng/μL.

La evaluación molecular de la resistencia a glifosato se realizó utilizando el primer RT73 (Monsanto, 2004) Se estableció la temperatura de hibridación (TA) para los primers de 53°C. En un volumen final de reacción de 20 μL se colocaron: buffer PCR Gibco 10X; Cl₂Mg (2,5 mM), dNTP (0,125M cada uno), primers F y R (5,5 pmol cada uno), 1 unidad de Taq polimerasa y 60 ng de ADN genómico, se llevó a volumen con agua ultra pura. Para la amplificación se utilizó el siguiente programa de PCR: la desnaturalización inicial se realizó a 95°C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, con una extensión final de 20 minutos. Los productos de PCR fueron separados y cotejados en geles de agarosa al 10% en buffer TAE, mediante electroforesis. Se sembraron 7 μL del producto de cada amplificación y se corrió a 50 W durante tres horas en una cuba de secuenciación Sequi-Gen GT BioRad. Se incluyó un marcador de peso molecular 30-330 bp Step ladder (Promega). Las bandas fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio y se fotografiaron. La lectura de los fragmentos de ADN fue visual, asumiendo que cada banda representaba un locus simple con alelos dominantes.

Control químico

Se exploró la sensibilidad de la accesión GER a ocho herbicidas alternativos al glifosato (Tabla 4.2). Los herbicidas comprendieron activos recomendados para cultivos regionales, con varios modos de acción y espectro de control. Se aplicó la dosis recomendada (X) usando un equipo de CO₂ a presión constante, con pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB), velocidad de 1,54 km h⁻¹ y caudal de 127 L ha⁻¹. La aplicación fue realizada al estado 1.3-1.4, 42 días luego de la emergencia de las plantas. La supervivencia de las plantas se evaluó 30 días después del tratamiento y los datos se expresaron como porcentaje del control sin herbicida, de la misma forma que en el ensayo de resistencia. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. Análisis de ANOVA y comparación de medias (test Tukey) fueron realizados con el software Infostat.

Tabla 4.2: Herbicidas utilizados en el ensayo de alternativas de control y dosis comercial (X) del principio activo.

Herbicida	Nombre comercial	Cultivo	Momento de aplicación	Formulación	Dosis g p.a ha ⁻¹
Imazetapir	Pivot H	Soja, maní, arveja, alfalfa, maíz CL.	POST: hasta 2° hoja verdadera	100 g L ⁻¹	100,0
Imazapir	Arsenal	Áreas sin cultivo, forestales, girasol CL.	POST: selectivo en cultivos CL.	480 g L ⁻¹	80,2
Clorimurón	Backup	Soja, pasturas.	POST: a partir de 1° hoja verdadera	250 g kg ⁻¹	15,0
Diclosulam	Spider	Soja.	PREE: barbecho	840 g kg ⁻¹	25,2
Bentazón	Basagran 60	Soja, maíz, sorgo, arveja, pasturas.	POST: a partir de 1° hoja verdadera.	600 g L ⁻¹	960,0
2,4-D (Sal)	Genérico	Trigo, cebada, maíz, sorgo, barbechos.	PREE: barbecho POST: trigo, hasta inicio encañonado.	602 g L ⁻¹	451,5
Fluroxipir	Starane	Trigo, cebada, centeno, avena.	POST: hasta hoja bandera.	288 g L ⁻¹	172,8
Saflufenacil + Imazetapir	Heat + Pivot (Optill)	Barbechos: soja, trigo, cebada, maíz.	PREE: barbecho	178 g kg ⁻¹ + 502 g kg ⁻¹	24,9 + 70,3

RESULTADOS

Condiciones agroecológicas

La población GER fue hallada en tres establecimientos distintos (Figura 4.1, Tabla 4.3), propiedad de los mismos dueños. En el primer punto relevado (Sitio 1), el biotipo formaba un grupo de más de 1000 plantas, dentro de un lote en barbecho, cuya rotación predominante en los últimos años había sido trigo-soja (Figura 4.2). El grupo estaba dispuesto en un parche semicircular ($>50 \text{ m}^2$) ubicado a menos de 30 m del borde N de un lote cuadrangular de aproximadamente 70 ha. Los individuos de la población se encontraban en diversos estados fenológicos, desde emergencia y roseta temprana hasta fructificación avanzada. La densidad promedio de las plantas adultas era de $5,4 \pm 1,5 \text{ pl m}^{-2}$, mientras que la segunda cohorte en emergencia se hallaba a una densidad de $92,3 \pm 10,3 \text{ pl m}^{-2}$. El lote había recibido una aplicación de glifosato a dosis comercial.

En el segundo lote explorado (Sitio 2), los individuos de la población GER formaban un parche de 50 x 20 m, en estado de roseta y floración. El lote invadido se encontraba vecino al Sitio 1, separado por menos de 1000 m en dirección NO. Frente a estos establecimientos, en un lote sembrado con cebada propiedad de los mismos dueños, se encontraron plantas aisladas de *Brassica rapa* (nabo silvestre). El número de individuos de esa especie era menor a 20, distribuidos por el lote, y se encontraban en inicio de floración.

El tercer sitio donde fueron halladas plantas de GER (Sitio 3) correspondió a un establecimiento separado por más de 12 km de distancia de los Sitios 1 y 2. En este sitio las plantas de *B. napus* se encontraban en un parche de más de 300 individuos en floración a una densidad de $2,5 \pm 1,6 \text{ pl m}^{-2}$, en una depresión de un lote de 80 ha sembrado con trigo. Algunas plantas aisladas fueron observadas en el camino de conexión entre los establecimientos (Sitio 4), sobre las banquinas del camino que habían recibido herbicida, y era evidente que habían sobrevivido a la aplicación de químico.

La rotación de cultivos básica de los lotes en que fue hallada la población GER era trigo-soja. El sistema productivo se encontraba bajo labranza cero, predominando el empleo de barbecho químico con glifosato y 2,4-D. El control de malezas en trigo se efectuaba con metsulfurón, 2,4-D y la mezcla iodosulfuron + metsulfurón (Hussar®).

La soja RR era tratada con glifosato (Roundup Full II 66,2%), a dosis entre 1,5 y 2 L ha⁻¹. De acuerdo a los registros de los productores este biotipo resistente tenía una presencia de más de tres años en la región. Fue observado por primera vez en Sitio 3. Su aparición y dispersión fue adjudicada a la maquinaria de cosecha contratada. La dispersión hacia los Sitios 2 y 3 tuvo lugar sin que mediaran cultivos de colza.

El primer lote donde fue hallado la población SMA (Sitio 5) se encontraba sembrado con soja RR y las plantas presentaban similares características a las del partido de Gonzales Chaves. La distancia en línea recta con respecto al sitio 1 era de aproximadamente 33 km. Los individuos se hallaban en múltiples estados de desarrollo, desde roseta a floración. Se observaron pequeños parches lineares cerca del alambrado y monte con no más de 20 plantas por parche. La rotación habitual del lote era soja-trigo. En un segundo lote de soja (Sitio 6), del mismo productor, se observaron franjas con individuos de *B. napus* en uno de los bordes, en floración e inicio de fructificación. En este caso se había realizado una aplicación de glifosato + imazetapir (3 L ha⁻¹ + 1,35 L ha⁻¹). Los efectos del imazetapir eran notables, la mayor parte de las plantas estaban muriendo, aunque su estado de desarrollo era muy avanzado. Estos dos lotes pertenecían al mismo dueño. También se observaron individuos aislados en los bordes de lote, caminos, molinos y otras zonas no arables. En la esquina de un lote, junto a un molino y tanque (Sitio 7), un grupo de plantas del biotipo fue hallado en fructificación avanzada. Este sitio se encontraba separado por 25 km del sitio 5 y 10 km del sitio 1, representando una posición intermedia entre ambos sitios.

En un establecimiento vecino (Sitio 8), propiedad de otro dueño, se observó un parche de plantas de *B. napus* en la esquina de un lote sembrado con soja RR. En este caso, los individuos se encontraban en fructificación avanzada. La accesión fue identificada como REG.

Según la información provista por el productor del partido de Tres Arroyos (Sitios 5, 6 y 7), las primeras observaciones del biotipo ocurrieron en 2006-07, en un lote que había sido cultivado por otro productor con colza de origen desconocido. Los voluntarios emergentes resultaron muy resistentes al glifosato, y se fueron dispersados a otros lotes, probablemente por la maquinaria de cosecha.

Tabla 4.3: Descripción de las accesiones utilizadas en los ensayos de caracterización de las poblaciones ferales de *Brassica napus* resistentes a glifosato.

Accesión	Sitios	Localidad	Habitat	Tamaño poblacional
GER	1, 2	Adolfo Gonzales Chaves	Dentro de lotes en barbecho. Establecimiento La Germana.	>1000 plantas 92,3 ± 10,3 pl m ⁻² (roseta) 5,4 ± 1,5 pl m ⁻² (floración)
	4		Sobre banquina de camino vecinal, que había recibido la aplicación de herbicida glifosato.	1-5 plantas
	3		Dentro de lote de trigo. Establecimiento El Coraje.	2,5 ± 1,6 pl m ⁻²
SMA	5, 6	San Mayol	Dentro de lote de soja RR.	>500 plantas
	7		Junto a molino, esquina de lote	~50 plantas
REG	8		Dentro de lote de soja RR.	>500 plantas

Figura 4.1: Distribución geográfica de los distintos sitios donde fueron halladas plantas ferales de *Brassica napus* con resistencia a glifosato.

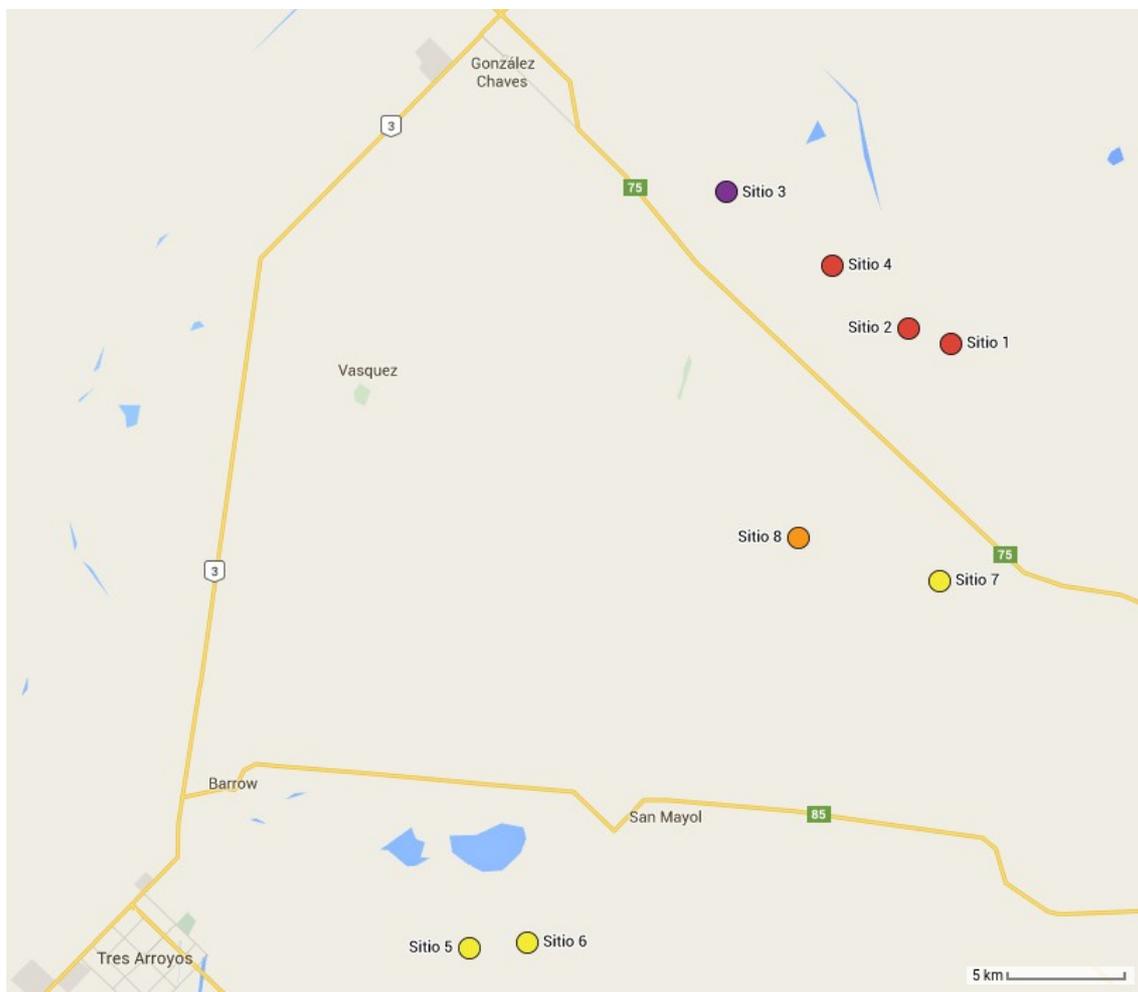


Figura 4.2: Arriba: Ubicación de la población de *Brassica napus* GER en la primavera del 2012, en los sitios de exploración 1 y 2. Abajo: Vista de la población GER en el sitio 1. Se observan dos cohortes: plantas en emergencia al frente y en madurez en la parte posterior.



Caracterización morfológica y química

El análisis de los caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos de las plantas de la accesión correspondieron con lo descrito para *B. napus* (Tabla 4.4). Los caracteres cualitativos más relevantes para diferenciar la especie como color de hojas, pubescencia, nivel de abrazamiento de las hojas superiores, color de flores, disposición de los pimpollos con respecto a las flores abiertas y disposición de las silicuas maduras, todos fueron congruentes con *B. napus*, diferenciándose de la especie silvestre *B. rapa*. El largo del rostro y la relación rostro/valva estuvieron comprendidos entre los valores de 0,8 a 1,0 cm y 0,20 a 0,17 citados para *B. napus* (Mulligan, 1995). La accesión GER presentó rostro de 0,97 cm y relación rostro/valva 0,21; sin diferenciarse de los mismos parámetros medidos en la colza *B. napus*. Ambos grupos se diferenciaron de *B. rapa* que presentó un rostro de 1,27 cm y una relación rostro/valva de 0,37. También se observó un alto nivel de producción de semilla por autofecundación bajo condiciones de ausencia de polinizadores en el invernadero.

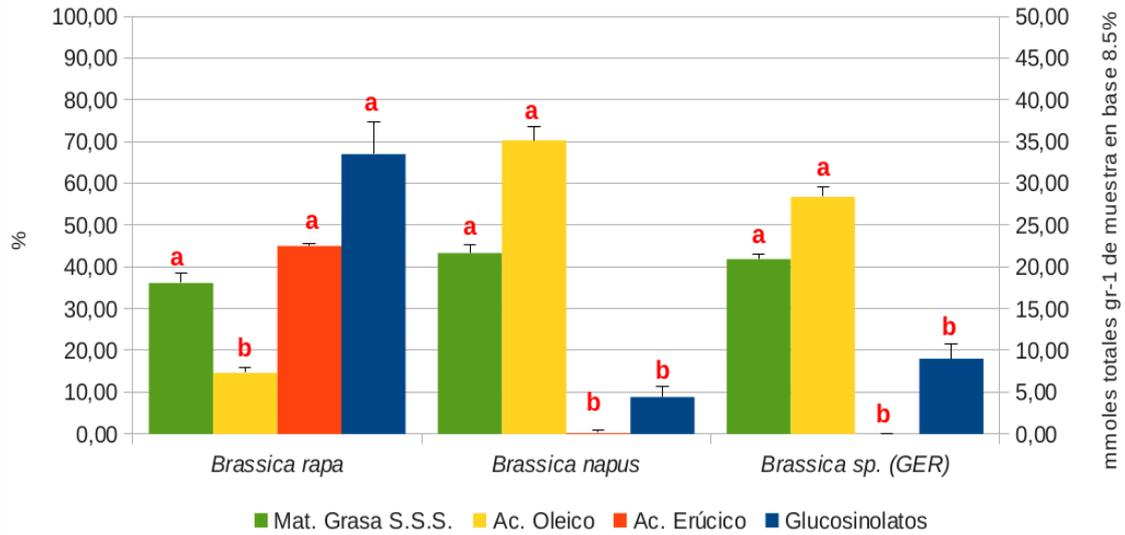
El análisis químico de las semillas de GER mostró un perfil ácido que no se diferenció al de variedades mejoradas de colza-canola (Figura 4.3). En especial, los valores de ácido erúxico (22:1) y glucosinolatos fueron congruentes con los observados en canola. Los niveles de ácido oleico (18:1) fueron elevados, sin diferenciarse de las variedades de *B. napus*, pero significativamente más alto que el de las poblaciones naturales de *B. rapa*. No se encontraron diferencias significativas entre ninguna de las accesiones para los valores de ácido linoleico (18:2) y linolénico (18:3). En el resto de los ácidos grasos del perfil ácido los valores de GER se asemejaron a los de las variedades de *B. napus*, y ambos se diferenciaron de *B. rapa*. Esta diferencia fue notable también en la proporción de ácido eicosenoico (20:1), otro ácido graso indeseable de cadena larga, que en las variedades mejoradas de colza-canola (y en la accesión GER) mostró escasa presencia (Ahuja y Banga, 1993; Agnihotri et al., 2007). El análisis de componentes principales de nueve caracteres cuantitativos morfológicos y químicos ubicaron a GER junto con las variedades de *B. napus* analizadas (Figura 4.4).

Tabla 4.4: Caracterización morfológica de la accesión feral de *Brassica napus* GER criada en el campo experimental del Departamento de Agronomía, comparada con poblaciones naturales de *B. rapa* y variedades comerciales de colza *B. napus*.

DESCRIPTORES	GER	<i>B. napus</i>	<i>B. rapa</i>
Ancho cotiledón (cm)	2,23 ± 0,05 a	2,28 ± 0,03 a	1,80 ± 0,02 b
Color hoja inferior	7,0 ± 0,0 b	7,0 ± 0,0 b	2,0 ± 0,0 a
Pubescencia hoja inferior	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	4,4 ± 0,1 a
Tricomas hoja inferior	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,9 ± 0,1 a
Abrazamiento hoja superior	2,0 ± 0,0 b	2,0 ± 0,0 b	3,5 ± 0,1 a
Color pétalos	2,0 ± 0,0 b	2,0 ± 0,0 b	3,0 ± 0,0 a
Disposición pimpollos	3,0 ± 0,0 a	3,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 b
Largo silicua (cm)	5,59 ± 0,18 a	5,72 ± 0,22 a	4,82 ± 0,07 b
Rostro silicua (cm)	0,97 ± 0,04 b	0,99 ± 0,04 b	1,27 ± 0,04 a
Relación rostro/valva	0,21 ± 0,01 b	0,23 ± 0,01 b	0,37 ± 0,01 a
Disposición silicuas	4,0 ± 0,0 a	4,0 ± 0,0 a	3,0 ± 0,0 b
Biomasa de semilla (mg pl ⁻¹)	3,25 ± 0,04 a	3,58 ± 0,13 a	1,12 ± 0,04 b

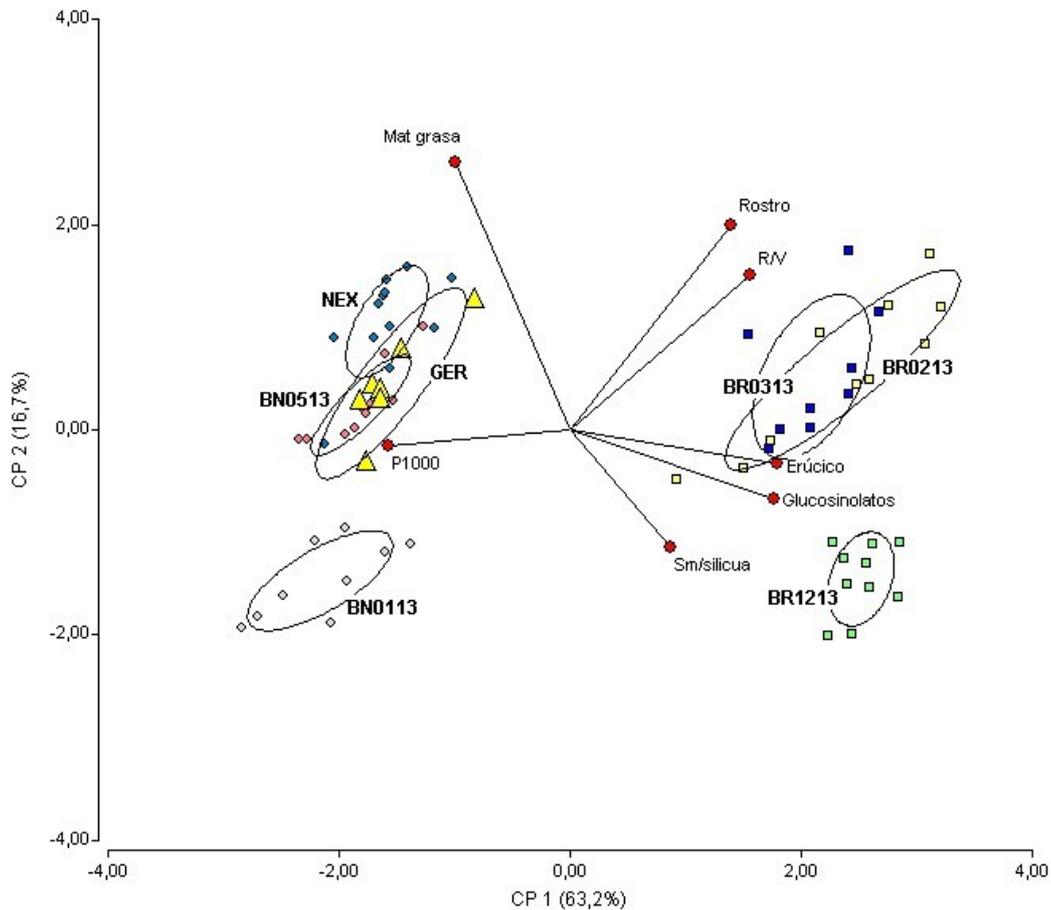
Dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias según Tukey para $p < 0,05$.

Figura 4.3: Caracterización química de los granos de la población feral de *Brassica napus* GER, de poblaciones naturales de *B. rapa* (5) y de variedades de colza *B. napus* (5). Ácidos grasos oleico, erúcico y materia grasa sobre sustancia seca (S.S.S.) expresados como porcentaje, glucosinolatos como μmoles totales por gr de muestra en base 8,5%.



Para cada carácter, letras diferentes indican diferencias entre especies según Tukey para $p < 0,05$.

Figura 4.4: Análisis de componentes principales (ACP) de accesiones de colza *Brassica napus*, poblaciones naturales de nabo *B. rapa* y de la población feral GER mediante siete parámetros cuantitativos medidos en plantas desarrolladas en su hábitat natural. Los vectores representan las variables estudiadas.



Parámetros: P1000=peso de mil granos (g); Mat grasa=% de materia grasa S.S.S.; Rostro=largo del rostro de las silicuas (cm); R/V=relación rostro valvas de las silicuas; Erúcido=% de ácido erúcido; Glucosinolatos=mmoles de glucosinolatos por gr de muestra base 8.5%; Sm/silicua=número de semillas por silicua.

Material genético: GER: población feral de *B. napus*, NEX, BN0113: variedades comerciales de colza-canola y BN0513: voluntario de colza-canola. BR0213, BR0313, BR1213: poblaciones naturales de *B. rapa*.

Caracterización de la resistencia

Las accesiones de *B. napus* feral GER, SMA y REG fueron resistentes al glifosato, aplicado a doble dosis comercial. La supervivencia fue cercana o superior al 90% en todos las accesiones evaluadas, diferenciándose de la colza convencional cuyas plantas mostraron síntomas severos de fitotoxicidad por acción del herbicida. No se encontraron diferencias significativas entre las accesiones ferales (Tabla 4.5).

El ensayo de dosis-respuesta confirmó que la accesión GER presentó elevada resistencia a glifosato, y fue significativamente diferente a la variedad comercial de colza (BNC) usada como control (Figura 4.5). La supervivencia de la accesión GER fue mayor al 70% incluso a más de 15 veces la dosis comercial de glifosato. En cambio, la supervivencia de la variedad BNC fue reducida un 75% a media dosis (0,65 kg e.a. ha⁻¹). La DL₅₀ de GER fue de 27,40 kg e.a. ha⁻¹ (más de 21X), mientras que la de NEX fue de 0,48 kg e.a ha⁻¹, lo que constituyó un factor de resistencia de 57 (Tabla 4.6).

Los resultados de este análisis fueron similares a los obtenidos a partir de la materia seca (Figura 4.5). Se estimó un valor de GR₅₀ para la accesión BNC de 14,76 kg e.a. ha⁻¹. En cambio, la variedad convencional de colza BNC presentó un GR₅₀ de 0,05 kg e.a. ha⁻¹, un tanto menor a la observada mediante los datos de supervivencia, por lo que el factor de resistencia se ubicó en 311 (Tabla 4.6).

Tabla 4.5: Supervivencia y materia seca de las accesiones de *Brassica napus* feral GER, SMA y REG y una variedad de colza convencional (BNC), a la aplicación de glifosato a doble dosis comercial, expresada como porcentaje del control.

Accesión	Supervivencia (%)	Materia seca (%)
BNC	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
GER (Sitio 1)	100,0 ± 0,0 a	88,0 ± 5,8 a
SMA (Sitio 7)	96,9 ± 2,4 a	89,8 ± 4,2 a
REG (Sitio 8)	86,3 ± 6,3 a	103,0 ± 11,7 a

Para cada columna, letras diferentes indican diferencias según Tukey para p <0,05.

Figura 4.5: Curvas de dosis-respuesta de la población feral de *Brassica napus* (GER) y una variedad de colza convencional BNC a la aplicación de un rango amplio de dosis de glifosato. Arriba expresada en porcentaje de supervivencia, abajo como materia seca. Cada punto representa la media de cuatro repeticiones conteniendo 10 plantas cada una.

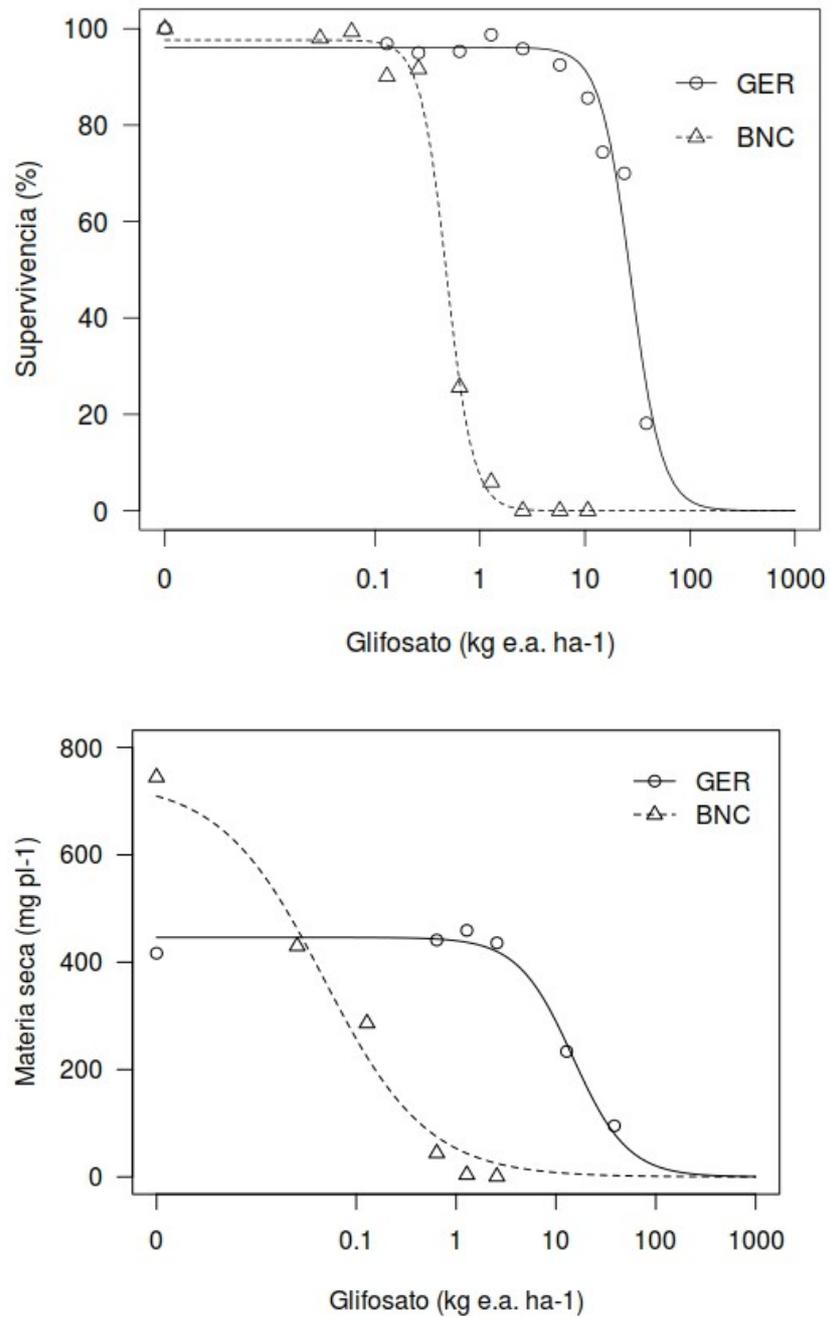


Tabla 4.6: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la supervivencia de la accesión de *Brassica napus* resistente (GER) y una variedad de colza convencional (BNC) a la aplicación de glifosato, expresadas como porcentaje de supervivencia y materia seca. Se estimaron también los niveles comparados de resistencia.

	Accesión	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>e</i> (DL ₅₀ o GR ₅₀)	FR ^a
Supervivencia (%)	BNC	3,46	97,65	0,48	56,87
	GER	2,95	96,14	27,40	
Materia seca (mg pl ⁻¹)	BNC	0,84	737,53	0,05	310,94
	GER	1,58	446,29	14,76	

Parámetros: *b*=pendiente de las curvas alrededor de *e*, *d*=límite superior de las curvas, *e*=punto de inflexión de las curvas, DL₅₀=dosis de glifosato (kg e.a. ha⁻¹) requerida para reducir en un 50% la supervivencia de las plantas, GR₅₀=dosis de glifosato (en kg e.a. ha⁻¹) requerida para reducir en un 50% la materia seca de las plantas, FR=factor de resistencia (DL₅₀ o GR₅₀Rs/DL₅₀ o GR₅₀ Su).

Detección del transgen mediante test inmunológico

La totalidad los individuos de GER y SMA muestreados mostraron respuesta positiva al test, confirmando que poseían la enzima CP4 EPSPS proveniente de *A. tumefaciens* (Figura 4.6). Por su parte, los individuos de la variedad NEX mostraron ausencia de la proteína. El test también identificó la presencia de la enzima CP4 EPSPS en la variedad de soja DM4612 y en el híbrido de maíz ARV2180, ambos con resistencia transgénica al herbicida.

Base molecular de la resistencia

Todos los individuos muestreados de la accesión GER con fenotipo resistente amplificaron el fragmento de 108 pb (Figura 4.7). Este hallazgo concuerda con la hipótesis que las poblaciones ferales de *B. napus* resistentes a glifosato contiene el transgén correspondiente al evento GT73. En cambio, los cinco individuos de la variedad convencional NEX no amplificaron este fragmento. El microsatélite amplificó productos en todos los individuos analizados, confirmando así que la PCR fue correcta. Además los patrones de bandas permitieron diferenciar *B. napus* de *B. rapa*.

Figura 4.6: Resultados del test inmunológico. Tres individuos negativos de una variedad convencional de *Brassica napus* (izquierda), seis individuos positivos correspondientes a la accesión GER (centro) y cinco individuos positivos de SMA (derecha).

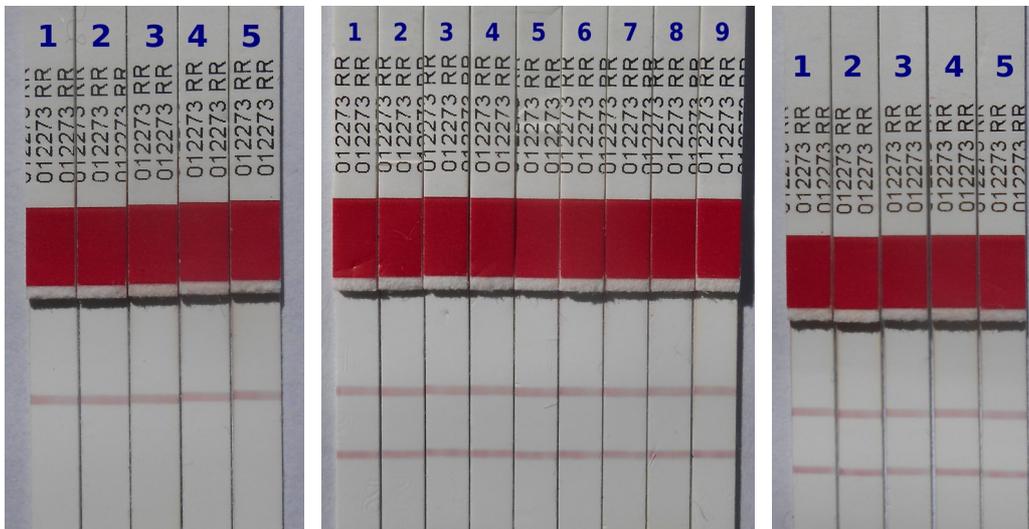
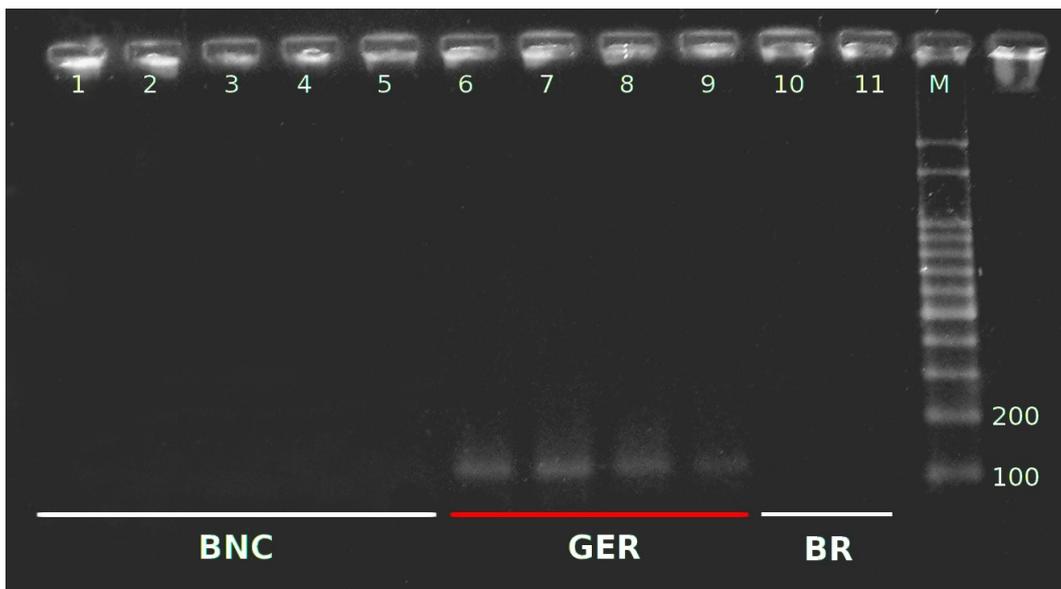


Figura 4.7: Patrón de bandas amplificadas con el primer RT73 para una variedad de colza convencional (calles 1-5) y para la población de *Brassica napus* feral GER (calles 6-9). Se incluyeron dos plantas de distintas poblaciones naturales de *B. rapa* (BR) (calles 10-11).



Control químico

A dosis comercial, todos los herbicidas evaluados lograron un completo control de la accesión resistente GER (Tabla 4.7). Los herbicidas inhibidores de la AHAS (imazetapir, imazapir, clorimurón y diclosulam) fueron más lentos en la aparición de síntomas y dejaron material vivo remanente, si bien los ápices de crecimiento resultaron totalmente dañados. Los herbicidas hormonales 2,4-D y fluroxipir fueron altamente efectivos, de rápida acción y mataron completamente a las plantas. La mezcla de saflufenacil e imazetapir fue igualmente efectiva.

Tabla 4.7: Supervivencia de la población feral de *Brassica napus* GER y una variedad de colza convencional (BNC), a la aplicación de herbicidas alternativos al glifosato a dosis comercial.

Herbicida		Supervivencia (%)	
Principio activo	Nombre comercial	BNC	GER
Imazetapir	Pivot	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Imazapir	Arsenal (Clearsol)	0,6 ± 0,6	0,0 ± 0,0
Clorimurón	Backup	0,6 ± 0,6	0,0 ± 0,0
Diclosulam	Spider	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Bentazón	Basagran	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4-D (Sal)	Genérico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Fluroxipir	Starane	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Saflufenacil + Imazetapir	Heat + Pivot (Optill)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

DISCUSIÓN

Las poblaciones de *Brassica* sp. no controladas por glifosato a nivel de campo mostraron elevada resistencia a este activo en ensayos bajo condiciones controladas, llegando a dosis 30 veces por encima de la dosis comercial. El perfil de resistencia de la accesión GER medido en el invernadero fue equivalente al observado por Nandula et al. (2007) en una variedad de colza-canola genéticamente modificada con resistencia a glifosato (Hyola 514RR). La caracterización morfológica y química de las plantas de GER permitieron identificar la especie como *B. napus*, con ciertos caracteres que la asemejan a variedades cultivadas de colza-canola.

Debido a la aparente ausencia de otros mecanismos de resistencia a glifosato en *B. napus* (como mutagénesis o cruzamiento con parientes que posean mutaciones naturales), al elevado factor de resistencia del biotipo y la confirmación mediante el método inmunológico y análisis molecular, se comprobó que se trataba de plantas de *B. napus* transgénicas. El origen de este biotipo es incierto, debido a la prohibición existente en nuestro país para el cultivo de variedades con el evento de transgénesis que confiere resistencia a glifosato.

Este descubrimiento podría sugerir que la resistencia a glifosato podría provenir de cultivos de colza transgénica realizados de manera informal en el país o de individuos ingresados como contaminante de semilla importada antes de 2007, año a partir del cual se solicita análisis probatorio de ausencia de material OGM (SENASA, 2007).

Los productores y profesionales consultados adjudicaron la aparición y dispersión de la población al ingreso de maquinarias contratadas. Ello no puede descartarse ya que se conoce que la maquinaria agrícola puede participar en la dispersión de malezas (Thill y Mallory-Smith, 1997; Benvenuti, 2007; Michael et al., 2010). Por las características de las semillas de *B. napus*, este es un suceso habitual en esta especie (Von der Lippe y Kowarik, 2007, Bailleul et al., 2012; Allnut et al., 2013). El hallazgo de estas poblaciones en lotes que posiblemente compartieron la misma maquinaria agrícola, está en concordancia con estas observaciones.

Las poblaciones ferales de *B. napus* halladas en otras partes de mundo aparecen frecuentemente en ambientes ruderales, en lugares con intenso cultivo de colza (Devos et al., 2012). En algunos casos, se ha observado la persistencia de estas poblaciones durante varios años, involucrando procesos de cambios de densidad,

extinción, recolonización y movimiento de comunidades (Crawley y Brown, 1995; Crawley y Brown, 2004). Pivard et al. (2008) demostraron que la persistencia de poblaciones ferales podía ser adjudicada en iguales proporciones al aporte constante de semillas desde lotes cultivados cercanos, como a la persistencia de la semilla en el banco del suelo. Pero además observaron que en un porcentaje menor, las poblaciones podían autoperpetuarse por reclutamiento local.

Los voluntarios de *B. napus* son usuales en áreas de cultivo de colza-canola del oeste de Canadá y en los Estados Unidos, donde se la considera una maleza esporádica. En Canadá, la aparición de plantas voluntarias de *B. napus* ha aumentado en las últimas tres décadas, considerándose una de las 10 malezas más comunes para mediados de los '90 (Gulden et al., 2008; Simard et al., 2002). Sin embargo, se carece de estudios sistemáticos sobre invasividad, interferencia y movimientos de *B. napus* como maleza ruderal. Es por esto que el caso presentado en este capítulo reviste características tan particulares. Si bien la presencia de plantas ferales de *B. napus* ha sido denunciada en países donde el cultivo de colza transgénica estaba prohibido (Saji et al., 2005; Schoenenberger y D'Andrea 2012; Hecht et al., 2014), en todos estos casos el procesamiento de semilla transgénica estaba permitido. Estas plantas aparecieron precisamente en zonas de manipuleo de semilla como puertos, carreteras y vías férreas. En nuestro país las plantas transgénicas fueron detectadas en ambientes típicamente ruderales, actuando como maleza y moviéndose varios kilómetros sin que se realizaran cultivos de colza.

La experimentación mostró que existen alternativas para el control de las poblaciones ferales resistentes a glifosato en varias situaciones y cultivos. En soja RR, el uso de herbicidas inhibidores de la AHAS (imazetapir, clorimurón y en pre-emergencia diclosulam) puede ser recomendada. En cereales de invierno, el 2,4-D demostró ser muy efectivo y podría usarse para control temprano de la primera emergencia de la población. En estados más avanzados del cultivo, el fluroxipir sería recomendado para controlar los nacimientos posteriores que son los que causaron mayores problemas y se escaparon al control temprano con sulfonilureas realizado habitualmente en trigo. El saflufenacil en mezcla con imazetapir fue igualmente efectivo.

Los herbicidas evaluados en el desarrollo de esta investigación fueron empleados en un lote invadido por este biotipo, y resultaron efectivos para controlar la población. El monitoreo de los lotes invadidos en el otoño de 2014 mostró completa eliminación de

la población GER en el sitio 1. La rotación de herbicidas fue modificada por el productor con respecto a años anteriores a la detección de la maleza. En este caso utilizó 2,4-D y dicamba en cereales de invierno, e imazetapir y clorimurón en la soja, complementando al glifosato. Por el contrario, en el sitio 3 no se realizó ningún cambio de manejo y se continuó con el manejo convencional basado en el uso intensivo de glifosato. En este lugar, se comprobó la presencia y dispersión de la población feral de *B. napus*, que se había extendido por todo el lote donde se lo localizó en 2012 y también hacia un lote vecino. Se estimó un tamaño poblacional de más de 100.000 plantas de *B. napus*.

La presencia de poblaciones ferales de *B. napus* con resistencia a glifosato en Argentina reafirma la conveniencia de rotar el empleo de herbicidas con diferente sitio de acción. La invasividad de estos biotipos ferales en ambientes agrícolas se ve aumentada por la presencia de resistencia a herbicidas. Este carácter le confiere una clara ventaja en sistemas agrícolas basados en el empleo intensivo de glifosato.

Capítulo 5: CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES NATURALES DE *Brassica rapa* CON RESISTENCIA TRANSGÉNICA A GLIFOSATO Y RESISTENCIA A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ENZIMA AHAS

Brassica rapa L. es una especie anual de la familia de las brassicaceae (crucíferas), cultivada desde hace siglos como hortícola u oleaginosa (Warwick, 2011). Es una de las seis especies de *Brassica* cultivadas, cuyas relaciones filogenéticas fueron descritas por el botánico coreano Woo Jang-choon, en lo que se dio a conocer como el triángulo de “U”. Se considera que tras cruces interespecíficas naturales con *B. oleracea* (coles o repollos), *B. rapa* dio origen a la especie cultivada *B. napus* (colza) (Gupta y Pratap, 2007; Allender y King, 2010; Iniguez-Luy y Federico, 2011; Prakash et al., 2012).

Brassica rapa es la primer especie brasicácea que fue domesticada. El centro de origen más aceptado es el Creciente Fértil, que abarca las regiones de los actuales países de Iran, Irak y Turquía. Otros autores consideran que el área nativa de *B. rapa* se extiende desde el Mediterráneo a toda Europa, centro de Asia y el cercano Oriente (Gómez-Campo y Prakash, 1999). La especie presenta grupos definidos o subespecies, diferenciados por sus características morfológicas. El tipo *oleífero* es utilizado como colza-canola principalmente en el oeste de Canadá, donde se la conoce como *turnip rape* o “colza tipo polaco”. Otros grupos están formados por subespecies cultivadas por sus hojas (col china, *Pak-choi*, *Pet-sai*) o sus raíces carnosas (nabo). Actualmente se reconocen dos amplias razas, con centros de origen independientes. El centro Occidental dio origen a las formas oleaginosas y de raíces engrosadas, y el centro oriental a las formas hortícolas (Gómez-Campo y Prakash, 1999; Prakash et al., 2012).

La forma silvestre de *B. rapa*, de la cual se originaron las variedades de nabo alimenticio y colza tipo polaco, es un biotipo altamente invasor de una amplio número de cultivos en todo el mundo (Gulden et al., 2008). En regiones templadas de Sudamérica y en especial en la región pampeana argentina, esta especie es una maleza agresiva, conocida como nabo o nabo silvestre. Es una planta que prefiere hábitats disturbados, presente con frecuencia en potreros, rastros de cultivos, a la vera de caminos y otros terrenos modificados (Marzocca et al., 1976). En Argentina está presente en todas las provincias del país (Martínez-Laborde, 1999).

En nuestro país la importancia de *B. rapa* como maleza de cultivos es reconocida

desde la década del 30 (Ibarra, 1937), época en la cual se comenzaron a aprovechar las poblaciones naturales de nabo para la producción de aceite industrial. La abundancia de *B. rapa* como maleza de trigo y lino era tal, que la sola separación de sus granos pagaba el trabajo de limpieza y hasta el costo de la producción del cereal cosechado. Debido a la caída de los precios de los cereales, y a los buenos rendimientos del nabo, llevó al gobierno nacional a incentivar la siembra de la maleza como un cultivo por si mismo. El grano de nabo cotizó en la Bolsa de Cereales hasta la década del 60 (Tenenbaum, 1937; Pascale, 1976; Iriarte y Valetti, 2008).

El flujo génico es el proceso que culmina con la incorporación de genes de una población dentro de otra. Las plantas voluntarias, las poblaciones ferales y los parientes silvestres, sexualmente compatibles, representan vías a través de las cuales podrían penetrar en las poblaciones naturales algunos rasgos presentes en los cultivos. Esas poblaciones son consideradas reservorio potenciales de rasgos genéticamente modificados (Ellstrand, 2003; Andersson y de Vicente, 2010).

La probabilidad de transferencia de genes entre las distintas *Brassica* es relativamente alta debido a la compatibilidad cruzada de los miembros del triángulo de U. Numerosos estudios han demostrado que las cruzas interespecíficas pueden resultar en híbridos exitosos. Las cruzas con mayor propensión al flujo génico estarían dadas por las que involucran a *B. rapa* y *B. napus*. En poblaciones de *B. rapa* creciendo afuera de cultivos de *B. napus*, la frecuencia de hibridación observada ha sido baja (0,4-1,5%). Sin embargo, cuando *B. rapa* actúa como madre y se encuentra aislada como maleza dentro de los cultivos de *B. napus* la frecuencia de hibridación puede ser sustancialmente mayor (56-93%) (FitzJohn et al., 2007; Devos et al., 2009).

La colza tipo argentino, *B. napus*, se destaca por su elevada participación en la producción mundial de aceites comestibles (FAOSTAT, 2015). El cultivo cuenta con variedades transgénicas resistentes a glifosato en Canadá, Estados Unidos, Australia y Japón (James, 2012), pero en nuestro país fueron prohibidas debido a las restricciones que implica la existencia de parientes silvestres naturalizados con los cuales puede haber flujo genético (SAGPyA, 1997; SENASA, 2007).

La primer variedad de colza resistente a herbicida fue obtenida en 1984 utilizando métodos tradicionales de fitomejoramiento. Para obtenerla, se realizaron retrocruzas con una población de *B. rapa* silvestre, naturalmente resistente a triazinas (Beverdort et al., 1980). En 1995 se registró la primera variedad transgénica resistente a glifosato,

desarrollada por Monsanto (James, 2012). Entre los cultivares de *B. napus* resistentes a herbicidas actualmente se incluye la resistencia a los herbicidas glifosato, glufosinato e imidazolinonas. Estas variedades fueron adoptadas rápidamente y actualmente ocupan más del 85% de la superficie de colza en el mundo (Hall et al., 2005; James, 2012).

Desde la liberación de las primeras variedades de *B. napus* transgénicas, se multiplicaron los estudios sobre flujo génico con especies emparentadas, con el objetivo de dimensionar los riesgos de que el transgén se transmitiera a poblaciones silvestres (Tabla 5.1) (Jørgensen y Andersen, 1994; Brown y Brown, 1996; Snow et al., 1999; Warwick et al., 2003).

La mayor probabilidad de flujo génico entre variedades transgénicas de *B. napus* con otras brasicáceas fue encontrada con poblaciones de *B. rapa* (Warwick et al., 2003; FitzJohn et al., 2007). Los primeros trabajos realizados con variedades transgénicas resistentes a glufosinato, demostraron que las cruas espontáneas con *B. rapa* producían híbridos viables, de reducida fertilidad masculina, pero que eran capaces de dejar descendencia. También comprobaron que las cruas recíprocas llevan a la introgresión del transgen en plantas morfológicamente indistinguibles de *B. rapa*, y con la pérdida del genoma C proveniente de *B. napus* (Jørgensen y Andersen, 1994). Diversos trabajos realizados con variedades transgénicas de *B. napus* con resistencia a insectos lepidópteros (Bt), reforzaron estos resultados, encontrándose valores de hibridación en ensayos a campo de entre 0,7 y 16,9% (Halfhill et al., 2002).

En Canadá, uno de los primeros países en introducir el cultivo de variedades transgénicas de *B. napus*, se realizaron relevamientos de poblaciones naturales de *B. rapa* localizadas cercanas a cultivos comerciales de colza transgénica resistente a glifosato. En uno de estos relevamientos la tasa de hibridación alcanzó el 13,6% (Warwick et al., 2003). Los híbridos encontrados presentaban el transgen de resistencia a glifosato, reducida fertilidad del polen, estructura genómica intermedia y la presencia de marcadores específicos para las dos especies parentales. Sin embargo, en una de estas poblaciones naturales fue hallado un individuo introgresado, que presentaba el transgen de resistencia y nivel de ploidía de *B. rapa*, sin marcadores de *B. napus*. No solo se confirmó la hibridación entre *B. napus* y *B. rapa* y la introgresión del transgen de resistencia a glifosato en la población silvestre, sino además la persistencia del transgen en la naturaleza por más de seis años, sin la

presión de selección del herbicida (Warwick et al., 2008). Otros relevamientos a mayor escala en Canadá, encontraron en cada una de las poblaciones estudiadas creciendo en los bordes de más de 70 lotes cultivados con *B. napus* transgénica, evidencias de hibridación de entre 1,1 y 17,5% (Simard et al., 2006).

Estos hallazgos bajo condiciones naturales confirman la capacidad reproductiva de los híbridos y las generaciones avanzadas producto de la cruce entre las dos especies de *Brassica* observadas en ensayos controlados. Si bien la fertilidad masculina de los híbridos es baja, se ha hallado que pueden ser reproductivamente tan exitosos como sus progenitores (Hauser et al., 1998). Los híbridos presentan características morfológicas similares a *B. rapa* y segregan para los caracteres de autocompatibilidad (Warwick et al., 2003), por lo que los genes de resistencia a herbicidas podrían permanecer en las poblaciones silvestres de forma encubierta. Snow et al. (1999) no encontraron diferencias en la producción de semillas entre plantas transgénicas y no transgénicas en la tercera generación de retrocruzas. Más aún, la fertilidad del polen y la producción de semillas de estas plantas BC3 fue similar a la de los individuos de *B. rapa* puros.

En regiones donde está autorizado el cultivo de colza transgénica, como en Canadá y Estados Unidos, suelen ocurrir poblaciones ferales de *B. napus* genéticamente modificadas (Yoshimura et al., 2006; Knispel and McLachlan, 2010; Schafer et al., 2011; Devos et al., 2012). Ello también se ha observado en zonas portuarias, caminos y vías férreas de regiones en las cuales el cultivo de variedades transgénicas estaba prohibido (Japón, Bélgica, Suiza), posiblemente debido a la dispersión de propágulos por el manipuleo y transporte de granos importados (Saji et al., 2005; Schoenenberger and D'Andrea, 2012; Devos et al., 2012; Hecht et al., 2014). En las mismas zonas donde se han encontrado poblaciones ferales de *B. napus* transgénica, se ha comprobado la presencia de híbridos con la especie silvestre *B. rapa*, y transferencia del transgen de resistencia a glifosato (Warwick et al., 2003; Yoshimura et al., 2006; Simard et al., 2006; Warwick et al., 2008; Aono et al., 2011).

En 2012 fueron halladas poblaciones ferales de *B. napus* con resistencia a glifosato en lotes sin registros de cultivo de colza-canola, en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Al mismo tiempo, se constató la existencia de poblaciones de *B. rapa* (nabo silvestre) en la misma zona, que no eran controladas con la aplicación de glifosato a dosis comercial. Los objetivos de este capítulo fueron caracterizar las poblaciones

ferales de *Brassica* sp. resistentes a glifosato, realizar la clasificación taxónomica de las accesiones, determinar el perfil de resistencia y el origen de la misma, y evaluar distintas medidas de control alternativo. La hipótesis es que las poblaciones ferales de *Brassica* sp. presentarán resistencia a glifosato de origen transgénico, que podrá ser detectada mediante diversas técnicas.

Tabla 5.1: Evidencias de flujo génico entre variedades de *Brassica napus* transgénicas y poblaciones silvestres de *B. rapa*.

País	Método de hibridación	Ambiente	Evento transgénico	Generaciones	Tasa de hibridación	Referencias
Dinamarca	Natural	Campo experimental	Resistencia a glufosinato	F1.	9%	Jørgensen y Andersen, 1994.
	Artificial	Invernáculo	Resistencia a glufosinato	F1, BC1, BC2, BC3.	-	Snow et al., 1999.
Canadá	Natural	Campo experimental Lotes comerciales	Resistencia a glifosato	F1.	6,5-8,3% 13,6%	Warwick et al., 2003.
	Natural	Campo experimental	Resistencia a lepidópteros	F1, BC1.	2-37,2%	Halfhill et al., 2004.
	Natural	Lotes comerciales	Resistencia a glifosato	F1, BC.	15,8-15,9%	Warwick et al., 2008.
	Natural	Lotes comerciales	Resistencia a glifosato Resistencia a glufosinato	F1.	1,1-17,5%	Simard et al., 2006.
USA	Artificial	Invernáculo	Resistencia a glufosinato	F1.	4,7-5,1%	Brown y Brown, 1996.
	Artificial	Invernáculo	Resistencia a lepidópteros	F1, BC1, BC2.	0-94,3%	Halfhill et al., 2002.
	Natural	Campo experimental			0,7-16,9%	
China	Artificial	Invernáculo	Resistencia a glifosato	F1.	-	Xiao et al., 2009.
	Natural	Campo experimental	Resistencia a glufosinato		0,04-0,41%	
Japón.	Natural	Banquinas de caminos	Resistencia a glifosato	F1.	2 plantas	Aono et al., 2011.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cría

Entre 2012 y 2014, se colectaron tres accesiones de *B. rapa* que habían resistido la aplicación comercial de glifosato en lotes cultivados del sudeste de Buenos Aires. Una población fue hallada en un campo cercano a la localidad de La Dulce, partido de Necochea (**LDU**). Otra población fue localizada en un establecimiento del partido de Balcarce (**BAL-R**), fructificando dentro de un lote de soja RR. Otra extensa población fue hallada en un lote perteneciente al establecimiento Morales (**MOR**), cercano a la localidad de Necochea. Esta accesión, que fue notificada por el técnico responsable, formaba extensas poblaciones en un barbecho, donde no había sido controlada por el herbicida. Se tomaron datos poblacionales mediante la escala semi-cuantitativa desarrollada por Domin-Krajina (Mueller-Dombois y Ellenberg, 1974). Como control se utilizó una población (JUA) hallada en un bajo no cultivado, sin presión de selección por herbicidas, y de probada susceptibilidad. Los registros históricos del manejo agrícola del lote fueron provistos por los productores y/o responsables técnicos de los establecimientos.

Para todos los ensayos, salvo que se indique lo contrario, la progenie de las accesiones fue criada en macetas de 15 cm de diámetro, en una mezcla de suelo y sustrato (Grow Mix® Terrafertil), a razón de 10 plantas por maceta. Las macetas se mantuvieron bajo condiciones controladas en invernadero, con dos riegos diarios. Se aplicó un fertilizante líquido grado 5-3-3 (Chase LI 533) y urea a razón de 10 L ha⁻¹ y 50 kg ha⁻¹ respectivamente. Además se realizaron aplicaciones periódicas de imidacloprid al 35% (Punto 35 Gleba, SC, 0,5 mL ha⁻¹), para el control de pulgón ceniciento de las coles (*Brevicoryne brassicae*).

Caracterización morfológica y química

Se tomaron datos morfológicos de los individuos de las accesiones LDU y BAL-R. La progenie de los individuos sobrevivientes a la aplicación del herbicida en el campo fue criada en el campo experimental del Departamento de Agronomía. Se tomaron datos taxonómicos para confirmar la clasificación de la especie de acuerdo a Mulligan (1995) y Gulden et al. (2008). Como control se emplearon plantas de dos variedades comerciales de colza y dos poblaciones ferales de *B. napus* y seis poblaciones naturales de nabo silvestre (*B. rapa*) de la misma región bajo estudio, sin resistencia a

glifosato.

Las poblaciones fueron sembradas en bandejas multicelda con sustrato comercial Growmix (Multipro) y criadas en invernáculo con luz natural, riego diario y a temperatura de 20-25 °C. En el estado de B4 de la escala CETIOM (Arnoud, 1989), en el mes de julio, las plantas fueron trasplantadas al campo experimental, bajo un marco de plantación de 0,3 x 0,5 m. Se utilizaron descriptores cuantitativos y cualitativos desarrollados por el Comité Internacional de Recursos Genéticos Vegetales, desarrollados en el capítulo 1 (IBPGR, 1990). Los datos cuantitativos fueron analizados mediante ANOVA y las medias fueron comparadas con el test de Tukey ($p < 0,05$). Los datos cualitativos fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para todos los análisis se utilizó el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2015).

Se determinó el contenido de materia grasa y el perfil ácido sobre una muestra de granos colectada en el hábitat natural. Como control se emplearon granos de variedades de colza (*B. napus*) y de poblaciones naturales de nabo silvestre (*B. rapa*). La materia grasa se determinó mediante resonancia magnética nuclear y el perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa. Los análisis fueron realizados por la Cámara Arbitral de Cereales de Bahía Blanca.

Caracterización de la resistencia a glifosato

Se evaluó la resistencia a glifosato de las accesiones de *B. rapa* mediante un ensayo de *screening* que fue repetido en dos años. Se aplicó glifosato (sal amónica, formulado al 39,6%) a doble dosis comercial ($X=1,29$ kg e.a. $ha^{-1}=3,7$ L P.C. ha^{-1}). La aplicación fue realizada al estado B3-B4, 42 días luego de la emergencia de las plantas, usando un equipo de CO₂ a presión constante, con pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB), velocidad de 1,54 km h⁻¹ y caudal de 127 L ha⁻¹. La supervivencia se evaluó cuatro semanas después de la pulverización utilizando una escala de daño visual, de acuerdo al siguiente detalle: 1 = sin daño, 2 = ≤ 25% daño, 3 = 26 - 75% daño, 4 = > 75% daño, 5 = muerte de plantas (adaptado de Moss et al, 1999). La respuesta fue expresada como porcentaje de supervivencia y las accesiones se designaron resistentes si el 20% de los individuos sobrevivían al herbicida (Moss et al., 1999). A los 40 días luego del tratamiento se cortó todo el material vegetal vivo y se llevó a estufa a 60°C hasta peso constante, para calcular la materia seca. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. Análisis de ANOVA y comparación de

medias (test Tukey) fueron realizados con el software Infostat. Para el análisis de los resultados, los valores expresados en porcentaje fueron transformados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y = \arcsen (x + 0,5)^{1/2} \text{ [Ecuación 1]}$$

Se caracterizó el nivel de resistencia a glifosato de las accesiones LDU y BAL-R mediante un ensayo de dosis-respuesta. Se aplicó un rango de dosis de glifosato (sal amónica, formulado al 39,6%) correspondientes a 1/10, 1/2, 1, 2, 10, 20 y 30 veces la dosis comercial ($X=1,29 \text{ kg e.a. ha}^{-1}=3,7 \text{ L P.C. ha}^{-1}$). En el control (JUA) las dosis utilizadas fueron 1/100, 1/50, 1/10, 1/2, 1, 2, y 5 X.

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. La supervivencia se evaluó cuatro semanas después de la pulverización, de la misma forma que en el ensayo de *screening*. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión log-logístico no lineal con tres parámetros y a un modelo Weibull tipo 1. Las curvas de dosis-respuesta se realizaron utilizando el paquete drc del software estadístico R3.2.2 (R Core Team, 2015). Se estimó la dosis requerida para matar el 50% de las plantas (DL_{50}). Este valor fue utilizado para calcular el factor de resistencia (FR), definido como la relación entre las DL_{50} de los biotipos resistente y susceptible ($DL_{50} \text{ Rs}/DL_{50} \text{ Su}$). La ecuación del modelo log-logístico utilizada fue:

$$Y = d / 1 + \exp \{b [\log(x) - \log(e)]\} \text{ [Ecuación 2]}$$

La ecuación del modelo Weibull tipo 1 utilizada fue:

$$Y = d (\exp \{-\exp [b(\log(x) - \log(e))]\}) \text{ [Ecuación 3]}$$

donde Y fue la supervivencia expresada en porcentaje, e la DL_{50} , d el coeficiente correspondiente al límite superior de la curva, b la pendiente de la curva alrededor de e, y x (variable independiente) la dosis del herbicida (Seefeldt et al., 1995; Nielsen et al., 2004; Knezevic et al., 2007; Ritz, 2010).

Caracterización de la resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS

Se exploró la sensibilidad de las accesiones de *B. rapa* LDU, BAL-R y MOR a tres herbicidas alternativos al glifosato, pertenecientes a distintas familias químicas de inhibidores de la enzima AHAS. Se aplicó imazapir ($X=80 \text{ g p.a. ha}^{-1}$), metsulfurón ($X=6 \text{ g p.a. ha}^{-1}$) y diclosulam ($X=25,2 \text{ g p.a. ha}^{-1}$), a doble dosis comercial (2X), en igual forma que para el ensayo de dosis-respuesta. Se evaluó daño visual y materia seca, y

se analizó mediante anova y test de comparación de medias (Tukey), con el paquete estadístico Infostat.

Se caracterizó el nivel de resistencia de la accesión de *B. rapa* LDU a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS mediante un ensayo de dosis-respuesta. Se aplicaron un rango de dosis del herbicida imazapir ($X=100$ g p.a. ha^{-1}) y metsulfurón ($X=6$ g p.a. ha^{-1}). La aplicación fue realizada al estado B3-B4, usando un equipo de CO_2 a presión constante, con pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB), velocidad de $1,45$ km h^{-1} y caudal de 161 L ha^{-1} .

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. La supervivencia se evaluó cuatro semanas después de la pulverización utilizando una escala de daño visual, y la respuesta fue expresada como porcentaje de supervivencia. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión log-logístico no lineal con tres parámetros. Las curvas de dosis-respuesta se realizaron utilizando el paquete drc del software estadístico R3.0.2 (R Core Team, 2015). Se estimó la dosis requerida para matar el 50% de las plantas (DL_{50}) y el FR.

Detección del transgen mediante test inmunológico

La presencia del transgen de resistencia a glifosato se evaluó mediante un *kit* comercial (QuickStik™ Kit for Roundup Ready® Canola Leaf & Seed) diseñado para detectar la expresión de la proteína CP4 EPSPS en los tejidos. Esta proteína, diferente a la sintetizada por la planta, proviene de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* y reduce la afinidad entre el herbicida y el complejo enzima-sustrato, lo que permite que la enzima EPSPS catalice normalmente las reacciones de síntesis de aminoácidos aromáticos (Arregui y Puricelli, 2008; Green, 2009; Feng et al., 2010).

Se utilizaron hojas frescas de 12 individuos de la accesión resistente a glifosato LDU, 15 individuos de BAL-R y 3 de MOR. Las plantas se encontraban en condiciones de invernáculo, en el estadio de dos hojas verdaderas. Como control se utilizaron hojas de 5 individuos del biotipo susceptible JUA.

Control químico con herbicidas alternativos

Se exploró la sensibilidad de la accesión LDU a cuatro herbicidas alternativos al glifosato y a los inhibidores de la enzima AHAS (Tabla 5.2). Los herbicidas comprendieron activos recomendados para los cultivos habituales en la región de

origen de las accesiones, con varios modos de acción y espectro de control. Se aplicó la dosis recomendada (X) usando un equipo de CO₂ a presión constante, con pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB), velocidad de 1,54 km h⁻¹ y caudal de 127 L ha⁻¹. La aplicación fue realizada al estado B3-B4, 42 días luego de la emergencia de las plantas. La supervivencia de las plantas se evaluó 30 días después del tratamiento y los datos se expresaron como porcentaje del control sin herbicida, de la misma forma que en los ensayos de resistencia. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. Análisis de ANOVA y comparación de medias (test Tukey) fueron realizados con el software Infostat.

Tabla 5.2: Herbicidas evaluados para el control químico de las accesiones de *Brassica rapa* con resistencia a glifosato y herbicidas AHAS.

Herbicida	Nombre comercial	Cultivo	Período de aplicación	Formulado	Dosis g p.a ha ⁻¹
Bentazón	Basagran 60	Soja, maíz, sorgo, arveja, pasturas.	POST: a partir de 1º hoja verdadera.	600 g L ⁻¹	960,0
2,4-D (Sal)	Genérico	Trigo, cebada, maíz, sorgo, barbechos.	PREE: barbecho POST: trigo, hasta inicio encañonado.	602 g L ⁻¹	451,5
Fluroxipir	Starane	Trigo, cebada, centeno, avena.	POST: hasta hoja bandera.	288 g L ⁻¹	172,8
Aclonifen	Prodigio	Girasol, cebolla.	POST: temprana, entre 2-4 hojas.	600 g L ⁻¹	480

RESULTADOS

Condiciones agroecológicas

La accesión de *B. rapa* LDU fue hallada por primera vez a fines de 2012, en un establecimiento cercano a la localidad de La Dulce, partido de Necochea, en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Tabla 5.3, Figura 5.1). Las plantas se encontraban en estado de fructificación dentro de un lote de soja RR. La presencia de esta población fue comprobada en los dos años subsiguientes. En 2014 se encontraba en el mismo lote, esta vez sembrado con avena para verdeo. Se observaron algunas plantas fructificando en el borde, junto a mostacilla (*Hirschfeldia incana* [L.] Lagr.-Foss.). Dentro del lote, las plantas se disponían en un gran parche semicircular con más de 200 plantas, ubicado a 20 m del borde SE del lote, y varios parches menores de entre 20-25 plantas, dispersos en todos los sentidos. Las plantas se encontraban en múltiples estados, desde roseta a floración avanzada. El lote había recibido una aplicación de 2,4-D a dosis comercial, y los síntomas de fitotoxicidad a este herbicida en las plantas de *B. rapa* eran apreciables. También se pudo observar que las plantas resistentes se habían dispersado a un lote vecino cultivado con soja RR, en donde se encontraron más de 20 plantas en estado de madurez.

En el otoño de 2013 las plantas de la accesión BAL-R se encontraban aisladas (<50) en el estado de floración a fructificación, dentro de un cultivo de soja RR. Dentro del mismo lote, y en cercanías de estas plantas, se observaron plantas de *B. napus* de gran porte en estado de roseta. En los bordes de este y otros lotes del establecimiento se observaron poblaciones combinadas de las dos especies. En general, las plantas de *B. napus* se encontraban en estado de roseta, con gran desarrollo vegetativo, en cambio los individuos de *B. rapa* se hallaban desde roseta hasta inicios de floración.

La rotación de cultivos básica del lote era trigo-soja, registrándose sólo la siembra de un cultivo de girasol en la década previa. El registro de herbicidas utilizados incluía a tres SU pero ninguna aplicación de herbicidas IMI. En toda la década, el sistema productivo se encontraba bajo siembra directa, predominando el empleo de barbecho químico con glifosato y 2,4-D. El control de malezas en trigo se efectuaba con dicamba y metsulfurón, y la soja RR era tratada con glifosato. No se registraban aplicaciones de herbicidas SU durante dos años consecutivos.

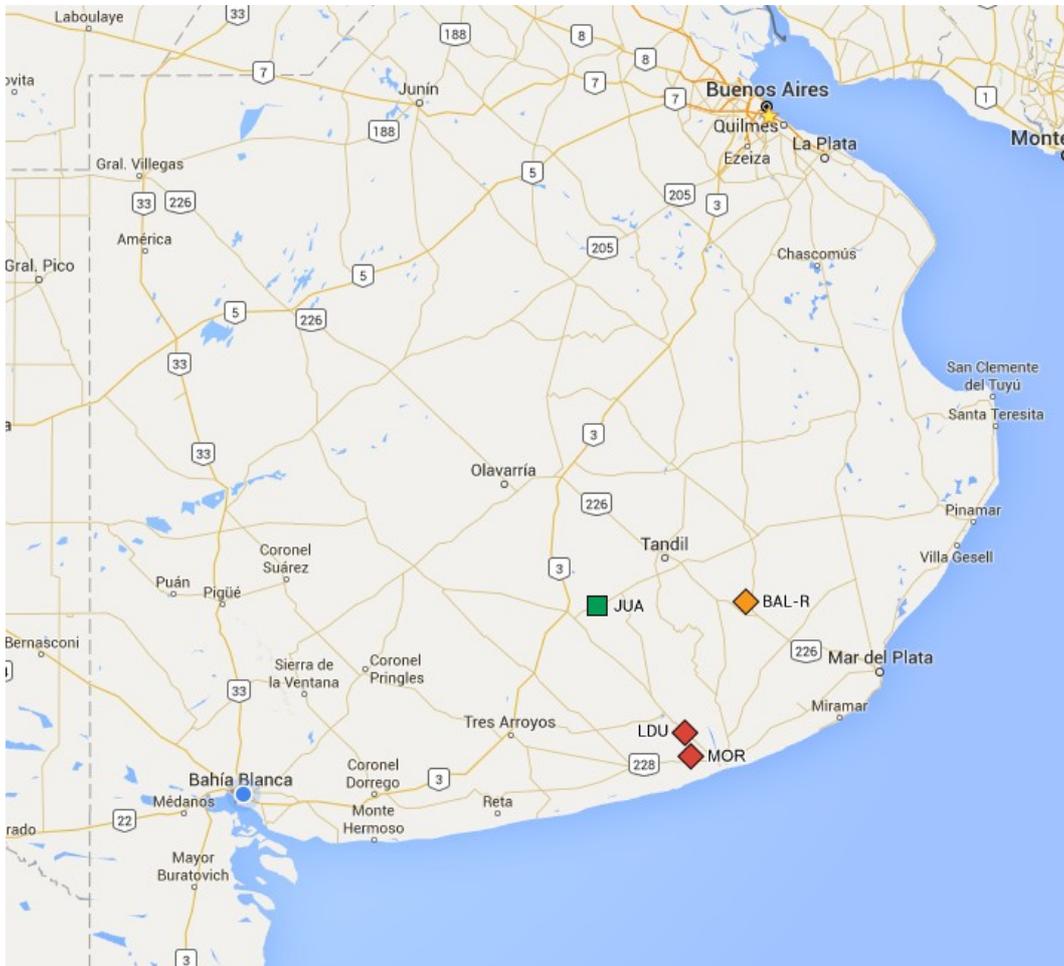
La población MOR era extensa (>1M plantas), se encontraba en estado de floración y

había invadido la totalidad de un lote agrícola de 16 ha. De acuerdo al técnico responsable, la población estaba presente en 2012, aunque con menor densidad y dispersión (Gopar, com. pers.). Por la distribución en la entrada al lote, se adjudicó el origen a la limpieza de la maquina cosechadora, usada en la cosecha de girasol. La preparación del lote para soja en ese año se realizó aplicando glifosato y 2,4-D, junto con clorimurón, siendo ese primer control efectivo. Sin embargo, debido a la abundante presencia de semillas en el banco del suelo, las plantas continuaron emergiendo. Los intentos de control se sucedieron con la aplicación de 1,6 L de sulfosato, 2,5 L de glifosato + 45 g clorimurón, 4 kg de glifosato ultramax (con el cultivo de soja en R4), todos estos tratamientos sin efecto notable en el control de la población de *B. rapa*. En 2013 se sembró cebada en el lote, y se aplicó en el barbecho 2,4-D y glifosato, con resultados aceptables. Durante el cultivo también se aplicó 2,4-D, dicamba y metsulfurón, con buen efecto. Pero la segunda camada de plantas emergió nuevamente, y debió ser controlada con la aplicación de fluroxipir en hoja bandera. Luego del cultivo la población emergió nuevamente dispersándose por todo el lote, como pudo observarse al momento de relevar el lote.

Tabla 5.3: Detalle de las condiciones agroecológicas de los sitios de colecta de las poblaciones de *Brassica rapa* utilizadas en los ensayos.

Accesión	Localidad	Fecha	Habitat	Tamaño poblacional	Estado fenológico
		Nov-12	Dentro de un lote agrícola sembrado con soja RR.	>100 plantas	Madurez
LDU	La Dulce	Mar-14	Dentro de dos lotes agrícolas, uno sembrado con avena y otro con soja RR.	>10.000 plantas	Roseta, floración y madurez
BAL-R	Balcarce	Abr-13	Dentro de lote de soja RR.	Algunas plantas aisladas (<50)	Floración y madurez
MOR	Necochea	Ago-14	Lote en barbecho.	>1.000.000 plantas	Roseta y floración
Control					
JUA	Benito Juárez	Nov-08	Población muy extendida en un bajo sin cultivar.	>50.000 plantas	Floración y madurez

Figura 5.1: Distribución geográfica de las accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato LDU, BAL-R y MOR, y de la población susceptible (JUA) usada como control.



Caracterización morfológica

El análisis de los caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos de las plantas de LDU y BAL-R correspondieron con lo descrito para *B. rapa* (Tabla 5.4). Los caracteres cualitativos más relevantes para diferenciar la especie como color de hojas, pubescencia, nivel de abrazamiento de las hojas superiores, color de flores, disposición de los pimpollos con respecto a las flores abiertas y disposición de las silicuas maduras, todos fueron congruentes con *B. rapa*, diferenciándose de los cultivares de *B. napus* evaluados. El largo del rostro y la relación rostro/valva estuvieron comprendidos entre los valores de 1,0 a 1,7 cm y 0,33 a 0,50 citados para *B. rapa* (Mulligan, 1995). La accesión LDU presentó rostro de 1,16 cm y relación

rostro/valva de 0,35; y en la accesión BAL-R los valores fueron de 1,29 y 0,39 respectivamente; sin diferenciarse de los mismos parámetros medidos en distintas poblaciones naturales de *B. rapa*. Ambos grupos se diferenciaron de *B. napus* que presentó un rostro de 0,99 cm y una relación rostro/valva de 0,22. Otro carácter taxonómico que permitió agrupar las accesiones junto con la especie *B. rapa* fue la biomasa de las semillas que fue de 1,6 y 1,2 mg sm⁻¹ en LDU y BAL-R respectivamente, diferenciándose de *B. napus* cuya biomasa fue de 3,5 mg sm⁻¹.

El análisis químico de las semillas de LDU y BAL-R mostró un perfil ácido no diferente al de otras poblaciones naturales de *B. rapa*. Los valores de ácido erúxico (22:1) y glucosinolatos fueron elevados (mayores a 46% y 22 mmoles gr⁻¹ de muestra en base 8,5%, respectivamente) y congruentes con los observados en el nabo silvestre (Tabla 5.5). Ambas accesiones presentaron elevados valores de ácido gadoleico o eicosenoico (20:1) (mayor al 8%), un ácido graso indeseable de cadena larga, que en las variedades mejoradas de colza-canola mostró escasa presencia (Ahuja y Banga, 1993; Agnihotri et al., 2007).

Tabla 5.4: Caracterización morfológica de las accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato LDU y BAL-R, comparadas con poblaciones naturales de *B. rapa* susceptibles y variedades de colza (*B. napus*).

DESCRIPTORES	LDU	BAL-R	<i>B. rapa</i>	<i>B. napus</i>
Ancho cotiledón (cm)	1,83 ± 0,07 b	1,79 ± 0,04 b	1,79 ± 0,04 b	2,27 ± 0,02 a
Altura planta (cm)	76,9 ± 2,9 b	74,8 ± 4,1 b	78,9 ± 1,5 b	111,7 ± 1,9 a
Color hoja inferior	2,5 ± 0,1 b	2,0 ± 0,0 b	2,0 ± 0,0 b	7,0 ± 0,0 a
Pubescencia hoja inferior	3,4 ± 0,3 a	3,2 ± 0,2 a	4,4 ± 0,1 a	0,0 ± 0,0 b
Tricomas hoja inferior	0,6 ± 0,1 b	0,7 ± 0,2 ab	0,9 ± 0,1 a	0,0 ± 0,0 c
Abrazamiento hoja superior	3,6 ± 0,1 a	4,0 ± 0,0 a	3,5 ± 0,1 a	2,0 ± 0,0 b
Color pétalos	3,0 ± 0,0 a	3,0 ± 0,0 a	3,0 ± 0,0 a	2,0 ± 0,0 b
Disposición pimpollos	1,4 ± 0,2 b	1,0 ± 0,0 b	1,0 ± 0,0 b	3,0 ± 0,0 a
Largo pétalo (mm)	10,0 ± 0,3 b	10,2 ± 0,4 b	9,7 ± 0,2 b	12,6 ± 0,2 a
Largo silicua (cm)	4,60 ± 0,15 b	4,61 ± 0,18 b	4,88 ± 0,08 b	5,68 ± 0,16 a
Rostro silicua (cm)	1,16 ± 0,07 ab	1,29 ± 0,09 a	1,31 ± 0,04 a	0,99 ± 0,03 b
Relación rostro/valva	0,35 ± 0,03 a	0,39 ± 0,03 a	0,38 ± 0,02 a	0,22 ± 0,01 b
Disposición silicuas	3,0 ± 0,0 b	3,0 ± 0,0 b	3,0 ± 0,0 b	4,0 ± 0,0 a
Semillas por silicua	13,7 ± 1,3 b	18,7 ± 1,4 a	20,3 ± 0,8 a	18,0 ± 0,8 ab
Biomasa de semilla (mg pl ⁻¹)	1,60 ± 0,17 b	1,23 ± 0,03 bc	1,10 ± 0,05 c	3,50 ± 0,10 a

Dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias según Tukey para $p < 0,05$.

Tabla 5.5: Caracterización química de los granos de las accesiones de *Brassica rapa* resistentes a herbicidas LDU y BAL-R, de poblaciones naturales de *B. rapa* susceptibles (5) y de variedades de colza *B. napus* (5). Ácidos grasos oleico, linoleico, linolénico, erúcico, gadoleico y materia grasa sobre sustancia seca (S.S.S.) expresados como porcentaje. GS: glucosinolatos (μ moles totales por g de muestra en base 8,5%).

Accesión	Materia grasa	Ac. Oleico	Ac. Linoleico	Ac. Linolénico	Ac. Erúcico	GS
LDU	33,1	12,3	13,8	11,9	47,7	39,9
BAL-R	38,6	12,6	14,7	12,1	46,5	22,2
<i>Brassica rapa</i>	38,4 \pm 1,1	16,0 \pm 1,0	14,0 \pm 0,4	9,4 \pm 0,3	44,0 \pm 1,0	34,8 \pm 2,7
<i>Brassica napus</i>	43,9 \pm 1,5	67,9 \pm 3,6	17,2 \pm 1,9	6,1 \pm 1,7	0,2 \pm 0,1	5,1 \pm 1,0

Caracterización de la resistencia a glifosato

Las accesiones de *B. rapa* LDU, BAL-R y MOR fueron resistentes a glifosato, aplicado a doble dosis comercial. La supervivencia fue superior al 90% en LDU y MOR, y cercana al 50% en BAL-R. Esta accesión se diferenció tanto del control susceptible como de las otras dos accesiones resistentes. La materia seca tras la aplicación de glifosato fue congruente con los valores de supervivencia obtenidos (Tabla 5.6).

La accesión LDU presentó elevada resistencia a glifosato, mostrando una supervivencia mayor al 15% a 30X (38,4 kg e.a. ha⁻¹=108 L P.C. ha⁻¹), y fue cercana al 50% a 10X. En cambio, la supervivencia de la población susceptible fue reducida al 30% con 1/100X (0,01 kg e.a. ha⁻¹, 0,04 L P.C ha⁻¹), y a menos del 5% con 0,5X. La DL₅₀ de LDU fue de 14,00 kg e.a. ha⁻¹ (11 veces la dosis comercial = 39,6 L P.C. ha⁻¹), mientras que la del biotipo susceptible fue de 0,01 kg e.a ha⁻¹ (menos de 1/100 la dosis comercial, 1,8 L P.C. ha⁻¹), lo que constituyó un factor de resistencia mayor a 1500 (Figura 5.2).

Los resultados de este análisis fueron similares a los obtenidos a partir de la materia seca (Figura 5.2). Se estimó un valor de GR₅₀ para la accesión LDU de 14,06 kg e.a. ha⁻¹, similar al valor obtenido a partir de la supervivencia. En cambio, la accesión susceptible JUA presentó un GR₅₀ de 0,06 kg e.a. ha⁻¹, un tanto mayor al observado

mediante los datos de supervivencia, por lo que el factor de resistencia se ubicó en 251 (Tabla 5.7).

La supervivencia y la acumulación de materia seca confirmaron la elevada resistencia a glifosato de BAL-R, aunque los datos no pudieron ser ajustados a ningún modelo estadístico de dosis-respuesta. Se observó que la mitad de los individuos resultaron totalmente muertos con dosis tan bajas como 0,13 kg e.a. ha⁻¹. Esto se expresó como niveles de supervivencia cercanos al 50% desde X/10 hasta doble dosis comercial (Tabla 5.8). A partir de dosis superiores a 10X los valores de supervivencia se redujeron significativamente.

Tabla 5.6: Supervivencia y materia seca remanente de las accesiones de *Brassica rapa* JUA, BAL-R, LDU y MOR, a la aplicación de glifosato a doble dosis comercial, expresada como porcentaje del control.

Biotipo	Supervivencia (%)	Materia seca (%)
JUA	0,6 ± 0,6 c	0,4 ± 0,4 b
BAL-R	49,4 ± 4,5 b	63,6 ± 8,6 a
LDU	93,4 ± 2,5 a	94,1 ± 9,8 a
MOR	92,6 ± 2,6 a	-

Para cada columna, letras diferentes indican diferencias según Tukey para p <0,05.

Figura 5.2: Curvas de dosis-respuesta de una accesión de *Brassica rapa* resistente a glifosato (LDU) y otra susceptible (JUA), a la aplicación de un rango de dosis de glifosato. Expresada en porcentaje de supervivencia (arriba) y materia seca (abajo), cada punto representa la media de cuatro repeticiones de 10 plantas cada una.

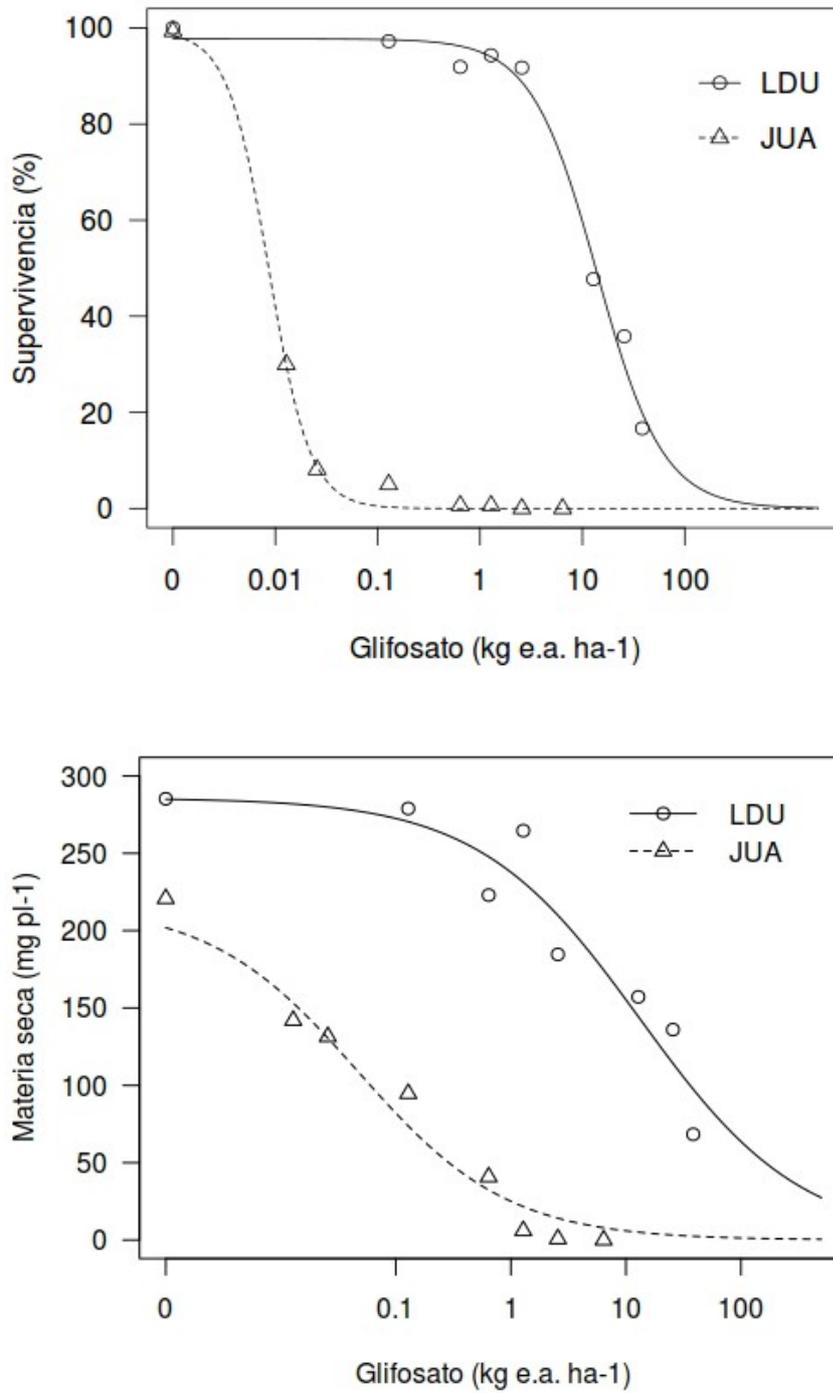


Tabla 5.7: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la supervivencia de la accesión de *Brassica rapa* resistente (LDU) y susceptible (JUA) a la aplicación de glifosato, expresadas como supervivencia y materia seca.

	Accesión	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	DL ₅₀ o GR ₅₀	FR ^a
Supervivencia (%)	JUA	2,18	99,31	0,009	0,009	1554,3
	LDU	1,35	97,71	13,989	13,989	
Materia seca (mg pl ⁻¹)	JUA	0,41	218,44	0,136	0,056	251,1
	LDU	0,49	287,06	29,669	14,059	

Parámetros: *b*=pendiente de las curvas alrededor de *e*, *d*=límite superior de las curvas, *e*=punto de inflexión de las curvas, DL₅₀=dosis de glifosato (en kg p.a. ha⁻¹) requerida para reducir en un 50% la supervivencia de las plantas, GR₅₀=dosis de glifosato (en kg p.a. ha⁻¹) requerida para reducir en un 50% la materia seca de las plantas, FR=factor de resistencia (DL₅₀ o GR₅₀ R/DL₅₀ o GR₅₀ S).

Tabla 5.8: Supervivencia (expresada como porcentaje del control) y materia seca (expresada en mg pl⁻¹), de dos accesiones de *Brassica rapa* tras la aplicación de un rango de dosis de glifosato (dosis en kg e.a. ha⁻¹).

TRAT	Dosis kg e.a. ha ⁻¹	JUA		BAL-R	
		Supervivencia (%)	Materia seca (g pl ⁻¹)	Supervivencia (%)	Materia seca (g pl ⁻¹)
CTRL	0,00	100,0 ± 0,0 a	220,7 ± 49,3 a	100,0 ± 0,0 a	218,4 ± 38,5 a
X/100	0,01	30,0 ± 16,2 b	142,0 ± 28,5 ab	-	-
X/50	0,03	8,1 ± 4,9 b	131,5 ± 26,6 ac	-	-
X/10	0,13	5,0 ± 5,0 b	125,8 ± 37,4 ad	52,5 ± 3,1 b	164,5 ± 14,3 ab
X/2	0,64	0,6 ± 0,6 b	40,8 ± 22,7 bd	44,4 ± 11,5 b	156,0 ± 38,7 ab
1X	1,28	0,6 ± 0,6 b	6,0 ± 3,7 cd	39,4 ± 4,6 b	146,5 ± 28,5 ab
2X	2,56	0,0 ± 0,0 b	0,8 ± 0,8 d	41,9 ± 5,6 b	147,0 ± 25,7 ab
5X	6,41	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 d	-	-
10X	12,82	-	-	23,1 ± 8,9 bc	99,0 ± 37,8 ab
20X	25,63	-	-	25,6 ± 9,1 bc	119,7 ± 42,0 ab
30X	38,45	-	-	5,6 ± 3,3 c	20,8 ± 14,3 b

Para cada columna, letras diferentes indican diferencias según Tukey para *p* < 0,05.

Caracterización de la resistencia a herbicidas inhibidores de la AHAS

La supervivencia de LDU y MOR fue superior al 90% para imazapir y diclosulam, en cambio para metsulfurón la resistencia fue menor y se ubicó cercana al 50%. Aún así, los niveles de resistencia para los tres herbicidas se diferenciaron estadísticamente de la accesión susceptible JUA, que fue totalmente afectada por los herbicidas (Tabla 5.9). Los mismos resultados se observaron en la materia seca, aumentando aún más el valor de supervivencia a metsulfurón (Tabla 5.10).

La accesión BAL-R presentó bajos valores de resistencia a los herbicidas AHAS, entre 1 y 14%, sin diferenciarse en ningún caso del control susceptible JUA. El mayor valor de supervivencia fue a diclosulam, aunque al ser menor al 20% no pudo confirmarse la resistencia en esta accesión. En el caso de la materia seca, los valores obtenidos fueron similares. Para el caso del diclosulam, si bien el valor fue elevado para la aplicación de este herbicida (cercano al 40%), no se diferenció del control susceptible, que también tuvo un valor elevado de materia seca remanente (30%). Esto estuvo relacionado con la forma de actuar del herbicida, que si bien destruye el punto de crecimiento, las hojas permanecen vivas por un tiempo prolongado, mayor al que se tomó para evaluar los resultados.

El ensayo de dosis-respuesta demostró que la accesión LDU presentó elevada resistencia a imazapir (Figura 5.3). La supervivencia de la accesión fue mayor al 75% a la dosis más alta evaluada, equivalente a 30X (2400 g p.a. ha⁻¹). En cambio, la supervivencia de la población susceptible fue reducida al menos del 15% con 1/200X (0,4 g p.a. ha⁻¹). La DL₅₀ de LDU fue de 7431,1 g p.a. ha⁻¹ (más de 90 veces la dosis comercial), mientras que la del biotipo susceptible fue de 0,03 g p.a. ha⁻¹, lo que constituyó un factor de resistencia mayor a 200.000 (Tabla 5.11).

También se demostró que la accesión LDU presentó resistencia moderada a metsulfurón-metil (Figura 5.3). La supervivencia de la accesión fue mayor al 30% a doble dosis comercial (12 g p.a. ha⁻¹), pero fue reducida al 5% con 20X. La supervivencia de la población susceptible fue reducida a menos del 10% con 1/100X (0,06 g p.a. ha⁻¹). La DL₅₀ de LDU fue de 9,18 g p.a. ha⁻¹ (1,5 veces la dosis comercial), mientras que la del biotipo susceptible fue de 0,01 g p.a. ha⁻¹, lo que constituyó un factor de resistencia mayor a 900 (Tabla 5.11).

Tabla 5.9. Supervivencia de las accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato BAL-R, LDU y MOR, y de la accesión susceptible JUA, a la aplicación de tres herbicidas inhibidores de la enzima AHAS a doble dosis comercial, expresada como porcentaje del control.

Principio activo	Supervivencia (%)			
	JUA	BAL-R	LDU	MOR
Imazapir	0,0 ± 0,0 b	1,3 ± 0,8 b	99,4 ± 0,4 a	92,0 ± 5,3 a
Metsulfurón	0,0 ± 0,0 b	5,8 ± 3,3 b	57,8 ± 11,2 a	22,2 ± 4,4 ab
Diclosulam	0,0 ± 0,0 b	14,1 ± 4,7 b	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a

Dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias según Tukey para $p < 0,05$.

Tabla 5.10: Materia seca de las accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato BAL-R, LDU y MOR, y de la accesión susceptible JUA, a la aplicación de tres herbicidas inhibidores de la enzima AHAS a doble dosis comercial, expresada como porcentaje del control.

Principio activo	Materia seca (%)			
	JUA	BAL-R	LDU	MOR
Imazapir	10,1 ± 3,6 b	7,3 ± 1,8 b	100,1 ± 13,5 a	-
Metsulfurón	12,8 ± 5,4 b	19,6 ± 2,8 b	94,8 ± 37,8 a	-
Diclosulam	31,1 ± 4,8 b	42,8 ± 11,3 b	124,4 ± 26,1 a	-

Dentro de cada fila, letras diferentes indican diferencias según Tukey para $p < 0,05$.

Figura 5.3: Curvas de dosis-respuesta de una accesión de *Brassica rapa* resistente a glifosato (LDU) y otra susceptible (JUA), a la aplicación de un rango de dosis de imazapir (arriba) y metsulfurón-metil (abajo). Expresada en porcentaje de supervivencia, cada punto representa la media de cuatro repeticiones de 10 plantas.

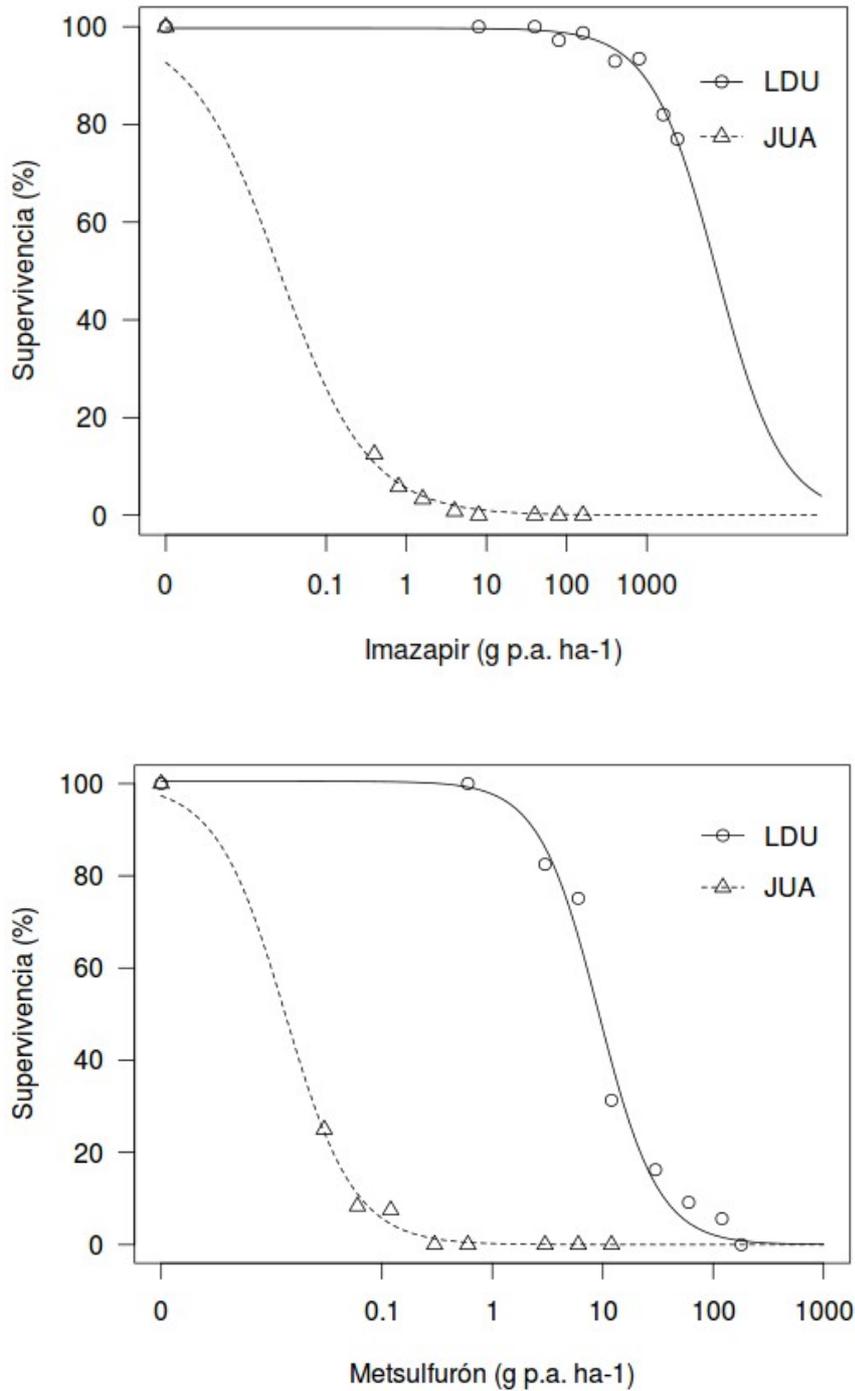


Tabla 5.11: Parámetros de las ecuaciones de regresión no lineal ajustadas para la supervivencia de la accesión de *Brassica rapa* resistente (LDU) y susceptible (JUA) a la aplicación de imazapir y metsulfurón-metil, expresadas como porcentaje de supervivencia. Se estimaron también los niveles comparados de resistencia.

	Accesión	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>e</i> (DL ₅₀)	FR
Imazapir	JUA	0,78	100,06	0,03	247.703,3
	LDU	1,06	99,71	7431,10	
Metsulfurón-metil	JUA	1,39	100,01	0,01	918,0
	LDU	1,60	100,49	9,18	

Parámetros: *b*=pendiente de las curvas alrededor de *e*, *d*=límite superior de las curvas, *e*=punto de inflexión de las curvas, DL₅₀=dosis de imazapir o metsulfurón (en g p.a. ha⁻¹) requerida para reducir en un 50% la supervivencia de las plantas, FR=factor de resistencia (DL₅₀ R/DL₅₀ S).

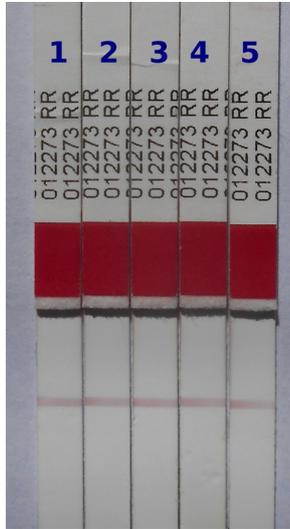
Detección del transgen mediante test inmunológico

Diez individuos de 12 evaluados de la población de *B. rapa* LDU y los 3 individuos evaluados de MOR mostraron respuesta positiva al test, confirmando que poseían la enzima CP4 EPSPS proveniente de *A. tumefaciens* (Tabla 5.12). En cambio, y en congruencia con los resultados observados en los ensayos de resistencia, sólo 7 de 15 plantas analizadas de la accesión BAL-R mostraron respuesta positiva al test. Esto implica una frecuencia cercana al 0,5 de presencia del transgen en la población. Todos los individuos usados como control presentaron una sola línea superior, indicando la ausencia de la proteína y el buen funcionamiento del test (Figura 5.4).

Tabla 5.12: Resultados del test inmunológico para confirmar la presencia de la proteína CP4 EPSPS en accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato (LDU, BAL-R y MOR), en contraste con un control negativo (JUA).

Accesión	n	Positivos	Frecuencia
JUA	5	0	0,00
BAL-R	15	7	0,47
LDU	12	10	0,83
MOR	3	3	1,00

Figura 5.4: Resultados del test inmunológico confirmando la presencia del transgen de resistencia a glifosato en varias accesiones de *Brassica rapa* resistentes a glifosato (LDU, BAL-R y MOR), en contraste con un control negativo (JUA).



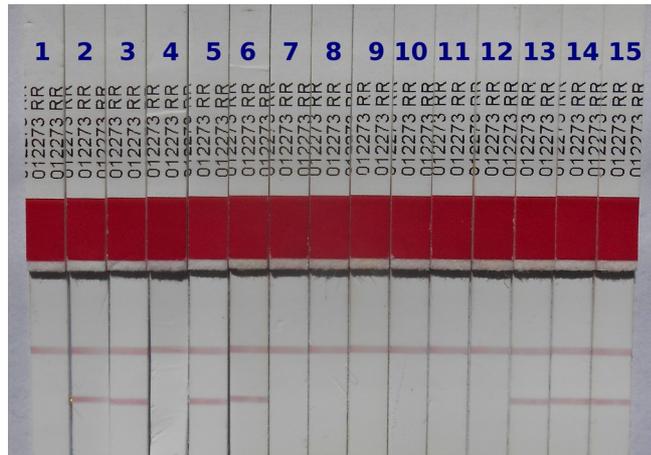
JUA



LDU



MOR



BAL-R

Control químico

A dosis comercial, todos los herbicidas evaluados lograron un buen control de la accesión resistente LDU (Tabla 5.13). Los herbicidas hormonales (2,4-D y fluroxipir), y el bentazón fueron altamente efectivos y de rápida acción. El aclonifen fue menos efectivo, pero de todas formas el nivel de control resultó aceptable.

Tabla 5.13: Supervivencia de una accesión de *Brassica rapa* resistente a glifosato y herbicidas inhibidores de la AHAS (LDU), a la aplicación de herbicidas alternativos.

Herbicida		LDU
Principio activo	Nombre comercial	Supervivencia (%)
Bentazón	Basagran	5,8 ± 3,0
2,4-D (Sal)	Genérico	0,0 ± 0,0
Fluroxipir	Starane	10,0 ± 5,0
Aclonifen	Prodigio	14,2 ± 7,4

DISCUSIÓN

Las poblaciones de *Brassica rapa* no controladas por glifosato a nivel de campo mostraron elevada resistencia a este activo en ensayos bajo condiciones controladas, incluso a dosis 30 veces por encima de la dosis comercial. Por otra parte, dos de estas accesiones presentaron además resistencia a herbicidas inhibidores de la AHAS. La caracterización morfológica y química de las plantas de las tres accesiones las clasificó como *B. rapa*.

Se comprobó que la resistencia a glifosato en las tres accesiones fue de origen transgénico. El hallazgo del transgen en poblaciones naturales de *B. rapa* implicaría el flujo génico desde cultivos o poblaciones ferales de colza con ese evento o la introducción del biotipo como contaminante de semilla.

En el capítulo anterior de esta tesis se demostró la presencia de biotipos de *B. napus* con resistencia transgénica a glifosato en Argentina. El origen de estos biotipos es desconocido, debido a la prohibición existente en nuestro país para el cultivo de variedades con el evento de transgénesis que confiere resistencia a glifosato. Este descubrimiento podría sugerir que la resistencia a glifosato provendría de cultivos de colza transgénica realizados de manera informal en el país o de individuos ingresados como contaminante de semilla importada antes de 2007, año a partir del cual la legislación nacional solicita el análisis probatorio de ausencia de material OGM (SENASA, 2007).

El hallazgo del trasgen en poblaciones naturales de *B. rapa*, una maleza habitual en los agroecosistemas de la región pampeana argentina, aumentaría la complejidad de los procesos involucrados en la dispersión de este rasgo. La presencia de resistencia transgénica a glifosato en poblaciones de *B. rapa* ha sido detectada en otros países del mundo, en especial en aquellos con gran proporción de cultivos de *B. napus* transgénicos, como Canadá o Estados Unidos (Warwick et al., 2003, Warwick et al., 2008). También se ha comprobado la hibridación entre plantas ferales o voluntarias de *B. napus* transgénicas e individuos de *B. rapa*, en situaciones donde el cultivo de variedades transgénicas estaba prohibido, como en Japón. La presencia de estas plantas de *B. napus* se adjudicó al transporte y caída de semilla (Aono et al., 2011).

Las accesiones LDU y MOR presentaron similitudes en el nivel de resistencia a glifosato y estabilidad del transgen, además de la presencia de resistencia a herbicidas

AHAS. Las poblaciones fueron uniformes tanto en caracteres morfológicos como en la resistencia a herbicidas. Esto implicaría que si su origen fue debido a flujo génico con poblaciones de *B. napus* transgénicas, sería poco probable que los eventos de hibridación hayan ocurrido en las condiciones argentinas. Todas las poblaciones ferales de *B. napus* halladas en nuestro país presentaron sólo resistencia a glifosato, sin encontrarse resistencia a herbicidas AHAS. Las poblaciones de *B. rapa* con resistencia múltiple a herbicidas deberían haber sufrido dos eventos de hibridación, uno con alguna de estas poblaciones ferales transgénicas de *B. napus*, y otro con algún cultivar con resistencia a herbicidas AHAS. Estos cultivares comenzaron a comercializarse en el país en 2013, y su distribución es muy acotada, lo mismo que el cultivo de *B. napus*, que en el promedio de los últimos 10 años no superó las 50.000 ha sembradas en el país (MAGyP, 2015).

En Canadá ha sido comprobado que el flujo génico entre cultivares de *B. napus* con distintos tipos de resistencia a herbicidas, ha generado poblaciones ferales con resistencias acumuladas, que no existían en ningún cultivar comercial. Las combinaciones más habituales halladas fueron las de resistencia transgénica a glifosato y resistencia a herbicidas AHAS, o resistencia transgénica a glifosato y glufosinato. Un caso extremo fue el hallazgo de plantas ferales con las tres resistencias acumuladas (glifosato, glufosinato y AHAS) (Hall et al., 2000). Esto haría posible que el flujo génico entre estas poblaciones ferales y *B. rapa* genere poblaciones de la especie silvestre con varias resistencias acumuladas, como las observadas en Argentina. De ser así, estas accesiones habrían llegado como contaminante de semilla de colza, de la misma forma que se hipotetiza que han llegado las poblaciones ferales de *B. napus* transgénicas. Aún así, este caso sería el primero registrado a nivel mundial de dos resistencias acumuladas en una población natural de *B. rapa*.

Por otro lado, la accesión BAL-R sólo presentó resistencia transgénica a glifosato, y este carácter segregó en la población en una proporción 50:50. Esta población fue hallada fructificando en un lote agrícola sembrado con soja RR, junto con plantas de *B. napus* en estado de roseta, que también habían sobrevivido la aplicación de glifosato a dosis comerciales. En los bordes del lote y en otros puntos del establecimiento se hallaron también poblaciones conjuntas de las dos especies. En este caso sería razonable pensar que el evento de hibridación podría haber ocurrido en las condiciones de ese establecimiento. La segregación del carácter de resistencia

y la ausencia de otro tipo de resistencia, además de la presencia de plantas ferales de *B. napus* apoyan esta hipótesis. En este caso, las plantas halladas en el lote serían individuos F1 productos de la cruce entre las dos especies, y la progenie colectada y caracterizada en los ensayos de resistencia, retrocruzas con el parental *B. rapa*. Esto explicaría el nivel de segregación observado. De ser así, el transgen de resistencia a glifosato podría introgresarse en poblaciones naturales de *B. rapa* en pocas generaciones, siendo estas indistinguibles morfológicamente de poblaciones puras de esta especie como se observó en el caso de BAL-R. Esto ya fue puesto de manifiesto en otros estudios bajo condiciones controladas (Snow et al., 1999) y en condiciones de campo (Warwick et al., 2008).

La experimentación mostró que existen alternativas para el control de las accesiones resistentes a glifosato y herbicidas AHAS en varias situaciones y cultivos. En cereales de invierno, el 2,4-D demostró ser muy efectivo y podría usarse para control temprano de la primera emergencia del biotipo. En estados más avanzados del cultivo, el fluroxipir sería recomendado para controlar los nacimientos posteriores. El bentazón es una opción en post-emergencia para el cultivo de soja, mientras que el aclonifen permitiría el control en girasol. De esta forma, se podría controlar la maleza con herbicidas alternativos al glifosato utilizado en variedades transgénicas de soja, y a las imidazolinonas en híbridos de girasol Clearfield.

Otra opción para reducir el tamaño de las poblaciones, sería la rotación de cultivos con especies de distinto ciclo de crecimiento. Esto permitiría interrumpir el ciclo de la maleza y disminuir el uso reiterado del glifosato mediante su reemplazo por herbicidas selectivos para esos cultivos, provocando cambios en las poblaciones de malezas y evitando la aparición de nuevos individuos resistentes.

La presencia de poblaciones naturales de *B. rapa* con resistencia transgénica a glifosato y a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS en Argentina presenta un panorama complejo que involucra aspectos de impacto ambiental por la liberación en ambientes naturales del transgen. Los procesos que estarían involucrados en la aparición y dispersión de estas poblaciones comprenden el flujo génico con biotipos ferales de *B. napus* en nuestro país o en el exterior, y/o la contaminación de semilla, sumado a la dispersión mediante la maquinaria agrícola. La invasividad de estas poblaciones en ambientes agrícolas caracterizados por un uso intensivo de glifosato y herbicidas AHAS se ve aumentada por la presencia de resistencia a estos herbicidas.

CONSIDERACIONES FINALES

- Los resultados de las exploraciones demostraron que Argentina mantiene su vigencia como centro de biodiversidad secundario de especies emparentadas con el cultivo de colza. Las poblaciones brasicáceas se encuentran ampliamente distribuidas en la región pampeana.
- La caracterización de las poblaciones naturales brasicáceas puso de manifiesto su diversidad y las complejas relaciones entre los biotipos cultivados y las poblaciones naturales. Éstas han estado en contacto en nuestro país desde hace más de cien años, y han ocurrido procesos de flujo génico, hibridación y endo y exoferalidad.
- Las poblaciones de *B. rapa* colectadas en cercanías de cultivos de colza *B. napus* presentaron plantas que pudieron caracterizarse morfológicamente como fuera de tipo y que evidenciaron la hibridación entre ambas especies. El riesgo de flujo génico entre el cultivo y *B. rapa*, y la transferencia de la resistencia a herbicidas a esta maleza fue comprobada bajo condiciones naturales (Tabla 6.1).
- Los biotipos de *Raphanus sativus* estudiados presentaron resistencia cruzada a múltiples principios activos con el mismo modo de acción, de las cinco familias de inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintetasa (AHAS) (Tabla 6.1). La secuenciación de estas accesiones confirmaron un cambio puntual de aminoácido en el gen de la enzima AHAS, de triptofano a leucina.
- Se demostró que una extensa población de *R. sativus* dispuesta en una franja no sembrada del margen del lote constituyó un refugio de alelos de susceptibilidad, y junto con una apropiada rotación de herbicidas, limitó la dispersión del biotipo resistente. Se determinaron alternativas para el control de los biotipos resistentes en varias situaciones y cultivos, que incluyeron herbicidas preemergentes como la mezcla de acetoclor y flurocloridona o el sulfentrazone, y herbicidas post-emergentes con aclonifen y benazolin.
- Las poblaciones ferales de *B. napus* no controladas por glifosato a nivel de campo mostraron elevada resistencia a este activo en ensayos bajo condiciones controladas. Se comprobó mediante diversos métodos que esta resistencia era de origen transgénico (Tabla 6.1). El origen de este biotipo fue incierto, debido a la prohibición existente en nuestro país para el cultivo de variedades con el evento de

transgénesis que confiere resistencia a glifosato. Se hallaron además alternativas para el control de estos biotipos, como el uso de herbicidas inhibidores de la AHAS en soja, y herbicidas hormonales en cereales de invierno.

- Las poblaciones de *Brassica rapa* no controladas por glifosato a nivel de campo mostraron elevada resistencia a este activo en ensayos bajo condiciones controladas. Dos de estas accesiones presentaron además resistencia a herbicidas inhibidores de la AHAS (Tabla 6.1). La caracterización morfológica y química de las plantas de las tres accesiones permitieron clasificar la especie como *B. rapa*.
- Se comprobó que la resistencia a glifosato en las tres accesiones de *B. rapa* fue de origen transgénico. El hallazgo del transgen en la especie silvestre *B. rapa* implicaría el flujo génico con poblaciones ferales que presentan este rasgo, o la introducción como contaminante de semilla. El control con herbicidas alternativos fue más restringido para las accesiones con resistencia múltiple. Los herbicidas hormonales, el bentazón y el aclonifen mostraron un buen control estos biotipos.
- La diversidad y distribución de poblaciones naturales brasicáceas emparentadas con el cultivo de colza (*Brassica napus*) en la región pampeana argentina limitan la difusión de modernas tecnologías de cultivo, como la resistencia a herbicidas. La presencia de poblaciones brasicáceas con resistencia a herbicidas, en especial la presencia de biotipos de *B. napus* y *B. rapa* con resistencia transgénica a glifosato presenta un panorama complejo que involucra aspectos de impacto ambiental por la liberación en ambientes naturales del transgen.

Tabla 6.1: Accesiones de malezas de distintas especies brasicáceas con resistencia a herbicidas detectadas en la región pampeana argentina, origen de la resistencia y método de detección.

Especie	Accesión	Origen	Habitat	Resistencia	Origen de la resistencia	Método de detección de la resistencia
<i>Brassica rapa</i>	BR0508 (BAL)	Balcarce	Borde de lote de colza IMI resistente. Establecimiento San Juan.	Inhibidores AHAS	Flujo génico con colza IMI resistente.	<i>Screening</i> con herbicida (caracterización morfológica, viabilidad del polen, citometría de flujo).
	BR1612 (LDU)	La Dulce	Dentro de lotes agrícolas, incluyendo soja RR.	Glifosato e inhibidores AHAS	Transgénico (Flujo génico, contaminación de semilla)	<i>Screening</i> con herbicida, test inmunológico.
	BR1014 (MOR)	Necochea	Lote en barbecho.			
<i>Brassica napus</i>	BR1313 (BAL-R)	Balcarce	Dentro de lote de soja RR. Establecimiento San Juan.	Glifosato	Transgénico (Flujo génico)	<i>Screening</i> con herbicida, test inmunológico, marcadores moleculares.
	BN1512 (GER)	Chaves	Dentro de lote en barbecho.	Glifosato	Transgénico (Contaminación de semilla, cultivo ilegal)	
	BN1712 (REG)	San Mayol	Dentro de lote de soja RR.			
	BN1812 (SMA)	San Mayol	Dentro de lote de soja RR.			
<i>Raphanus sativus</i>	BN0614 (ELC)	Chaves	Dentro de lote de soja RR.	Inhibidores AHAS	Mutación natural y selección.	<i>Screening</i> con herbicida, marcadores moleculares, secuenciación.
	RS0508 (BAL-1A)	Balcarce	Dentro de lote de colza IMI resistente. Establecimiento San Juan.			
	RS0310 (ERC)	Necochea	Lote en barbecho.			
	RS0410 (SJQ)	Energía	Lote en barbecho.			
	RS0211 (PIE-A)	Pieres	Dentro de lote de girasol CL.			

REFERENCIAS

- Alexander, M. P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology* 44(3):117-122.
- Agnihotri, A., Prem, D. y Gupta, K. 2007. The Chronicles of Oil and Meal Quality Improvement in Oilseed Rape. En: S. Gupta (ed.) *Advances in Botanical Research, Volume 45: Rapeseed Breeding*. Academic Press - Elsevier Ltd. San Diego, USA, pp. 49–97.
- Ahuja, K. y Banga, S. 1993. Oil and Meal Quality. En: Labana, K., Banga, S. S., Banga, S. K. (eds.) *Breeding Oilseed Brassicas*. Springer Berlin Heidelberg. New York, pp 76-93.
- Al-Shehbaz, I., Beilstein, M. y Kellogg, E. 2006. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution* 259:89–120.
- Allainguillaume, J., Alexander, M., Bullock, J. M., Saunders, M., Allender, C. J., King, G., Ford, C. S., Wilkinson, M. J. 2006. Fitness of hybrids between rapeseed (*Brassica napus*) and wild *Brassica rapa* in natural habitats. *Molecular Ecology* 15: 1175-84.
- Allender, C. J. y King, G. J. 2010. Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology* 10:54.
- Allnut, T., Blackburn, J., Copeland, J., Dennis, C., Dixon, J., Laybourn, R., Wontner-Smith, T., Chisholm, J., Hugo, S., Henry, C. 2013. Estimates of genetically modified oilseed in shared farming machinery. *Annals of Applied Biology* 162:119–130.
- Ammitzbøll, H. y Jørgensen, B. R. 2006. Hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and different populations and species of *Raphanus*. *Environmental Biosafety Research* 5(1):3–13.
- Andersson, M.S. y de Vicente, M.C. 2010. *Gene flow between crops and their wild relatives*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 564 pp.
- Aono, M., Wakiyama, S., Nagatsu, M., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kubo, A., Saji, H.

2006. Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environmental Biosafety Research* 5(2):77–87.
- Aono, M., Wakiyama, S., Nagatsu, M., Kaneko, Y., Nishizawa, T., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kubo, A., Saji, H. 2011. Seeds of a possible natural hybrid between herbicide-resistant *Brassica napus* and *Brassica rapa* detected on a riverbank in Japan. *GM Crops* 2: 201-210.
- Appelqvist, L.-A. 1972. Historical Background. En: Appelqvist, L. Y Ohlson, R. (eds.) *Rapeseed. Cultivation, Composition, Processing and Utilization*. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, pp. 1-8.
- Arnoud, F. 1989 *Colza: Sélection – Variétés*. Cahier technique. C.E.T.I.O.M. París, Francia.
- Arregui C. M. y Puricelli E. 2008. Mecanismos y modo de acción de los herbicidas, capítulo 3, en: *Mecanismos de acción de plaguicidas*. Arregui C.M.; Puricelli E. (eds.). Rosario, Argentina, p 125-203.
- Ash J., Novak C. y Scheideler S. E. 2003. The Fate of Genetically Modified Protein from Roundup Ready Soybeans in Laying Hens. *Journal of Applied Poultry Research* 12: 242-245.
- Ashworth, M. B., Walsh, M. J., Flower, K. C., Powles, S. B. 2014. Identification of the first glyphosate-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) population. *Pest Management Science* 70:1432–1436.
- Bailleul, D., Ollier, S., Huet, S., Gardarin, A., Lecomte, J. 2012. Seed spillage from grain trailers on road verges during oilseed rape harvest: an experimental survey. *PloS One* 7(3):e32752.
- BASF, 2014. [Online] Disponible: http://www.agro.basf.com.ar/Prensa_Detalle.aspx?id=56&origen=prensa
- Bateman, A.J. 1955 Self-incompatibility systems in angiosperms: III. Cruciferae. *Heredity* 9:53–68.
- Beversdorf, W. D., Weiss-Lerman, J., Erickson, L. R., Souza Machado, V. 1980. Transfer of cytoplasmically-inherited triazine resistance from bird's rape to cultivated oilseed rape (*Brassica campestris* and *B. napus*). *Canadian Journal of*

- Genetics and Cytology 22:167–172.
- Beckie, H. J. 2006. Herbicide-Resistant Weeds: Management Tactics and Practices. *Weed Technology* 20:793–814.
- Bedmar, F., Perdigon, J. A., Monterubbianesi, M. G. 2006. Residual phytotoxicity and persistence of chlorimuron and metsulfuron in soils of Argentina. *Journal of Environmental Biology*, 27:175–179.
- Benvenuti, S. 2007. Weed Seed Movement and Dispersal Strategies in the Agricultural Environment. *Weed Biology and Management* 7(3):141–157.
- Bianchi, M., Fleck, N., Agostinetto, D., Rizzardi, M. 2011. Interference of *Raphanus sativus* in soybean cultivars' yield. *Planta Daninha* 29:783–792.
- Bing D. J., Downey R. K., Rakow F. W. 1996. Hybridization among *Brassica napus*, *B. rapa* and *B. juncea* and their two weedy relatives *B. nigra* and *Sinapis arvensis* under open pollination conditions in the field. *Plant Breeding* 115: 470–473.
- Blackshaw, R., D. Lemerle, R. Mailer, K. Young. 2002. Influence of wild radish on yield and quality of canola. *Weed Science* 50: 344–349.
- Blackshaw, R., Lemerle, D., Mailer, R., Young, K. 2002. Influence of wild radish on yield and quality of canola. *Weed Science*, 50:344–349.
- Boelcke, O. 1967. Cruciferae. *En Cabrera, A.L. (ed.), Flora de la provincia de Buenos Aires, Vol 3. INTA, Buenos Aires, pp. 281-371.*
- Brown, J. y Brown, A. 1996. Gene transfer between canola (*Brassica napus* L. and *B. campestris* L.) and related weed species. *Annals of Applied Biology* 129:513–522.
- Brown, J., Thill, D. C., Brown, A. P., Mallory-Smith, C., Brammer, T. A., Nair, H. S. 1995. Gene transfer between canola (*Brassica napus* L.) and related weed species. *Proceedings of the 7th Symposium on Environmental Releases of Biotechnology Products: Risk Assessment Methods and Research Progress. Pensacola, Florida.*
- Busch, L., Gunter, V., Mentele, T. Tachikawa, M., Tanaka, K. 1994. Socializing Nature: Technoscience and the Transformation of Rapeseed into Canola. *Crop Science* 34(3):607-614.
- Campbell, L. y Snow, A. 2009. Can feral weeds evolve from cultivated radish

- (*Raphanus sativus*, Brassicaceae)? American Journal of Botany 96(2):498-506.
- CASAFE (Cámara de la Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes de la República Argentina). 2007. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina, Edición 2007. Tomo 1: Generalidades – Herbicidas – Fertilizantes.
- Costa, L. O. y Rizzardi, M. A. 2014. Resistance of *Raphanus raphanistrum* to the herbicide metsulfuron-methyl. *Planta Daninha* 32:181–187.
- Couvreur, T. L., Franzke, A., Al-Shehbaz, I. A., Bakker, F. T., Koch, M. A., Mummenhoff, K. 2010. Molecular phylogenetics, temporal diversification, and principles of evolution in the mustard family (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* 27(1):55–71.
- Crawley, M. J. y Brown, S. L. 1995. Seed Limitation and the Dynamics of Feral Oilseed Rape on the M25 Motorway. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 259(1354):49–54.
- Crawley, M. J. y Brown, S. L. 2004. Spatially structured population dynamics in feral oilseed rape. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271:1909–1916.
- Crouch, J. H., Lewis, B. G., Lydiate, D. J., Mithen, R. 1995. Genetic diversity of wild, weedy and cultivated forms of *Brassica rapa*. *Heredity* 74(5):491–496.
- Cuthbert, J. L. and McVetty, P. B. 2001. Plot-to-plot, row-to-row and plant-to-plant outcrossing studies in oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Science* 81: 657-664.
- De la Vega, A. J., DeLacy, I. H., Chapman, S. C. 2007. Progress over 20 years of sunflower breeding in central Argentina. *Field Crop Research* 100:61–72.
- Devos, Y., De Schrijver, A., Reheul, D. 2009. Quantifying the introgressive hybridisation propensity between transgenic oilseed rape and its wild/weedy relatives. *Environmental Monitoring and Assessment* 149: 303-322.
- Devos, Y., Hails, R., Messéan, A., Perry, J., Squire, G. 2012. Feral genetically modified herbicide tolerant oilseed rape from seed import spills: are concerns scientifically justified? *Transgenic Research* 21(1):1–21.
- Devos, Y., Reheul, D., De Schrijver, A., Cors, F., Moens, W. 2004. Management of

- herbicide-tolerant oilseed rape in Europe: a case study on minimizing vertical gene flow. *Environmental Biosafety Research* 3: 135-148.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. 2015. Infostat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Donald, W. W. 1990. Sulfonylurea Herbicides. *En* W. W. Donald (ed.) *Systems of Weed Control in Wheat in North America*. Weed Science Society of America, Champaign, USA.
- Doyle, J. y Doyle J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19(1):11-15.
- Duggleby, R. G., Pang, S. S. 2000. Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 33:1–36
- Duggleby, R. G., McCourt, J. A., Guddat, L. W. 2008. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:309–324.
- Ellstrand, N.C. 2003. *Dangerous liaisons?: when cultivated plants mate with their wild relatives*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 264 pp.
- Ellstrand, N.C., Heredia, S., Leak-Garcia, J., Heraty, J., Burger, J., Yao, L., Nohzadeh-Malakshah, S., Ridley, C. 2010. Crops gone wild: evolution of weeds and invasives from domesticated ancestors. *Evolutionary Applications* 3:494-504.
- FAOSTAT, 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL <http://faostat.fao.org>
- Feng, P., CaJacob, C., Martino-Catt, S., Cerny, E., Elmore, G., Heck, G., Huang, J., Kruger, W., Malven, M., Miklos, J., Padgett, S. 2010. Glyphosate-resistant crops: developing the next generation products. *En*: Nandula, V. (Ed.), *Glyphosate resistance in crops and weeds*. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA.
- FitzJohn, R. G., Armstrong, T. T., Newstrom-Lloyd, L. E., Wilton, A. D., Cochrane, M. 2007. Hybridisation within *Brassica* and allied genera: evaluation of potential for transgene escape. *Euphytica* 158: 209-230.
- Fleck, N., Bianchi, M., Rizzardì, M., Agostinetto, D. 2006. *Raphanus sativus*

- interference on soybean cultivars during crop vegetative period. *Planta Daninha* 24:425–434.
- Ford, C. S., Allainguillaume, J., Grilli-Chantler, P., Cuccato, G., Allender, C. J., Wilkinson, M. J. 2006. Spontaneous gene flow from rapeseed (*Brassica napus*) to wild *Brassica oleracea*. *Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences* 273:3111–3115.
- Franzke, A., Lysak, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Koch, M.A., Mummenhoff, K. 2011. Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science* 16(2):108–116.
- Gómez-Campo, C. y Prakash, S. 1999. Origin and Domestication. En: Gómez-Campo, C. (Ed), *Biology of Brassica coenospecies*: 33-58. Elsevier Science, Madrid.
- Green, J. 2009. Evolution of glyphosate-resistant crop technology. *Weed Science* 57:108-117.
- Gressel, J. 2005. Introduction – The Challenges of Fertility. En: J. Gressel (Ed.), *Crop Fertility and Volunteerism*: 59-79. Taylor & Francis Group, USA.
- Gruber, S. y Claupein, W. 2007. Fecundity of volunteer oilseed rape and estimation of potential gene dispersal by a practice-related model. *Agriculture, Ecosystems y Environment* 119(3-4):401–408.
- Gulden, R., Shirliffe, S. y Gordon, A. 2003a. Secondary seed dormancy prolongs persistence of volunteer canola in western Canada. *Weed Science* 51(6):904–913.
- Gulden, R., Shirliffe, S. y Thomas, A. 2003b. Harvest losses of canola (*Brassica napus*) cause large seedbank inputs. *Weed Science* 51(1):83–86.
- Gulden, R., Thomas, A. y Shirliffe, S. 2004. Secondary dormancy, temperature, and burial depth regulate seedbank dynamics in canola. *Weed Science* 52(3):382–388.
- Gulden, R., Warwick, S. I. y Thomas, A. 2008. The Biology of Canadian Weeds. 137. *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. *Canadian Journal of Plant Science* 88(5):951–996.
- Gupta, S. y Pratap, A. 2007. History, origin, and evolution. En: S. Gupta (ed.) *Advances*

- in Botanical Research, Volume 45: Rapeseed Breeding. Academic Press - Elsevier Ltd. San Diego, USA., pp. 1–20.
- Halfhill M. D., Millwood R. J., Raymer P. L., Stewart Jr. C. N. 2002. Bt-transgenic oilseed rape hybridization with its weedy relative, *Brassica rapa*. Environmental Biosafety Research 1:19-28.
- Halfhill M. D., Zhu B., Warwick S. I., Raymer P. L., Millwood R. J., Weissinger A. K., Stewart Jr. C. N. 2004. Hybridization and backcrossing between transgenic oilseed rape and two related weed species under field conditions. Environmental Biosafety Research 3:73-81.
- Hall, L., Rahman, H., Gulden, R. H., Thomas, G. 2005. Volunteer Oilseed Rape - Will Herbicide-Resistance Traits Assist Fertility? En: J. Gressel (Ed.), Crop Fertility and Volunteerism: 59-79. Taylor & Francis Group, USA.
- Hall, L., Topinka, K., Huffman, J., Davis, L., Good, A. 2000. Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B. napus* volunteers. Weed Science 48(6):688–694.
- Hancock, J. F. 2012. Plant evolution and the origin of crop species. Michigan State University (3rd Ed), USA.
- Hansen, L. B., Siegismund, H. R., Jørgensen, R. B. 2001. Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. Genetic Resources and Crop Evolution 48: 621–627.
- Hansen, L. B., Siegismund, H. R., Jørgensen, R. B. 2003. Progressive introgression between *Brassica napus* (oilseed rape) and *B. rapa*. Heredity 91(3):276-283.
- Harlan, J. R. 1992. Crops & Man. American Society of Agronomy (2nd Edition). Madison, USA.
- Hashem, A., Bowran, D., Piper, T., Dhammu, H. 2001. Resistance of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in the Western Australia wheat belt. Weed Technol. 15:68–74.
- Hauser, T. P., Jørgensen, R. B., Østergård, H. 1997. Preferential exclusion of hybrids in mixed pollinations between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (Brassicaceae). American Journal of Botany 84(6):756–762.

- Hauser, T. P., Jørgensen, R. B., Østergård, H. 1998. Fitness of backcross and F2 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 81: 436–443.
- Heap, I.M. 1997. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science*, 51 (3):235–243.
- Heap, I. 2015. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org>
- Hecht, M., Oehen, B., Schulze, J., Brodmann, P., Bagutti, C. 2014. Detection of feral GT73 transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) along railway lines on entry routes to oilseed factories in Switzerland. *Environmental Science and Pollution Research International* 21(2):1455–1465.
- Hernández Bermejo, J. E. 1993. *Raphanus L.* En: Castroviejo S. (Ed.). *Flora Ibérica*. Vol. IV. Real Jardín Botánico, Madrid, pp. 435-439.
- Holt, J.S., Powles, S.B., Holtum, J.A.M. 1993. Mechanisms and Agronomic Aspects of Herbicide Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:203–229.
- Ibarra, F.E. 1937. Malezas más comunes del trigo y del lino. En: *Almanaque del Ministerio de Agricultura*, Buenos Aires, pp 405–410.
- IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources). 1990. *Descriptors for Brassica and Raphanus*. Rome.
- INASE (Instituto Nacional de Semillas). 2015. *Catálogo Nacional de Cultivares*. Disponible en: <http://www.inase.gov.ar>.
- Iniguez-Luy, F. y Federico, M. 2011. The Genetics of *Brassica napus*. En: R. Schmidt y I. Bancroft (eds.) *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. Springer Berlin Heidelberg. New York, USA. pp. 33–66.
- Iriarte, I. y Valetti, O. 2008. *Cultivo de Colza*. Chacra Experimental Integrada Barrow. Convenio MAAyP-INTA. Tres Arroyos, Argentina.
- Irwin, R. E. y Strauss, S. Y. 2005. Flower color microevolution in wild radish: evolutionary response to pollinator-mediated selection. *The American Naturalist* 165(2):225-237.

- Istilart, C. 2005. Control químico de malezas en girasol en siembra directa en la zona sur bonaerense. Carpeta de actualización técnica para profesionales. Cosecha gruesa 2004/2005: p. 92 (CD). CEI Barrow.
- James, C. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief. No. 44. Ithaca, NY.
- James, T., Klaffenbach, P., Holland, P.T., Rahman, A. 1995. Degradation of primisulfuron-methyl and metsulfuron-methyl in soil. *Weed Research*, 35:113–120.
- Jørgensen, R. B. y Andersen, B. 1994. Spontaneous Hybridization Between Oilseed Rape (*Brassica napus*) and Weedy *B. campestris* (Brassicaceae): A Risk of Growing Genetically Modified Oilseed Rape. *American Journal of Botany* 81: 1620-1626.
- Kaneko Y., Kimizuka-Takagi, C., Bang, S.W., Matsuzawa, Y. 2007. Radish. En: Kole, C. (editor): *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 5, Vegetables*, pp.: 141-160. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin.
- Kaneko, Y., Bang, S.W., Matsuzawa, Y. 2011. *Raphanus*. En: Kole C (ed) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, 1st edn. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp 247–258.
- Kawata, M., Murakami, K. y Ishikawa, T. 2009. Dispersal and Persistence of Genetically Modified Oilseed Rape around Japanese Harbors. *Environmental Science and Pollution Research International* 16(2):120–26.
- Knezevic, S. Z., Streibig, J. C. y Ritz, C. 2007. Utilizing R Software Package for Dose-Response Studies: The Concept and Data Analysis. *Weed Technology* 21(3): 840–848.
- Knispel, A. L. y McLachlan, S. M. 2010. Landscape-scale distribution and persistence of genetically modified oilseed rape (*Brassica napus*) in Manitoba, Canada. *Environmental Science and Pollution Research International* 17(1):13–25.
- Koch, M. A. y Kiefer, C. 2006. Molecules and migration: biogeographical studies in cruciferous plants. *Plant Systematics and Evolution* 259(2-4):121–142.

- Krato, C., Hartung, K. y Petersen, J. 2012. Response of imidazolinone-tolerant and -susceptible volunteer oilseed rape (*Brassica napus* L.) to ALS inhibitors and alternative herbicides. *Pest Management Science* 68(10):1385–1392.
- Landbo, L., Andersen, B. y Jørgensen, R. 1996. Natural hybridisation between oilseed rape and a wild relative: hybrids among seeds from weedy *B. campestris*. *Hereditas* 125:89–91.
- Leckie, D., Smithson, A. y Crute, I. R. 1993. Gene movement from oilseed rape to weedy populations - a component of risk assessment for transgenic cultivars. *Aspects of Applied Biology* 35:61-66.
- Leflon, M., Eber, F., Letanneur, J. C., Chelysheva, L., Coriton, O., Huteau, V., Ryder, C. D., Barker, G., Jenczewski, E., Chèvre, A. M. 2006. Pairing and recombination at meiosis of *Brassica rapa* (AA) x *Brassica napus* (AACC) hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 113(8):1467–1480.
- Lefol, E., Danielou, V. y Darmency, H. 1996. Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Research* 45:153–161.
- Légère, A. 2005. Risks and consequences of gene flow from herbicide-resistant crops: canola (*Brassica napus* L) as a case study. *Pest Management Science* 61: 292-300.
- Leguizamón, E. S. 2009. Herbicidas. La agricultura y el manejo de las malezas en la región pampeana. En: Ricci D (ed) *La Argentina 2050*, 1 ed. CASAFE, Buenos Aires, pp. 400-416.
- Lewis-Jones, L. J., Thorpe, J.P. y Wallis, G.P. 1982. Genetic divergence in four species of the genus *Raphanus*: Implications for the ancestry of the domestic radish *R. sativus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 18(1):35–48.
- Li, M., Yu, Q., Han, H., Vila-Aiub, M., Powles, S.B. 2012. ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. *Pest Management Science* 69:689–695.
- Liu, Y., Wei, W., Ma, K., Li, J., Liang, Y., Darmency, H. 2013. Consequences of gene flow between oilseed rape (*Brassica napus*) and its relatives. *Plant Science* 211:42–51.

- Londo J. P., Bollman, M. A., Cynthia, L., Sagers, C.L., Henry Lee, E., Watrud, L. S. 2011. Glyphosate-drift but not herbivory alters the rate of transgene flow from single and stacked trait transgenic canola (*Brassica napus*) to nontransgenic *B. napus* and *B. rapa*. *The New Phytologist* 191:840–849.
- Lü, N., Yamane, K. y Ohnishi, O. 2008. Genetic diversity of cultivated and wild radish and phylogenetic relationships among *Raphanus* and *Brassica* species revealed by the analysis of trnK/matK sequence. *Breeding Science* 22:15-22.
- Lutman, P. J., Freeman, S. E. y Pekrun, C. 2003. The long-term persistence of seeds of oilseed rape (*Brassica napus*) in arable fields. *The Journal of Agricultural Science* 141(2):231–240.
- Lysak, M. A. y Koch, M. A. 2011. Phylogeny, genome, and karyotype evolution of crucifers (Brassicaceae). En: Schmidt, R. y Bancroft, I. (eds.) *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. Springer Berlin Heidelberg. New York, USA, pp. 1–31.
- Madafiglio, G. P., Medd, R. W., Cornish, P. S. 1999. A decimal code for the growth and development stages of wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.). *Plant Protection Quarterly* 14:143–146.
- MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). 2015. Sistema Integrado de Información Agropecuaria. Disponible en: www.siiia.gov.ar.
- Malik, M. 2009. *Biology and Ecology of Wild Radish (Raphanus raphanistrum)*. Tesis para acceder al grado de Doctor. Clemson University.
- Mallory-Smith, C. A. y Retzinger, E. J. 2003. Revised Classification of Herbicides by Site of Action for Weed Resistance Management Strategies. *Weed Technology* 17:605–619.
- Martínez-Laborde, J. B. 1999. Brassicaceae. En: Zuloaga, F. O. y Morrone, O. (eds.): *Catálogo de las Plantas Vasculares de la Argentina. Dicotyledoneae. Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Garden* 74:1-1246.
- Marzocca, A., Marisco, O., Del Puerto, O. 1976. *Manual de malezas*. 3º ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Marzocca, A., 1994. *Guía descriptiva de malezas del Cono Sur*, 1st ed. INTA, Buenos

Aires.

- Mazzara, M., Grazioli, E., Savini, C., Van den Eede, G. 2007. Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line RT73 Using Real-time PCR. Validation Report and Protocol. Community Reference Laboratory for GM Food and Feed, Institute for Health and Consumer Protection, European Commission. Ispra, Italia.
- Mekenian, M. y Willemsen, R. 1975. Germination characteristics of *Raphanus raphanistrum*. I. Laboratory studies. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 102(5):243–252.
- Michael, P., Owen, M. y Powles, S. 2010. Herbicide-Resistant Weed Seeds Contaminate Grain Sown in the Western Australian Grainbelt. Weed Science 58(4):466–472.
- Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences. 2004. A recommended procedure for real-time quantitative TaqMan PCR for Roundup Ready canola GT73. En: <http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods/MONArt47-pcrGT73rapeseed.pdf>
- Moss, S. R., Clarke, J. H., Blair, A. M., Culley, T. N., Read, M. A., Ryan, P. J., Turner, M. 1999. The occurrence of herbicide-resistant grass-weeds in the United Kingdom and a new system for designating resistance in screening assays. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference. Brighton, UK, pp. 179–184.
- Mueller-Dombois, D. y Elleberg, H. 1974. Aims and methods of vegetation ecology. Wiley (1st ed.) New York. 547 p.
- Mulligan, G. 1995. Key to the Brassicaceae (Cruciferae) of Canada and Alaska. Agriculture and Agri-Food Canada. Ottawa, Canada.
- Nandula, V., Reddy, K., Rimando, A., Duke, S., Poston, D. 2007. Glyphosate-Resistant and -Susceptible Soybean (*Glycine max*) and Canola (*Brassica napus*) Dose Response and Metabolism Relationships with Glyphosate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(9):3540–3545.
- Nielsen, O., Ritz, C. y Sreibig, J. 2004. Nonlinear Mixed-Model Regression to Analyze Herbicide Dose-Response Relationships. Weed Technology 18:30–37.
- Office of Gene Technology Regulator (OGTR). 2002. The biology and ecology of canola (*Brassica napus*). Australia.

- Oms, J. A. y Tort, A. P. 1959. Identificación histológica de algunas *Brassicac* en subproductos oleaginosos. Junta Nacional de Granos (SAyG). Casa Jacobo Peuser, Buenos Aires.
- Panetsos, C. y Baker, H. 1967. The origin of variation in “wild” *Raphanus sativus* (Cruciferae) in California. *Genetica* 38:243–274.
- Parodi, L. R. 1964. Las malezas invasoras de los cultivos. En: Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Vol. 2. Buenos Aires: ACME, pp. 201-321.
- Pascale, N. 1976. Colza. Su cultivo, mejoramiento y usos. En: Kugler, W. (ed.) Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería – Tomo II. Editorial Acme (2da edición). Buenos Aires.
- Patiño, V. M. 1963 Plantas cultivadas y animales domésticos en América Equinoccial IV: Plantas introducidas. Editorial Imprenta Departamental. Cali, Colombia.
- Pertl, M., Hauser, T. P., Damgaard, C., Jørgensen, R. B. 2002. Male fitness of oilseed rape (*Brassica napus*), weedy *B. rapa* and their F1 hybrids when pollinating *B. rapa* seeds. *Heredity* 89(3):212–218.
- Pessel, D., Lecomte, J., Emeriau, V., Krouti, M., Messean, A., Gouyon, P. H. 2001. Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 102(6-7):841–846.
- Pivard, S., Adamczyk, K., Lecomte, J., Lavigne, C., Bouvier, A., Deville, A., Gouyon, H., Huet, S. 2008. Where do the feral oilseed rape populations come from? A large-scale study of their possible origin in a farmland area. *Journal of Applied Ecology* 45:476-485.
- Prakash, S., Wu, X., Bhat, S.R. 2012. History, Evolution, and Domestication of Brassica Crops. *Plant Breeding Reviews* 35:19–82.
- Prather, T., Ditomaso, J., Holt, J. 2000. Herbicide Resistance: Definition and Management Strategies. ANR Publications, Univ of California.
- Primiani, M., Cotterman, J., Saari, L. 1990. Resistance of kochia (*Kochia scoparia*) to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Weed Technology*, 4(1):169–172.
- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria. Disponible: <http://www.r-project.org>

- Rabbani, M. A., Murakami, Y., Kuginuki, Y., Takayanagi, K. 1998. Genetic variation in radish (*Raphanus sativus* L.) germplasm from Pakistan using morphological traits and RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 307–16.
- Reiner, H., Holzner, W., Ebermann, R. 1995. The development of turnip-type and oilseed-type *Brassica rapa* crops from wild-type in Europe—an overview of botanical, historical and linguistic facts. *Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress (Rapeseed Today and Tomorrow)*, Vol. 4, pp. 1066–1069. Cambridge, UK.
- Richter, O., Zwerger, P., Böttcher, U. 2002. Modelling spatio-temporal dynamics of herbicide resistance. *Weed Res.* 42:52–64.
- Ridley, C. E. y Ellstrand, N. 2008. Evolution of enhanced reproduction in the hybrid-derived invasive, California wild radish (*Raphanus sativus*). *Biological Invasions* 11(10):2251–2264.
- Ridley, C. E., Kim, S. -C. y Ellstrand, N. 2008. Bidirectional history of hybridization in California wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae), as revealed by chloroplast DNA. *American Journal of Botany* 95(11):1437–1442.
- Rieseberg L. H. y Carney S. C. 1998. Tansley Review – Plant Hybridization. *New Phytologist* 140:598-624.
- Ritz, C. 2010. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(1):220–229.
- Rouchaud, J., Neus, O., Cools, K., Bulcke, R. 1999. Metsulfuron-methyl soil persistence and mobility in winter wheat and following green manure crops. *Toxicological & Environmental Chemistry* 71(3-4):369–381.
- Roux, F., Paris, M. y Reboud, X. 2008. Delaying weed adaptation to herbicide by environmental heterogeneity: a simulation approach. *Pest Management Science* 64:16–29.
- Roux, F. y Reboud, X. 2007. Herbicide resistance dynamics in a spatially heterogeneous environment. *Crop Protection* 26:335–341.
- SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). 1997. Solicitud de ensayo a campo de canola tolerante al herbicida glifosato. Resolución N° 228.

CONABIA.

- Saji, H., Nakajima, N., Aono, M., Tamaoki, M., Kubo, A., Wakiyama, S., Hatase, Y., Nagatsu, M. 2005. Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environmental Biosafety Research* 4(4):217–222.
- Sala, C. A., Bulos, M., Altieri, E., Ramos, M. L. 2012. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. *Helia* 35:57–69.
- Schafer, M. G., Ross, A., Londo, J., Burdick, C., Lee, E. H., Travers, S. E., Van de Water, P., Sagers, C. 2011. The establishment of genetically engineered canola populations in the U.S. *PLoS One* 6(10):e25736.
- Schoenenberger, N. y D'Andrea, L. 2012. Surveying the occurrence of subsynchronous glyphosate-tolerant genetically engineered *Brassica napus* L. (Brassicaceae) along Swiss railways. *Environmental Sciences Europe* 24(1):23.
- Scursoni, J., Gigón, R., Martín, A. N., Vigna, M., Leguizamón, E. S., Istilart, C., López, R. 2014. Changes in weed communities of spring wheat crops of Buenos Aires province of Argentina. *Weed Science* 62:51–62.
- Seefeldt, S., Jensen, J. y Fuerst, E., 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9(2):218–227.
- SENASA (Secretaría Nacional de Sanidad Ambiental). 2007. Resolución 305/2007: Prohibe la importación de colza portadora de eventos transgénicos no autorizados para su producción y comercialización en la República Argentina. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1318&io=7383>
- Senior, I. J. y Bavage, A. D. 2003. Comparison of genetically modified and conventionally derived herbicide tolerance in oilseed rape: A case study. *Euphytica* 132: 217-226.
- Shaner D. L. y O'Connor S. L. 1991. The imidazolinone herbicides. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., 289 pp.
- Simard, M. -J., Légère, A., Warwick, S. I. 2006. Transgenic *Brassica napus* fields and *Brassica rapa* weeds in Quebec: sympatry and weed-crop in situ hybridization. *Canadian Journal of Botany* 84:1842–1851.
- Simard, M., Légère, A., Pageau, D., Lajeunesse, J., Warwick, S. I. 2002. The

- Frequency and Persistence of Volunteer Canola (*Brassica napus*) in Québec Cropping Systems. *Weed Technology* 16(2):433–439.
- Smit, J. J. y Cairns, A.L. 2001. Resistance of *Raphanus raphanistrum* to chlorsulfuron in the Republic of South Africa. *Weed Research* 41:41–47.
- Snow, A. A., Andersen, B. y Jørgensen, R. B. 1999. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Molecular Ecology* 8:605–615.
- Snow, A. A., Campbell, L. G. 2005. Can Feral Radishes Become Weeds? En: Gressel J (ed) *Crop Fertility and Volunteerism*, Taylor & Francis, pp. 193-208.
- Snow, A. A., Uthus, K., Culley, T. 2001. Fitness of hybrids between weedy and cultivated radish: implications for weed evolution. *Ecological Applications* 11(3):934–943.
- Squire, G. R., Breckling, B., Dietz Pfeilstetter, A., Jørgensen, R., Lecomte, J., Pivard, S., Reuter, H., Young, M. 2011. Status of feral oilseed rape in Europe: its minor role as a GM impurity and its potential as a reservoir of transgene persistence. *Environmental Science and Pollution Research International* 18(1):111–115.
- Swanson E. B., Herrgesell M. J., Arnoldo M., Sippel D. W. y Wong R. S. 1989. Microspore mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to the imidazolinones. *Theoretical and Applied Genetics* 78:525–530.
- Tan, M. y Medd, R. 2002. Characterisation of the acetolactate synthase (ALS) gene of *Raphanus raphanistrum* L. and the molecular assay of mutations associated with herbicide resistance. *Plant Science* 163:195–205.
- Tan, S., Evans, R., Dahmer, M., Singh, B., Shaner, D. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 61:246-257.
- Tenembaum, J. 1937. El Nabo. Su cultivo en el país. En: *Almanaque del Ministerio de Agricultura*, Buenos Aires, pp. 329–334.
- Theisen, G. 2008. Aspectos botânicos e relato da resistência de nabo silvestre aos herbicidas inibidores de ALS. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil.
- Thill, D. C. y Mallory-Smith, C. A. 1997. The Nature and Consequence of Weed Spread in Cropping Systems. *Weed Science* 45(3):337–342.

- Thomas, P. 2003. Canola growers manual. Canola Council of Canada. Alberta, Canada.
- Tranel, P. J. y Wright, T. R. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* 50:700–712.
- Tranel, P. J., Wright, T. R. y Heap, I. M. 2015. Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Online. Disponible en: <http://www.weedscience.com>
- Van den Bulcke, M., De Schrijver, A., De Bernardi, D., Devos, Y., MbongoMbella, G., Leunda Casi, A., Moens, W., Sneyers, M. 2007. Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: an evaluation of real-life samples. *European Food Research and Technology* 225:49–57.
- Vavilov, N. 1951. Estudio sobre el origen de las plantas cultivadas. Versión española de Felipe Freier, Acme Agency.
- Vigna, M. R., Papa, J. C., Ponsa, J. C., Bedmar, F., Guevara, G., Rainero, H., Olea, I., Gigon, R., Istilart, C., López, R., Arguissain, G. G., Picapietra, G. 2014. El control químico de malezas en cultivos extensivos. En: Fernández, O., Leguizamón, E., Acciaresi, H. (Eds.) *Malezas e Invasoras de la Argentina*. Tomo I: Ecología y Manejo. EdiUNS, Bahía Blanca, Argentina, pp. 505-620.
- Vila-Aiub, M. M., Neve, P. y Powles, S. B. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist* 184:751–767.
- Von der Lippe, M. y Kowarik, I. 2007. Crop seed spillage along roads: a factor of uncertainty in the containment of GMO. *Ecography* 30(4):483–490.
- Walker, A., Cotterill, E. y Welch, S. 1989. Adsorption and degradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl in soils from different depths. *Weed Research* 29:281–287.
- Walsh, M. J., Duane, R. D. y Powles, S. B. 2001. High Frequency of Chlorsulfuron-Resistant Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*) populations across the Western Australian Wheatbelt. *Weed Technology* 15:199–203.
- Walsh, M. J. y Powles, S. B. 2007. Management Strategies for Herbicide-resistant Weed Populations in Australian Dryland Crop Production Systems. *Weed Technology* 21:332–338.

- Walsh, M. J., Powles, S. B., Beard, B. R., Parkin, B. T., Porter, S. A. 2004. Multiple-herbicide resistance across four modes of action in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Weed Science* 52:8–13.
- Warwick, S. I. 2011. Brassicaceae in agriculture. En: R. Schmidt y I. Bancroft (eds.) *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. Springer Berlin Heidelberg. New York, USA. pp. 33–66.
- Warwick, S. I., Simard, M.-J., Légère, A., Beckie, H.J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Séguin-Swartz, G., Stewart, C.N. 2003. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theoretical and Applied Genetics* 107(3):528–539.
- Warwick, S. y Francis, A. 2005. The biology of Canadian weeds. 132. *Raphanus raphanistrum* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 6:3–6.
- Warwick, S. I. y Anderson, J.K. 1999. Guide to the wild germplasm of Brassica and allied crops. Agriculture Canada Research Branch, Technical Bulletin 1993-15E, Ottawa, Canada. 22 pp.
- Warwick, S. I., Légère, A., Simard, M. -J., James, T. 2008. Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology* 17(5):1387–1395.
- Wei, W. y Darmency, H. 2008. Gene flow hampered by low seed size of hybrids between oilseed rape and five wild relatives. *Seed Science Research* 18(2):115–123.
- Wilkinson, M. J., Elliott, L. J., Allainguillaume, J., Shaw, M. W., Norris, C., Welters, R., Alexander, M., Sweet, J., Mason, D. C. 2003. Hybridization between *Brassica napus* and *B. rapa* on a national scale in the United Kingdom. *Science* 302: 457-9.
- Wilkinson, M. J., Davenport, I. J., Charters, Y. M., Jones, A. E., Allainguillaume, J., Butler, H. T., Mason, D. C., Raybould, A. F. 2000. A direct regional scale estimate of transgene movement from genetically modified oilseed rape to its wild progenitors. *Molecular Ecology* 9(7):983–991.
- Xiao, L., Lu, C., Zhang, B., Bo, H., Wu, Y., Wu, G., Cao, Y., Yu, D. 2009. Gene transferability from transgenic *Brassica napus* L. to various subspecies and

- varieties of *Brassica rapa*. *Transgenic Research* 18(5):733–746.
- Yamagishi, H. y Terachi, T. 2003. Multiple origins of cultivated radishes as evidenced by a comparison of the structural variations in mitochondrial DNA of *Raphanus*. *Genome* 46(1):89–94.
- Yamane, K., Lü, N. y Ohnishi, O. 2005. Chloroplast DNA variations of cultivated radish and its wild relatives. *Plant Science* 168(3):627–634.
- Yoshimura, Y., Beckie, H. J. y Matsuo, K. 2006. Transgenic oilseed rape along transportation routes and port of Vancouver in western Canada. *Environmental Biosafety Research* 5(2):67–75.
- Yu, Q., Han, H., Li, M., Purba, E., Walsh, M. J., Powles, S. B. 2012. Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. *Weed Research* 52:178–186.
- Yu, Q., Han, H., Vila-Aiub, M. M., Powles, S. B. 2010. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *Journal of Experimental Botany* 61:3925–3934.
- Yu, Q., Powles, S. B. 2014. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science* 70:1340–1350.
- Yu, Q., Zhang, X. Q., Hashem, A., Walsh, M. J., Powles, S. B. 2003. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Science* 51:831–838.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

PUBLICACIONES

Revistas con referato

Pandolfo, C. E., Presotto, A., Poverene, M., Cantamutto, M. 2013. Limited occurrence of resistant radish (*Raphanus sativus*) to AHAS-inhibiting herbicides in Argentina. *Planta Daninha* 31(3):657-666.

Pandolfo, C. E., Presotto, A., Moreno, F., Dossou, I., Migasso, J.P., Sakima, E., Cantamutto, M. 2016. Broad resistance to AHAS-inhibiting herbicides in feral radish (*Raphanus sativus* L.) populations from Argentina. *Pest Management Science* 72:354-361. DOI: 10.1002/ps.4006

Artículos de divulgación

Pandolfo, C. E., Cantamutto, M. A., Poverene, M. 2010. Los parientes nocivos de la colza-canola. *Revista Análisis de Semillas* 4 (15): 49-53.

Pandolfo, C. E. 2013 Cuando rotar es controlar. Resistencia a herbicidas en nabón y estrategias para mitigar efectos nocivos. *La Nueva Provincia, suplemento Con el campo*, 26-11-2013.

TRABAJOS PRESENTADOS EN REUNIONES CIENTÍFICAS

- **VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe.** Pucón, Chile, Octubre 2009. Cantamutto, M., Presotto, A., Ureta, S., Gutierrez, A., **Pandolfo, C.E.**, Poverene, M. El recurso genético argentino para la Colza-Canola.
- **I Jornada de Intercambio de Producción Científico-Tecnológico.** Departamento de Agronomía-CERZOS. Bahía Blanca, Diciembre 2009. Cantamutto, M., Presotto, A., **Pandolfo, C.E.**, Bizet, J., Ureta, S., Gutierrez, A., Poverene, M. Estudio agroecológico de parientes silvestres de la colza. En: <http://www.cerzos-conicet.gov.ar/BoletinCERZOS/Especial/trabajos/16.htm>
- **XIV Congreso Latinoamericano de Genética (ALAG).** Viña del Mar, Chile, Octubre 2010. Ureta, S., Maestro, E., **Pandolfo, C.**, Cantamutto, M., Poverene, M. Flujo génico entre colza (*Brassica napus*) resistente a herbicida y la especie silvestre *B.*

rapa (Gene flow between herbicide tolerant rapeseed (*Brassica napus*) and the wild species *B. rapa*). Resumen 201, Actas p. 307.

- **2nd World Conference on Biological Invasions and Ecosystem Functioning.** Mar del Plata, Noviembre 2011. Cantamutto, M. A., **Pandolfo, C. E.**, Presotto, A., Paz, N., Suardiaz, G., Giachetti, F., Ureta, S., Poverene, M. Study of the progeny of two Brassicaceae weeds collected in proximity of oilseed rape. Abstract Book, p. 77. Disponible en: http://www.grieta.org.ar/biolief/index_htm_files/BIOLIEF%202011%20-%20CONFERENCE%20PROGRAM%20AND%20ABSTRACT%20BOOK.pdf
- **II Jornada de Intercambio de Producción Científico-Tecnológico.** Departamento de Agronomía-CERZOS. Bahía Blanca, Noviembre 2011. **Pandolfo, C. E.**, Cantamutto, M. A., Presotto, A., Ureta, S., Poverene, M. Estudio de la progenie de malezas Brassicáceas (*Brasica rapa*, *Raphanus sativus*) recolectadas en proximidad de cultivos de colza-canola (*B. napus*). En: http://www.cerzos-conicet.gob.ar/paginas/2011_resumenes.pdf
- **Top Ciencia BASF 2012.** Buenos Aires, Julio 2012. Cantamutto, M., Poverene, M., Presotto, A., **Pandolfo, C.**, Ureta, S., Casquero, M., Gutierrez, A. Por una mayor durabilidad de la tecnología CL en girasol.
- **XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas.** Potrero de los Funes, Octubre 2012. **Pandolfo, C. E.**; Presotto, A.; Ureta, S.; Poverene, M.; Cantamutto, M. Detección de individuos de *Raphanus sativus* resistentes a varios herbicidas AHAS en Argentina. Libro de Resúmenes (ISBN 978-987-1834-07-5), p. 187.
- **XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas.** Potrero de los Funes, Octubre 2012. **Pandolfo, C. E.**; Presotto, A.; Casquero, M.; Sakima, E.; Migasso, J.; Cantamutto, M. Caracterización de la interferencia de un biotipo de *Raphanus sativus* en girasol CL. Libro de Resúmenes (ISBN 978-987-1834-07-5), p. 188.
- **XV Congreso Latinoamericano de Genética (ALAG), XLI Congreso Argentino de Genética.** Rosario, Octubre 2012. Ureta MS, **C. Pandolfo**, M Cantamutto, M Poverene. Transferencia de tolerancia a imidazolinonas a tres crucíferas naturalizadas. J. Bas. App. Gen. 23(Suppl. 1):290.
- **Top Ciencia BASF 2013.** Buenos Aires, Julio 2013 y São Paulo, Brasil, Agosto 2013. **Pandolfo, C.**, Presotto, A., Cantamutto, M. Estrategias para la mitigación del efecto nocivo de biotipos de nabón (*Raphanus sativus*) con resistencia a herbicidas inhibidores de la AHAS. En: http://www.agro.basf.com.ar/Uploads/TopCiencia_anexos/Trabajos%20Top

[%20Ciencia%202013%20-%20BASF.zip](#)

- **XLII Congreso Argentino de Genética.** Salta, Octubre 2013. Ureta MS, F Torres Carbonell, **C Pandolfo**, M Cantamutto, M Poverene. Caracterización de plantas fuera de tipo en una población de *Brassica rapa* lindante a colza *B. napus*. J. Bas. App. Gen. 24(Suppl. 1):224.
- **III Jornada de Intercambio de Producción Científico-Tecnológico.** Departamento de Agronomía-CERZOS. Bahía Blanca, Diciembre 2013. **Pandolfo, C.**, Presotto, A., Migasso, J. P., Mock, F., Cantamutto, M. Identificación de un biotipo feral de *Brassica napus* con resistencia a glifosato. En: <http://www.boletin.cerzos-conicet.gob.ar/images/numero24/LIBRO-RESUMENES-III-JIPCiTe.pdf>
- **6º Congreso Argentino de Girasol.** Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR). Buenos Aires, Mayo 2014. **Pandolfo, C.**, Presotto, A., Sakima, E., Migasso, J. P., Cantamutto, M. Alternativas de control para biotipos de nabón (*Raphanus sativus*) resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS en girasol. En: <http://www.asagir.org.ar/Imagenes/6toCongreso/Murales/2014M18.pdf>
- **Top Ciencia BASF 2014.** Buenos Aires, Junio 2014. **Pandolfo, C.**, Presotto, A., Cantamutto, M. Control químico de un biotipo feral de *Brassica napus* resistente a glifosato. Libro de Actas, p. 27.
- **XLIII Congreso Argentino de Genética.** Bariloche, Octubre 2014. **Pandolfo C, A** Presotto, M Cantamutto. Resistencia a inhibidores AHAS en *Raphanus sativus* conferida por una mutación en el gen de la enzima. J. Bas. App. Gen. 25(Suppl. 1):138.
- **XLIII Congreso Argentino de Genética.** Bariloche, Octubre 2014. **Pandolfo C, A** Presotto, I Uribe, A Kirzner, J P Migasso, F Mock, M Cantamutto. Resistencia a glifosato en poblaciones naturales de *Brassica napus* en Argentina. J. Bas. App. Gen. 25(Suppl. 1):275.
- **XLIII Congreso Argentino de Genética.** Bariloche, Octubre 2014. Torres Carbonell F, MS Ureta, **C Pandolfo**, M Cantamutto, M Poverene. Fenotipado de individuos de *Brassica rapa* expuestos a flujo génico de colza IMI-resistente. J. Bas. App. Gen. 25(Suppl. 1):244.
- **XLIII Congreso Argentino de Genética.** Bariloche, Octubre 2014. Ureta MS, M Hernández, **C Pandolfo**, M Cantamutto, M Poverene. Persistencia de la resistencia a imidazolinonas en poblaciones silvestres de *Brassica* y *Raphanus*. J. Bas. App. Gen. 25(Suppl. 1):245.

- **Top Ciencia BASF 2015.** Mendoza, Julio 2015. **Pandolfo C. E.**, Presotto A., Villar, R., Martínez, J.M., Duval, M., Cantamutto, M. Exploración del efecto protector de semilla del fluxofenim (Concep III) contra la fitotoxicidad de la dimetenamida (Frontier) en sorgo.
- **XXII Congreso Latinoamericano de Malezas, I Congreso Argentino de Malezas.** Buenos Aires, Septiembre 2015. **Pandolfo, C.**, Presotto, A., Cantamutto, M. Detección de resistencia transgénica a glifosato en poblaciones naturales de *Brassica napus* L. y *B. rapa* L. Libro de Resúmenes p. 279. En: <http://www.asacim.com.ar/congreso/pdf/RH.EO.04Pandolfoe.pdf>
- **XLIV Congreso Argentino de Genética.** Mar del Plata, Septiembre 2015. **Pandolfo C,** A Presotto, F Torres Carbonell, S Ureta, M Poverene, M Cantamutto. Detección del transgén GT73 de resistencia a glifosato en poblaciones naturales de *Brassica napus* y *B. rapa*. J. Bas. App. Gen. 26(Suppl. 1):175.
- **XLIV Congreso Argentino de Genética.** Mar del Plata, Septiembre 2015. Ureta MS, **C Pandolfo,** A Presotto. La evolución de las malezas resistentes a herbicidas. J. Bas. App. Gen. 26(Suppl. 1):30.
- **XLIV Congreso Argentino de Genética.** Mar del Plata, Septiembre 2015. Torres Carbonell F, A Presotto, **C Pandolfo,** MS Ureta, M Poverene. Uso de microsatélites para la identificación de *Brassica napus*, *B. rapa* y sus híbridos interespecíficos. J. Bas. App. Gen. 26(Suppl. 1):172.
- **XLIV Congreso Argentino de Genética.** Mar del Plata, Septiembre 2015. Hernández M, MS Ureta, F Torres Carbonell, **CE Pandolfo,** M Poverene. Comparación de la aptitud biológica de híbridos de colza y la maleza *B. rapa* con y sin resistencia a imidazolinonas. J. Bas. App. Gen. 26(Suppl. 1):113.

TRANSFERENCIAS

Poverene M., Cantamutto M. A., Ureta S., Presotto A., Gutierrez A., **Pandolfo C. E.** 2009. Probabilidad de transferencia de tolerancia a herbicidas desde colza a especies silvestres emparentadas. Segundo Informe Técnico para Dow Agrosiences S.A. (12 pp).

Cantamutto M. A., **Pandolfo C. E.**, Presotto A., Ureta S., Gutierrez A., Poverene M.. 2011. Probabilidad de transferencia de tolerancia a herbicidas desde colza a especies silvestres emparentadas. Informe Técnico Final para Dow Agrosiences S.A. (47 pp).

Pandolfo C., Presotto A, Cantamutto M. 2013. Denuncia de la presencia de biotipos de *Raphanus sativus* resistentes a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS en Argentina. **International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. En: <http://www.weedscience.org/Details/Case.aspx?ResistID=6738>

Pandolfo C., Presotto A, Ureta S., Poverene M., Cantamutto M. 2013. Denuncia de la presencia de biotipos de *Raphanus sativus* resistentes a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS en Argentina. Red de Conocimiento de Malezas Resistentes (REM-AAPRESID). En: <http://www.aapresid.org.ar/rem/raphanus-sativus-nabon>

Pandolfo C., Presotto A, Migasso J., Mock F., Cantamutto M. 2013. Denuncia de la presencia de un biotipo feral de *Brassica napus* resistente a glifosato en Argentina. Red de Conocimiento de Malezas Resistentes (REM-AAPRESID). En: <http://www.aapresid.org.ar/rem/brassica-napus-colza-canola>

Pandolfo C., Presotto A, Cantamutto M. 2014. Denuncia de la presencia de un biotipo de *Brassica rapa* resistente a glifosato y herbicidas inhibidores de la AHAS en Argentina. Red de Conocimiento de Malezas Resistentes (REM-AAPRESID). En: <http://www.aapresid.org.ar/rem/alerta-roja-brassica-rapa-nabo>

Pandolfo, C.E., Presotto, A. y Cantamutto, M. 2014. Caracterización de poblaciones ferales de *Brassica napus* con resistencia transgénica a glifosato. Informe Técnico para el Servicio Nacional de Sanidad Ambiental (SENASA), 50 pp.

ANEXO DE IMÁGENES

Imagen 1. Arriba: Población de *Brassica rapa* en un campo natural, al borde de una laguna. Abajo: Población de *Raphanus sativus* en un lote agrícola con colza.



Imagen 2. Arriba: Población de *Brassica nigra* en la banquina de un camino vecinal del partido de Balcarce. Abajo: Población de *Sinapis arvensis* sobre RP228.



Imagen 3. Plantas fuera de tipo en la progenie de poblaciones de *Brassica rapa* colectadas en la cercanía de cultivos de colza (*B. napus*), criadas en un jardín común.



Imagen 4. Plantas de una población de *Raphanus sativus* resistente a herbicidas AHAS invadiendo un lote de girasol CL (arriba), y uno de trigo (abajo).



Imagen 5. Plantas de una población feral de *Brassica napus* resistente a glifosato, invadiendo lotes de soja RR.



Imagen 6. Plantas de una población de *Brassica rapa* resistente a glifosato, invadiendo distintos lotes agrícolas.

