

TRABAJO FINAL DE INTENSIFICACIÓN

EVALUACIÓN DE LA APTITUD BIOLÓGICA DE UNA POBLACIÓN DE NABO SILVESTRE (*Brassica rapa*) CON RESISTENCIA TRANSGÉNICA A GLIFOSATO



Ornella Ivonne Accatino

Tutor

Dra. María Soledad Ureta

Consejeros

Dr. Claudio E. Pandolfo

Dr. Alejandro Presotto



Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur

Noviembre 2019

CONTENIDOS

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	6
2.1 Hipótesis.....	18
2.2 Objetivo.....	18
3. Materiales y métodos.....	19
4. Resultados	27
5. Discusión.....	32
6. Conclusiones.....	34
7. Bibliografía.....	35
8. Anexo.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. DIFERENCIAS EN CARACTERES MORFOLÓGICOS PARA LAS ESPECIES B. NAPUS Y B. RAPA.

TABLA 2: NÚMERO DE PLANTAS DE CADA ACCESIÓN DE BRASSICA RAPA POR CADA BANDEJA, PREVIO A LA APLICACIÓN DE GLIFOSATO.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: CENTRO DE ORIGEN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO BRASSICA (DIXON, 2007).

FIGURA 2: TRIÁNGULO DE "U". RELACIÓN GENÓMICA DE LAS ESPECIES CULTIVADAS DEL GÉNERO BRASSICA.

FIGURA 3: MAPA DE APTITUD BIOLÓGICA PARA CULTIVOS INVERNALES (IZQUIERDA) Y PRIMAVERALES (DERECHA). FUENTE: CLIMA Y AGUA - INTA CASTELAR.

FIGURA 4: COMPARACIÓN DE ÓRGANOS DE BRASSICA NAPUS (IZQUIERDA) Y B. RAPA (DERECHA). A Y B: HOJAS INFERIORES, C Y D: HOJAS SUPERIORES, E Y F: FLORES ABIERTAS EN INFLORESCENCIAS, G Y H: SILICUAS.

FIGURA 5: VISTA DE UNA PLANTA DE B. RAPA EN FLORACIÓN Y FRUCTIFICACIÓN EN UN LOTE DE SOJA

RR, UBICADO EN UN ESTABLECIMIENTO AGROPECUARIO DEL PARTIDO DE BALCARCE, DURANTE 2013.

FIGURA 6: VISTA DE LA POBLACIÓN CONTROL DE BRASSICA RAPA JUA, DURANTE EL 2008.

FIGURA 7: TEST INMUNOLÓGICO. KIT COMERCIAL (QUICKSTIX™ KIT FOR ROUNDUP READY® CANOLA LEAF & SEED). LAS DOS BANDAS DE LA IZQUIERDA CON DOS LÍNEAS COLOREADAS SON TESTS POSITIVOS, MIENTRAS QUE LA Banda DE LA DERECHA ES UN TEST QUE RESULTÓ NEGATIVO PARA LA PRESENCIA DE LA PROTEÍNA CP4 EPSPS.

FIGURA 8: CARPA ANTIAFIDOS CONTENIENDO EN SU INTERIOR UNA DE LAS ACCESIONES DE BRASSICA RAPA EN ESTUDIO.

FIGURA 9: BANDEJA MULTICELDA CON PLANTINES DE BRASSICA RAPA, PREVIO A LA APLICACIÓN DE GLIFOSATO.

FIGURA 10: DIÁMETRO DE ROSETA (CM), DIÁMETRO DE RAÍZ (CM), ALTURA DE PLANTAS (CM) Y NÚMERO DE RAMIFICACIONES PRINCIPALES, DE UNA ACCESIÓN DE BRASSICA RAPA CON EL TRANSGÉN DE RESISTENCIA A GLIFOSATO (RR) Y UNA ACCESIÓN SIN EL TRANSGÉN (BR). NS: DIFERENCIAS NO SIGNIFICATIVAS, *: $P < 0.05$, **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

FIGURA 11: NÚMERO DE SILICUAS POR INFLORESCENCIA, LARGO DE SILICUA (CM), LARGO DEL ROSTRO DE LA SILICUA (CM), NÚMERO DE SEMILLAS POR SILICUA, PESO DE MIL SEMILLAS (G) Y RENDIMIENTO POR PLANTA (G), DE UNA ACCESIÓN DE BRASSICA RAPA CON EL TRANSGÉN DE RESISTENCIA A GLIFOSATO (RR) Y UNA ACCESIÓN SIN EL TRANSGÉN (BR). NS: DIFERENCIAS NO SIGNIFICATIVAS, *: $P < 0.05$, **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

FIGURA 12: DÍAS TRANSCURRIDOS ENTRE LA SIEMBRA Y LA FLORACIÓN DE UNA ACCESIÓN DE BRASSICA RAPA CON EL TRANSGÉN DE RESISTENCIA A GLIFOSATO (RR) Y UNA ACCESIÓN SIN EL TRANSGÉN (BR). NS: DIFERENCIAS NO SIGNIFICATIVAS, *: $P < 0.05$, **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

FIGURA 13: SUPERVIVENCIA A LA APLICACIÓN DEL HERBICIDA GLIFOSATO DE LAS POBLACIONES COLECTADAS DENTRO DEL CULTIVO, PRIMERA (RR) Y SEGUNDA (RRG2) GENERACIÓN, Y FUERA DEL CULTIVO (BR Y JUA). BARRAS CON LETRAS DISTINTAS REPRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA $P < 0,05$ SEGÚN TEST ESTADÍSTICO DE TUKEY.

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer en primer lugar, a mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de todos estos años, por los valores que me han inculcado y por haberme hecho la persona que soy, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

Luego debo decir que sin el apoyo de mis amigos hubiese sido fácil abandonar la meta a mitad del camino, sin embargo este trabajo es fruto del esfuerzo y acompañamiento mutuo entre los amigos que la vida me ha dado.

No puedo olvidarme de mencionar a Emiliana Bastias, prima, concubina y mejor amiga con quien nos hemos impulsado hacia adelante mutuamente durante toda la vida. También a mi compañero de vida Kevin Jesser, quien me ha ayudado a superar la recta final de mi carrera de Ingeniera Agrónoma.

A mi equipo de trabajo: Soledad Ureta, Claudio Pandolfo y Alejandro Pressoto les agradezco por dejarme ser parte de su proyecto, por su acompañamiento en cada paso de mi trabajo final de la carrera. Sobre todo a mi tutora Soledad, quien se ha ocupado de mí en todos los aspectos, cual madre.

A todos, les estoy infinitamente agradecida.

1.RESUMEN

Dentro del género *Brassica* (familia Brassicaceae) se encuentran especies distribuidas mundialmente que han sido utilizadas desde muchos años a. C. para alimentación humana, animal y más modernamente para la industria. Por otra parte, muchas de las especies que integran este género se consideran malezas de los cultivos. Estudios moleculares del ADN de las especie de *Brassica* demuestran que evolucionaron de un antecesor en común y se ha comprobado que es posible el cruzamiento entre las mismas, lo que representa un potencial peligro debido a posible incorporación de transgenes de las especies *Brassica* cultivadas hacia las silvestres en el ecosistema. En Argentina no está autorizada la producción de colza transgénica, debido al impacto que se pueda generar el flujo de genes con las especies silvestres establecidas en nuestro país. No obstante, en el año 2013 se hallaron algunas plantas de *B. rapa* resistente a glifosato creciendo en un lote de soja, en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. En el presente trabajo se evaluó la aptitud biológica de dicha población en comparación con otra población susceptible que se había establecido fuera del lote cultivado. Asimismo, se comparó la población original con una generación avanzada obtenida en aislamiento para detectar cambios en la frecuencia de la resistencia. El objetivo principal de este trabajo de intensificación, fue detectar cambios en la fertilidad de estas plantas y la capacidad de perpetuarse en el ambiente. Los resultados obtenidos demostraron que la aptitud biológica de la población con resistencia transgénica a glifosato no se vio afectada y que la frecuencia del gen dentro de la población se mantuvo estable en la siguiente generación. Además del daño ecológico que podría provocar, este hecho implica un importante problema a futuro para las relaciones internacionales y la comercialización de colza.

2.INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Brassicaceae (Cruciferae) existen numerosas especies utilizadas para consumo humano, animal y como oleaginosas de uso industrial y biocombustibles. Entre ellas se destacan la colza utilizada como oleaginosa (*Brassica napus* y *B. rapa*), las mostazas usadas como condimentos (*B. juncea*, *B. nigra*, *Sinapis alba*), los repollos, coles, brócoli, nabo sueco, rutabaga, coliflor y repollitos de Bruselas (*B. oleracea*). Por otro lado, existen especies dentro de esa misma familia que representan malezas para los cultivos, como por ejemplo *B. rapa*, especie adventicia en todo el mundo. En Argentina se distribuye desde Jujuy hasta Tierra del Fuego, y sus semillas se mezclan con las de cultivos como el trigo, la alfalfa, el lino y otros, bajando el valor comercial ya que se consideran impurezas (Marzocca *et al.*, 1976; Cabrera *et al.*, 1967).

Origen y domesticación

Existen registros de la antigua literatura india, china, griega y romana que datan de hasta 5000 años antes del presente, donde se menciona a los cultivos de *Brassica*, que fueron inicialmente domesticados por su uso hortícola y más tarde como cultivos productores de aceite comestible (Prakash *et al.*, 2012).

El centro de origen de las distintas especies de *Brassica* es bastante incierto, aunque se cree que *Brassica oleracea* tiene origen en la región mediterránea, *B. napus* en el sudeste de Europa, y *B. rapa* en un área muy extensa que abarca el oeste de Europa, hasta el este de China y Corea. En cuanto a *B. juncea*, su centro de origen se encuentra en Medio Oriente y *B. carinata* proviene del noreste de Africa (Figura 1), pero ninguna es nativa de América. Si bien sus centros de origen parecen ser diferentes, existen pruebas de que todas éstas provienen de un progenitor común con un número básico de cromosomas $n=6$, a partir del cual surgieron las especies diploides *B. nigra*, *B. rapa* y *B. oleracea*. Producto de su hibridación y posterior poliploidización las especies diploides dieron origen a tres anfidiploides: *B. napus*, *B. carinata* y *B. juncea*. El botánico Woo Jang Woo planteó las relaciones entre las *Brassica* ilustradas en lo que se conoce como el triángulo de "U" (Figura 2) (Dixon, 2007; Iriarte y Valetti, 2008). La transferencia de genes entre todas las especies del género *Brassica* y sus parientes más cercanos es

posible. Las cruces más frecuentes se dan entre *B. rapa* y *B. napus*, siendo mayor el porcentaje de hibridación cuando *B. rapa* actúa como madre (56-93% frecuencia de hibridación) (FitzJohn *et al.*, 2007; Devos *et al.*, 2008).

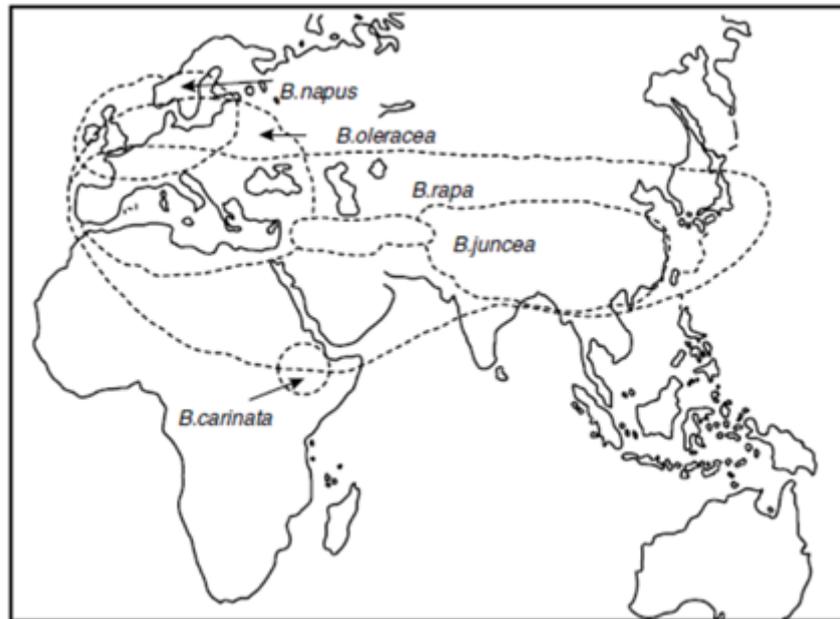


Figura 1: Centro de origen de las especies del género *Brassica* (Dixon, 2007).

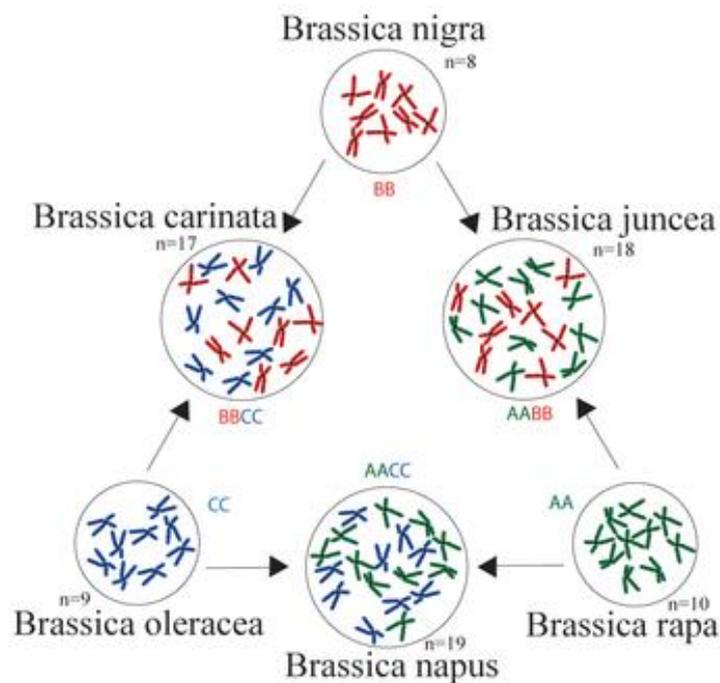


Figura 2: Triángulo de "U". Relación genómica de las especies cultivadas del género *Brassica*.

Reseña histórica

Tanto *B. rapa* como *B. napus* son nativas de Eurasia. Mientras que *B. rapa* fue la primera especie de *Brassica* en ser domesticada varios miles de años antes del presente, 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. Durante la Segunda Guerra Mundial, como consecuencia del freno de las relaciones comerciales con Europa y Asia (principales productores del mismo), Canadá comenzó a desarrollar el cultivo de colza para satisfacer la demanda local de aceite (Prakash *et al.*, 2012).

El aceite obtenido de ambas especies contenía alto porcentaje de ácido erúxico y glucosinolatos en la harina de extracción, características que hacían que no fuera apta para el consumo humano o animal. Fue así que comenzó el proceso de mejoramiento del cultivo, que consistió en tres grandes etapas. La primera, encabezada por Canadá en la década de 1960, fue dirigida hacia la obtención de un producto apto para consumo humano. Como punto de partida, se utilizaron semillas de la especie *B. napus* provenientes de Argentina y de *B. rapa* originaria de Polonia. El resultado fue la obtención de cultivares con menos de 2% de ácido erúxico en aceite y menos de 20 mmol de glucosinolatos en la harina de extracción de alta calidad proteica, conocidos desde entonces como canola (Canadian Oil Low Acid) de tipo argentino o polaco (Prakash *et al.*, 2012; Iriarte y Valetti 20,08; Gulden *et al.*, 2008).

La segunda etapa del mejoramiento de esta especie comenzó con la era de la biotecnología, cuando se apuntó a la obtención de variedades de más fácil manejo en el campo. Por esto se crearon variedades con resistencia a herbicidas, materiales más precoces y homogéneos en comparación con los primitivos, entre otras características. Los primeros cultivares transgénicos con resistencia a herbicidas se obtuvieron a mediados de la década de 1990, y se desarrollaron exclusivamente en la especie *B. napus*. Las dudas y cuestionamientos sobre la utilización de esta tecnología surgieron con base en que *B. napus* posee diversos parientes silvestres en las regiones donde se realiza el cultivo, con lo que el riesgo de flujo de genes hacia estos es alto, provocando

entre otras cosas el acortamiento de su ciclo floral y la introducción de resistencia a herbicidas (Bruins, 2010; Gulden et al., 2008).

La tercera etapa del mejoramiento se enfoca en las nuevas generaciones millennials y centennials, quienes se inclinan por una alimentación de calidad con una dieta balanceada. El aceite de colza posee una baja proporción de ácidos grasos saturados, responsables del aumento del colesterol malo (LDL) en sangre, mientras que la combinación de los ácidos grasos no saturados es sumamente beneficiosa: posee altos niveles de oleico (alrededor del 60 %) y un excelente balance de linoleico (Omega 6) y linolénico (Omega 3), que favorecen la síntesis del colesterol “bueno” (HDL) (Iriarte y Valetti 2008). En esta nueva era del mejoramiento se trata de optimizar la calidad nutricional apuntando a obtener variedades con mejor relación oleico/linoleico y menor contenido de grasas saturadas, entre otras cosas (Rakov *et al.*, 2007).

Actualmente en el mundo y en Argentina

Las características benéficas del aceite de colza lo han convertido en el tercer cultivo oleaginoso del mundo luego de soja y palta, con una producción de 30 millones de toneladas de aceite. En el mundo se producen 70 millones de toneladas de colza y los principales productores son Canadá (29%), la Unión Europea (25%) y China (19%) (USDA, 2019).

En Argentina se producen 40 mil toneladas de colza al año y todos cultivares actuales corresponden a la especie *B. napus*. Si bien el área donde es posible la producción de cultivares -tanto invernales como primaverales- es extensa (Figura 3), el cultivo es sembrado en las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Córdoba, Entre Ríos, Santa Fe y Santiago del Estero representando en total un área sembrada no superior a las 20.000 ha (Iriarte, 2014; Agroindustria, 2019).

Las ventajas de la producción en nuestro país radican en que se trata de una oleaginosa de ciclo invierno-primaveral frente a las demás que son estivales, por lo que ingresa al mercado en una época en la que hay demanda y ocupa la molienda en épocas donde no se utiliza para la soja y el girasol. También permite la realización de cultivos de segunda en sistemas de labranza cero. La posible causa por la que la producción nacional de este cultivo no está en auge es la falta de información sobre los requerimientos del cultivo

en la zona, que genera un mal manejo del mismo, obteniéndose rendimiento por debajo del potencial (1400 kg ha⁻¹ en la zona vs 5000 kg ha⁻¹ potenciales) (Gómez y Miralles, 2002), acompañado de la falta de inversión en la mejora genética para la obtención de variedades más adaptadas a la zona. Sumado a esto, la competencia con el trigo por el espacio en el mismo momento y la presencia de malezas de su misma familia hacen difícil su manejo.

A lo largo del tiempo diferentes entidades estatales y privadas generaron programas para incursionar en la producción de este cultivo en el país, pero reiterados problemas para la comercializar el producto terminaban por dar fin a estos programas (Iriarte y Valetti, 2008). En la actualidad existen variedades creadas por mejoradores del INTA que se adaptan mejor a las condiciones agroclimáticas de la zona (Iriarte, 2017)

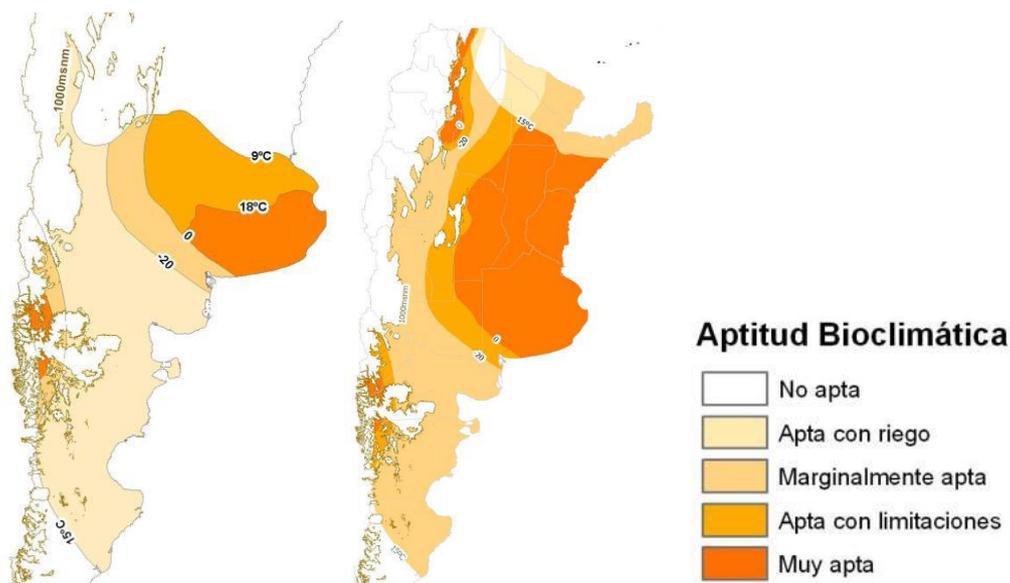


Figura 3: Mapa de aptitud biológica para cultivos invernales (izquierda) y primaverales (derecha). Fuente: Clima y Agua - INTA Castelar.

Morfología

Brassica napus y *B. rapa* son especies anuales muy similares en cuanto a su morfología, se diseminan por semillas muy pequeñas, de 2,5 a 4 gramos ubicadas dentro de silicuas dehiscentes por dos valvas. Tienen raíz pivotante y tallo erecto y ramificado que puede llegar al metro de altura. Poseen dos tipos de hojas dispuestas en forma alterna. Asimismo, poseen caracteres que permiten distinguirlas tanto en estado vegetativo

como en estado reproductivo (Tabla 1 y Figura 4) (Marzocca *et al.*, 1976; Pandolfo *et al.*, 2018).

Tabla 1. Diferencias en caracteres morfológicos para las especies *B. napus* y *B. rapa*.

Órgano	<i>Brassica napus</i> (colza)	<i>Brassica rapa</i> (nabo)
Hojas superiores	abrazamiento parcial, forma: lanceolada, dentada o aserrada, liradas, ápice redondeado.	totalmente abrazadoras, forma: ovadas, dentadas u onduladas, enteras o sinuadas, con ápice mayormente redondeado
Hojas inferiores	pediceladas, color: verde claras y nervadura central blanca, forma: elípticas, dentadas o aserradas, sin pubescencia.	pediceladas, color: verde oscura y nervadura central blanca o violacea, forma: ovada u elíptica, ondulada o aserrada, con pubescencia sobre el envés
Inflorescencia	flores abiertas ubicadas por debajo de pimpollos	flores abiertas ubicadas por encima de pimpollos
Flores	amarillo claro y de mayor tamaño	amarillo intenso y de menor tamaño
Silicuas	valvas de 3,3 a 5 cm de largo y rostro de 0,8 a 1 cm	valvas de 2,3 a 3,5 cm de largo, y rostro de 1 a 1,7 cm

Figura 4: Comparación de órganos de *Brassica napus* (izquierda) y *B. rapa* (derecha). A y B: hojas inferiores, C y D: hojas superiores, E y F: Flores abiertas en inflorescencias, G y H: silicuas.

Brassica napus (colza)



Brassica rapa (nabo)





***Brassica rapa* como maleza**

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, esquilmente y desecante del suelo. En Argentina es una maleza común en cultivos de trigo y otros cereales de invierno, se difunde entre sus semillas y 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).

Las variedades hortícolas de *B. rapa* fueron introducidas en América por los colonizadores europeos. 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) y sería el origen de las poblaciones maleza de esta especie en Sudamérica. En nuestro país, la importancia de *B. rapa* como maleza de cultivos es reconocida desde la década del '30 (Ibarra, 1937). De hecho, la abundancia de *B. rapa* como maleza en la zona era tal, que en 1930 la sola separación de las semillas de nabo del cultivo de cereal

cubría los costos de producción del mismo, lo que generó un incentivo para producirlo por separado. Tanta era su difusión que figuraba su cotización en la bolsa de cereales y en 1940 se establecieron las bases para comercialización.

Flujo génico

Existe la posibilidad de que los genes de una población se muevan hacia otra en un proceso conocido como “flujo génico” y es, de hecho, una de las bases de la evolución. El flujo génico puede ser medido y estimado por diferentes métodos como pueden ser la observación de caracteres fenotípicos o marcadores moleculares (Planter, 2007).

Este proceso puede ocurrir naturalmente tanto entre individuos de poblaciones silvestres como entre éstos y los cultivos modificados por el hombre, a través de plantas voluntarias, poblaciones ferales y los parientes silvestres sexualmente compatibles con el cultivo como puente entre ellos. El éxito de las hibridaciones depende de que se produzca la polinización cruzada. Para que esto ocurra, ambas especies parentales deben estar floreciendo al mismo tiempo, las plantas deben estar cerca en el espacio para permitir que un vector (como el viento, el agua o animales) transporte el polen desde el padre hasta los tejidos receptivos de la madre, el polen debe ser capaz de efectuar la fertilización, y, finalmente, los embriones resultantes deben convertirse en semillas viables y germinar. Por lo tanto, cualquiera de estos factores puede prevenir la hibridación. Aun así la hibridación sucede (Ellstrand, 2003).

La incorporación de genes del cultivo de *B. napus* en poblaciones silvestres de *B. rapa* podría tener un efecto incierto sobre las mismas. El destino de un alelo en una población dependerá de su efecto sobre la aptitud biológica de los individuos que lo adquieren. Existen tres posibles destinos para un alelo en una población: 1) que no tenga ningún efecto en ese ambiente ecológico (alelo neutro), con lo cual su frecuencia está sujeta a la deriva génica y podría persistir o perderse, 2) que su efecto sea deletéreo y conduzca a una depresión alogámica, disminuyendo la viabilidad y fertilidad de los híbridos, o 3) que el alelo sea beneficioso y el flujo génico acelere su diseminación en la población silvestre (Ellstrand, 2003).

La aptitud biológica es una medida relativa de la eficacia reproductiva de un genotipo cuando se lo compara con otro. Los componentes de la aptitud son la supervivencia y la fecundidad, que pueden resultar afectadas en distintos momentos del ciclo vital. La medición de la aptitud puede hacerse a través de parámetros que reflejan la supervivencia y la fertilidad de los individuos, y la estimación de la misma es crucial, ya que, como se mencionó anteriormente, la incorporación de un gen puede ser deleterea. Por lo general las poblaciones silvestres son más rústicas que los cultivos y sobreviven a las plagas y enfermedades con diversos mecanismos de defensa, con lo cual la introgresión de un gen que le confiera una característica que a cierto cultivo le permita sobrevivir, puede no ser tan significativo para supervivencia de la especie silvestre que lo adquirió. Por el contrario, puede representar un costo para la planta que lo adquiera debido a efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres fenotípicos que a su vez afecten la aptitud (Poverene y Ureta, 2004).

Resistencia a herbicidas

Existen variedades de *B. napus* resistentes a diferentes tipos de herbicidas obtenidos tanto por transgénesis como por mejoramiento convencional. Los eventos transgénicos registrados actualmente incluyen colza resistente a glifosato (Canadá 1994, aprobada también en Estados Unidos, Japón, México, Reino Unido y Australia), glufosinato (Canadá 1996, aprobada en Estados Unidos, Japón y Australia), y bromoxinil (Canadá y Japón 1997) (OGTR, 2002). En Argentina está prohibida la utilización de cultivares obtenidos a través de transgénesis (SAGPyA, 1997; SENASA, 2007), aunque sí se permite la utilización de cultivares obtenidos a través de los métodos de mejoramiento tradicionales. Es por esto que desde hace unos años se utiliza la tecnología Clearfield obtenida por mutaciones inducidas, la cual presenta resistencia a los herbicidas de la familia de las imidazolinonas (INASE, 2019).

No obstante, la prohibición del cultivo de colza transgénica en Argentina, en el 2012 fueron halladas en la región pampeana del país, poblaciones ferales de *B. napus* con el transgén de resistencia a glifosato. A partir de esta situación, el Grupo de Investigación de las Relaciones Cultivo-Silvestre (GIRCS CERZOS-UNS), comenzó a trabajar en su

caracterización y surgieron diferentes hipótesis respecto a su origen. Se cree que las mismas pudieron haber ingresado por contaminación de semillas importadas de otros cultivos antes del 2007, año a partir del cual la legislación nacional solicita el análisis probatorio de ausencia de material OGM (SENASA, 2007), o bien por la producción de colza transgénica de forma no autorizada (Pandolfo *et al.*, 2018).

Luego del hallazgo de poblaciones ferales de colza con resistencia transgénica a glifosato en la provincia de Buenos Aires, en el verano de 2012 se constató la existencia de poblaciones de nabo silvestre (*B. rapa*) resistente a glifosato en la misma zona. Nuevamente se comprobó que la resistencia a glifosato en estas poblaciones era de origen transgénico. Pero alguna de estas además presentaron resistencia al grupo de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS.

La presencia de poblaciones naturales de nabo con resistencia transgénica a glifosato y a herbicidas AHAS en Argentina presenta un panorama complejo que involucra aspectos de impacto ambiental por la liberación en ambientes naturales del transgén. Además, para 2019 estas poblaciones se han dispersado por todo el centro sur de la provincia de Buenos Aires. El transgén ha persistido por más de 8 años en ambientes agrícolas, moviéndose también a zonas ruderales, con menor intervención humana y presión de selección por herbicidas (Pandolfo *et al.*, 2017; Pandolfo *et al.*, 2018). En estos ambientes, la dispersión del transgén sólo dependerá de su efecto en la aptitud biológica de las plantas. Esto implica un grave riesgo para la diversidad de las poblaciones silvestres de *B. rapa* y del ambiente en general.

Para el presente trabajo de intensificación se trabajó con una población de *B. rapa* colectada en un lote agrícola de Balcarce, que presentaba resistencia a glifosato (pero no a herbicidas AHAS). Esta resistencia no se debería a una mutación natural sino a la presencia del transgén GT73 que confiere resistencia a glifosato. La presencia del transgén en estas poblaciones podría implicar un costo biológico, disminuyendo la fertilidad de las plantas, reduciendo la dispersión y el impacto ambiental.

2.1HIPÓTESIS

- 1) La población de *Brassica rapa* que posee el transgén de resistencia a glifosato presentará una disminución en su aptitud biológica.
- 2) La proporción de plantas con resistencia a glifosato en una población segregante, disminuirá con el avance generacional sin presión de selección.

2.2OBJETIVOS

- 1) Caracterizar la aptitud biológica de una población silvestre de *Brassica rapa* con el transgén de resistencia a glifosato.
- 2) Caracterizar la resistencia a glifosato de dos generaciones de una población de *Brassica rapa* segregante para ese carácter.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En el año 2013 se colectaron plantas de *B. rapa* de un campo ubicado en la zona de Balcarce. En el momento de colección el campo se encontraba sembrado con soja RR y las accesiones que se utilizaron para este estudio fueron tomadas tanto dentro del lote (RR) como fuera del lote (BR).

Las plantas de la accesión RR se encontraban aisladas (<50) en el estado de floración a fructificación, dentro de un cultivo de soja RR (Figura 5). 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.



Figura 5: Vista de una planta de *B. rapa* en floración y fructificación en un lote de soja

RR, ubicado en un establecimiento agropecuario del partido de Balcarce, durante 2013. La historia del lote indica que el año 2008 fue el único año en el que se sembró colza, con tecnología CL. La rotación de cultivos básica del lote fue trigo-soja, registrándose sólo la siembra de un cultivo de girasol en la década previa. El registro de herbicidas utilizados incluyó a tres SU (sulfonilureas) pero ninguna aplicación de herbicidas IMI (imidazolinonas). En toda la década, el sistema productivo estuvo bajo siembra directa, predominando el empleo de barbecho químico con glifosato y 2,4-D. El control de malezas en trigo se efectuó con dicamba y metsulfurón, y la soja RR fue tratada con glifosato. No se registraron aplicaciones de herbicidas SU durante dos años consecutivos.

En trabajos previos, se comprobó que la accesión RR, colectada dentro del lote de soja, presentaba resistencia a glifosato. Más aún, se detectó por distintos métodos, que las plantas poseían el transgén GT73 que confiere resistencia a este herbicida, propiedad de Monsanto (Pandolfo *et al.*, 2018). La población BR, que carecía de la aplicación de herbicidas debido a que se encontraba fuera del lote de soja RR, fue considerada como susceptible.

Como control se utilizó una población de *B. rapa* de probada susceptibilidad a herbicidas, colectada en una zona 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 (Figura 6).



Figura 6: Vista de la población control de *Brassica rapa* JUA, durante el 2008.

Evaluación de aptitud biológica

Se evaluó la aptitud biológica de la accesión de *B. rapa* hallada dentro de un lote de soja, con resistencia transgénica a glifosato (RR), y se la comparó con la accesión de la misma población, colectada en los bordes del mismo lote y sin resistencia a glifosato (BR).

Las accesiones fueron sembradas en bandejas multicelda con sustrato comercial Growmix (Multipro) y criadas en el invernáculo del Dpto. de Agronomía (UNS) con luz natural, riego diario y a temperatura de 20-25 °C.

En el estadio de tres hojas verdaderas se realizó un test inmunológico con un kit comercial (QuickStix™ Kit for Roundup Ready® Canola Leaf & Seed) para determinar que efectivamente las plantas presentaran el transgén GT73. Este kit está 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).

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. 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 μ L para hoja y 350 μ L 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 (Figura 7).

De esta forma se seleccionaron dentro de la accesión RR, 15 plantas que poseyeran efectivamente el evento transgénico, y se comprobó que las 15 plantas de la accesión BR no presentarían el transgén.

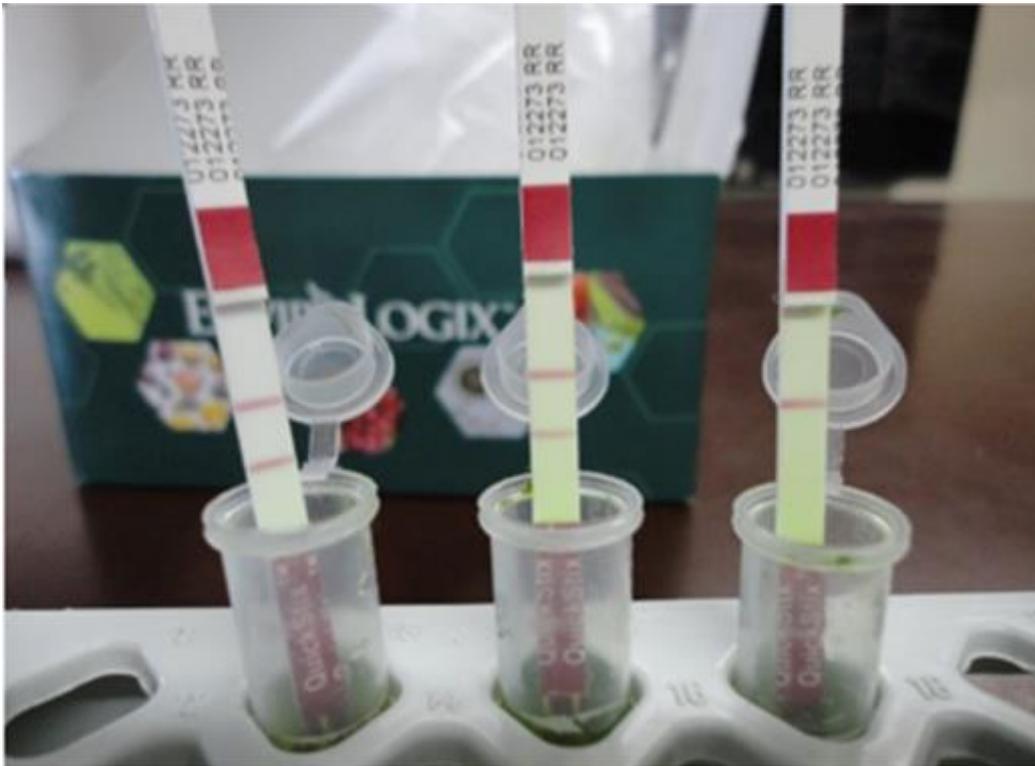


Figura 7: Test inmunológico. Kit comercial (QuickStix™ Kit for Roundup Ready® Canola Leaf & Seed). Las dos bandas de la izquierda con dos líneas coloreadas son tests positivos, mientras que la banda de la derecha es un test que resultó negativo para la presencia de la proteína CP4 EPSPS.

Las 15 plantas de cada accesión se trasplantaron en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la UNS, bajo condiciones de aislamiento, en carpas cubiertas por un tejido antiáfidos (Figura 8), con riego automatizado y desmalezado manual periódicamente. Durante el período de floración se colocaron abejas dentro de las carpas para facilitar la polinización. Debido a pérdidas durante el ciclo de crecimiento, se evaluó un número de 14 plantas para la accesión susceptible (BR) y 12 para la accesión resistente (RR).



Figura 8: Carpa antiáfidos conteniendo en su interior una de las accesiones de *Brassica rapa* en estudio.

En el campo se tomaron los siguientes datos: diámetro raíz, diámetro de la roseta, altura de planta, número de ramas por planta y días transcurridos hasta la floración desde la siembra y el trasplante.

A la madurez de las accesiones, se cosechó la totalidad de las plantas de cada carpa por separado cada una con su correcta identificación. Una vez en el laboratorio se tomó una muestra de un total de 15 silicuas de la rama principal de cada una de las plantas, con la

que se determinaron caracteres morfológicos y componentes del rendimiento tales como: largo de silicua, largo del rostro de las silicuas, número de semillas por silicua, peso de mil semillas y peso total de las semillas de cada planta.

Mediante el programa Infostat 2019 (Di Rienzo, 2019) se analizaron los caracteres cuantitativos evaluados en el ensayo. Las medias de cada variable de las dos poblaciones fueron comparadas mediante un test *t* de student. Esta prueba se aplica bajo el supuesto de que ambas poblaciones están normalmente distribuidas y poseen varianzas iguales.

Persistencia de la resistencia

Se evaluó la resistencia a glifosato de las accesiones de *B. rapa*. Las poblaciones fueron sembradas en bandejas multicelda y posteriormente puestas en el invernadero bajo condiciones controladas de humedad y temperatura de igual forma que en el ensayo previo (Figura 9).

Se comparó la accesión originaria de Balcarce colectada dentro del lote durante 2013 (RR), y un avance generacional (RRG2) obtenido bajo condiciones de aislamiento y sin selección por herbicidas, realizado durante 2016 en una carpa provista con malla antiáfido. Como controles se utilizaron la accesión colectada en 2013 en el borde del mismo lote donde se obtuvo BR, y la población susceptible JUA.

Se aplicó glifosato (formulado al 39,6%) a doble dosis comercial ($X=1,29 \text{ kg e.a. ha}^{-1}=3,7 \text{ L P.C. ha}^{-1}$). La aplicación fue realizada al estado 3-4 hojas verdaderas, 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. Un día previo a la aplicación se realizó un conteo para conocer el número de plantas que efectivamente existían al momento (Tabla 2)

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). 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: $y = \arcsen (x + 0,5)^{1/2}$.



Figura 9: Bandeja multicelda con plantines de *Brassica rapa*, previo a la aplicación de glifosato.

Tabla 2: Número de plantas de cada accesión de *Brassica rapa* por cada bandeja, previo a la aplicación de glifosato.

Población	Repetición	Nº plantas antes de la aplicación
RR	1	66
	2	76
	3	78
	4	72
RRG2	1	81
	2	67
	3	63
	4	ATACADA POR HONGOS*
BR	1	74
	2	87
	3	95
	4	68
JUA	1	24
	2	9
	3	34
	4	41

*La repetición que fue atacada por hongos no fue tomada en cuenta en la evaluación de los resultados.

4.RESULTADOS

Evaluación de la aptitud biológica

El análisis comparativo de las poblaciones resistente (RR) y susceptible (BR) indicó que los parámetros evaluados resultaron en su mayoría similares entre las poblaciones, mostrando una gran similitud entre la accesión susceptible a glifosato y la accesión con resistencia a herbicida.

A pesar de que se observaron diferencias entre la supervivencia de las accesiones RR y BR, estas no fueron significativas.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas para los caracteres vegetativos analizados: ancho de roseta, altura de planta y número de ramificaciones principales. Tampoco hubo diferencias significativas entre los valores medios del diámetro de la raíz de las dos poblaciones, aunque se registró una leve diferencia, siendo mayor el valor para la población RR (Figura 10).

Se hallaron diferencias en algunos parámetros reproductivos como: silicuas por inflorescencia y peso de 1000 semillas (que fueron mayores en la accesión susceptible BR), y en el largo de silicua y número de semillas por silicua (que fueron mayores en la accesión resistente RR). El peso total de las semillas de las plantas de la población resistente fue levemente menor que las de la población susceptible y los valores medios de las muestras de RR fueron más variables que los de BR, no llegando a resultar una diferencia significativa. Por compensación entre estos componentes, no se hallaron diferencias significativas en el rendimiento final por planta (Figura 11).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los valores medios de longitud de rostro de las silicuas de ambas poblaciones, oscilando entre 1,57 cm en BR y 1,76 cm en RR, valores propios de la especie *B. rapa* (Figura 11).

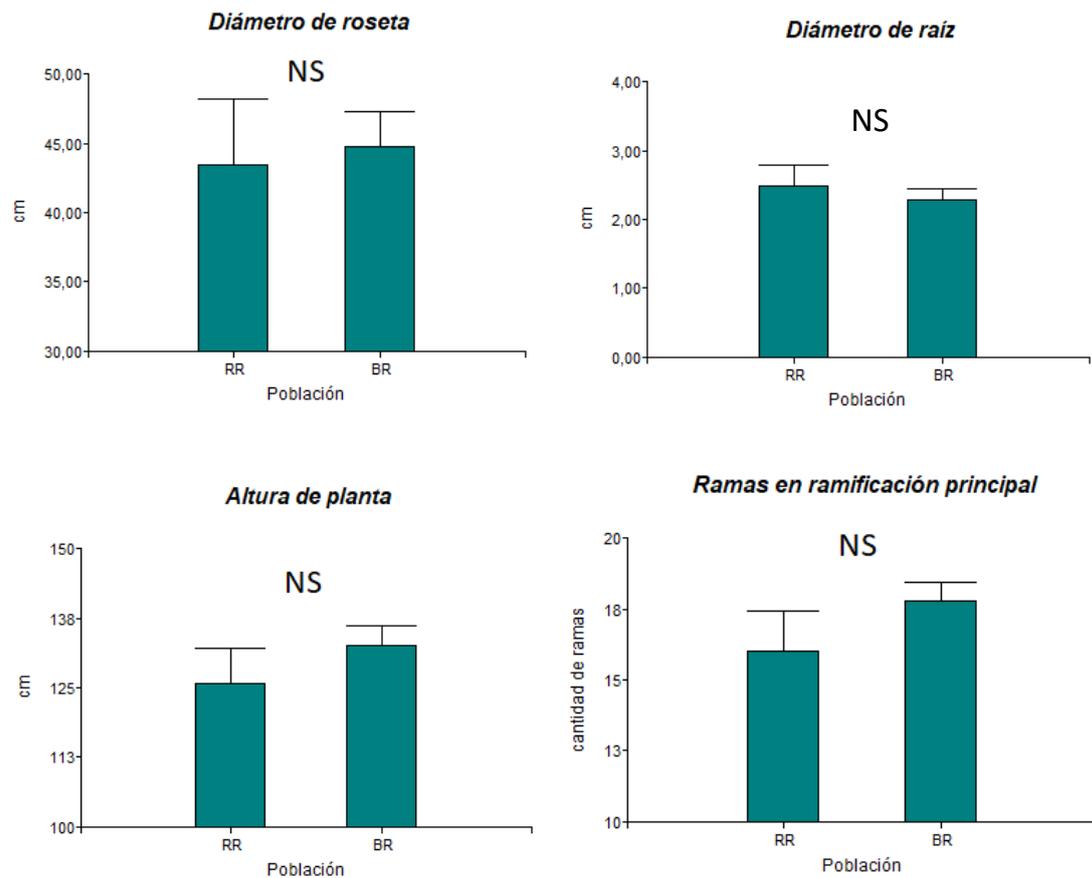


Figura 10: Diámetro de roseta (cm), diámetro de raíz (cm), altura de plantas (cm) y número de ramificaciones principales, de una accesión de *Brassica rapa* con el transgén de resistencia a glifosato (RR) y una accesión sin el transgén (BR). NS: diferencias no significativas, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

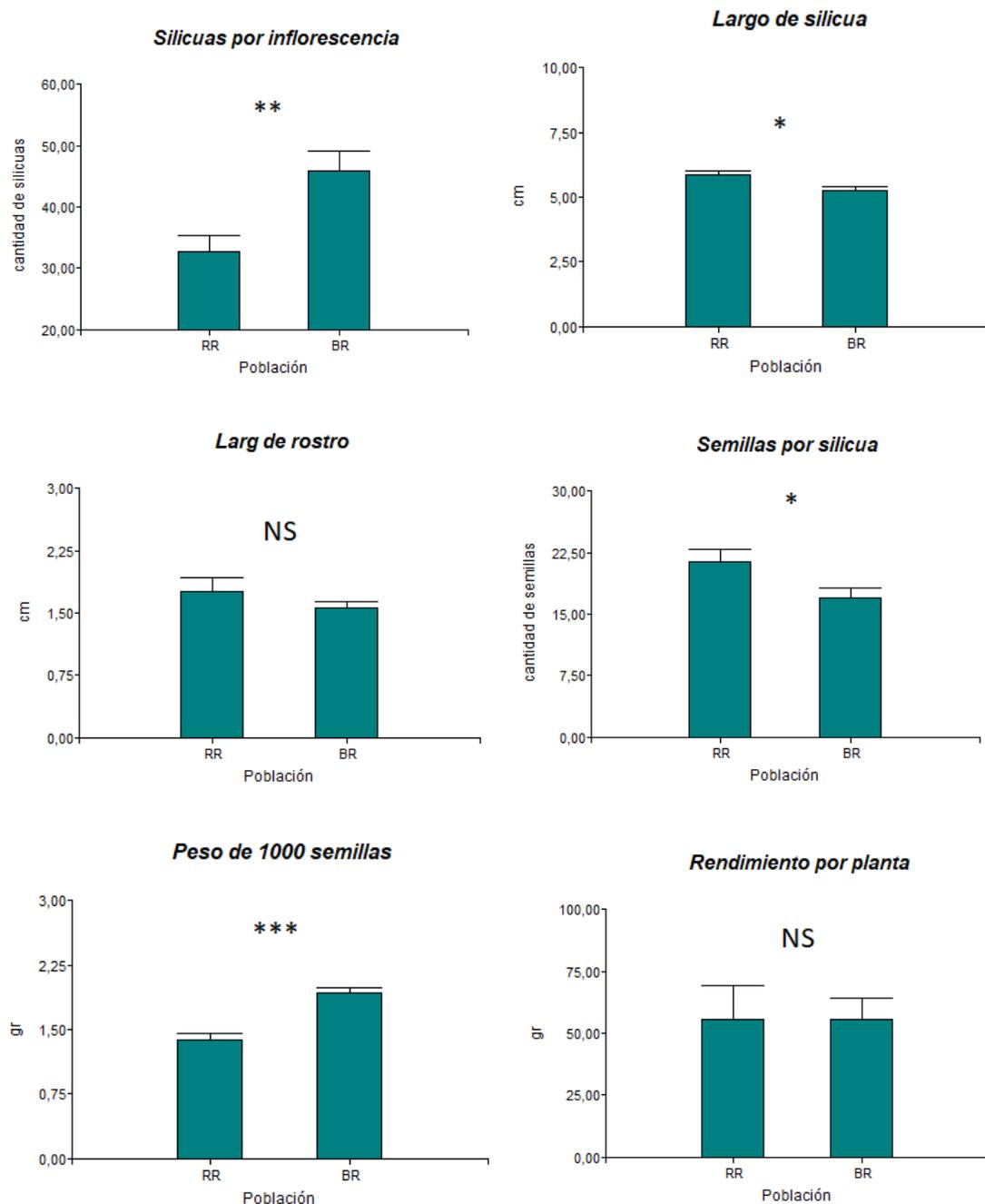


Figura 11: Número de silicuas por inflorescencia, largo de silicua (cm), largo del rostro de la silicua (cm), número de semillas por silicua, peso de mil semillas (g) y rendimiento por planta (g), de una accesión de *Brassica rapa* con el transgén de resistencia a glifosato (RR) y una accesión sin el transgén (BR). NS: diferencias no significativas, *: $p < 0.05$, **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

El intervalo de tiempo transcurrido entre la siembra y la floración de ambas poblaciones fue similar. En cuanto al tiempo transcurrido entre el trasplante y la floración de RR y BR, tampoco fue significativamente diferente (Figura 12).

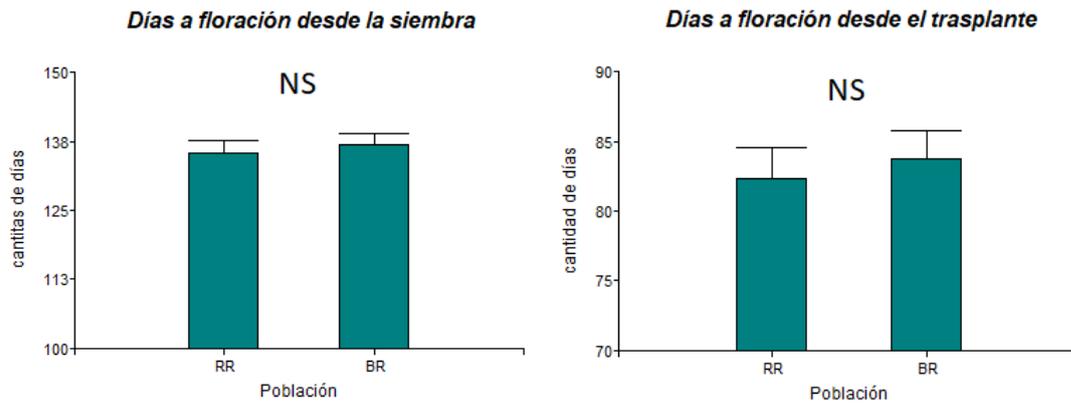


Figura 12: Días transcurridos entre la siembra y la floración de una accesión de *Brassica rapa* con el transgén de resistencia a glifosato (RR) y una accesión sin el transgén (BR). NS: diferencias no significativas, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Persistencia de la resistencia

Los resultados fueron concluyentes, la accesión tomada dentro del lote de soja RR resistió a la aplicación del producto tanto en su primera como en su segunda generación (Figura 13).

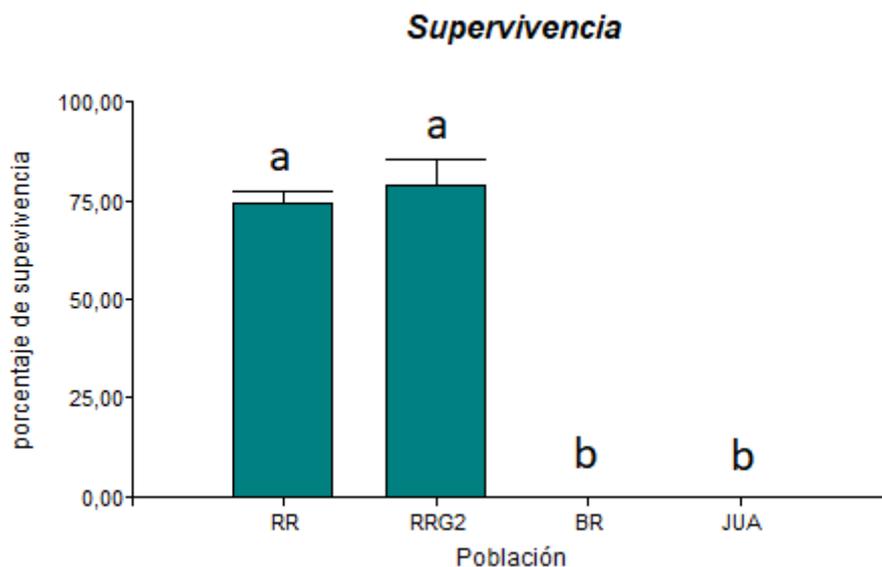


Figura 13: Supervivencia a la aplicación del herbicida glifosato de las poblaciones colectadas dentro del cultivo, primera (RR) y segunda (RRG2) generación, y fuera del cultivo (BR Y JUA). Barras con letras distintas representan diferencias significativas para $p < 0,05$ según test estadístico de Tukey.

Frente a la aplicación del herbicida glifosato a todas las accesiones en estudio se pudo observar que la accesión colectada dentro del lote RR tuvo una marcada resistencia al mismo, que fue del 74,22%. La supervivencia en la segunda generación RRG2 fue levemente superior, con un 78,93% de individuos sobrevivientes, aunque la diferencia entre las mismas no fue significativa. En cuanto a las accesiones colectadas fuera del cultivo, éstas no resistieron a la aplicación del herbicida.

5.DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demostraron que la presencia del transgén no disminuyó la aptitud biológica de esta población de *B. rapa* y, su dispersión en ambientes ruderales sin presión de selección por glifosato no se vería limitada. A pesar de que se encontraron diferencias en algunos componentes del rendimiento entre las accesiones con y sin el transgén, estas fueron compensadas y no resultaron en diferencias en el rendimiento final por planta. Los caracteres que permiten la supervivencia y fecundidad de las plantas de *B. rapa* con el transgén de resistencia a glifosato, no se ven afectados con la introgresión del mismo a su genoma, con lo cual la aptitud biológica de estas plantas no se vio afectada.

Por otra parte, la proporción de plantas resistentes en una generación avanzada, obtenida en condiciones de aislamiento y sin presión de selección de herbicida, se mantuvo constante.

La mayor pérdida de individuos durante el ciclo vegetativo de la población RR pudo deberse a efectos propios de la hibridación entre *B. rapa* y *B. napus*. Estos efectos deletéreos que genera la hibridación entre dos especies se estabilizan en las siguientes retrocruzas, pero al tratarse de una población que fue tomada de un campo donde no se había registrado la producción de colza, no se sabe cómo se introdujo el gen de resistencia a la zona ni tampoco se sabe qué generación de hibridación es la que el equipo de trabajo recolectó. A pesar de esto, las diferencias en supervivencia con respecto a la accesión susceptible BR no fue significativa.

En trabajos previos, se ha observado que los híbridos F1 y F2 producto de cruzas controladas entre *B. napus* y *B. rapa* suelen en general presentar menos aptitud biológica que sus parentales, en promedio. Sin embargo, alguno de sus híbridos individuales ha mostrado ser reproductivamente tan exitoso como los progenitores (Hauser et al., 1998). En la evaluación del costo de la introgresión de un transgén de resistencia a herbicidas de *B. napus* en una población de *B. rapa*, (Snow et al. 1999) no hallaron diferencias entre la accesión con y sin el transgén, tras tres retrocruzas con la especie silvestre.

La persistencia del transgén en ambientes naturales agrestales de Argentina ya ha sido confirmada por al menos 5 años en una población de *B. rapa*. Además, se observó la dispersión de las plantas transgénicas por varios kilómetros desde el lugar de la primera detección, incluso hacia hábitats ruderales, con menos intervención humana y presión de herbicida (Pandolfo et al., 2018). En estos entornos, la persistencia de los biotipos dependerá de la aptitud biológica o *fitness* de estas plantas.

Argentina se ubica en uno de los principales puestos de producción de soja transgénica resistente a glifosato, con lo cual se le brinda a esta maleza un escenario favorable para su crecimiento y dispersión, viéndose favorecida por la presión de selección que le ofrece la aplicación de glifosato al cultivo como práctica de manejo típica.

Este hecho implica un importante problema a futuro para las relaciones internacionales de comercialización, ya que semillas de *B. rapa* transgénica podrían mezclarse con las de cualquier cultivo producido en la Argentina y migrar hacia países donde puede representar un potencial peligro biológico.

6.CONCLUSIONES

- La presencia del transgén de resistencia a glifosato en una población de *Brassica rapa* no implicó una reducción en su aptitud biológica, comparada con la misma población sin el transgén.
- La resistencia a glifosato se mantuvo constante en una población segregante luego de un avance generacional bajo condiciones de aislamiento y sin presión de selección de herbicidas.
- La dispersión de estas poblaciones de *B. rapa* no se vería limitada incluso en ambientes ruderales, con menor intervención humana y presión de selección por herbicidas. Esto implica un grave riesgo para la diversidad de las poblaciones naturalizadas de *B. rapa* de Argentina y del ambiente en general.

7. BIBLIOGRAFÍA

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.

Becker H. C., Damgaard C., Karlsson B. 1992. Environmental variation for outcrossing rate in rapeseed (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics*. 84: 303–306.

Bruins, M. 2010. El aporte del mejoramiento vegetal para la agricultura (online). Disponible en: http://www.seednews.inf.br/_html/site_es/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=61

Cabrera A. L., Suarez D., Boelcke O., Burkart A., Dawson G., Fabris H., Giusti L., Pontiroli A. 1967. Flora de la Provincia de Buenos Aires. Colección científica del INTA.

Devos, Y., A. de Schrijver & D. Reheul. 2008. Quantifying the introgressive hybridisation propensity between transgenic oilseed rape and its wild/weedy relatives. *Environmental Monitoring and Assessment* 149(14):303-322.

Ellstrand, N.C. 2003. *Dangerous liaisons?: when cultivated plants mate with their wild relatives*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 264 pp.

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., T.T. Armstrong, L.E. Newstrom-Lloyd, A.D. Wilton & M. Cochrane. 2007. Hybridisation within Brassica and allied genera: evaluation of potential for transgene escape. *Euphytica* 158: 209-230

Gómez, N. V., Agosti, M. B., Miralles, D. 2007. Fenología y generación del rendimiento del cultivo de colza-canola. XV Congreso de AAPRESID. Rosario, Argentina

Green, J. 2009. Evolution of glyphosate-resistant crop technology. *Weed Science* 57:108-117.

Gulden, R.H., S.I. Warwick & A. Thomas. 2008. The Biology of Canadian Weeds. 137. *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. *Canadian Journal of Plant Science* 88(5): 951–996

Ibarra, F.E. 1937. Malezas más comunes del trigo y del lino. En: *Almanaque del Ministerio de Agricultura*, Buenos Aires, pp 405–410.

Ibarra, F.E. 1937. Malezas más comunes del trigo y del lino. En: *Almanaque del Ministerio de Agricultura*, pp.: 405–410. Buenos Aires. Pascale, N. 1976. Colza. Su cultivo, mejoramiento y usos. En: Kugler, W. (editor): *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería – Tomo II*. Editorial Acme, 2da edición. Buenos Aires. 35 pp.

INASE (Instituto Nacional de Semillas). 2019. Catálogo Nacional de Cultivares. Disponible en: <http://www.inase.gov.ar>.

Instituto Nacional de Semillas (INASE). 2015. Catálogo Nacional de Cultivares. Disponible en: <http://www.inase.gov.ar>

Iriarte L., Lopez Z. (2014) .Cultivo de colza en Argentina. Situación actual y perspectivas INTA, Chacra experimental integrada de Barrow.

Iriarte, L. 2017. Macacha INTA, nuevo cultivar de colza. Disponible en: https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/3154/Agro_barrow_59_p.18.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Iriarte, L. y Valetti, O. 2008. Cultivo de Colza. Chacra Experimental Integrada Barrow. Convenio MAAyP-INTA. Tres Arroyos, Argentina.

James, C. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief. No. 52. Ithaca, NY.

MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). 2019. Existencias de Aceites y Subproductos por Provincia. Disponible en: https://www.agroindustria.gov.ar/new/0-0/programas/dma/existencias/01_existencias_series.php

Marzocca A., Mársico O. J. y Del Puerto O. 1976. Manual de malezas. Editorial Hemisferio Sur. 8-11.

Olsson, G. 1960. Self-incompatibility and outcrossing in rape and white mustard. *Hereditas* 46: 241–252.

Pandolfo, C., Presotto, A., Torres Carbonell, F., Ureta, M.S., Poverene, M., Cantamutto, M. 2018. Transgene escape and persistence in an agroecosystem: the case of glyphosate resistant *Brassica rapa* L. in central Argentina. *Environmental Science and Pollution Research* 25(7):6251-6264. DOI:10.000/s113560170726-3

Parodi, L. R. (editor). 1964. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. 2. El cultivo de las plantas útiles. Editorial ACME. Buenos Aires. 1411 pp.

Patiño, V. M. 1963 Plantas cultivadas y animales domésticos en América Equinoccial IV: Plantas introducidas. Editorial Imprenta Departamental. Cali, Colombia.

Planter, E. A. (2007). Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. *Ecología Molecular*. Semarnat-Ine-UNAM-Conabio, 49-61.

Poverene, M., Ureta S. (2004). Flujo génico mediado por polen y su posible impacto ambiental. En: Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. (eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*: 399-408. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina

Prakash, S., Wu, X., Bhat, S.R. 2012. History, Evolution, and Domestication of Brassica Crops. *Plant Breeding Reviews* 35:19–82.

Rakow, G., Relf-Eckstein, J. A., & Raney, J. P. 2007. Rapeseed genetic research to improve its agronomic performance and seed quality/investigaciones genéticas de colza con el fin de mejoramiento de sus propiedades agronómicas y calidad de semilla. *Helia*, 30(46), 199-206.

SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). 1997. Solicitud de ensayo a campo de canola tolerante al herbicida glifosato. Resolución N° 228. 193 CONABIA.

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>

Soengas P., Velasco P., Vilar M., Cartea M. A. 2013. Mating system of *Brassica napus* and its relationship with morphological and ecological parameters in northwestern Spain. *Journal of Heredity*. 104(4): 491–499

Tenembaum, J. 1937. El Nabo. Su cultivo en el país. En: *Almanaque del Ministerio de Agricultura*, pp.: 329–334. Buenos Aires.

Torres Carbonell, F., M.S. Ureta, C. Pandolfo, M. Cantamutto & M. Poverene. 2014. Fenotipado de individuos de *Brassica rapa* expuestos a flujo génico de colza IMI-resistente. XLII Congreso Argentino de Genética. *Journal of Basic and Applied Genetics* 25(Suppl. 1):244.

Ureta, M.S., F. Torres Carbonell, C. Pandolfo, M. Cantamutto & M. Poverene. 2013. Caracterización de plantas fuera de tipo en una población de *Brassica rapa* lindante a colza *B. napus*. XLI Congreso Argentino de Genética. *Journal of Basic and Applied Genetics* 24(Suppl. 1):224.

8.ANEXO

Tabla A1: Análisis de la varianza y test de Tukey con $p=0.05$ de los datos tomados antes y después de la aplicación de glifosato en las poblaciones en estudio.

Población	Medias	n	E.E.	Símbolos
RR	74,22	4	2,88	a
RRG2	78,93	3	3,33	a
BR	0	4	2,88	b
JUA	0	4	2,88	b

Tabla A2: Análisis de los parámetros evaluados

Parámetro evaluado	Valor	Medio	Valor	Medio	Resultado Prueba	Símbolos
	BR		RR	T		
Largo silicua (cm)	5,25		5,85		0,0187	*
Largo rostro (cm)	1,57		1,76		0,2638	NS
Silicuas por inflorescencia	45,9		32,76		0,0054	**
N° semillas	16,94		21,42		0,0278	*
Peso 1000 (g)	1,9		1,4		<0,0001	***
Peso semillas (g)	55,5		55,4		0,995	NS
Diámetro raíz (cm)	2,29		2,48		0,5454	NS
Diámetro roseta (cm)	44,74		43,42		0,8001	NS
Altura (cm)	132,64		125,67		0,3331	NS
Ramas	17,79		16		0,2774	NS
Días de floración a siembra	136,79		135,33		0,6269	NS
Días de floración a trasplante	83,79		82,33		0,6269	NS