



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

Evaluación de la aptitud biológica de un biotipo de nabo silvestre (*Brassica rapa*) con resistencia a glifosato y herbicidas AHAS

NATALIA BELÉN SUÁREZ

Tutora

DRA MARÍA SOLEDAD URETA

Consejeros

DR. CLAUDIO EZEQUIEL PANDOLFO

DR. ALEJANDRO PRESOTTO

Asesora externa

ING. SOFÍA TILLERÍA



Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
MATERIAL VEGETAL	14
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	15
ENSAYO DE FITNESS	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
RESULTADOS.....	21
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	21
ENSAYO DE FITNESS	22
VIABILIDAD DEL POLEN	29
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA	35



Agradecimientos

A mi tía Alejandra, por haber colaborado en mi educación fundamentalmente en sus inicios.

A mis papás, Orlando y Rosa, por haberme inculcado los valores de la humildad, constancia y trabajo.

A mi amiga Juliana, por su amistad, honestidad y sobre todo risas. Por enseñarme con su ejemplo a no bajar los brazos.

A mi amiga Yessica, por su agradable compañía sobre todo en los últimos años de cursado de la carrera, por su ayuda e insistencia cuando mi dispersión era notable.

A mi amiga Carla, por acompañarme toda la vida. Por enseñarme que no existen distancias cuando el cariño es verdadero. Por escucharme y entenderme.

A mis amigas, Loana y Gimena, por ser de fierro y compartir su camino en la vida conmigo. Por enseñarme con su ejemplo que todo es posible. Por creer en mí y en mis capacidades.

Al equipo Medi-Can, por acompañarme en la utópica posibilidad de trabajar durante mi carrera. Por insistir en el armado del trabajo final.

A mi consejero, Dr. Alejandro Presotto, por sus enseñanzas y conocimientos sobre el final de la carrera. Por su generosidad.

A mi asesora externa, Sofía Tillería, por permitirme colaborar en su ensayo y hacer posible la constitución de esta tesis. Pero, sobre todo, por su paciencia y cariño.

A mi tutora, Dra. María Soledad Ureta, por ser mi maestra de vida con sus enseñanzas y experiencias. Por su infinita bondad, generosidad y compañía. Por ser mi segunda mamá y un ejemplo vivo de resiliencia.

A mi consejero, Dr. Claudio Pandolfo, por la enorme colaboración en el final de mi carrera y armado del trabajo final. Por emplear siempre su sabiduría para ayudarme. Por ser prácticamente un hermano en este camino.

A mis amigas de cuatro patitas, Tita y Madrid, por su inagotable compañía en jornadas de estudio y trabajo, por encontrar en su mirada la fortaleza para seguir adelante.

A mi compañero de vida, Nicolás, por ser mi pilar y mi motivación, mi ejemplo en el esfuerzo, voluntad y perseverancia. Por explicarme la importancia de “hacer”. Y, sobre todo, enseñarme qué es el amor.

Soy una parte de todo aquello que he encontrado en mi camino
Alfred Tennyson

There is a greatest intelligence in all things



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Triángulo de U, que describe las relaciones filogenéticas entre las especies cultivadas del género <i>Brassica</i>	7
Figura 2: Individuo de <i>Brassica rapa</i> en estado de floración.....	8
Figura 3: Plantas voluntarias de colza transgénica creciendo dentro de un lote de soja resistente a glifosato, en el partido de Gonzales Chaves, provincia de Buenos Aires, durante la primavera de 2012.	11
Figura 4: Test inmunológico positivo para la presencia del transgén de resistencia a glifosato.	14
Figura 5: Tareas de labranza en el jardín común (Departamento de Agronomía, 2018)	17
Figura 6: Ensayo de fitness de <i>Brassica rapa</i> en estado de floración, durante la primavera de 2019.	18
Figura 7: Determinación en laboratorio de longitud de silicuas, número de semillas por silicua, peso total de las semillas de la planta	19
Figura 8: Identificación de poblaciones con resistencia transgénica a glifosato con primer RT73.	21
Figura 9: Identificación de individuos con resistencia a herbicidas AHAS. Digestión con enzima BsrDI.....	22
Figura 10: Altura promedio de planta (cm) de dos poblaciones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); En dos campañas (a) 2018 y (b) 2019	24
Figura 11: Número promedio de ramas por planta de dos poblaciones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA) medidas en dos ensayos de fitness en los años 2018 y 2019.....	25
Figura 12: Número promedio de silicuas por inflorescencia de dos poblaciones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); medidas en dos campañas, (a) 2018 y (b) 2019.....	26
Figura 13: Largo de silicua promedio (en centímetros) de dos poblaciones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); medidas en dos ensayos de fitness en los años 2018 y 2019.....	27
Figura 14: Número promedio de semillas por silicua de dos poblaciones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); medidas en dos campañas (a) 2018 y (b) 2019.....	28
Figura 15: Peso promedio de semillas por planta (en gramos) de dos poblaciones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); medidas en dos ensayos de fitness en los años 2018 y 2019.	29
Figura 16: Viabilidad del polen (%) de dos poblaciones de <i>Brassica rapa</i> resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA) promediado entre los años 2018 y 2019.29	
Figura 17: Flores de B rapa con anteras cargadas de polen (izquierda). Gránulos de polen sometidos a tinción Alexander en el microscopio. Los gránulos fértiles son de color rojo y los infértiles de color verde (derecha)	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Poblaciones de <i>Brassica rapa</i> utilizadas en el ensayo de fitness, durante los años 2018 y 2019.....	15
Tabla 2. Tabla de ANOVA para los caracteres de aptitud biológica medidos en poblaciones de <i>Brassica rapa</i> resistentes y susceptibles a herbicidas, durante dos años.....	23
Tabla 3. Caracteres fenotípicos (media \pm error estándar) de poblaciones de <i>Brassica rapa</i> resistentes (R) y susceptibles (S), medidos en dos experimentos durante dos estaciones de crecimiento (primavera 2018 e invierno 2019). Las poblaciones fueron ordenadas de la más cercana a la más alejada al sitio donde se realizó el ensayo (Bahía Blanca).....	23

RESUMEN

Durante el año 2014, se constató la existencia de poblaciones de *Brassica rapa* con resistencia a glifosato (de origen transgénico) y a herbicidas inhibidores de la AHAS en el país. La adquisición de dichas resistencias se debió al flujo génico ocurrido entre esta maleza y *Brassica napus* (colza canola). Aunque el cultivo transgénico de colza está prohibido en Argentina, individuos con esta tecnología fueron detectados en el país. La adquisición de genes de resistencia puede generar efectos pleiotrópicos en el individuo, como por ejemplo la disminución de la aptitud biológica. Para determinar si se produjo algún detrimento en la producción de semillas se realizó el presente ensayo, en el cual se cuantificaron caracteres fenotípicos en dos poblaciones resistentes de *Brassica rapa* (BAL y LDU) y se las comparó con individuos de cuatro poblaciones susceptibles (ERI, JUA, NEC y SCB). Luego de confirmar la presencia de los genes de resistencia mediante la caracterización molecular, se procedió a cultivar las diferentes poblaciones en un jardín común. Se midieron distintos parámetros como viabilidad de polen, altura de las plantas, número de silicuas por planta, el número de ramas y silicuas por inflorescencia principal, longitud y el número de semillas y peso total de semillas de cada planta. Se pudo determinar que no existieron diferencias significativas entre individuos susceptibles y resistentes para ninguno de los parámetros observados, por lo tanto, se podría afirmar que la adquisición de los genes de resistencia en el caso de *Brassica rapa* no implicó una disminución en la aptitud biológica.



INTRODUCCIÓN

De la misma forma que aumenta la población en el mundo lo hace la demanda de alimentos producidos por cultivos. Ante la imposibilidad de continuar expandiendo las fronteras agrícolas, la alternativa más plausible es generar aumentos en los rendimientos de las cosechas (Fernández, 2015). Son varios los factores que ocasionan detrimentos en la producción agrícola, dentro de los cuales se destacan las plagas, enfermedades y malezas. Estas últimas, se estima que generan pérdidas del 10 % a nivel global (Harlan, 1965). En este contexto puede decirse que el aprendizaje, manejo y control sobre las especies plaga, favorecerá el aumento de rindes en terrenos cultivados (Fernández, 2015)

Dentro de la familia de las brasicáceas se reconocen un centenar de especies con multiplicidad de usos. Está integrada por plantas aromáticas, oleaginosas y hortícolas, pero también gran cantidad de especies consideradas maleza de los sistemas productivos (Iriarte, 2011). *Brassica rapa* y *B. napus* son dos de las seis especies de *Brassica* cultivadas cuyas relaciones filogenéticas fueron descritas por el botánico coreano Woo Jang-choon, en lo que se conoce como el triángulo de "U" (Figura 1). 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, cruza

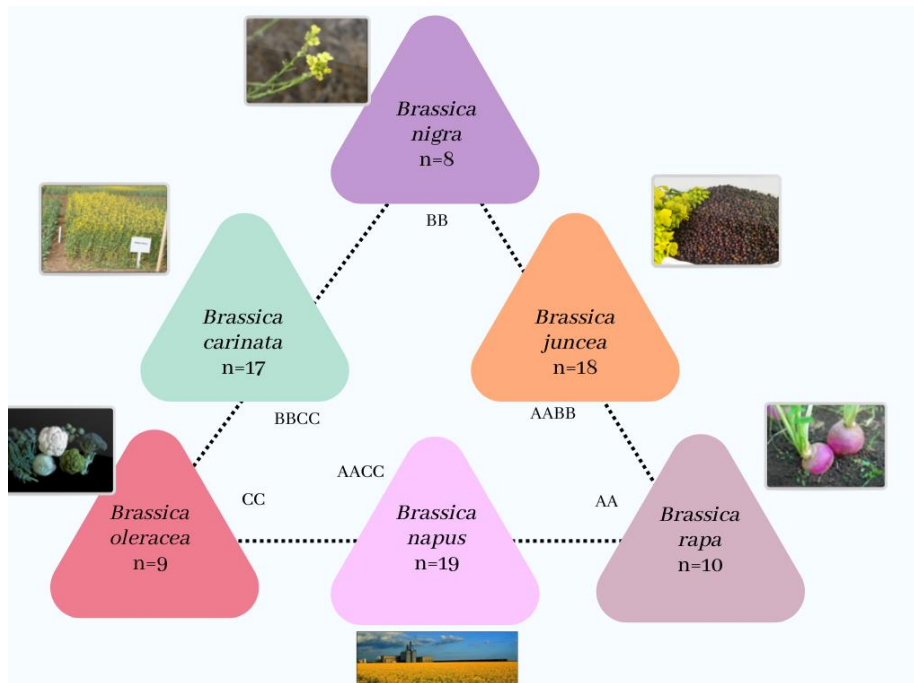


Figura 1: Triángulo de U, que describe las relaciones filogenéticas entre las especies cultivadas del género *Brassica*.

interespecíficas naturales entre ellas, seguidas de duplicación espontánea de cromosomas, dieron origen a las tres especies anfidiploides: *B. napus* (AACC $2n = 38$), *B. juncea* (AABB, $2n = 36$) y *B. carinata* (BBCC, $2n = 34$). *B. napus* es un híbrido natural entre *B. oleracea* y *B. rapa* y es también considerado el cultivo más importante de la familia (Gupta y Pratap, 2007; Allender y King, 2010; Iniguez-Luy y Federico, 2011, Prakash y otros, 2012).

Brassica rapa es una especie anual, de raíz pivotante, con tallos erguidos y ramificados, que pueden alcanzar un metro y medio de altura y a menudo presentan tricomas (Figura 2). Las hojas basales son cortamente pecioladas, lirado-pinatífidas, dentadas, no persistentes.



Figura 2: Individuo de *Brassica rapa* en estado de floración

Las medianas pinatilobuladas, con el lóbulo terminal grande y los lóbulos laterales pequeños, triangulares y con base dilatada abrazadora. Las hojas superiores son

lanceoladas, enteras y abrazadoras en la base. Los racimos se disponen en los extremos de las ramas, con las flores superando los pimpollos, alargados durante la fructificación. *B. napus* también es una especie anual, aunque ocasionalmente es bienal, de profunda raíz pivotante. Los tallos son erectos y ramificados, con la particularidad de ser glabros. Las hojas basales son lobuladas y 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 un abrazamiento total. Las flores son amarillas, más claras y grandes que *B. rapa* y una vez abiertas no suelen superar los pimpollos (Pandolfo et al., 2018).

Brassica napus es cultivada en el mundo bajo la forma de colza-canola como oleaginosa, siendo su aceite el tercero en importancia, luego del de palma y soja. A nivel mundial durante la campaña 2021/2022 se cosecharon aproximadamente 41.486 mil toneladas, siendo los principales productores y consumidores, China, Unión Europea, India y Canadá (USDA). Con respecto a *Brassica rapa*, su uso es más diversificado ya que, además de la producción de aceite, puede emplearse como forrajera, aromática y medicinal.

En la actualidad, más del 25 % de la colza empleada en el mundo es genéticamente modificada (GM) existiendo cultivares con distintas resistencias a herbicidas como glifosato, glufosinato y bromoxinil. Canadá, Estados Unidos, Australia, Japón y Chile se mencionan como los países que la utilizan (FAOSTAT, 2016; ISAAA, 2016).

El cultivar transgénico con más difusión es el que incluye la resistencia a glifosato, puesto que es el herbicida más usado a nivel mundial. Esta resistencia es conferida mediante la introducción de dos genes. El primero, que codifica la expresión en los tejidos de la proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa). 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. El segundo, denominado gen *gox*, codifica la enzima glifosato oxidoreductasa es el responsable del proceso de degradación del glifosato (Arregui y Puricelli, 2008; Green, 2009; Feng et al., 2010).



Además, existen cultivares que no son transgénicos pero que poseen resistencia a herbicidas de la familia de las imidazolinonas, tecnología denominada Clearfield® (INASE, 2015). Estos cultivares fueron generados 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).

Si bien los cultivos transgénicos suponen una ventaja para las producciones agropecuarias, en el caso particular de la colza-canola, su uso en nuestro país está prohibido desde 1997 (SAGPyA, 1997). Esto se debe a los altos riesgos de flujo génico que existen entre las diferentes especies de *Brassica* que componen el triángulo de U. Se define como flujo génico al proceso de incorporación de genes de una población dentro de otra. Las plantas voluntarias, las poblaciones ferales y los parientes silvestres sexualmente compatibles representan vías a partir de las cuales podrían penetrar rasgos presentes en los cultivos, de modo que estas poblaciones son potenciales reservorios de rasgos genéticamente modificados (Ellstrand, 2005; Andersson y De Vicente, 2010). En Argentina la presencia de poblaciones naturales con las cuales podría existir flujo génico entre la colza transgénica derivó en su prohibición en 1997. En el caso de *B. napus* la mayor frecuencia de polinización del cultivo hacia parientes silvestres se ha observado en *B. rapa*. En poblaciones de esta última creciendo afuera del cultivo de colza, las frecuencias de hibridación observadas han sido bajas (04-1,5 %), sin embargo, pueden ser mayores (53-93 %) cuando *B. rapa* actúa como madre y se encuentra aislada como maleza dentro de los cultivos (FitzJohn et al., 2007; Devos et al., 2008)

Poblaciones ferales de colza han sido detectadas en regiones del mundo donde el cultivo tiene gran difusión, incluyendo países de Europa, Estados Unidos y Canadá. Podemos definir “ferales” a las plantas que derivan de especies cultivadas que se han domesticado parcial o totalmente y que pueden reproducirse por sí mismas en contraposición con un cultivo (Gressel, 2005). Suelen desarrollarse en hábitats ruderales como espacios no cultivados, márgenes de los cultivos, veras de rutas, caminos, zanjas, vías férreas, puertos, instalaciones de almacenamiento y procesamiento de granos (Squire et al., 2011; Devos et al., 2012). Por otra parte, la forma silvestre o feral de *B. rapa* es una maleza altamente invasora de una gran cantidad de cultivos de invierno, difundiéndose entre sus semillas y rastrojos. También afecta cultivos de verano, huertas y montes frutales (Parodi, 1964, Marzocca et al., 1979).

En 2012 fueron halladas poblaciones de *B. napus* con resistencia a glifosato en lotes sin registro de cultivo de colza-canola (Figura 3), en el sudeste de la provincia de Buenos Aires.



Figura 3: Plantas voluntarias de colza transgénica creciendo dentro de un lote de soja resistente a glifosato, en el partido de Gonzales Chaves, provincia de Buenos Aires, durante la primavera de 2012.

Las plantas constituían malezas de difícil control y presentaban años de persistencia. Luego de su evaluación, se confirmó que los biotipos presentaban resistencia transgénica al herbicida glifosato (Pandolfo et al., 2014a y b). El origen de estos biotipos es incierto, podría sugerirse que la colza transgénica habría sido cultivada de forma ilegal o bien ingresado como contaminante de semilla importada. Por otra parte, la dispersión pudo deberse al ingreso de maquinaria agrícola contratada y al uso de ferrocarril como transporte de granos. Además, en el 2014, se constató la existencia de poblaciones de *B. rapa* con resistencia a glifosato y a herbicidas inhibidores de la AHAS. Se probó también que la resistencia a glifosato en esta especie era de origen transgénico (Pandolfo, 2015).

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 por cruzamientos interespecíficos, disminuyendo la viabilidad y fertilidad de los híbridos, o 3) que el alelo sea beneficioso y el flujo génico acelere su disseminación 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, como dormición, germinación, medición de tamaño de frutos, producción de polen fértil y semillas. La estimación es crucial, ya que, como se mencionó anteriormente, la incorporación de un gen puede ser deletérea. 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 significativa para supervivencia de la especie silvestre que lo adquirió. Por el contrario,

puede representar un costo para la planta que lo adquiriera debido a efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres fenotípicos que a su vez afecten la aptitud (Poverene y Ureta, 2004).

En especies como *Lolium rigidum*, *Raphanus raphanistrum* L. y *Kochia scoparia* que poseían cinco, cuatro y dos mutaciones de resistencia a AHAS, respectivamente no se observó un impacto significativo en crecimiento y competitividad de la planta. En estos casos, es probable que los alelos de resistencia permanezcan en la población, incluso sin la selección provocada por el uso de herbicidas, y en algunas ocasiones pueden acumular múltiples mutaciones en la misma planta. Sin embargo, *Amaranthus powellii* con la mutación Trp574Leu AHAS mostró un fuerte efecto pleiotrópico en la morfología y anatomía de la planta, lo que resultó en una reducción significativa en el crecimiento y la producción de semillas. Similares efectos pleiotrópicos se observaron en poblaciones de *Raphanus sativus* de Argentina con la misma mutación (Vercellino et al., 2018)

El análisis y estudio de los diversos parámetros que influyen en la aptitud biológica permite determinar los efectos sobre la introgresión de genes en plantas silvestres. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar poblaciones de *Brassica rapa* resistentes a herbicidas halladas en Argentina y evaluar si existen diferencias entre poblaciones con el gen de resistencia y sin el mismo con respecto a la aptitud biológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

En la primavera del año 2012 y 2013, se recolectaron silicuas de plantas de dos poblaciones de *Brassica rapa* resistentes al glifosato. Ambas crecían en campos de soja genéticamente modificada con resistencia al herbicida mencionado, en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Una población se encontró en Necochea (LDU) y otra en Balcarce (BAL) (Pandolfo et al, 2018). La primera mostró resistencia a herbicidas inhibidores de las enzimas AHAS y a glifosato, mientras que BAL sólo a glifosato en algunos individuos (mostraba segregación para el carácter de resistencia). Junto a estas últimas, también se encontraron plantas de la especie *Brassica napus* que también sobrevivieron al glifosato. La presencia de la proteína CP4 EPSPS en ambas poblaciones se confirmó previamente con el kit QuickStix para hojas y semillas de canola Roundup Ready (EnviroLogix, Portland, ME, EE.UU.) (Figura 4) (Pandolfo et al., 2018).



Figura 4: Test inmunológico positivo para la presencia del transgén de resistencia a glifosato.

A partir de estas plantas, se generó una subpoblación de BAL pura con el transgén de resistencia a glifosato (BAL-R) mediante la selección de plantas resistentes utilizando la prueba inmunológica rápida. La resistencia a ambos herbicidas (glifosato e inhibidores de las enzimas AHAS) se confirmó en plantas LDU recurriendo a una caracterización molecular como se detalla más adelante y también a través de un experimento de dosis-respuesta (Pandolfo et al., 2017). La prueba inmunológica, determinó que el 86% de las plantas de *B. rapa* LDU y el 70% de BAL presentaron respuesta positiva, confirmando que poseían la enzima CP4 EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* (Pandolfo et al., 2017). Como control susceptible (SUS) se utilizaron poblaciones de *B. rapa* de Necochea (NEC), San Carlos de Bariloche (SCB), Entre Ríos (ERI) y Benito Juárez (JUA) (Tabla 1). Estas cuatro se obtuvieron de un amplio rango de condiciones ambientales para reducir el efecto de fondo genético.

Tabla 1. Poblaciones de *Brassica rapa* utilizadas en el ensayo de fitness, durante los años 2018 y 2019.

Accesión	ID	Origen	Año de colecta	Características del sitio de colecta
La Dulce	LDU	La Dulce, Argentina	2016	En campo agrícola. Resistencia transgénica a glifosato y a herbicidas AHAS.
Balcarce	BAL	Balcarce, Argentina	2013	En campo agrícola. Resistencia transgénica a glifosato.
Necochea	NEC	Necochea, Argentina	2009	Ruta 228
Juárez	JUA	Benito Juárez, Argentina	2009	Campo natural, ruta 74
San Carlos de Bariloche	SCB	Bariloche, Argentina	2017	Orillas del lago Nahuel Huapi
Entre Ríos	ERI	Concepción del Uruguay, Argentina	2011	Ruta 14

Caracterización molecular

Para confirmar la presencia del transgén que confiere resistencia al glifosato, y a la mutación que le confiere resistencia a las AHAS en las poblaciones BAL y LDU, se realizó una

caracterización molecular. Se aisló ADN de hojas jóvenes liofilizadas de plantas resistentes LDU y BAL (n = 40) y de plantas susceptibles (n = 20) utilizando el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987). Las pruebas PCR se realizaron con muestras de ADN utilizando cebadores específicos para transgén CT73, realizado por Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (2004) y para mutación Trp-574-Leu (Hu et al., 2017).

La presencia del transgén se evaluó en las poblaciones de LDU y BAL, utilizando cebadores específicos (RT73), para el gen CP4 EPSPS, según el protocolo descrito por Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (2004) y Mazzara et al. (2007). La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con un ciclador BioRed (My cycler TM Thermal Cycler). La solución contenía un volumen final de 20 μ L, que estaban compuestos de 30 ng de ADN, 1 X buffer de PCR (Gibco), MgCl 0.05 nM de cada dNTP, cebadores (F y R, 10 pM de cada uno) y 1 U Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación comenzaron con desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos compuestos por 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 54°C y un minuto a 72°C, con una elongación final a 72°C durante 20 minutos. Los productos amplificados mediante PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio.

Para confirmar la presencia de la mutación PM2, se evaluó una muestra aleatoria (n=16) de individuos LDU. Para este ensayo molecular, se usaron marcadores CAPS desarrollados por Hu et al. (2017). En la PCR se llegó a un volumen final de 20 μ L, utilizando el cebador BsrDI, y conteniendo las mismas proporciones que para el estudio anterior. En cuanto a los ciclos de la PCR, se inició con la desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos compuestos de 94°C por 30 segundos, hibridación a 56°C durante 45 segundos y 72°C por 1 minuto. También una elongación final a 72°C durante 20 minutos. Finalmente, la digestión con enzimas de restricción se llevó a cabo con un volumen final de 25 μ L, conteniendo 8 μ L de producto de PCR, 0.5 μ L de enzima BsrDI (Catálogo: R0574S, New England Biolabs Inc.) y 2.5 de 10 x buffer NEB 2.1. Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 65°C y los productos de la digestión se corrieron en geles de agarosa al 2% a 60 V durante una hora y se tiñeron con bromuro de etidio.

Ensayo de fitness

Para determinar si existe un costo adaptativo vinculado a los genes de resistencia en poblaciones de *B. rapa*, se realizó un ensayo en el cual se cuantificaron los componentes del rendimiento de poblaciones resistentes (R) y susceptibles (S), comparando dos poblaciones resistentes: BAL (R1, resistente a glifosato) y LDU (R2, resistente a glifosato e imidazolinonas) con individuos de cuatro poblaciones susceptibles procedentes de distintos lugares del país (ERI, JUA, NEC y SCB) (Tabla 1). El ensayo se efectuó en un jardín común ubicado en el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina (S 38° 41' 38", W 62° 14' 53") (Figura 5).



Figura 5: Tareas de labranza en el jardín común (Departamento de Agronomía, 2018)

Las semillas de cada población fueron sembradas en bandejas de plástico y se cultivaron en invernadero en condiciones controladas ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), con una frecuencia de riego de dos veces por día y siendo fertilizadas con fertilizante líquido (Chase LI, grado 5-3-3). Al alcanzar el período de 3-4 hojas, las plántulas de cada población fueron trasplantadas al campo experimental. A partir de allí fueron regadas por goteo y fertilizadas con urea para un óptimo desarrollo y crecimiento. El experimento se llevó a cabo en dos temporadas de crecimiento, una entre septiembre de 2018 y enero de 2019, mostrando cómo se comportarían las plantas en una fecha tardía (primavera) y la otra en una fecha temprana

(invierno) entre junio y noviembre de 2019. De esta manera, se logró simular dos cohortes en el agroecosistema.

Se comparó la población BAL (R1), con solo el transgén de resistencia a glifosato, y la población LDU (R2), con resistencia a glifosato y AHAS, con cuatro poblaciones susceptibles utilizadas como control (S). Las plantas de cada población se colocaron en bloques, cada uno conformado por seis unidades experimentales (UE) (Figura 6). Las UE estaban comprendidas por cuatro hileras espaciadas a 1 metro, con 7 plantas por hilera a intervalos de 0.3 metros ($n = 28$). El diseño experimental fue en bloques completos al azar con cuatro repeticiones.



Figura 6: Ensayo de fitness de *Brassica rapa* en estado de floración, durante la primavera de 2019.

Durante el periodo de floración se evaluó la viabilidad del polen mediante tinción diferencial (Alexander, 1980). Se recolectaron tres flores por planta de al menos tres plantas

por bloque, de cada una de las poblaciones evaluadas. Las flores en antesis se sacudieron sobre un portaobjetos limpio para recolectar polen fresco, se añadió una gota de tinción y se contaron al menos 300 granos de polen en cada portaobjetos.

Al final de la temporada de crecimiento se midió altura de las plantas y el número de ramas y silicuas por inflorescencia principal en cinco plantas del centro de la parcela de cada UE antes de la cosecha. En el laboratorio, se midió la longitud y el número de semillas por silicuas en diez silicuas por planta (Figura 7). Luego, se pesó la semilla total de cada planta



Figura 7: Determinación en laboratorio de longitud de silicuas, número de semillas por silicua, peso total de las semillas de la planta

para obtener el rendimiento por planta. Los datos de las cinco plantas por unidad experimental se promediaron para el análisis estadístico.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el software INFOSTAT. Se consideraron como efectos la temporada de crecimiento (primavera o invierno), el biotipo (S, R1 y R2) y bloque dentro de la temporada de crecimiento, población (BAL, LDU, ERI, SCB, JUA y NEC) dentro del biotipo y la interacción entre temporada de crecimiento y biotipo. Las medias se compararon mediante el test de Tukey.

Las diferencias en la viabilidad del polen se evaluaron con Análisis de la Varianza (ANOVA) utilizando el programa Infostat (2015).

RESULTADOS

Caracterización molecular

La mutación del transgén GT73 se confirmó en las plantas de la subpoblación BAL-R que se utilizaron en el ensayo de aptitud biológica. Además, se confirmó que el 87.5% de los individuos LDU tenían la mutación del transgén GT73. Estas plantas amplificaron el fragmento correspondiente a 108 pb que le confiere la resistencia a glifosato, mientras que en las poblaciones susceptibles utilizadas como control (ERI, SCB, JUA, NEC) el fragmento estaba ausente (Figura 8).

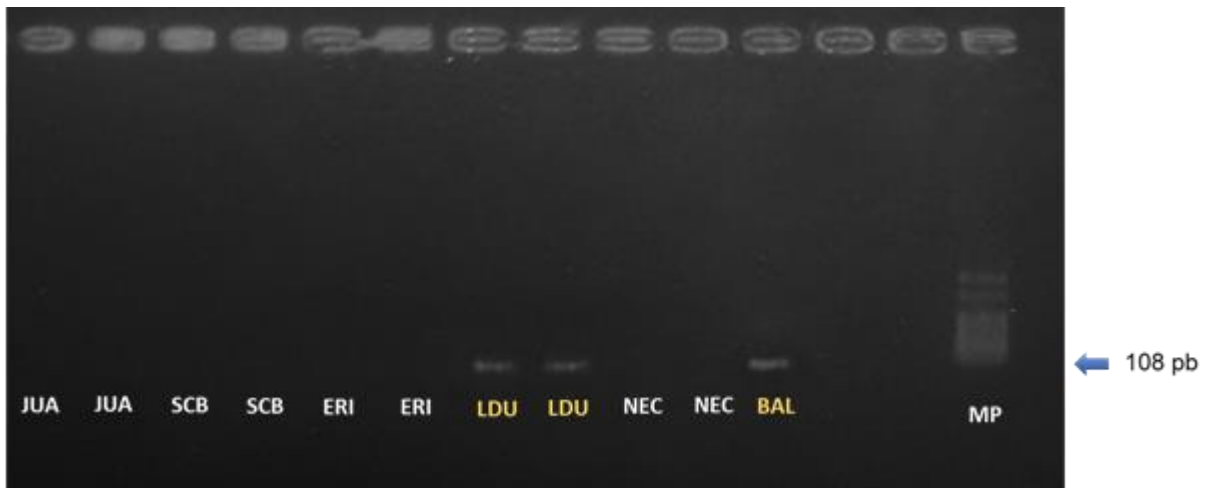


Figura 8: Identificación de poblaciones con resistencia transgénica a glifosato con primer RT73.

El análisis molecular de la población LDU usando marcadores CAPS confirmó la presencia de la mutación Trp-574-Leu en la enzima AHAS. El 93% de las plantas analizadas presentó un patrón de bandas esperado para la mutación que confiere la resistencia a los herbicidas inhibidores de la enzima AHAS. Estas plantas amplificaron un fragmento de 766 pb, correspondiente al segmento no digerido esperado con un cambio de sólo un nucleótido en la secuencia de ADN. Por otro lado, las plantas control amplificaron dos fragmentos de 570 pb y 196 pb producidos por la escisión en el sitio de restricción (Figura 9).

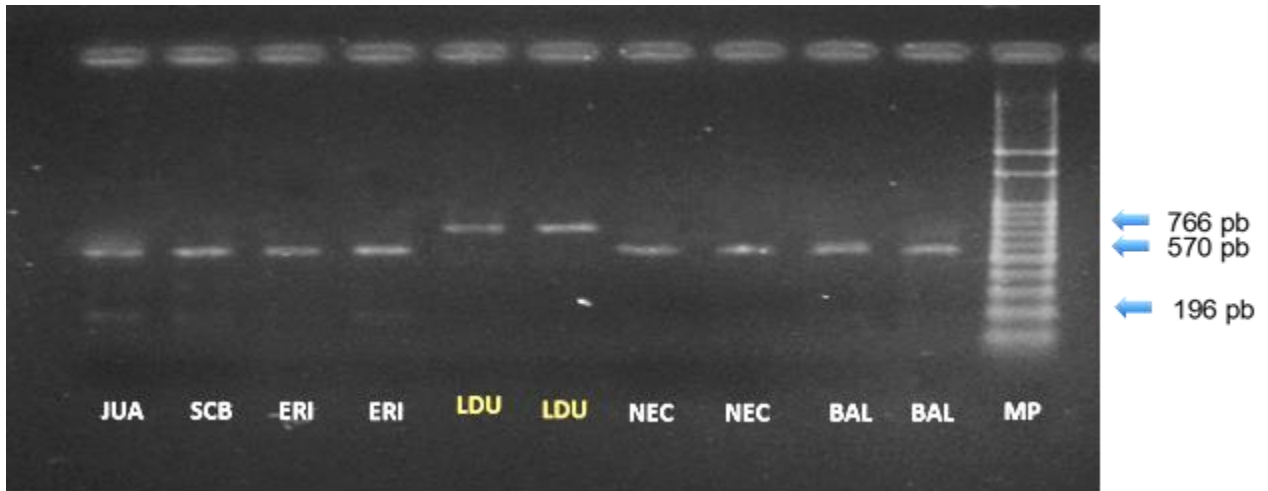


Figura 9: Identificación de individuos con resistencia a herbicidas AHAS. Digestión con enzima BsrDI.

Ensayo de fitness

Se analizaron los datos de los ensayos de aptitud biológica en 2018 y 2019 en conjunto y se encontraron diferencias significativas entre poblaciones para todos los caracteres medidos, excepto para el número de semillas por silicuas (Tabla 2). Además, para los caracteres altura de planta, número de silicuas y número de semillas por silicua, se encontraron interacciones entre las poblaciones y los años, por lo que debieron analizarse por separado (Tabla 3). En el resto de los casos (número de ramas, largo de silicuas y rendimiento por planta), no se encontraron interacciones, por lo que para su expresión gráfica los datos fueron promediados.

Tabla 2. Tabla de ANOVA para los caracteres de aptitud biológica medidos en poblaciones de *Brassica rapa* resistentes y susceptibles a herbicidas, durante dos años.

Efecto	Altura		Número de ramas		Número de silicuas		Largo de silicua		Número de semillas por silicua		Rendimiento por planta	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Población	12,57	<0,0001	2,54	0,0292	8,84	<0,0001	4,51	0,0006	1,81	0,1109	7,27	<0,0001
Año	2,47	0,1174	0,13	0,7191	28,03	<0,0001	22,14	<0,0001	24,96	<0,0001	0,15	0,6994
Bloque>Año	0,20	0,9406	0,46	0,7681	0,71	0,5842	0,48	0,7479	1,08	0,3646	0,29	0,8836
Año x Población	5,66	0,0001	0,93	0,4607	2,90	0,0145	1,49	0,1927	7,28	<0,0001	1,31	0,1982

Tabla 3. Caracteres fenotípicos (media \pm error estándar) de poblaciones de *Brassica rapa* resistentes (R) y susceptibles (S), medidos en dos experimentos durante dos estaciones de crecimiento (primavera 2018 e invierno 2019). Las poblaciones fueron ordenadas de la más cercana a la más alejada al sitio donde se realizó el ensayo (Bahía Blanca).

Año	Población	Condición	Altura	Número de ramas	Número de silicuas	Largo de silicua	Número de semillas por silicua	Productividad por planta
2018	JUA	S	74,42 \pm 2,96 a	8,35 \pm 0,66 a	23,35 \pm 1,76 a	3,64 \pm 0,10 a	22,02 \pm 1,34 ab	3,61 \pm 0,58 a
	NEC	S	61,76 \pm 1,90 b	11,45 \pm 2,85 a	20,15 \pm 1,46 ab	3,56 \pm 0,11 ab	22,00 \pm 0,81 ab	3,44 \pm 0,61 a
	LDU	R	57,90 \pm 2,86 b	6,45 \pm 0,49 a	17,30 \pm 2,02 ac	3,21 \pm 0,13 bc	17,48 \pm 1,26 b	3,08 \pm 0,92 ab
	BAL	R	46,24 \pm 1,89 c	6,24 \pm 0,48 a	14,81 \pm 1,07 bc	3,65 \pm 0,15 a	22,54 \pm 1,45 a	1,63 \pm 0,39 b
	ERI	S	45,92 \pm 1,63 c	5,31 \pm 0,40 a	15,19 \pm 1,45 bc	3,25 \pm 0,07 ac	18,52 \pm 0,87 ab	1,73 \pm 0,43 b
	SCB	S	52,93 \pm 3,48 bc	7,07 \pm 0,68 a	11,93 \pm 1,54 c	2,99 \pm 0,13 c	22,14 \pm 1,82 a	1,15 \pm 0,51 b
2019	JUA	S	67,60 \pm 2,62 ab	8,50 \pm 0,50 ab	29,25 \pm 2,25 ab	4,37 \pm 0,15 a	16,03 \pm 0,93 b	3,56 \pm 0,53 ac
	NEC	S	69,30 \pm 2,95 ab	7,95 \pm 0,59 ac	33,60 \pm 3,42 ab	4,28 \pm 0,12 a	16,04 \pm 1,03 b	5,93 \pm 1,06 a
	LDU	R	73,62 \pm 2,85 a	6,80 \pm 0,50 ac	34,75 \pm 2,99 a	4,31 \pm 0,11 a	21,23 \pm 0,56 a	4,91 \pm 0,66 ab
	BAL	R	51,78 \pm 1,78 c	6,25 \pm 0,68 bc	22,00 \pm 2,37 bc	4,43 \pm 0,11 a	16,93 \pm 0,62 b	2,28 \pm 0,41 bc
	ERI	S	60,50 \pm 2,43 bc	6,20 \pm 0,46 c	32,10 \pm 2,94 ab	4,04 \pm 0,11 a	15,46 \pm 0,88 b	3,60 \pm 0,56 ac
	SCB	S	64,13 \pm 3,02 ab	8,67 \pm 0,73 a	16,87 \pm 3,15 c	4,15 \pm 0,22 a	18,20 \pm 1,98 ab	1,54 \pm 0,46 c

Letras distintas expresan diferencias significativas para cada variable, dentro de cada año, según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Con respecto al parámetro altura de planta en el 2018, si bien se observaron diferencias entre las poblaciones, las mismas no se pudieron asociar a los biotipos resistentes o susceptibles (Figura 10 a). El biotipo resistente (BAL) fue semejante a dos de los susceptibles (ERI y SCB). A su vez, el otro biotipo resistente (LDU) fue similar a dos de los cuatro biotipos susceptibles.

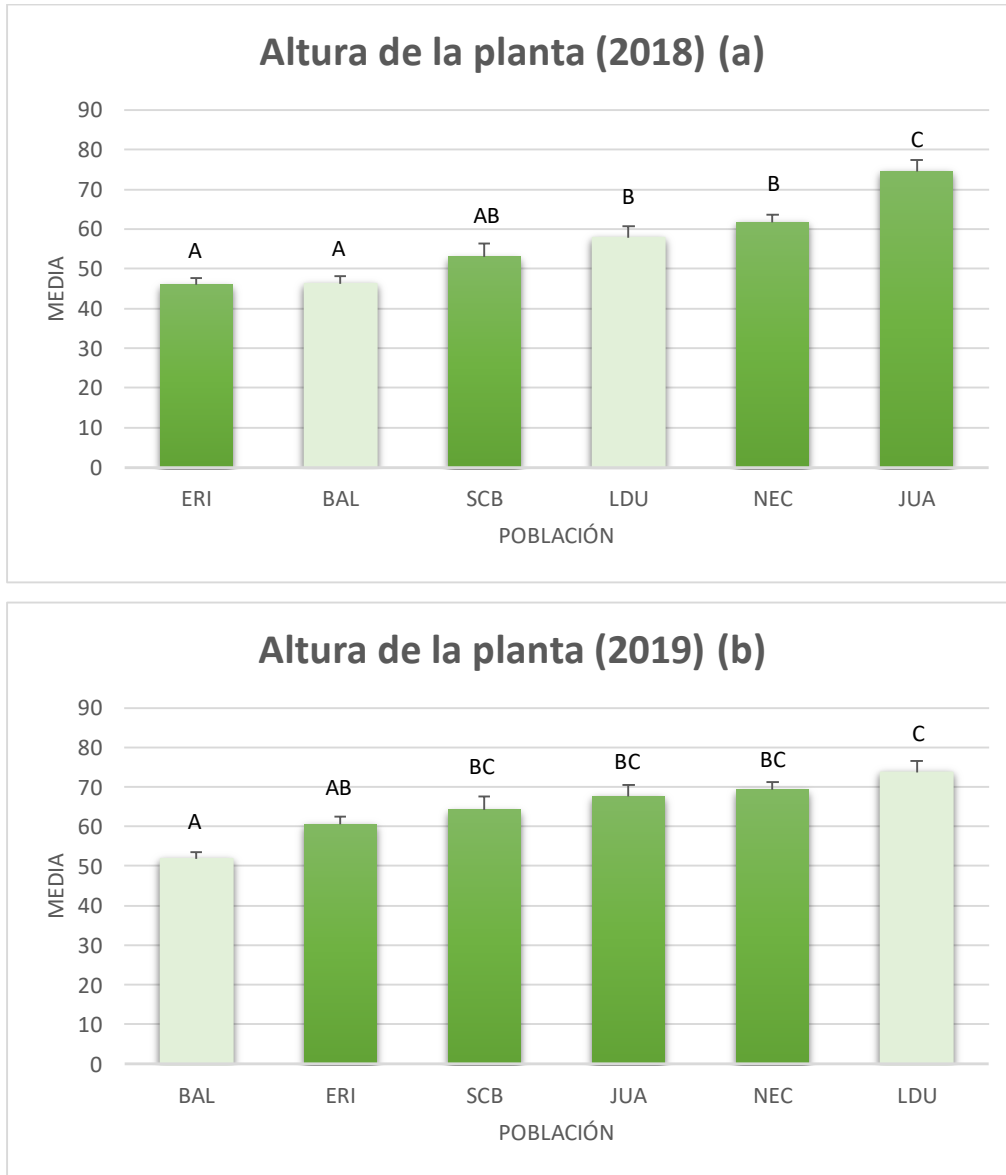


Figura 10: Altura promedio de planta (cm) de dos poblaciones de *Brassica rapa* resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); En dos campañas (a) 2018 y (b) 2019

En 2019, se volvió a observar que BAL y ERI no presentaron diferencias significativas. Además, LDU fue similar a tres poblaciones susceptibles (SCB, JUA y NEC) (Figura 10 b).

En cuanto al número de ramas por planta, al no haber interacción se promediaron los datos de las dos campañas 2018 y 2019 y se comprobó que no existieron diferencias entre los biotipos susceptibles y resistentes a herbicidas (Figura 11). Sólo se hallaron diferencias entre dos de las poblaciones susceptibles (ERI y NEC)

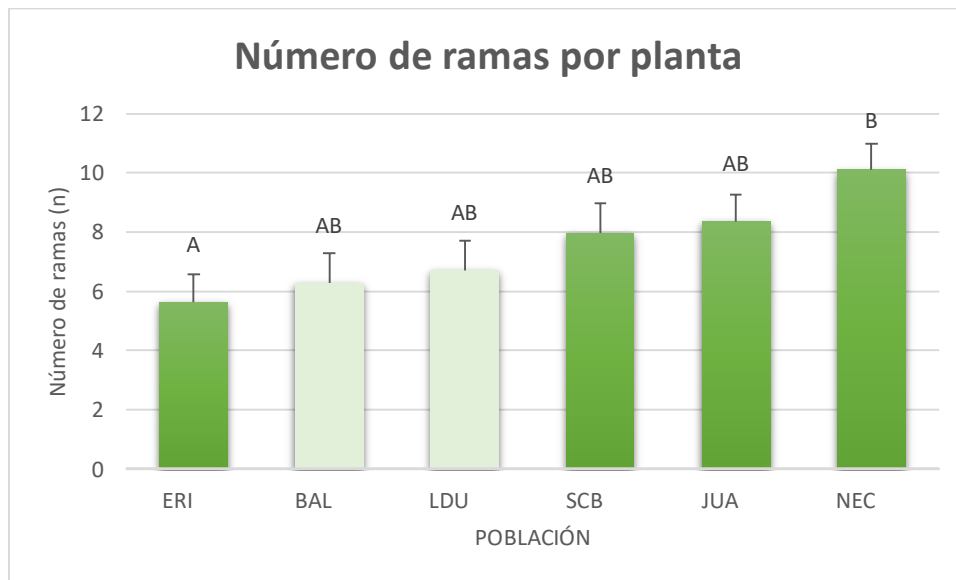


Figura 11: Número promedio de ramas por planta de dos poblaciones de *Brassica rapa* resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA) medidas en dos ensayos de fitness en los años 2018 y 2019.

Luego, en el análisis del número de silicuas por inflorescencia para 2018, se observó que la población BAL, resistente a glifosato, fue semejante a dos poblaciones susceptibles (ERI y SCB). Además, LDU, con doble resistencia a herbicidas, fue similar a tres de las cuatro poblaciones susceptibles, NEC y JUA, y ERI (Figura 12 a).

Para el 2019, se evidenció que no existían diferencias entre BAL y ninguna de las poblaciones susceptibles. Asimismo, LDU resultó similar a tres poblaciones susceptibles (JUA, ERI y NEC) (Figura 12 b).

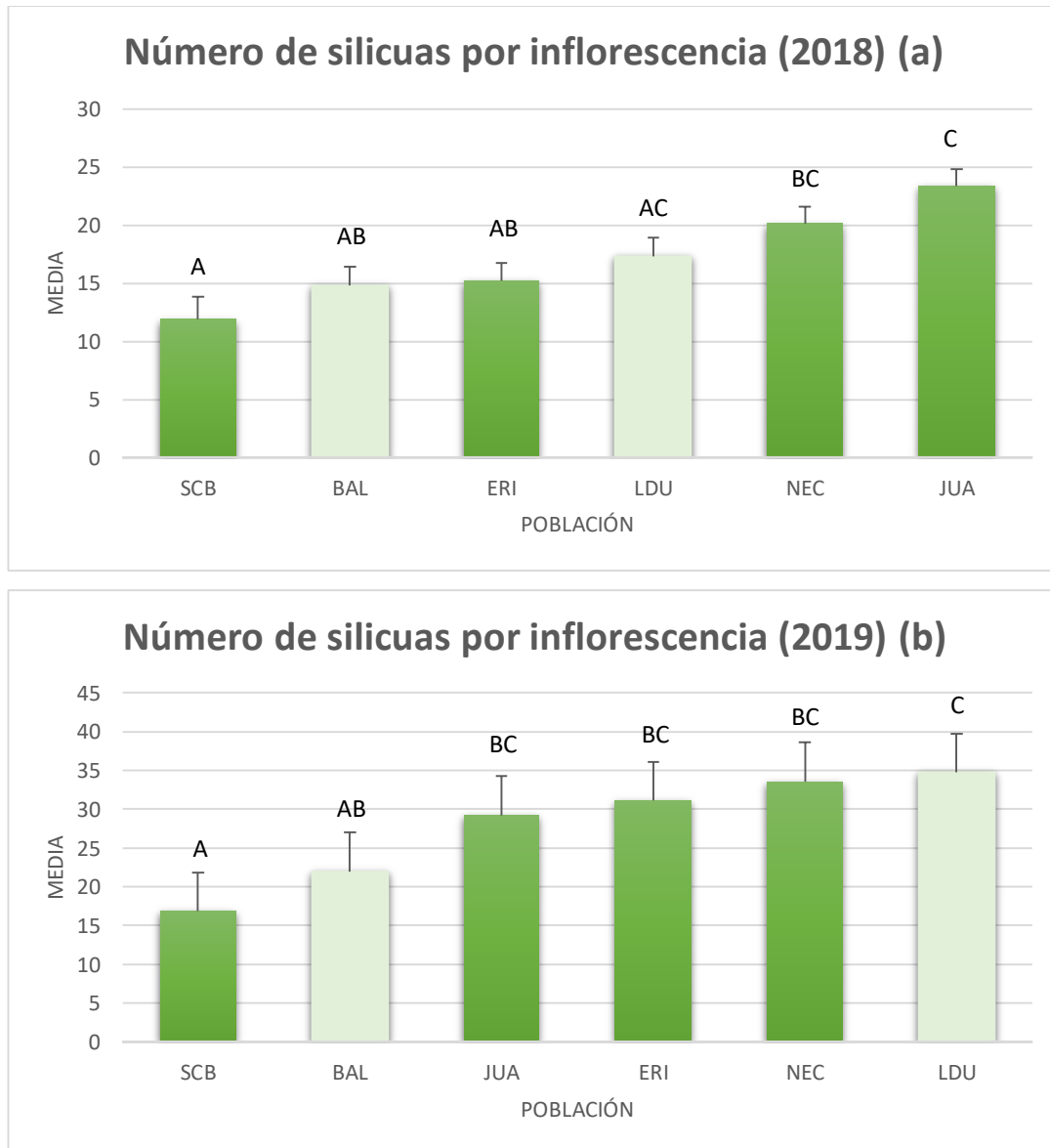


Figura 12: Número promedio de silicuas por inflorescencia de dos poblaciones de *Brassica rapa* resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); medidas en dos campañas, (a) 2018 y (b) 2019.

En el caso de largo de silicuas, al no haber interacción entre el año y el biotipo, se promediaron los datos de los años y se observó que LDU no presentó diferencias significativas con ninguna de las poblaciones susceptibles mientras que BAL tuvo el mismo largo de silicua que NEC y JUA (Figura 13).

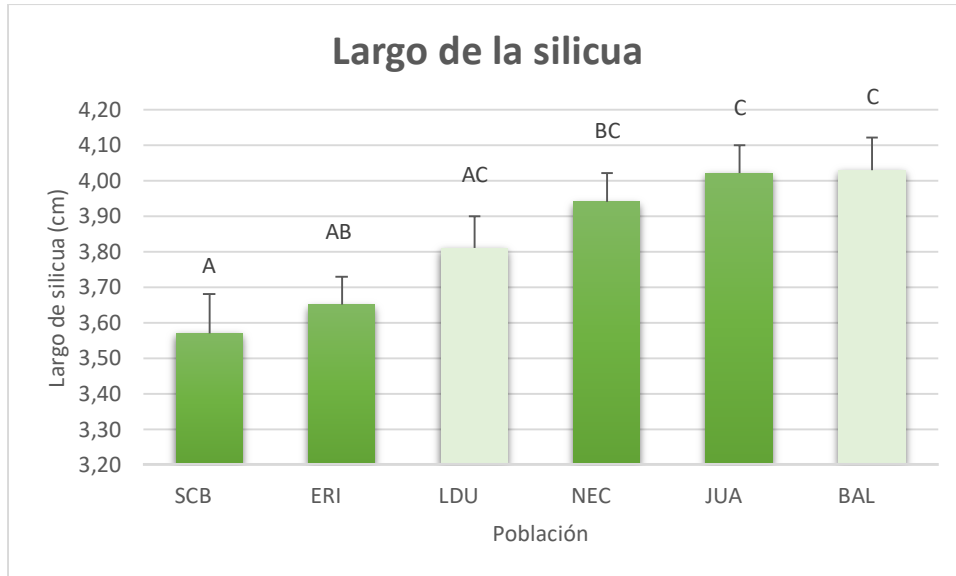


Figura 13: Largo de silicua promedio (en centímetros) de dos poblaciones de *Brassica rapa* resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); medidas en dos ensayos de fitness en los años 2018 y 2019.

Cuando consideramos número de semillas por silicua para el año 2018, no se encontraron diferencias entre LDU y tres poblaciones susceptibles (ERI, JUA y NEC). Además, BAL fue semejante a todas las poblaciones susceptibles tanto para la campaña de 2018 como 2019. Por su parte LDU fue semejante únicamente a SCB en 2019 (Figura 14 a y b).

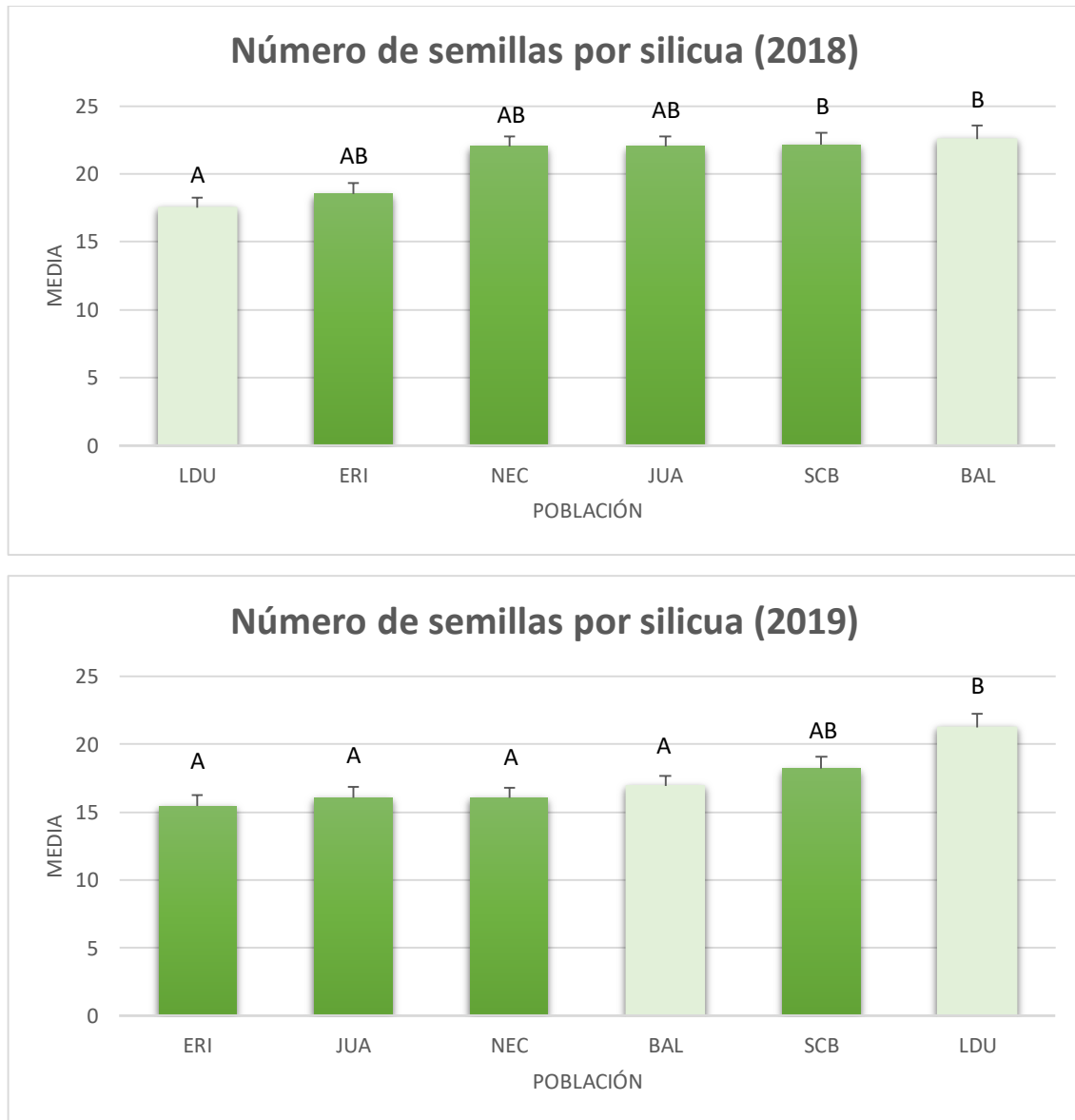


Figura 14: Número promedio de semillas por silicua de dos poblaciones de *Brassica rapa* resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); medidas en dos campañas (a) 2018 y (b) 2019.

Finalmente, cuando analizamos los datos de peso de semillas por planta pudimos inferir que, si bien existieron diferencias entre las poblaciones, el biotipo resistente BAL no se diferenció de los susceptibles SCB, ERI Y JUA. Por su parte, el otro biotipo resistente LDU fue semejante a NEC, JUA y ERI (Figura 15).

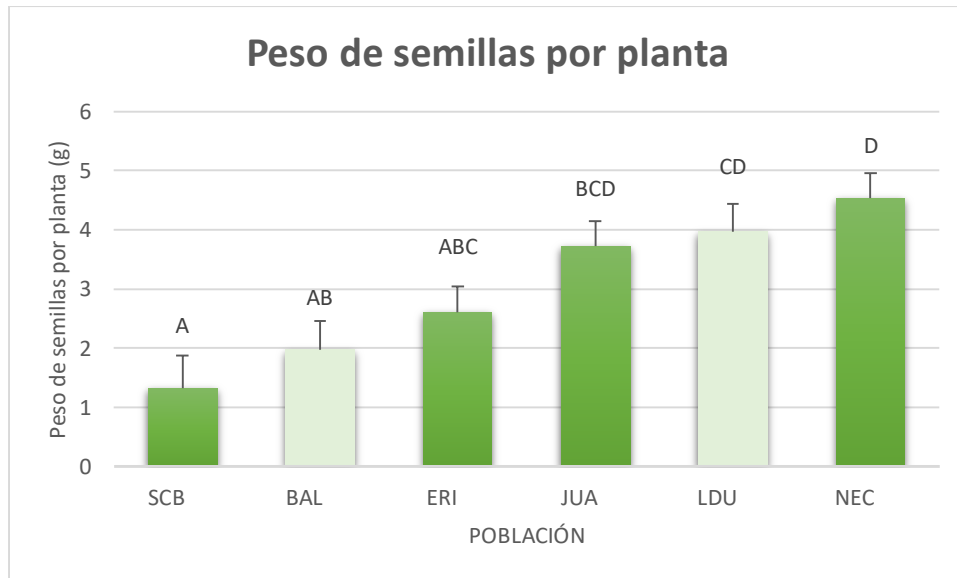


Figura 15: Peso promedio de semillas por planta (en gramos) de dos poblaciones de *Brassica rapa* resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA); medidas en dos ensayos de fitness en los años 2018 y 2019.

Viabilidad del polen

Con respecto a la viabilidad de polen, osciló entre 92% y 96% de granos de polen viables, mostrando que no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad del polen entre las biotipos susceptibles y resistentes (Figura 17).

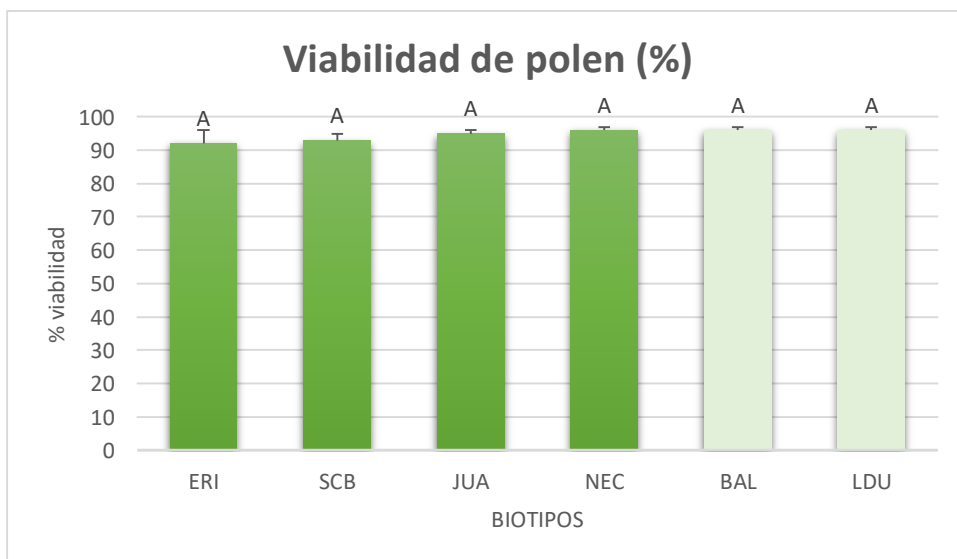


Figura 16: Viabilidad del polen (%) de dos poblaciones de *Brassica rapa* resistentes a herbicidas (BAL y LDU), y cuatro susceptibles (ERI, SCB, NEC y JUA) promediado entre los años 2018 y 2019.

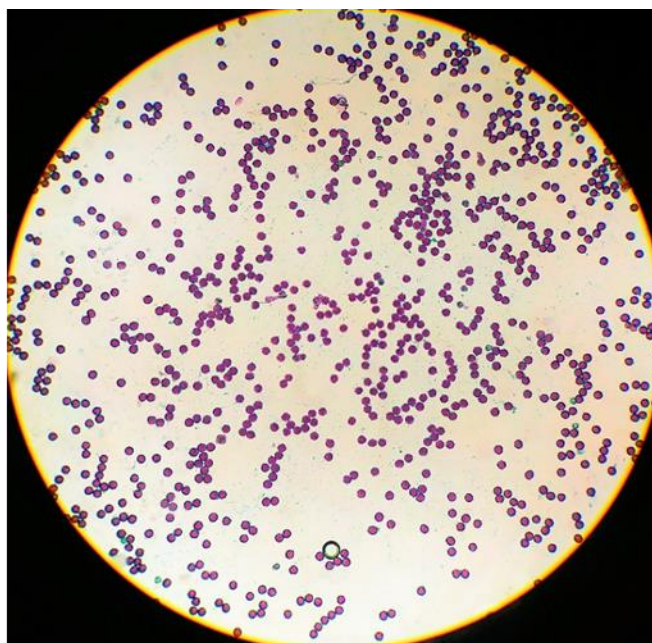


Figura 17: Flores de B rapa con anteras cargadas de polen (izquierda). Gránulos de polen sometidos a tinción Alexander en el microscopio. Los gránulos fértiles son de color rojo y los infértiles de color verde (derecha)

DISCUSIÓN

Una forma de estimar el costo en la aptitud biológica debido a la adquisición de genes del cultivo como la resistencia a herbicidas es evaluar poblaciones con el mismo fondo genético, excepto por el gen o los genes que otorgan la resistencia. En el caso del presente ensayo se compararon dos tipos de resistencias donde, tanto la población BAL como LDU, poseían el transgén GT73 que le confería la resistencia a glifosato, pero, además, LDU poseía la mutación Trp-574-Leu que le confería resistencia a herbicidas del grupo de las imidazolinonas. El porcentaje elevado de individuos resistentes dentro de las poblaciones de BAL y LDU impidió la utilización de individuos susceptibles de dichas poblaciones no pudiéndose efectuar la comparación de poblaciones con el mismo fondo genético. Por este motivo se buscaron poblaciones susceptibles de todo el país, para poder aumentar la variabilidad al máximo posible y disminuir el error (Vila-Aiub, 2015). Como consecuencia, se observaron diferencias marcadas entre las distintas poblaciones. Por ejemplo, en el carácter “peso de semillas por planta”, se pudo identificar una gran variabilidad entre las distintas zonas de origen de *B. rapa*. Podríamos inferir que, en líneas generales, mientras más alejada se encuentre la zona de origen con respecto al partido de Bahía Blanca, donde se realizó el ensayo, se observaron valores menores en los componentes asociados al rendimiento en estas poblaciones. Estas diferencias no tendrían que ver con los costos de *fitness*, sino con una no adaptación a la zona donde se realizó el jardín común (Bahía Blanca).

Además, en el caso de BAL (R) se observaron, en general, bajos valores en los componentes de rendimiento. Esto podría explicarse si consideramos que podría tratarse de una cruce reciente entre *Brassica rapa* y *B. napus* (Pandolfo et al., 2018). En el lugar donde se encontró esta población también se encontraron individuos de colza feral, observándose además segregación en el carácter de resistencia, por lo que este carácter no estaría completamente introgresado. Entonces, el menor rendimiento en esta población podría deberse no a la presencia del transgén, sino a que es una cruce reciente y por lo tanto estaría experimentando deficiencias debido a la cruce interespecífica.

Por otra parte, es importante destacar que el cálculo del número de semillas producidas por un individuo solo estima la capacidad reproductiva femenina, cuando, de hecho, el

número de copias de un alelo de resistencia que se transmiten a la siguiente generación es la suma de los valores reproductivos masculinos y femeninos (Vila-Aiub, 2009). Por tal motivo, también se buscó medir caracteres reproductivos masculinos como es el caso de viabilidad en el polen (Delph et al., 1998; Song et al., 2002). Contrariamente a lo propuesto por Warwick et. al. en 2003 sobre la fertilidad del polen en híbridos entre colza y nabo, las poblaciones evaluadas en este estudio presentaron altos valores de fertilidad del polen tanto en individuos susceptibles como resistentes a herbicidas. La presencia del transgén en poblaciones naturales de *B. rapa* es el resultado de la hibridación entre cultivares de colza transgénica o de poblaciones silvestres con poblaciones salvajes de *B. rapa*, los altos niveles de fertilidad de polen, indican que estas poblaciones deben ser generaciones avanzadas y no híbridos F1.

En los cultivos transgénicos que son comercializados, se espera que cualquier costo de resistencia a herbicidas sea mínimo debido a los incentivos económicos para desarrollar variedades resistentes y/o tolerantes a herbicidas de alto rendimiento. Los fitomejoradores seleccionan las líneas transgénicas de mayor rendimiento antes de la comercialización, de modo que rara vez haya interacciones en el rendimiento asociadas con el rasgo insertado (Snow, 1999).

Por lo tanto, a priori, se esperaría que los costos incurridos en las malezas emparentadas que adquieren los transgenes de resistencia a los herbicidas sean indetectables (Snow, 1999). Sin embargo, la resistencia a herbicidas puede tener un costo adaptativo, al cual podemos definir como la reducción de la aptitud de una planta en un ambiente libre de herbicidas causada por los efectos pleiotrópicos negativos de los alelos de resistencia en uno o varios componentes de la aptitud (Vila-Aiub, 2015). En el presente ensayo, no se encontraron diferencias significativas entre biotipos susceptibles y resistentes para ninguno de los caracteres asociados a la aptitud biológica. Esto significa que la presencia del gen de resistencia, no determinó una modificación en la productividad de *Brassica rapa*.

La ausencia de costos de aptitud en poblaciones con genes de resistencia, sumado a la presión de selección por el uso intensivo de herbicidas, promovió su dispersión en el paisaje. Estas plantas se trasladaron a ambientes con menor intervención humana y presión de

herbicidas (Pandolfo et al., 2018). Esta propagación implica una consecuencia negativa para el manejo de los campos cultivados en la provincia de Buenos Aires, puesto que está comprobada su presencia en más del 10% de los lotes agrícolas de la región (AAPRESID, 2019). Esto conlleva consecuencias no solo de índole social-económico, sino también ambientales. En tal sentido, identificar las características de *Brassica rapa* nos permitirá desarrollar estrategias eficientes para su control, tales como empleo de cultivos de cobertura, rotación de cultivos y controles químicos planificados como la estrategia del “doble golpe”.

Aunque ninguna actividad productiva está exenta de erogaciones, conociendo su comportamiento, desarrollo y características evolutivas nos permitirá actuar en consecuencia de las mismas, para reducir al mínimo los riesgos de impacto negativos tanto para la humanidad como para el ambiente.

CONCLUSIONES

- Se confirmó la presencia del transgén GT73 en las plantas de la población BAL y LDU.
- El análisis molecular de la población LDU usando marcadores CAPS confirmó la presencia de la mutación Trp-574-Leu en la enzima AHAS.
- La fertilidad del polen no se vio disminuida pese a tratarse de un híbrido entre *Brassica napus* y *Brassica rapa*, sugiriendo que las poblaciones representan generaciones avanzadas de la cruce.
- No se detectaron diferencias en costo de aptitud biológica entre biotipos resistentes y sensibles a herbicidas en *B. rapa*.
- Las diferencias en los rendimientos entre poblaciones encontrados pueden atribuirse a las distintas zonas de origen, que se acentuaron conforme nos distanciamos del lugar del ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

- AAPRESID, 2019 disponible en <http://www.aapresid.org.ar/rem/mapas-rem/>
- Allender, C. J. y King, G. J. (2010). Origins of amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology*, 10, p. 54.
- Andersson, M. S. y De Vicente, M. C. (2010). Gene flow between crops and their wild relatives. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 564 pp.
- 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.
- Devos, Y., Hails, R., Messéan, A., Perry, J. y Squire, G. (2012). Feral genetically modified herbicide tolerant oilseed rape from seed import spills: are concerns scientifically justified? *Transgenic research*, 21 (1), pp. 1-21.
- Devos, Y., De Schrijver, A. y Reheul, D. (2008). Quantifying the introgressive hybridisation propensity between transgenic oilseed rape and its wild/weedy relatives. *Environmental monitoring and assessment*, 149 (1-4), pp. 303-322.
- Delph LF, Weinig C, Sullivan K. 1998. Why fast-growing pollen tubes give rise to vigorous progeny: the test of a new mechanism. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265: 935–939.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15. <https://doi.org/10.2307/4119796>.
- Ellstrand, N. C. (2003). Dangerous liaisons? when cultivated plants mate with their wild relatives. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 264 pp.
- FAOSTAT (2016) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org>. Accessed 14 December 2021.
- 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.

Fernandez, O. A. (2015). Malezas, definición. Visión y enfoques. Malezas e invasoras de la Argentina. (primera edición, Vol 1, 4-21). EdiUNS.

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

Gupta, S. y Pratap A. (2007). History, origin and evolution. En Gupta, S. (ed.), *Advances in Botanical Research, Volume 45: Rapeseed Breeding* (pp.: 1-20). San Diego, USA: Academic Press-Elsevier, 554 pp.

Harlan, J. R. y J. M. J. De Wet .1965. Some thoughts upon weeds. *Economic Botany* 19: 16-24.

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

International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA) 2016). GM Approval Database <http://www.isaaa.org>. Accessed 14 December 2021.

Iniguez-Luy, F. y Federico, M. (2011). The genetics of Brassica napus. En Schmidt, R y Bancroft, I. (eds.), *Genetics and Genomics of the Brassicaceae* (pp. 33-66). New York, USA: Springer Berlin Heidelberg, 677 pp.

Iriarte, I. y Valentti, O. 2008. Cultivo de colza. Chacra experimental Integrada Barrow. Convenio MAAyP-INTA. Tres Arroyos, Argentina.

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.

Pandolfo, C. E., Presotto, A. y Cantamutto, M. (2014a). Control químico de un biotipo feral de *B. napus* con resistencia a glifosato. Buenos Aires: Top Ciencia BASF 2014, 23 pp.

Pandolfo, C. E., Presotto, A. y Cantamutto, M. (2014b). Caracterización de poblaciones ferales de *Brassica napus* con resistencia transgénica a glifosato. Informe técnico para SENASA, 51 pp.

Pandolfo, C., Presotto, A., Torres Carbonell, F., Ureta, S., Poverene, M., Cantamutto M., 2015. Detección del transgén GT73 de resistencia a glifosato en poblaciones naturales de *Brassica napus* y *B. rapa*. *Journal of Basic and Applied Genetics* 26(Suppl. 1):175.

Pandolfo, C., Presotto, A., Torres Carbonell, F., Ureta, 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*. ISSN 0944-1344

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. y Bhat, S. R. (2012). History, Evolution, and Domestication of Brassica Crops. *Plant Breeding Reviews*, 35, pp. 19-82.

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

Snow A, Andersen B, Jørgensen R (1999) Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Mol Ecol* 8:605–615

Song Z, Lu B, Zhu Y, Chen J. 2002. Pollen competition between cultivated and wild rice species (*Oryza sativa* and *O. rufipogon*). *New Phytologist* 153: 289–296.

Squire, G. R., Breckling, B., Dietz Pfeilstetter, A., Jorgensen, R., Lecomte, J. Pivard, S., Reuter, H y 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), pp. 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, S., Evans, R., Dahmer, M., Singh, B., Shaner, D. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 61:246-257.

Vercellino, R. B., Pandolfo, C. E., Breccia, G., Cantamutto, M. A., Presotto, A. D., AHAS Trp574Leu substitution in *Raphanussativus* L.: screening, enzyme activity and fitness cost. *Wiley Online Library*.2018.

Vila-Aiub, M. M., Neve, P., Powles, S., Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *Tansley review*. 2009.

Vila-Aiub M., Gundel, P. E., Preston, C., Experimental methods for estimation of plant fitness costs associated with herbicide-resistance genes. Weed Science Society of America. 2015.

Warwick SI. 1991. Resistencia a herbicidas en malezas: fisiología y biología de la población. Revista Anual de Ecología y Sistemática 22:95–114.