



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR
DE POBLACIONES DE *Brassica rapa* Y *B. napus*
CON RESISTENCIA A HERBICIDAS

TORRES CARBONELL FRANCISCO JAVIER

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2019

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Maestría en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre el 23 de febrero de 2016 y el 12 de julio de 2019, bajo la dirección del Dr. Alejandro Daniel Presotto y la codirección de la Dra. María Soledad Ureta.

.....



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

“Karukinka es mi tierra mi voz mi manera de sentir...”

*“Herederos de esta tierra
Somos los hijos del viento
Nueva es la generación
Somos dueños de esta historia
Los obreros de memoria
Sangre fuego y rendición”*

Facundo Armas. Herederos de esta tierra (2014)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Soledad Ureta y el Dr. Alejandro Presotto, que más que directores, fueron una guía constante en el desarrollo de esta tesis, sobre todo en momentos donde las fuerzas escaseaban y primaba la frustración. Gracias por su apoyo constante, por enseñarme y corregirme para llegar a buen puerto.

A la Dra. Mónica Poverene, principalmente por brindarme la posibilidad de defender esta tesis. La franqueza para hablarme y su continua asistencia han sido realmente importantes en estos años.

Al Dr. Claudio Pandolfo, por sus siempre oportunos aportes, por trabajar a mi lado y por que mucha de esta tesis también es gracias a él.

A mis colegas becarios, Boris y Fernando. Por su amistad, por esos momentos donde el trabajo se descontracturaba. El trabajo se hizo muy llevadero con su compañía.

A las Mg. Alicia Morant y Nelly Salomon, y a todos los compañeros del laboratorio de Genética y el Cerzos, que siempre estuvieron disponibles ante una consulta y supieron darme soluciones.

A mis amistades de la Universidad, de Fútbol, Futsal y Ultimate. Ellos han sabido duplicar mis alegrías y dividir las angustias a la mitad.

A mis amistades de Río Grande, quienes me recargaban las energías en cada verano y siempre me instaron a superarme. A Walter, que me llevó a la escuela.

A mis padres y hermanos, que han sido un cimiento firme sobre el que siempre he podido sostenerme. Soy lo que soy gracias a mi familia, porque me dieron todo.

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

A la Universidad Nacional del Sur, por haberme otorgado la beca de posgrado que permitió la realización de esta tesis y mi crecimiento como profesional.

A todos, Gracias.

RESUMEN

El cultivo de variedades de colza (*Brassica napus*) con resistencia a herbicidas en nuestro país presenta el riesgo de transferencia de esa característica a especies silvestres emparentadas. Una de estas especies es el nabo silvestre (*B. rapa*), una importante maleza de los cultivos de invierno que se encuentra ampliamente distribuida en la región pampeana. Debido a esto, actualmente se encuentra prohibida la introducción de semilla de colza transgénica en el país. Resulta crucial evitar la dispersión de nuevos biotipos de malezas resistentes debido a que disminuyen la efectividad de las tecnologías de control químico disponibles.

En el año 2008, en el partido de Balcarce, se encontró una población de *B. rapa* en simpatria con un cultivar de colza resistente a imidazolinonas y otro susceptible. Además, en diferentes sitios de la provincia de Buenos Aires se han hallado recientemente poblaciones del género *Brassica* con resistencia a glifosato. Los objetivos generales de esta tesis fueron abordar el estudio de flujo génico desde *B. napus* hacia la maleza *B. rapa*, determinar la presencia y transferencia de resistencia a herbicidas, y efectuar la caracterización morfológica y molecular de los individuos resistentes.

Para desarrollar estos objetivos se realizaron actividades experimentales que permitieron determinar el grado de hibridación entre las especies, en particular entre la maleza y el cultivar resistente a herbicidas, se identificaron caracteres morfológicos intermedios, se realizó una caracterización molecular sobre los presuntos híbridos interespecíficos, y se evaluó la perdurabilidad del rasgo de resistencia en el ambiente estudiado. Por otro lado, se relevó la presencia de nuevas poblaciones con resistencia a glifosato, se investigó el origen molecular de la resistencia y se evaluó la presencia de resistencia múltiple a glufosinato de amonio. En última instancia, se propusieron medidas de prevención y control.

Los resultados obtenidos comprobaron la hibridación entre *B. napus* y *B. rapa* en el área principal de cultivo de la Argentina. Los híbridos heredaron caracteres fenotípicos de ambos parentales y el carácter de resistencia a imidazolinonas fue efectivamente transferido desde la colza cultivada. No obstante, el rasgo desapareció al cabo de un año post-hibridación indicando que ante la ausencia de presión de selección por herbicida, la menor aptitud biológica de los híbridos, la competencia con otro cultivo y la rotación del mecanismo de acción de los herbicidas afectaron considerablemente la perdurabilidad de

estos individuos. En la evaluación de poblaciones resistentes a glifosato provenientes de distintos sectores de la región pampeana, se confirmó el origen transgénico de la resistencia. Por otro lado, no se detectaron poblaciones con resistencia múltiple al herbicida glufosinato de amonio.

ABSTRACT

Herbicide-resistant rapeseed (*Brassica napus*) cultivation in our country entails the risk of gene transfer into wild relative species. One of this species is wild turnip (*B. rapa*), an important winter crops' weed, widely distributed in the Pampean region. Thus, transgenic rapeseed is forbidden in the country. It is crucial to avoid dispersion of new resistant weed biotypes as they reduce the effectiveness of chemical control technologies.

In 2008, a *B. rapa* population which was sympatric to an imidazolinone-resistant rapeseed cultivar and a susceptible one, was found in Balcarce county. Furthermore, in different sites of Buenos Aires province, glyphosate-resistant *Brassica* sp. populations have recently been found. The objectives of this thesis were to study the gene flow from *B. napus* to *B. rapa* weed, to establish the presence and transfer of herbicide-resistance and to perform a morphological and molecular characterization of resistant individuals.

In order to achieve this objectives, experimental activities were developed. They established the degree of hybridization between species, particularly amongst the weed and the herbicide-resistant cultivar, intermediate morphological characters were identified, a molecular characterization was performed upon the putative inter-specific hybrids and the resistant trait persistence was assessed in the studied environment. Moreover, the presence of new glyphosate-resistant populations was screened, the molecular origin of the resistance was investigated and the presence of multiple resistance to glufosinate was evaluated. Ultimately, prevention and control measures were proposed.

The results confirmed hybridization between *B. napus* and *B. rapa* in Argentina's main crop area. The hybrids inherited phenotypic characters from both parents and the herbicide-resistant trait was successfully transferred from rapeseed. In spite of this, resistant-trait disappeared after a year post-hybridization showing that without herbicide selection pressure, hybrid fitness, competition with another crop and rotation on the mechanism of action had a significant relevance on these individuals' persistence. Transgenic origin was verified on glyphosate-resistant populations from different parts of the Pampean region. Conversely, no glufosinate-resistant populations were detected.

INDICE

PREFACIO.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABLAS.....	13
ABREVIATURAS.....	14
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	29
Hipótesis y Objetivos.....	29
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FENOLÓGICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS ENTRE <i>Brassica napus</i> y <i>B. rapa</i>.....	31
Introducción.....	31
Materiales y Métodos.....	34
Resultados.....	44
Discusión.....	54
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS CON RESISTENCIA A IMIDAZOLINONAS.....	59
Introducción.....	59
Materiales y Métodos.....	63
Resultados.....	67
Discusión.....	71
CAPÍTULO III: RELEVAMIENTO DE POBLACIONES BRASICÁCEAS CON RESISTENCIA TRANSGÉNICA A GLIFOSATO Y GLUFOSINATO DE AMONIO.....	76
Introducción.....	76
Materiales y Métodos.....	78
Resultados.....	82

Discusión.....	86
CONCLUSIONES.....	90
Proyecciones de Trabajo.....	91
CONSIDERACIONES FINALES.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	94
PRODUCCIÓN CIENTIFICA GENERADA EN EL TRANCURSO DE ESTA TESIS.....	107
APÉNDICE.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Triángulo de U mostrando las relaciones entre las distintas especies cultivadas del género <i>Brassica</i> (U, 1935).....	19
Figura 2. Producción de colza en tn para los departamentos de la provincia de Buenos Aires durante la campaña 2008/2009 (A) y 2012/13 (B).....	28
Figura 1.1. Floración simultánea de la población de <i>B. rapa</i> BAL1 lindera al cultivar de colza NEXERA 8450 durante la primavera de 2008.....	35
Figura 1.2. Ubicación de los dos cultivares de colza y las accesiones de nabo silvestre colectadas dentro del establecimiento la Isaura, en el partido de Balcarce.....	35
Figura 1.3. A) Hoja basal elíptica, característica del control NEX. B) Dos individuos FT destacándose del resto de la progenie de la población <i>B. rapa</i> de Balcarce. Comparación de la disposición de los pimpollos por encima de las flores abiertas en individuos FT (C), respecto de pimpollos por debajo de las flores abiertas en un control JUA (D).....	45
Figura 1.4. Análisis de coordenadas principales para <i>B. napus</i> , <i>B. rapa</i> y los individuos fuera de tipo, basado en datos morfológicos cualitativos.....	48
Figura 1.5. Análisis de componentes principales para NEX, JUA y los individuos fuera de tipo, basado en datos morfológicos cuantitativos. 1) Largo de silicua, 2) Largo de valva, 3) Ancho de hoja, 4) Largo de hoja, 5) Altura, 6) Largo de rostro, 7) Relación largo de rostro:largo de valva.....	49
Figura 1.6. Medias y errores estándar de las sumas térmicas requeridas para alcanzar el estadio de elongación del botón floral para los biotipos NEX y FT en ambas fechas de siembra, analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).....	50
Figura 1.7. Medias y errores estándar de las sumas térmicas requeridas para alcanzar el estadio de antesis para los biotipos NEX y FT en ambas fechas de siembra, analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).....	50
Figura 1.8. Medias y errores estándar de las sumas térmicas requeridas para alcanzar el estadio de elongación del botón floral (Ebf), antesis (Ant), comienzo de madurez (Mad) y duración del período de floración (PFI) para los biotipos NEX, GOS y FT correspondiente a la primera fecha de siembra, analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).....	51

Figura 1.9. A) Experimento VRN2 con individuos GOS en estado vegetativo, e individuos NEX en estado reproductivo luego de 862,5 °C d (81 DDS). B) Experimento VRN2 con individuos GOS en estado vegetativo, e individuos NEX en madurez luego de 1689,1 °C d (126 DDS).....	52
Figura 1.10. Individuo FT en estado vegetativo luego de 1689,1 °C d (126 DDS) junto a otras plantas del mismo biotipo que ya se encuentran en estado de fructificación (G4, CETIOM).....	53
Figura 1.11 Medias y errores estándar de las sumas térmicas requeridas para alcanzar el estadio de comienzo de madurez (Mad) y duración del período de floración (PFI) para los biotipos NEX y FT correspondiente a la segunda fecha de siembra, analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).....	54
Figura 2.1. Patrón de amplificación correspondiente a la PCR-multiplex para individuos de los biotipos <i>B. napus</i> , <i>B. rapa</i> y G1. BR (calles 1-4): controles de la maleza (JUA y LDU); BN (calles 5-9): controles del cultivo (NEX y GOS); G1 (calles 11-21): individuos IMI-resistentes; M: Marcador de peso molecular. a) Alelo de 140 pb del SSR BRMS005. b) Alelo de 150 pb del SSR BRMS005. c) Alelo de 170 pb del SSR BRMS005. d) Alelo de 178 pb del SSR BRMS005. e) Alelo de 240 pb del SSR Ap1c5Pr.....	69
Figura 2.2. Caracterización molecular y detección de la mutación <i>BNAHAS3</i> en híbridos interespecíficos entre un cultivar de colza IMI-resistente y la maleza <i>B. rapa</i> mediante uso de marcadores CAPS. 1: control resistente (NEX); 2: control susceptible (JUA); 3-5: individuos G1a; 6-7: Individuos G1b; M: Marcador de peso molecular. a) Alelo de 766 pb. b) Alelo de 570 pb c) Alelo de 196 pb.....	71
Figura 3.1. Arriba: Individuos <i>B. rapa</i> en distintos ambientes con deficiente control mediante glifosato. A) Individuos de la población LDU creciendo cerca de una alcantarilla de la Ruta Prov. N° 86 luego de la aplicación de glifosato; B) Plantas de de la población AZU b dentro de un lote de soja en madurez fisiológica. Abajo: Individuos <i>B. napus</i> en lotes de soja con deficiente control mediante glifosato. C) Individuos de la población GER en estado reproductivo dentro de una soja en estado vegetativo en 2012. D) La misma población GER en estado de fructificación dentro de una soja en R5-R6 durante el año 2014.....	81
Figura 3.2. A) Mortalidad observada 15 DDA por la aplicación de 2,16 kg e.a. ha ⁻¹ de glifosato sobre individuos no resistentes al herbicida. B) Comparación visual de los	

efectos del herbicida sobre la accesión resistente GER y otra susceptible, con mortalidad total de los individuos.....83

Figura 3.3. Medias y errores estándar de la proporción del peso seco remanente en las accesiones BN (azul) y BR (rojo) respecto del control no pulverizado 31 DDA de glifosato. Barras con distinta letra presentan diferencias significativas según prueba de Fisher ($p > 0,05$).....84

Figura 3.4. A) Mortalidad observada 21 DDA en todos los biotipos pulverizados con 0,8 kg i.a. ha⁻¹ de glufosinato de amonio. B) Comparación visual de la mortalidad en un biotipo pulverizado y el control no pulverizado.....85

Figura 3.5. Proporción del peso seco remanente (media y error estándar) del control sin tratar (JUA-C), y de las accesiones BN (azul) y BR (rojo) respecto del control no pulverizado 33 DDA. Barras con distinta letra presentan diferencias significativas según prueba de Fisher.....85

Figura 3.6. Patrón de amplificación obtenido mediante el *primer* RT73 para el cultivar NEX (1), la población *B. napus* feral de GER (2), y las accesiones LDU (3-4) y SMA (5-6). La 7ma calle corresponde a un control negativo. a) Alelo de 108 pb.....86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Descriptores utilizados para la caracterización fenotípica de los biotipos BN, BR y FT.....	38
Tabla 1.2. Variables utilizadas para la caracterización fenológica de los biotipos NEX, GOS y FT. Fuente: Iriarte y Valetti, 2008.....	43
Tabla 1.3. Caracteres morfológicos métricos analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).....	46
Tabla 2.1. Registro de rotaciones y control de malezas de la serie 2008-2013 efectuado en un mismo lote del establecimiento la Isaura del partido de Balcarce.....	64
Tabla 2.2. Acciones utilizadas en el experimento de evolución de la persistencia de individuos IMI-resistentes, colectadas dentro del establecimiento la Isaura, en el partido de Balcarce.....	64
Tabla 2.3. Secuencia de los <i>primers</i> utilizados en la experimentación molecular y su ubicación en el genoma A o C correspondiente a las Brasicáceas.....	67
Tabla 2.4. Supervivencia de individuos (% +/- EE) a una doble dosis comercial de imazapir sobre generaciones sucesivas recolectadas en el mismo establecimiento y sus respectivos controles. Letras distintas indican diferencias significativas según test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,01$).....	68
Tabla 2.5. Cantidad de individuos analizados y frecuencia alélica de los microsatélites utilizados (BRMS005, AP1C5pr) en los controles correspondientes a ambos parentales (BR y BN) y los individuos IMI-resistentes de la primera generación de híbridos <i>B. rapa</i> x <i>B. napus</i> (acciones BAL 08A y BAL 08B), y el total de las dos poblaciones juntas.....	70
Tabla 3.1. Acciones utilizadas en el <i>screening</i> de resistencia a glifosato y glufosinato de amonio, especie a la que pertenecen, año de recolección, origen y experimentos en los que participó.....	80

ABREVIATURAS

AC: antes de Cristo

ADN: ácido desoxirribonucleico

AHAS: acetohidroxiácido sintasa

Ala: alanina

ALS: acetolactato sintasa

ANOVA: análisis de la varianza

asp: asparagina

AZUa: *B. napus* de Azul

AZUb: *B. rapa* de Azul

B2: roseta con 2 hojas desplegadas (escala CETIOM)

B3: roseta con 3 hojas desplegadas (escala CETIOM)

B4: roseta con 4 hojas desplegadas (escala CETIOM)

BAL: progenie híbrida de las poblaciones *B. rapa* a y b de Balcarce

BALa: *B. rapa* de sitio a en Balcarce

BALb: *B. rapa* de sitio b en Balcarce

BN: *Brassica napus*

BR: *Brassica rapa*

CAPS: cleaved amplified polymorphic sequence

CETIOM: *Centre Technique Interprofessionnel des Oleagineux Metropolitanains*

CL: Clearfield

CONABIA: Comisión Nacional de Biotecnología

CP4 EPSPS: 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*

cv.: cultivares

D: botón floral cerrado (Escala CETIOM)

DDA: días después de aplicación

DDS: días después de la siembra

dntp: desoxirribonucleótidos de trifosfato

DOR: *B. napus* de Dorrego

e.a.: equivalente ácido

ENE: *B. napus* de Energía

EPSPS: 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa

E.E. U.U.: Estados Unidos de América

F: *forward*

F1: híbrido de primera generación

F2: numerosas flores abiertas (escala CETIOM)

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FLC: locus de floración C

FRI: inductor frígida

FT: fuera de tipo

G1: primera generación

G2: segunda generación

G4: cuarta generación

G4: 10 primeras silicuas con semillas (escala CETIOM)

G6: sexta generación

G7: séptima generación

GER: *B. napus* agrestal de Germana

GLI: *screening* de resistencia a glifosato

GLU: *screening* de resistencia a glufosinato de amonio

GM: genéticamente modificado

GOS: *B. napus* cultivar Gospel de Sursem Semillas S.A.

GVI: *B. napus* de General Villegas

i.a.: ingrediente activo

IADO: Instituto Agroindustrial de Oleaginosas

SAyG: Secretaría de Agricultura y Ganadería

INASE: Instituto Nacional de Semillas

IBPGR: *International Board for Plant Genetics Resources*

IMI: imidazolinonas

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

ISAAA: *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*

JUA: *B. rapa* de Benito Juárez

LDU: *B. rapa* agrestal de La Dulce

leu: leucina

LOB: *B. napus* de Lobería

M: millón

MAGyP: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca

MgCl₂: cloruro de magnesio

n: número

NEX: *B. napus* cultivar Nexera 8450 de Dow Agrosiences S.A.

nM: nanomolar

OGM: organismo genéticamente modificado

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

P1000: peso de mil semillas

pb: pares de bases

P.C.: producto comercial

PCR: *polymerase chain reaction*

PIE: *B. napus* de Pieres

pM: picomol

PRI: *B. napus* de Coronel Pringles

R: resistente (control)

R: *reverse*

R5: inicio de formación de semillas en soja

R6: semillas completamente desarrolladas en soja

REML: *restricted maximum likelihood*

RH: resistente a herbicidas

RIO: *B. napus* de Río Cuarto

RR: *Roundup Ready*

S: susceptible (control)

S.A.: Sociedad Anónima

SAGPyA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación

SAyG: Secretaría de Agricultura y Ganadería

SC: solución concentrada

SE: sudeste

ser: serina

SMA: *B. napus* agrestal de San Mayol

SNP: *single nucleotide polymorphism*

sp.: especie

ssp.: subespecie

SSR: *Simple Sequence Repeat*

SU: sulfonilureas

TA: temperatura de *annealing*

TAN: *B.rapa* de Tandil

T_b : temperatura basal de crecimiento para *B. napus*

T_m : temperatura media diaria

TP: triazolopirimidinas

trp: triptofano

U: unidad

U: Woo Jang-choon

UBA: Universidad de Buenos Aires

UE: unidad experimental

UNS: Universidad Nacional del Sur

UPGAMA: *unweighted pair group method with arithmetic mean*

W: watts

X: dosis comercial

x: variable dependiente

y: variable independiente

INTRODUCCION GENERAL

Las Brasicáceas (*Brassicaceae*), antiguamente conocidas como crucíferas, son una familia vegetal que comprenden numerosos cultivos industriales y comestibles de gran importancia económica, plantas ornamentales, y especies modelo (Warwick, 2011). Recientemente, se han reconocido dentro de la familia, 338 géneros y 3709 especies distribuidas ampliamente en los más diversos ambientes alrededor del mundo (Warwick *et al.*, 2006). Muchas de las especies de esta familia han sido cultivadas desde hace siglos debido a que sus raíces, tallos, flores y semillas son comestibles (Iriarte y Valetti, 2002; Warwick, 2011; Prakash *et al.*, 2012). Sin embargo, es también reconocida por sus más de 120 especies de malezas, muchas de las cuales son cosmopolitas en los sistemas agrícolas de todo el mundo (Warwick, 2011). Dentro de la familia *Brassicaceae*, el género *Brassica* es el más importante y se encuentra representado por seis especies cultivadas, las cuales están íntimamente interrelacionadas. Tres de estas especies son diploides – *Brassica nigra* ($2n = 16$, genoma BB), *B. oleracea* ($2n = 18$, CC) y *B. rapa* ($2n = 20$, AA) – y descienden de un progenitor común con un número básico de cromosomas $x = 6$, mientras que las tres restantes son anfidiploides – *B. carinata* ($2n = 34$, BBCC), *B. juncea* ($2n = 36$, AABB), y *B. napus* ($2n = 38$, AACC) –, producto de la hibridación y posterior poliploidización de dos de los taxa diploides (Warwick, 2011; Kumar, 2015). Las relaciones genómicas de las seis especies cultivadas del género *Brassica* fueron descritas por el botánico coreano Woo Jang-choon (U, Nagaharu) en lo que se conoce como el triángulo de U (U, 1935) (Figura 1).

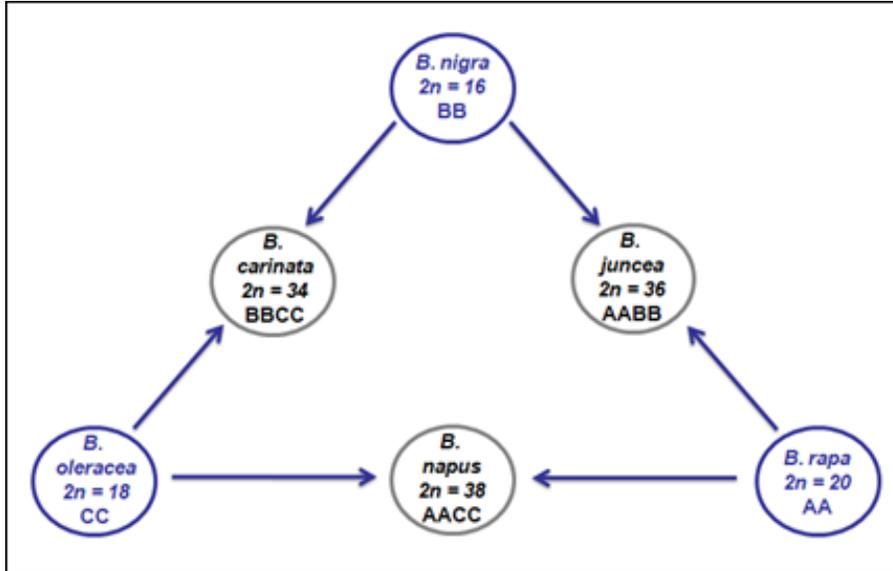


Figura 1. Triángulo de U mostrando las relaciones entre las distintas especies cultivadas del género *Brassica* (U, 1935).

Dentro de la familia *Brassicaceae*, las especies que la integran pueden ser fácilmente distinguidas de cualquier otra familia de plantas vasculares debido a su arquitectura floral uniforme y altamente conservada. Las flores presentan simetría bilateral, y cuentan en general con cuatro sépalos en dos espirales, cuatro pétalos (aunque a veces ausentes) diagonalmente opuestos en forma de cruz (lo cual le brinda el nombre de crucíferas), seis estambres tetradínamos (los dos exteriores más cortos que los cuatro interiores), y un ovario bicarpelar. En contraste, los frutos exhiben una enorme variabilidad en tamaño, forma y estructura. Por lo tanto, son utilizados como carácter más relevante en las clasificaciones taxonómicas clásicas. La estructura más frecuente de los frutos consiste en una cápsula bivalva, dividida longitudinalmente por un falso tabique en dos lóculos, generalmente dehiscentes. Sobre la base de la relación largo/ancho, los frutos han sido clasificados en silicuas y silículas, aunque esta división arbitraria no tiene ninguna implicancia filogenética (OECD, 1997; Warwick, 2011).

Brassica rapa L. (syn. *Campestris*), es una especie altamente polimórfica que incluye muchos cultivos que han sido domesticados a través de un largo período en Europa y Asia, como también importantes malezas de la agricultura. Esta especie recibe las denominaciones de nabo, nabo silvestre, nabo forrajero, nabo oleaginoso, canola polaca, col china, mostaza de campo o rutabaga. Fue una de las primeras Brasicáceas domesticadas (Gómez-Campo y Prakash, 1999) y existen evidencias de su uso entre

1500 y 2000 años A.C. en la India como un cultivo multipropósito, mientras que en Europa parece haberse cultivado desde principios de la edad media. Los primeros cultivares comerciales de *B. rapa* aparecen en los Países Bajos en el siglo XVI, principalmente para su uso como aceite de lámparas para iluminación (Prakash *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015). Se considera que *B. rapa* se divide en dos razas principales, tal vez correspondientes a dos centros de origen independientes ubicados en Europa y Asia (Warwick *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2015). El centro occidental o europeo, ubicado en la zona del Mediterráneo, dio origen a las formas oleaginosas cultivadas actualmente en Norteamérica y Europa, y a las formas de raíces engrosadas utilizadas como hortalizas. El centro oriental o asiático dio origen a las formas oleaginosas cultivadas principalmente en India y China, diferentes a las originadas en Europa, y a formas seleccionadas por sus hojas comestibles (col china, *pak choi*) (Appelqvist, 1972; Gomez-Campo y Prakash, 1999; Gupta y Pratap, 2007; Prakash *et al.*, 2012). Poblaciones naturales de *B. rapa* suelen crecer a través de Europa, Asia Central y el Cercano Oriente, asociadas a ambientes ruderales, probablemente debido al escape de cultivos (Appelqvist, 1972; Gulden *et al.*, 2008; Warwick, 2011; Prakash *et al.*, 2012).

El nabo fue introducido en América por Jacques Cartier, quien lo sembró en Canadá en 1541. También fue cultivado en Estados Unidos entre 1609 y la década de 1620 (Boswell, 1949). Desde el siglo XVI se encuentran registros de su cultivo en Sudamérica. Se menciona que los nabos que se comercializaban en Lima durante la época colonial eran cosechados directamente de los campos de trigo y de las acequias, donde crecían en forma sub-espontánea. El escape de cultivo parece haber sido general para estas especies en toda América desde varios siglos atrás (Patiño, 1963). En nuestro país la importancia de *B. rapa* como maleza de cultivos es reconocida desde la década del 30' (Ibarra, 1937). En esa misma época se comenzaron a aprovechar las poblaciones naturales de nabo. Según Tenenbaum (1937), la abundancia de *B. rapa* como maleza de trigo y en especial de lino fue tal, que la sola separación de los granos de nabo pagaba el trabajo de limpieza y hasta el costo de la producción del cereal cosechado. Por este motivo, el gobierno incentivó a los productores a realizar la siembra por separado, con un resultado económico superior al de la siembra de cereales. El grano de nabo se destinaba a la elaboración de aceite no comestible, e inclusive cotizó en la Bolsa de Cereales hasta la década del 60' (Pascale, 1976; Iriarte y Valetti, 2008).

La colza-canola (*Brassica napus* L.), también denominada como canola argentina, colza o canola (Gulden *et al.*, 2008), es el cultivo oleaginoso más importante de la familia *Brassicaceae* (Warwick, 2011). En el año 2017 fueron cosechadas a nivel mundial más de 89 M t, sobre 41 M ha sembradas, lo que hace a la colza el tercer aceite en importancia luego de la soja (365 M tn) y la palma datilera (318 M tn) (FAOSTAT, 2019). Se caracteriza por poseer un aceite de excelente calidad para el consumo humano y un residuo de extracción de alto nivel proteico para la alimentación animal (Iriarte y Valetti, 2008). La colza es de origen reciente en comparación con otras Brasicáceas y no se han encontrado poblaciones naturales de esta especie (Warwick, 2011). Actualmente, la especie botánica que se cultiva como colza-canola es *Brassica napus*, y es aceptado que se originó producto de la hibridación natural entre *B. oleracea* y *B. rapa* en el sur de Europa o en la región Mediterránea donde los dos taxa parentales convivían (U, 1935; OGTR, 2002; Gulden *et al.*, 2008; Warwick, 2011; Prakash *et al.*, 2012). Usualmente se reconocen dos subespecies, la rutabaga de ciclo vegetativo bienal y características tuberosas (spp. *rapifera*) y la colza anual de características aceiteras (spp. *napus* o spp. *oleifera*) (Warwick, 2011; Prakash *et al.*, 2012).

Los primeros registros del cultivo de colza en Europa datan del siglo XV, cuando se comenzó a utilizar como fuente de aceite para iluminación y fabricación de jabones. Junto con *B. rapa*, su cultivo se volvió popular en todo el norte de Europa debido a su capacidad para crecer con bajas temperaturas, lo que la hacía una de las pocas especies oleaginosas aptas para ser cultivada en zonas templadas y frías, y para el siglo XVIII se había difundido hasta Inglaterra (Prakash *et al.*, 2012). Más tarde, se descubren sus propiedades como aceite lubricante para metales en ambientes de alta humedad y temperatura debido al alto contenido de ácido erúxico (ácido cis-13-decosenoico, 22:1, n-9), por lo que toma gran importancia en la industria naval alrededor de la II Guerra Mundial (Appelqvist, 1972; Iriarte y Valetti, 2008).

Luego de la guerra, Canadá inicia un importante proceso de mejoramiento del cultivo de *B. napus* y *B. rapa* con el objetivo de obtener aceites comestibles, debido a que los altos niveles de ácido erúxico en el aceite habían demostrado ser tóxicos para el consumo humano. Por otra parte, tampoco era posible utilizar la harina de extracción, ya que la presencia de glucosinolatos, metabolitos secundarios que al hidrolizarse dan lugar a productos tóxicos goitrogénicos (antitiroideos), restringían su uso en la alimentación animal. De esta manera, se introduce germoplasma de *B. rapa* obtenido de Polonia, y de

B. napus proveniente de empresas semilleras de Estados Unidos, las cuales aludían que las semillas de esa especie provenían de Argentina. Esto dio lugar a la denominación de tipo “argentino” y “polaco” para los cultivares de colza (Appelqvist, 1972; Busch *et al.*, 1994; Iriarte y Valetti, 2002; Gulden *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2012).

El desarrollo del cultivar Oro en el año 1966 con la característica de bajo contenido de ácido erúxico en grano, y en 1967 del cv. Tower con reducido contenido en glucosinolatos constituyó una importante mejora en la calidad (Gómez y Miralles, 2006; Iriarte y Valetti, 2008). Los cultivares con ambas características combinadas pasaron a denominarse con el nombre comercial de “canola” (por las siglas en inglés de *Canadian Oil Low Acid*) o colzas doble “00”, respondiendo a un estándar de calidad mundial que identifica a estos cultivares por presentar niveles de ácido erúxico menores al 2% del total de ácidos grasos y contenido de glucosinolatos inferiores a 20 μ moles por gramo de grano (Kumar *et al.*, 2015). El desarrollo de esta tecnología desplazó, en pocos años, la producción de colza convencional en el resto del mundo por los cultivares de calidad canola (Bosch *et al.*, 1994).

El mejoramiento genético de la colza continuó durante las décadas siguientes, sobre todo en Canadá, originando cultivares resistentes a herbicidas, en especial mediante la utilización de biotecnología para el desarrollo de variedades transgénicas. Los eventos transgénicos registrados actualmente incluyen colza resistente a glifosato, glufosinato de amonio y bromoxinil (Beckie *et al.*, 2003). Los cultivares resistentes a glifosato son cultivados en Canadá, Estados Unidos, Australia, Chile y Japón (James, 2016; ISAAA, 2017). Por otro lado, la colza resistente a imidazolinonas se desarrolló utilizando métodos de mejora tradicional (Tan *et al.*, 2005; Krato y Petersen, 2012b).

En la década del 70' el desarrollo de cultivares de calidad canola en Canadá generó un nuevo impulso para la producción por parte de instituciones gubernamentales como el INTA, IADO¹ y la ex SAyG², y educativas como la Facultad de Agronomía de la UBA. Estos organismos promovieron la introducción y evaluación de variedades mejoradas, mientras que la Ex Junta Nacional de Granos estableció las bases para su comercialización (Pascale, 1976; Iriarte y Valetti, 2008). La inclusión de híbridos de mayor rendimiento en la década del 90' y el mejoramiento de la genética y del manejo en la

¹ Instituto Agroindustrial de Oleaginosas.

² Secretaría de Agricultura y Ganadería (actual Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca).

década del 2000 ha llevado a un comportamiento cíclico en el área sembrada con colza en el país durante los últimos años (MAGyP, 2017).

Por el hecho de que su domesticación es reciente, en comparación con otros cultivos del género, la colza todavía retiene características silvestres como un rápido desarrollo, alta plasticidad, maduración reproductiva acelerada, alta capacidad reproductiva y una significativa dehiscencia del fruto (Gulden *et al.*, 2003b; Hall *et al.*, 2005). La especie *B. napus* no se conoce en estado silvestre, hecho que refuerza las teorías de su origen en ambientes cultivados (Prakash *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a la significativa dehiscencia del fruto, durante la cosecha se pierden cantidades considerables de semilla que quedan en el suelo (Gulden *et al.*, 2003b; Pivard *et al.*, 2008). Las semillas de *B. napus* tienen la capacidad de sobrevivir en el mismo y, bajo cierto tipo de condiciones, entrar en dormición secundaria para emerger posteriormente como plantas voluntarias (Landbo y Jorgensen, 1997; Gulden *et al.*, 2008). Estas poblaciones pueden persistir hasta cinco años posteriores a un cultivo de colza (Simard *et al.*, 2002; Gulden *et al.*, 2003a; Lutman *et al.*, 2003), e incluso se ha documentado un caso con una duración de hasta siete años (Beckie y Warwick, 2010).

Por otro lado, el tamaño relativamente pequeño de la semilla ($P_{1000} \approx 4$ g) y una esfericidad del 93%, que le brinda alta capacidad de rodadura (Kocabiyik *et al.*, 2004), generan que la misma se filtre con mucha facilidad a través de grietas u orificios existentes en las maquinarias agrícolas y/o contenedores, provocando grandes pérdidas durante el transporte y almacenamiento (Von der Lippe y Kowarik, 2007). De esta forma, las plantas derivadas de cultivos pueden escapar hacia ambientes naturales o semi-naturales, retornando total o parcialmente a un estado de-domesticado, convirtiéndose en poblaciones ferales (Pivard *et al.*, 2008). Estas comunidades suelen desarrollarse en hábitats ruderales como espacios no cultivados, márgenes de los cultivos, vera de rutas, caminos, zanjas, vías férreas, obras en construcción, instalaciones de almacenamiento y procesamiento de granos, puertos y baldíos (Pivard *et al.*, 2008; Devos *et al.*, 2012). Las poblaciones ferales dependen del auto-reclutamiento y/o de la caída de semillas en el transporte para evitar la extinción (Yoshimura *et al.*, 2006; Pivard *et al.*, 2008). Por lo tanto, la probabilidad de persistencia a largo plazo es menor, si bien se han documentado casos de hasta al menos 8 años de persistencia, lo más común en poblaciones sin disturbio, es que desaparezcan luego de 3 o 4 años (Crawley y Brown, 1995; Pessel *et al.*, 2001; Busi y Powles, 2016).

Plantas voluntarias de *B. napus* suelen encontrarse en áreas de cultivo de colza-canola al oeste de Canadá y en los Estados Unidos. En Canadá, la aparición de plantas voluntarias de *B. napus* ha aumentado en las últimas tres décadas, considerándose una de las 10 malezas más frecuentes para mediados de los 90' (Gulden *et al.*, 2008; Simard *et al.*, 2002). Poblaciones ferales de *B. napus* han sido detectadas en regiones del mundo donde el cultivo tiene gran difusión, incluyendo países de Europa, Estados Unidos y Canadá (Devos *et al.*, 2012).

Las malezas constituyen una restricción muy importante en la mayor parte de los sistemas cultivados de todo el mundo debido a que su presencia ocasiona perjuicios económicos de mayor o menor grado de severidad. La denominación de “maleza” ha sido aplicada por el hombre a diferentes poblaciones de especies vegetales (Scursoni, 2009). Harlan y De Wet (1965) definieron como maleza a todo organismo vegetal no deseado que se desarrolla en hábitats alterados por el hombre. El concepto tiene un origen antropocéntrico, ya que en realidad no existe ninguna característica morfológica o fisiológica que permita caracterizar a una especie vegetal como maleza. Así, existen algunas especies que de acuerdo con el sitio y momento donde crecen pueden ser consideradas cultivos o malezas (Harlan, 1992). Un ejemplo podría ser el nabo que comprende formas mejoradas de *B. rapa*, pero además se la considera una importante maleza en varias regiones del mundo, incluso en nuestro país donde se encuentra ampliamente distribuida (Marzocca, 1976, 1994; Martínez-Laborde, 1999).

Por otro lado, la colza en la Argentina resulta una alternativa interesante a los cereales invernales, por su ciclo vegetativo de invierno-primavera (Prioletta *et al.*, 2015). Los cultivares de esta especie pueden clasificarse fisiológicamente en dos tipos o grupos. Las variedades de tipo primaveral, florecen temprano sin vernalización. Mientras que por el contrario, las variedades de tipo invernal requieren períodos prolongados de bajas temperaturas para poder entrar en la etapa reproductiva (Hawkins *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011). En Argentina, los cultivares comerciales de colza pertenecen solamente a la especie *B. napus* (Iriarte y Valetti, 2008; INASE, 2017). Además, en nuestro país no se cultivan variedades transgénicas, han sido prohibidas debido a las restricciones que implica la existencia de parientes silvestres naturalizados con los cuales puede haber flujo génico (SAGPYA, Resolución 228/97). Sin embargo, a pesar de que el riesgo ambiental de flujo génico no es diferente para cultivos genéticamente modificados y cultivos similares obtenidos por mejora convencional (Dyer, 1994; Senior y Dale, 2002), se ha

avanzado en la introducción de líneas no transgénicas con resistencia a herbicidas (INASE, 2017).

El flujo de genes se produce habitualmente debido al intercambio de polen entre individuos formalmente considerados una especie o entre especies emparentadas. El cultivo, las poblaciones ferales y los voluntarios, pueden servir como fuente de polen para el flujo génico entre especies (Poverene y Ureta, 2004; Liu *et al.*, 2013). Sin embargo, este no es el único mecanismo de dispersión de los genes del cultivo, también lo es la semilla. La migración de semilla se puede dar en el tiempo, a través de plantas voluntarias y/o en el espacio a través de poblaciones ferales (Devos *et al.*, 2012). Esta migración puede resultar en nuevas fuentes de plantas que introducen transgenes en localidades y años donde la colza no está presente (Liu *et al.*, 2013). Las poblaciones ferales suelen tener floración prolongada, en alta coincidencia con las especies silvestres (Pessel *et al.*, 2001; Gruber y Claupein, 2007). Comprender y manejar el flujo génico en agroecosistemas es importante ya sea para proteger a los cultivos de la contaminación con malezas o plantas voluntarias, o para prevenir la posible transferencia de transgenes desde los cultivos a sus parientes silvestres (Pivard *et al.*, 2008).

Si bien *B. napus* es una especie prevalentemente autógama, de polinización anemófila y entomófila, se han reportado tasas de entrecruzamiento que varían entre un 12% y un 47%, con un promedio del 34% (Becker *et al.*, 1992). Inclusive el polen de esta especie se ha detectado hasta a 1,5 km de distancia del cultivo debido al transporte anemófilo (Timmons *et al.*, 1995). Por otro lado, *B. rapa* es una alógama obligada, y tiene un alto potencial de hibridación con la colza cultivada en forma espontánea debido a que ambas comparten el genoma A de las Brassicáceas (Snow *et al.*, 1999; Warwick *et al.*, 2003). Los genomas A y C son lo suficientemente similares como para permitir recombinaciones intergenómicas entre ellos, por lo que repetidas retrocruzas de los híbridos interespecíficos con *B. rapa* eventualmente resultarán en la pérdida del ADN no recombinado del cromosoma C (Snow *et al.*, 1999). Si bien la ocurrencia de eventos de hibridación e introgresión es posible, la probabilidad es generalmente baja aunque varía con la especie y las circunstancias (Legere, 2005; Devos *et al.*, 2009).

Los factores mencionados generan que la principal preocupación sea que los genes con resistencia a herbicidas pueden ser transferidos por polinización a la maleza emparentada, confiriéndole una ventaja adaptativa, y de esta manera, que se genere un

impacto agroecológico indeseable (Dyer, 1994). Un biotipo se considera resistente a un herbicida cuando presenta la característica heredable de sobrevivir a la dosis recomendada del herbicida, mientras que para el biotipo silvestre esta dosis resulta letal (Holt *et al.*, 1993; Heap, 2005). Ya en el año 1994, Jorgensen y Andersen advertían que si bien la presencia de *B. rapa* podría ser erradicada de los lotes de colza cuando los mismos fueran resistentes a herbicidas, los genes de resistencia probablemente se transferirían a la maleza por hibridación y retrocruzas. Así, el uso de esta tecnología se volvería inaplicable luego de algunos años. Con tan solo dos o tres generaciones de retrocruza, las plantas se vuelven morfológica y citológicamente indistinguibles de la maleza, pero los genes de resistencia continúan expresándose (Warwick *et al.*, 2008).

Una hibridación exitosa resulta en híbridos interespecíficos viables, en los cuales la supervivencia y posterior reproducción son esenciales para que ocurra flujo génico (Liu *et al.*, 2013). El *fitness* (o aptitud biológica) se define como la habilidad de los organismos, o más raramente, de las poblaciones o especies, para sobrevivir y reproducirse en el ambiente en el que se encuentran (Orr, 2009). Los híbridos de primera generación entre *B. napus* y *B. rapa* presentan una producción de semillas intermedia (Hauser *et al.*, 1998b; Hauser *et al.*, 2003) o menor a ambas especies progenitoras (Warwick *et al.*, 2003; Allainguillaume *et al.*, 2006). Las generaciones tempranas generalmente exhiben menor producción de semillas que la especie pura *B. rapa* debido a desequilibrios meióticos asociados a la presencia de cromosomas C univalentes (U, 1935; Jorgensen y Andersen, 1994).

Comprender la aptitud biológica asociada a los híbridos interespecíficos es de vital importancia para evaluar la evolución de la población (Ellstrand, 2003). A modo general, el aumento de plantas introgresadas estables puede tomar varias generaciones, durante las cuales, la selección reduce fuertemente la frecuencia de híbridos dentro de las poblaciones. El costo en el *fitness* que supone la hibridación, el número desigual de cromosomas acumulados durante generaciones y la recombinación o pérdida del cromosoma en el que se encuentra el gen de resistencia, haría improbable que el mismo se propague entre y dentro de las poblaciones silvestres (Liu *et al.*, 2013).

Sin embargo, la presión de selección debido a aplicaciones repetidas de herbicidas con el mismo sitio de acción es otro factor de suma importancia, sino el más importante, en la evolución de biotipos resistentes (Beckie, 2006a; Neve *et al.*, 2014). En Argentina, la

producción de cultivos extensivos es muy dependiente del control químico de malezas. Existe una idea generalizada que los costos y esfuerzos que demanda prevenir la aparición de biotipos resistentes a herbicidas es similar a la que demanda controlarlos, por lo tanto, los productores usualmente no modifican su modelo de control de malezas hasta que la resistencia se encuentra presente (Papa y Tuesca, 2014). Por el contrario, la prevención puede costar significativamente mucho menos que lidiar con la resistencia una vez que esta se encuentra totalmente desarrollada (Beckie, 2006a). El manejo de la resistencia a herbicidas depende de dos estrategias fundamentales: reducir la presión de selección diversificando el control de malezas, y minimizar la dispersión de la resistencia a través del movimiento de polen, la producción de semillas y la diseminación de propágulos (Norsworthy *et al.*, 2012). En este sentido, el uso de herbicidas alternativos, la mezcla de distintos modos de acción, la integración de prácticas mecánicas, la rotación de cultivos, la inclusión de cultivos de cobertura, entre otros factores, son requeridos para disminuir la presión selectiva (Beckie, 2006a).

El uso de marcadores moleculares tanto para la detección de híbridos interespecíficos, como para la detección y cuantificación de OGMs en diversos cultivos se ha difundido en los últimos años, especialmente aquellos basados en el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) debido a la naturaleza estable de la molécula de ADN y a la sensibilidad de esta tecnología (Demeke y Ratnayaka, 2008). Entre ellos un marcador ampliamente utilizado lo constituyen los microsatélites (SSR), que han sido reconocidos como marcadores moleculares útiles en mejoramiento asistido por marcadores, análisis de diversidad genética, análisis de poblaciones y otros propósitos en varias especies (Gupta y Varshney, 2000). Se han aislado varios SSR en especies del género *Brassica*, especialmente en *B. napus* (Suwabe *et al.*, 2002).

En el año 2008, el grupo de investigación del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur³ en cooperación con empresas privadas (Dow Agrosciences y BASF Argentina S.A.), detectaron la presencia de una población de *B. rapa* que se encontraba en floración simultánea con un cultivar de colza de ciclo primaveral, resistente a imidazolinonas, y otro cultivar de ciclo invernal, susceptible a esta familia de herbicidas. La misma se ubicaba dentro del establecimiento “la Isaura” del partido de Balcarce en la provincia de Buenos Aires. Se colectaron muestras de semilla de los individuos *B. rapa* y

³El grupo responsable del Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur estuvo conformado por el Dr. Claudio Pandolfo, Dr. Alejandro Presotto, Dra. Soledad Ureta, Dra. Agustina Gutiérrez, Dr. Miguel Cantamutto y Dra. Mónica Poverene.

la población fue monitoreada hasta el año 2014. A partir del trabajo de investigación efectuado, se realizó una publicación científica en una revista con referato (Ureta *et al.*, 2017).

En 2012, varias poblaciones de *B. napus* que habían sobrevivido a la aplicación de glifosato fueron halladas en campos del SE de la provincia de Buenos Aires por personal técnico de la empresa BASF Argentina S.A. Simultáneamente, poblaciones naturales de *B. rapa* con resistencia múltiple a glifosato e inhibidores de AHAS se detectaron en la misma región (Figura 2). El grupo de trabajo realizó la caracterización de las condiciones agroecológicas en las cuales se desarrollaron las poblaciones resistentes a glifosato, la clasificación taxonómica y estableció el perfil de resistencia al glifosato y otros herbicidas que se podrían emplear como alternativas de manejo para retrasar la expansión de las poblaciones. Ambos hallazgos fueron denunciados en la Red de Conocimiento en Malezas Resistentes (REM, 2014a, b), en jornadas científico-tecnológicas (Pandolfo *et al.*, 2013), en publicaciones científicas con referato (Pandolfo *et al.*, 2016; Pandolfo *et al.*, 2018), mientras que el caso de *B. rapa* también se encuentra denunciado en el *International Survey of Herbicide Resistant Weeds* (Heap, 2018).

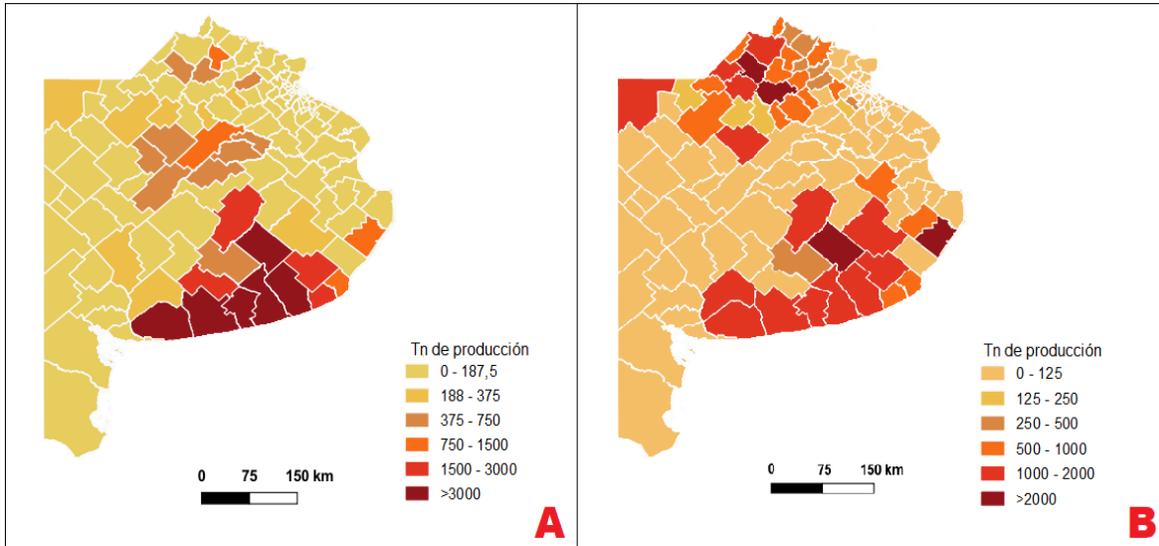


Figura 2. Producción de colza en tn para los departamentos de la provincia de Buenos Aires durante la campaña 2008/2009 (A) y 2012/13 (B). Fuente: Ministerio de Agronindustria.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue estudiar el flujo génico desde *Brassica napus* hacia la maleza *B. rapa*, determinar la presencia y transferencia de resistencia a herbicidas, y efectuar la caracterización morfológica y molecular de los individuos resistentes.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis 1: La progenie de la población *B. rapa* colectada en Balcarce incluye plantas típicas e individuos fuera de tipo. Estos últimos, originados por cruzamientos interespecíficos entre la maleza y dos cultivares de colza, uno de tipo invernal y, otro primaveral y resistente a herbicidas.

Predicciones 1: Las plantas fuera de tipo se podrán identificar y caracterizar a partir de descriptores morfológicos. Los híbridos interespecíficos que provengan del cruzamiento con el cultivar primaveral no presentarán requerimientos de vernalización para alcanzar la etapa reproductiva. Los híbridos interespecíficos entre la maleza y el cultivar invernal necesitaran acumular horas frío para alcanzar la etapa reproductiva.

Objetivo 1: Detectar evidencias de flujo génico, caracterizar los híbridos entre *Brassica napus* y *B. rapa*, y estimar la proporción de estos individuos que deriven de cruzamientos con el cultivar invernal y con el primaveral en la progenie de la población *B. rapa* colectada en el partido de Balcarce.

Hipótesis 2: La frecuencia de individuos resistentes a imidazolinonas en la población de *B. rapa* de Balcarce disminuye en los años subsiguientes al evento de hibridación.

Predicciones 2: Los híbridos cultivo-maleza con el carácter de IMI-resistencia serán detectable en los primeros años luego del evento de hibridación. Sin embargo, debido a la baja aptitud biológica de los híbridos, junto a la rotación de cultivos y los modos de acción de herbicidas utilizados, la supervivencia de estos individuos disminuirá y no serán detectables en la población *B. rapa* de Balcarce.

Objetivo 2: Determinar la proporción de individuos IMI-resistentes en la progenie de la población *B. rapa* del partido de Balcarce, establecer su carácter híbrido, y estudiar la evolución de la frecuencia de las plantas resistentes.

Hipótesis 3: En poblaciones del género *Brassica* colectadas en diversos sitios de la región pampeana, es factible detectar individuos resistentes a glifosato y/o identificar otros eventos biotecnológicos asociados a este (e.g.: resistencia a glufosinato de amonio).

Predicciones 3: Nuevas poblaciones Brasicáceas con resistencia a glifosato podrían ser halladas en la región pampeana, así como poblaciones del género *Brassica* con resistencia a glufosinato de amonio. La resistencia a ambos herbicidas será de origen transgénico.

Objetivo 3: Releva la sensibilidad a glifosato y glufosinato de amonio en poblaciones de colza y nabo silvestre colectadas en la región pampeana y confirmar la presencia del evento transgénico correspondiente.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FENOLÓGICA DE HÍBRIDOS

INTERESPECÍFICOS ENTRE *Brassica napus* y *B. rapa*

Introducción

La hibridación entre cultivos y malezas es uno de los procesos evolutivos que desafían la tecnología agrícola moderna, debido a sus consecuencias impredecibles en la dinámica de las poblaciones. Para que se verifique una hibridación introgresiva exitosa, los parientes cultivados y las malezas deben coexistir, tener períodos de floración coincidentes, compartir polinizadores, ser sexualmente compatibles, producir semilla viable y progenie fértil, luego los rasgos introducidos deben persistir en las poblaciones silvestres naturales (Ellstrand, 2003; Devos *et al.*, 2009).

La hibridación y posterior introgresión entre las especies emparentadas *B. napus* y *B. rapa* ha sido estudiada extensamente tanto a nivel morfológico, citológico y molecular (U, 1935; Jorgensen y Andersen, 1994; Landbo *et al.*, 1996; Scott y Wilkinson, 1999; Hansen *et al.*, 2001; Halfhill *et al.*, 2002; Warwick *et al.*, 2003; Wilkinson *et al.*, 2003; Allainguillaume *et al.*, 2006; Simard *et al.*, 2006; Luitjen *et al.*, 2014). *Brassica rapa* tiene un alto potencial de hibridación con la colza cultivada en forma espontánea (Warwick *et al.*, 2003) y la incorporación de genes del cultivo en la maleza se ha demostrado de forma empírica (Liu *et al.* 2013).

Distintas frecuencias de hibridación se han obtenido dependiendo de las distancias y la proporción relativa de cada especie, siendo este último factor el más importante cuando las plantas se encuentran en cercanía (Halfhill *et al.*, 2004). *B. napus* es una especie predominantemente autocompatible (70% en promedio), mientras que *B. rapa* es considerada de fecundación cruzada obligada debido a un sistema de autoincompatibilidad esporofítica (Warwick *et al.*, 2003; Gulden *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). Además, el tubo polínico de esta última presenta un menor desarrollo cuando crece en el estilo de *B. napus* que cuando lo hace el polen con-específico, mientras que la germinación de polen no presenta diferencias cuando las dos especies lo hacen en el estilo de *B. rapa*. Esto genera que la hibridación interespecífica sea más frecuente cuando *B. rapa* actúa como madre (Hansen *et al.*, 2003). Si bien el potencial es alto, en general

las frecuencias de hibridación suelen ser bajas (0,4-17,5%) (Landbo *et al.*, 1996; Scott y Wilkinson *et al.*, 1999; Warwick *et al.*, 2003; Wilkinson *et al.*, 2003; Simard *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que cuando plantas de nabo silvestre actúan como madre y se encuentran dentro de lotes de colza ampliamente dispersas entre sí, esta frecuencia puede alcanzar hasta un 93% (Jorgensen y Andersen, 1994).

En poblaciones de *B. rapa* simpátricas al cultivo se esperaría encontrar rasgos característicos de *B. napus* provenientes de la introgresión de genes del cultivo hacia la maleza, mientras que en poblaciones alopátricas esos caracteres estarían ausentes. La colza se diferencia morfológicamente del nabo silvestre debido a que en estado vegetativo presenta hojas glaucas y glabras, mientras que la maleza posee hojas que tienen pelos cortos y suaves con una base ligeramente bulbosa (tricomas) especialmente sobre la cara superior (Marzocca, 1994; Gulden *et al.*, 2008). En estado reproductivo, es característico de *B. napus* la disposición de los pimpollos florales por encima de las flores abiertas mientras que, por alargamiento de los pedicelos, en *B. rapa* son las flores abiertas las que se encuentran por encima de los pimpollos (Pascale, 1976; Marzocca, 1994). Además, otra característica diferencial es la relación largo de rostro:largo de valva, que en los cultivos de colza toma valores de entre 1:5 a 1:6 y en el nabo lo hace entre 1:2 y 1:3 (Mulligan, 2008).

Una vez iniciada la floración en la colza, esta se extiende por un período de aproximadamente 30 a 35 días (Iriarte y Valetti, 2008). El control del momento de inicio de esta etapa depende de ciertos factores ambientales y genéticos (Nanda *et al.*, 1996). Entre los factores del ambiente se encuentran la temperatura, el fotoperíodo y la vernalización, la cual define el grupo fisiológico (Hawkins *et al.*, 2002; Gómez y Miralles, 2011; Gómez *et al.*, 2018). Los cultivares de *B. napus* pueden clasificarse fisiológicamente en dos tipos o grupos. Las variedades de tipo invernal pasan el invierno en estado de roseta y completan su desarrollo en primavera. Durante el periodo invernal, deben cubrir obligadamente un requerimiento de vernalización para poder entrar en la etapa reproductiva, este requerimiento se cumple por exposición prolongada a bajas temperaturas. Las variedades de tipo primaveral, por otro lado, tienen un requerimiento de vernalización débil y florecen bajo condiciones favorables (Hawkins *et al.*, 2002). En nuestro país se encuentran disponibles cultivares de ambos grupos, ocupando las primaverales una mayor proporción (Schwab, 2010; Iriarte y López, 2014; INASE, 2017).

Además de las horas de frío acumuladas, la duración de período en que las plantas están expuestas a la luz solar (fotoperíodo) es otro factor ambiental importante en la inducción floral, siendo la colza una especie con respuesta a días largos (Iriarte y Valetti, 2008; Wang *et al.*, 2011). Sin embargo, es la temperatura el factor que mayor importancia presenta en la duración de las etapas de crecimiento y desarrollo (Weymann *et al.*, 2015). Es la única variable ambiental que afecta a todos los cultivares a lo largo de todo el ciclo, de forma tal que cuando esta aumenta, la duración de las etapas se acorta (Gómez *et al.*, 2018).

Los requerimientos de vernalización parecen cubrir un amplio espectro de respuestas que van desde requerimiento débil hasta obligado. Los genotipos con requerimiento de vernalización obligado, se los denomina de respuesta cualitativa y es la que se observa en la mayoría de los materiales invernales (Hawkins *et al.*, 2002). Sin embargo, el tiempo a floración es un carácter de herencia cuantitativa (Raman *et al.*, 2013). En *B. napus* y otras especies del género *Brassica* relacionadas se han mapeado varios loci de caracteres cuantitativos (QTL) asociados a este rasgo con efectos importantes y alta heredabilidad (Wang *et al.*, 2011). Inclusive, Jorgensen y Andersen (1994) encontraron que si bien las plantas de *B. rapa* no requerían vernalización, los híbridos interespecíficos con un cultivar de *B. napus* vernalizante necesitaban de un tratamiento en frío para iniciar la floración.

En la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, bajo condiciones de días alargándose, se activan genes de distintas vías metabólicas de las cuales el producto final es una señal que se transporta al meristema apical e inicia la floración (Turck *et al.*, 2008). Estas señales, se encuentran reprimidas por el factor de transcripción Locus de Floración C (FLC), sin embargo, la vernalización reprime la expresión de FLC, permitiendo la inducción de la floración. Tanto FLC como su inductor *FRIGIDA* (FRI), son determinantes mayoritarios de la variación natural en el tiempo a floración para esta especie (Wang *et al.*, 2011). En *B. napus* se han aislado regiones homólogas a estos genes de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2011; Raman *et al.*, 2013).

La población de *B. rapa* del partido de Balcarce, se encontró en floración simultánea en el mismo sitio y campaña con un cultivar de colza invernal y uno primaveral con tolerancia a imidazolinonas. La presencia de híbridos cultivo-maleza con resistencia a herbicidas junto con plantas voluntarias, las cuales surgen de semillas que caen al suelo en el momento

de la cosecha y/o por contaminación proveniente de maquinarias agrícolas (Gulden *et al.*, 2003a; Gruber y Claupein, 2007), suponen un riesgo ambiental en el sistema productivo. Sin embargo, individuos producto de la cruce interespecífica con un cultivar invernal susceptible, podrían diluir el efecto del polen con genes de resistencia y, de esta manera, disminuir la tasa de introgresión de este rasgo en la maleza. Conocer o estimar la proporción de individuos provenientes del cruzamiento con el cv. invernal o el primaveral, permitirá realizar una mejor evaluación del riesgo de transferencia de IMI-resistencia a la maleza *B. rapa*.

Los objetivos particulares de esta sección fueron: 1) Detectar evidencias de flujo génico en la progenie de la población *B. rapa*; 2) Caracterizar a los híbridos cultivo-maleza e identificar marcadores morfológicos útiles para sudetección; 3) Estimar la proporción del flujo génico desde dos cultivares de colza hacia poblaciones de *B. rapa*, a través de la presencia de requerimientos de vernalización.

Materiales y Métodos

Material vegetal

En la primavera del año 2008 en el establecimiento la Isaura, se encontraban sembrados tres lotes de cultivo con colza cv. Nexera 8450 (NEX) y dos con el cv. Gospel (GOS). El cultivar NEX presenta resistencia a herbicidas de la familia de las imidazolinonas y es de ciclo primaveral, mientras que GOS es susceptible a este grupo de herbicidas y tiene requerimientos de vernalización. En los lotes de colza se encontró presencia de *B. rapa* sobre los bordes (< 10 m), junto con una alta densidad de otras malezas. Las condiciones de floración simultánea cultivo-maleza fueron constatadas por el grupo de investigación (Figura 1.1). Al momento de madurez se tomaron muestras de silicuas de las poblaciones en dos sectores distintos, denominando a las colecciones como BAL1 y BAL2 (Figura 1.2). Ambas poblaciones se hallaban en número menor a 50 plantas.

Como control se utilizó una población de *B. rapa* (JUA) sin contacto con cultivos de colza, colectada en 2008 sobre el margen este de la Ruta Provincia N° 74, entre Benito Juárez y Tandil. La población se encontraba muy extendida ($n > 1000$) en un área aislada, no cultivada. La susceptibilidad de la población JUA a imidazolinonas fue comprobada en experimentos previos a esta tesis.



Figura 1.1. Floración simultánea de la población de *B. rapa* BAL1 lindera al cultivar de colza NEXERA 8450 durante la primavera de 2008.



Figura 1.2. Ubicación de los dos cultivares de colza y las accesiones de nabo silvestre BAL1 y BAL 2 colectadas dentro del establecimiento la Isaura, en el partido de Balcarce.

NEX: Cultivar de colza NEXERA 8450 (resistente a imidazolinonas); GOS: Cultivar de colza GOSPEL (susceptible a imidazolinonas).

Caracterización morfológica de híbridos putativos

La caracterización se realizó en un jardín común durante dos ciclos (años 2012 y 2016) en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur ubicado en la localidad de Bahía Blanca, Buenos Aires (S 38° 41' 38" O 62° 14' 53"). Para el estudio se realizó una mezcla o *bulk* de las accesiones BAL1 y BAL2 y se sembraron las semillas en bandejas plásticas para almácigos de 54 x 27 cm, con 128 celdas para cría de plantines, logrando un total de 1024 individuos en ambos ciclos. Se utilizó sustrato comercial en base a turba (Grow Mix ® Terrafertil) y las bandejas se mantuvieron en invernáculo, con riego diario automático. Cuando las plántulas se encontraban en un estadio de 2-4 hojas (estadio B2-B4 de la escala CETIOM; Arnoud, 1989) se seleccionaron individuos fuera de tipo (FT) en base a la presencia de caracteres propios del cultivar de colza (forma y color de hoja basal). Estas plantas fueron trasplantadas a macetas de 10 L y se ubicaron dentro de una carpa cubierta con malla antiáfidos, provista de riego automático. A lo largo de ambos ciclos se realizaron dos aplicaciones de fertilizante líquido (Chase LI, 5-3-3) y se controló la presencia de pulgón de las Brassicáceas (*Brevicoryne brassicae*) mediante Point 35 Gleba (imidacloprid 35%, SC, 0,5 mL ha⁻¹) a medida que se consideraba necesario en cada caso. A comienzos del período reproductivo se colocaron las macetas a campo abierto, en un sector levemente aislado de otras Brassicáceas (> 100 m) y la polinización fue efectuada a través de agentes naturales. En plena etapa reproductiva (estadio F2, CETIOM) se realizó una purificación de individuos que no se ajustaban a los parámetros de un individuo FT y, por el contrario, se asemejaban al control JUA. Finalmente, fueron caracterizados 61 individuos FT en el año 2012 y 47 individuos en el ciclo 2016.

A modo de control, se sembró el cultivar comercial NEX provisto por la empresa obtentora y la población de *B. rapa* JUA. De cada uno de los controles correspondientes al ciclo 2012 fueron trasplantadas 15 plantas a macetas de 10 L (unidad experimental) para su caracterización morfológica en el mismo ambiente y con el mismo manejo que los individuos FT. En el segundo ciclo, correspondiente al año 2016, a modo de control se trasplantaron 30 individuos NEX y 15 JUA.

La caracterización fenotípica se realizó utilizando 31 descriptores del *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR, 1990) y otros disponibles en bibliografía especializada (Pascale, 1976; Mulligan, 2008). La evaluación comprendió 23 caracteres

cualitativos y 8 métricos: 4 caracteres generales de la planta, 1 del cotiledón, 16 de la hoja, 2 de la flor, 6 del fruto y 2 de la semilla (Tabla 1.1). Las variables cualitativas fueron transformadas en categorías previo a su análisis estadístico.

Se utilizó un diseño en bloques completos, considerando a los años como bloques, los biotipos (FT, NEX y JUA) como tratamientos y los valores de cada planta individual como repeticiones. Todos los análisis estadísticos de esta tesis fueron efectuados a través del paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2017). Para analizar y comparar los rasgos métricos se realizó un análisis de la varianza utilizando la función `gls` del *software* R (a través de Infostat), que permitió estimar los valores medios de cada descriptor métrico, corrigiendo el desbalance en el número de plantas entre tratamientos y la falta de homocedasticidad para algunas variables estudiadas por el método de máxima verosimilitud restringida (REML). Las medias fueron comparadas mediante la prueba de comparación de Fisher para $p \leq 0,05$.

Para estudiar la semejanza entre las poblaciones se realizó un análisis multivariado utilizando por separado los descriptores métricos y categóricos. En el caso de los categóricos, se consideró la frecuencia de cada una de las clases determinadas en cada población en donde existía variación entre poblaciones y se realizaron dos análisis de coordenadas principales. Uno con el total de los individuos particionados por biotipo, y otro adicionándole a la media de cada biotipo un árbol de recorrido mínimo con distancia Euclídea para estimar la distancia en el espacio original entre las poblaciones. Para los rasgos métricos, se efectuó un análisis de componentes principales seleccionando los caracteres que explicaban un mayor porcentaje de la variabilidad presente entre poblaciones.

Tabla 1.1 Descriptores utilizados para la caracterización fenotípica de los biotipos BN, BR y FT.

Descriptor	Fuente	Órgano	Detalle
Descriptores categóricos			
Retención del cotiledón	IBPGR	Cotiledón	Caída de los cotiledones al poco tiempo de la aparición de las primeras hojas verdaderas o retención de los mismos por mayor tiempo.
Hábito de crecimiento de la planta	IBPGR	Planta	Clasificación del tipo de planta: Tallo acortado, no ramificado, sosteniendo hojas en rosetas o terminando en una cabeza con hojas; ramificaciones extremadamente cortas formando una corona con hojas; tallos elongados y/o alargados, no ramificados, sosteniendo hojas y/o una cabeza; tallo elongado, no ramificado, sosteniendo pimpollos axilares compactos; ramificaciones elongadas sosteniendo cabezas y/o hojas; tallos elongados, no ramificados, terminando en ápices florales o pre-florales alargados; ramificaciones elongadas terminando en ápices florales o pre-florales alargados; raíz alargada; u otro.
Color de hoja de plántula	IBPGR	Hoja	Clasificación en el estadio de 5 hojas: Verde glauco, verde amarillento, verde claro, verde, verde oscuro, verde púrpura, púrpura u otro.
Hoja de plántula (incisiones)	IBPGR	Hoja	Incisiones marginales en estadio de 5 hojas: entera, crenada, dentada, aserrada, ondulada, doble dentada u otra.
Pubescencia de la hoja	IBPGR	Hoja	Presencia o ausencia de tricomas en el estadio de 5 hojas.
Ángulo de la hoja	IBPGR	Hoja	Clasificación del ángulo del pecíolo con la horizontal, en la hoja

Forma de la hoja	IBPGR	Hoja	más expandida: Erecto ($>87^\circ$), abierto ($\approx 67^\circ$) semipostrado ($\approx 45^\circ$), postrado ($<30^\circ$), horizontal ($\approx 0^\circ$), u oblicuo ($>-10^\circ$). Clasificación en la hoja más expandida: Orbicular, elíptica, obovada, espatulada, ovada, lanceolada, oblonga u otra.
División de la hoja (margen)	IBPGR	Hoja	Clasificación en la hoja más expandida: Entera, crenado, dentada, aserrada, ondulada, doble dentada u otra.
División de la hoja (incisiones)	IBPGR	Hoja	Clasificación en la hoja más expandida: Entera, sinuada, liriada, lacerada u otra.
Forma del ápice de la hoja	IBPGR	Hoja	Ápice agudo o redondeado en la hoja más expandida.
Color de la hoja	IBPGR	Hoja	Clasificación en la hoja más expandida: Verde amarillenta, verde claro, verde, verde oscura, verde púrpura, púrpura u otra.
Color de la nervadura central	IBPGR	Hoja	Clasificación en la hoja más expandida: Blanca, verde claro, verde, púrpura, roja u otra.
Pubescencia de la planta	IBPGR	Planta	Presencia o ausencia de pubescencia en el tallo floral.
Forma de la hoja superior	Adaptado de IBPGR	Hoja	Clasificación de las hojas sobre el tallo floral: Orbicular, elíptica, obovada, espatulada, ovada, lanceolada, oblonga u otra.
División de la hoja (margen) superior	Adaptado de IBPGR	Hoja	Clasificación de la hoja sobre el tallo floral: Entera, dentada, aserrada, ondulada u otra.
Hoja abrazadora	Pascale, 1976; Mulligan, 2008	Hoja	Hojas sobre el tallo floral completamente abrazadoras son características de <i>B. rapa</i> , hojas sobre el tallo floral parcialmente o no abrazadoras son características de <i>B. napus</i> .
Disposición de flores	Pascale, 1976	Flor	Pimpollos por debajo de las flores abiertas es característico de <i>B. rapa</i> , por encima de las flores abiertas es característico de <i>B.</i>

Color de pétalos	IBPGR	Flor	<i>napus</i> . Clasificación de pétalos: Blanco, amarillo pálido, amarillo, amarillo anaranjado, rosa, rojo, púrpura u otro.
Sincronía	IBPGR	Planta	Clasificación de la sincronía floral entre plantas del mismo biotipo: Baja (inicio de floración dispersa en varias semanas), intermedia, o alta (inicio de floración dispersa en pocos días).
Superficie de la silicua	IBPGR	Fruto	Clasificación de la superficie de la silicua: lisa, ondulada o con constricciones entre semillas.
Actitud de la silicua	IBPGR	Fruto	Clasificación de la actitud de la silicua con respecto al tallo: erecta, colgando o apuntando hacia abajo.
Color de la semilla	IBPGR	Semilla	Clasificación del color primario de la semilla: Amarilla, marrón amarillenta, marrón clara, marrón, marrón oscura, marrón rojiza, negro azulada, negro grisácea u otra.
Semillas por silicua	IBPGR	Semilla	Clasificación del número de semillas por silicua madura (n=3) de cada planta individual: Pocas (<10 semillas), intermedio (11-21 semillas), muchas (<21 semillas).
Descriptores métricos			
Largo de hoja	IBPGR	Hoja	Largo de la lámina (cm), en la hoja más expandida.
Ancho de hoja	IBPGR	Hoja	Ancho de la lámina (cm), en la hoja más expandida.
Relación ancho:largo de la hoja	IBPGR	Hoja	Relaciones mayores a 1 revelan hojas ensanchadas y menores a 1, alargadas.
Largo de valva	IBPGR	Fruto	Largo de la valva (cm).
Ancho de valva	IBPGR	Fruto	Ancho de la valva (cm).

Relación largo de rostro:largo de valva	Mulligan, 2008	Fruto	Relaciones de 1/3 a 1/2 (raramente 1/4) son características de <i>B. rapa</i> , relaciones de 1/5 a 1/6 (raramente 1/7) son características de <i>B. napus</i> .
Largo de silicua	Adaptado de IBPGR	Fruto	Suma de largo de valva y largo de rostro (cm).
Altura	IBPGR	Planta	Altura desde el suelo hasta la punta del ápice floral (cm), previo a cosecha.

Determinación de requerimientos de vernalización

El experimento de vernalización se realizó en dos fechas contrastantes: una temprana (VRN1) de forma tal que se cubrieran los requerimientos de horas-frío necesarias para que se induzca la floración de los biotipos invernales, y una tardía (VRN2) en donde estos requerimientos no fueran cubiertos. El diseño inicialmente se diagramó para realizarse en forma completamente aleatorizada considerando dos factores fijos, la fecha de siembra (VRN1, VRN2) y los biotipos (NEX, GOS y BAL₍₁₊₂₎). Se consideraron como repeticiones a las plantas individuales por biotipo en cada fecha de siembra. Debido a una sucesión de heladas post-trasplante, una gran cantidad de plántulas se perdieron principalmente en la primera fecha de siembra, por lo que el experimento quedó desbalanceado.

El experimento VRN1 se sembró el día 15 de abril en forma similar a la realizada previamente para la caracterización morfológica. Se lograron 640 individuos de las poblaciones BAL1 y BAL2, mientras que se obtuvieron 128 individuos de los cultivares NEX y GOS. Treinta y tres días después de la siembra (DDS), cuando las plántulas se encontraban en un estadio B3-B4 de la escala CETIOM se seleccionaron, sobre las accesiones BAL1 y BAL2, 45 individuos FT en base a los criterios descritos en la caracterización morfológica. Las plántulas FT fueron trasplantadas al campo experimental y se fertilizaron con fosfato di-amónico (18-46-0) y urea (46-0-0). El mismo día se trasplantaron también 45 individuos NEX y 45 GOS. Las plantas contaron con riego localizado por goteo satisfaciendo las necesidades hídricas diarias. Debido a la mortalidad post-trasplante, finalmente se lograron establecer 9 repeticiones para el tratamiento FT, 40 repeticiones para el tratamiento NEX y 38 repeticiones para el tratamiento GOS.

El día 22 de agosto se sembraron los individuos correspondientes a VRN2 en las mismas condiciones iniciales que VRN1, pero totalizando 1280 individuos BAL (BAL1 y BAL2), 50 NEX y 40 GOS. A los 48 DDS se seleccionaron nuevamente individuos FT sobre plántulas en estadio B3-B4 (CETIOM). Se trasplantaron a campo 51 individuos FT, 50 individuos NEX y 20 individuos GOS, y se fertilizó con fosfato di-amónico y urea. De las plantas trasplantadas se establecieron efectivamente 47 repeticiones de los FT, 42 de NEX y 20 de GOS.

A modo de control, también se incluyeron 20 plántulas de la accesión de *B. rapa* JUA. Las mismas fueron sembradas y trasplantadas a campo en las mismas condiciones que los biotipos correspondientes a VRN2. Sobre ellas se tomaron datos fenológicos con el objeto de comprobar que la maleza *B. rapa* no posee requerimientos de vernalización.

Durante el transcurso del experimento, se realizó una aplicación de 100 kg ha⁻¹ de urea granulada en elongación (estadio D, CETIOM) a todas las plantas en los dos experimentos, y se controló la presencia de pulgón de las Brassicáceas (*Brevicoryne brassicae*) en estado reproductivo (estadio F2, CETIOM) con el mismo producto y dosis que en la caracterización morfológica. En todos los individuos del biotipo FT de VRN1 y VRN2 se confirmó el carácter híbrido mediante las técnicas moleculares detalladas en el Capítulo 2 con los marcadores BRMS005 y Ap1c5Pr (ver detalle en Capítulo 2, páginas 66-67).

Para evaluar los requerimientos de vernalización de los tres biotipos se tomaron datos de cuatro variables asociadas a la fenología de las etapas reproductivas en cada repetición (Tabla 1.2). Con el objetivo de individualizar los efectos de la temperatura respecto de la vernalización, la duración de las fases fenológicas se establecieron a través del tiempo térmico. Para el cálculo diario se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo térmico} = (T_m - T_b)$$

En donde T_m es la temperatura media diaria y T_b es la temperatura basal de crecimiento para *B. napus*. En este experimento se utilizó una $T_b = 5$ °C en base a Morrison *et al.* (1989) y Battisti *et al.* (2013). Posteriormente se realizó la suma térmica acumulada de cada día entre el momento de trasplante a campo y el estadio fenológico específico. El resultado fue expresado en grados día (°C d).

Tabla 1.2. Variables utilizadas para la caracterización fenológica de los biotipos NEX, GOS y FT. Fuente: Iriarte y Valetti, 2008.

Estadio Fenológico	Detalle
Elongación del botón floral	Sumas térmicas acumuladas desde el trasplante hasta la aparición de un grupo de pimpollos florales en el centro de la roseta desde el trasplante.
Antesis	Sumas térmicas acumuladas desde el trasplante hasta el momento de la apertura de la primera flor desde el trasplante.
Comienzo madurez	Sumas térmicas acumuladas desde el trasplante hasta la caída de la última flor abierta en el tallo principal desde el trasplante.
Período en floración	Sumas térmicas acumuladas desde antesis hasta comienzo de madurez.

Debido a que uno de los biotipos (GOS) no floreció en VRN2, ni siquiera luego de 3005 °C d (250 DDS), se procedió inicialmente al análisis de los datos mediante un ANOVA doble considerando dentro del factor biotipos solamente a los individuos NEX y FT. Luego, sobre las variables que presentaban interacción, se realizó un ANOVA simple para cada fecha de siembra por separado considerando a los biotipos como factor fijo y los valores individuales de cada planta como repeticiones. Para el caso del experimento VRN1, se incluyó también en este nuevo análisis al biotipo GOS, debido a que las plantas de este cultivar si florecieron en esa fecha de siembra, y por lo tanto se podía realizar el análisis con los tres tratamientos (NEX, FT y GOS), mientras que para VRN2 solo se contó con los biotipos NEX y FT. Tanto para el ANOVA doble como para el ANOVA simple efectuado sobre la primer fecha de siembra, se utilizó la función *gls* del software R (a través de Infostat) para corregir el desbalance en el número de plantas entre poblaciones (asociado principalmente a los pocos individuos del biotipo FT), y la falta de homocedasticidad. En el caso del ANOVA simple efectuado sobre el experimento VRN2, no fue necesario modelar el desbalance. Las medias estimadas fueron comparadas mediante la prueba de Fisher para $p \leq 0,05$.

Resultados

Caracterización morfológica de híbridos putativos

Dentro de los 1024 individuos evaluados en cada ciclo, provenientes de la progenie de la población de *B. rapa* de Balcarce, se identificaron 61 individuos fuera de tipo en el año 2012 y 47 en 2016, resultando en un promedio de 5,28% entre los dos ciclos. Estos híbridos putativos mostraron caracteres propios de *B. napus* tales como forma de hoja elíptica y color verde glauco en el estado de roseta, y disposición de los pimpollos por encima de las flores abiertas (Figura 1.3). Por su parte, la población JUA se caracterizó por poseer hojas basales verde violáceas a verde oscuras, y de forma ovada o a veces elíptica.

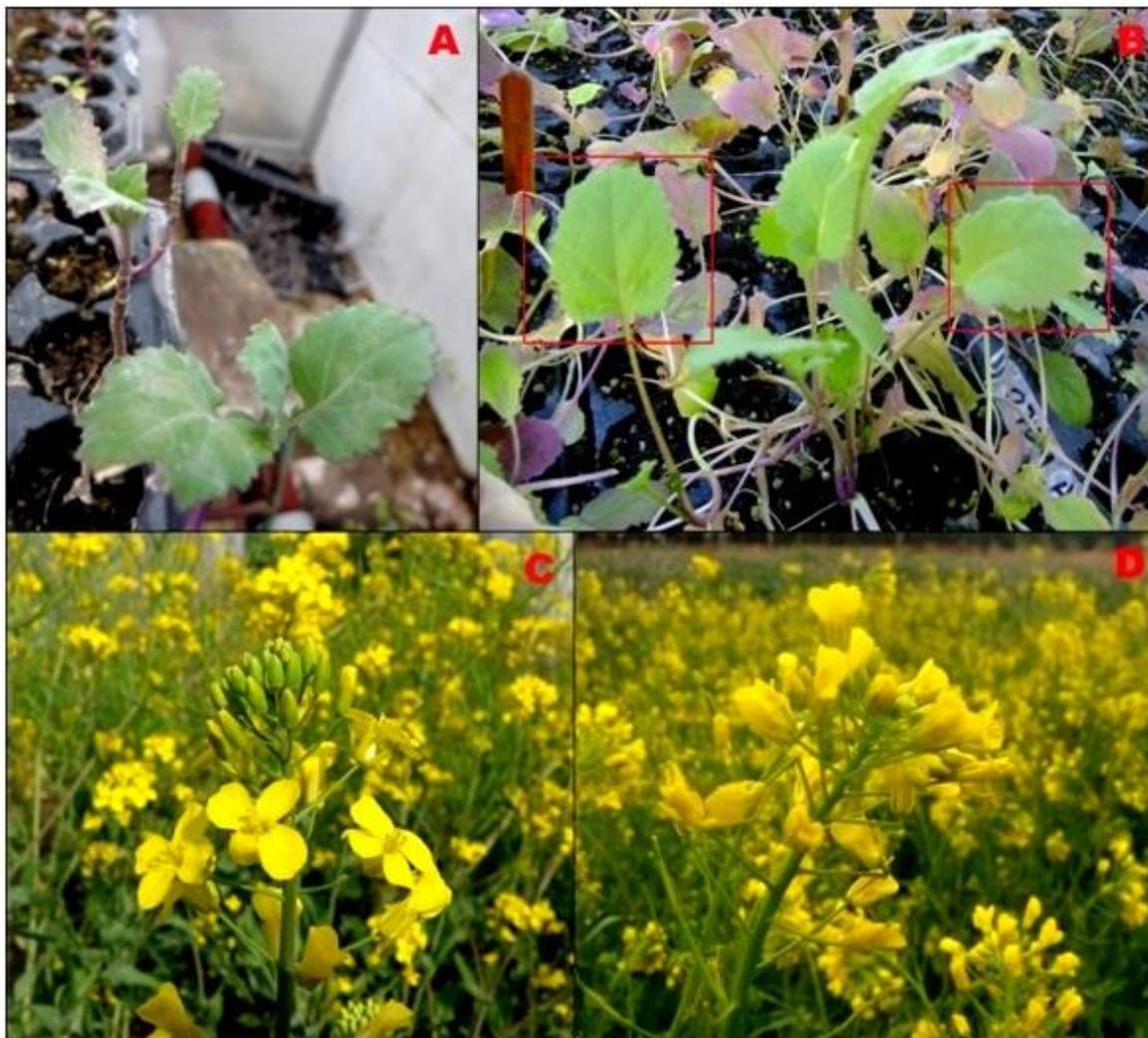


Figura 1.3. A) Hoja basal elíptica, característica del control NEX. B) Dos individuos FT destacándose del resto de la progenie de la población *B. rapa* de Balcarce. Comparación de la disposición de los pimpollos por encima de las flores abiertas en individuos FT (C), respecto de pimpollos por debajo de las flores abiertas en un control JUA (D).

Los tres biotipos presentaron un ciclo anual con caída temprana del cotiledón y hábito de crecimiento inicial en forma de roseta. Luego de hacerse visibles los pimpollos florales, comenzó la elongación vertical del tallo floral con hojas superiores, en general de forma distinta a las basales, e insertas en disposición oblicua sobre el mismo. En la axila de las hojas superiores se desarrollaron ramificaciones secundarias conteniendo un racimo terminal de flores con pétalos amarillos en todos los individuos. Posterior a la floración, que presentó distinta duración para cada biotipo, se desarrollaron las silicuas. Los frutos eran en su totalidad de actitud erecta y superficie ondulada, con un ancho de valva similar en las tres poblaciones. Dentro de las silicuas se encontraron un número variable de semillas dependiendo del biotipo.

Las plantas del biotipo NEX fueron muy uniformes en su fenotipo, característico de la estructura genética de un cultivar comercial sobre el que ha actuado la selección. Presentaron una altura que osciló entre los 60 a 113 cm (Tabla 1.3). Sus hojas basales eran verde glauco, con nervadura central blanca, de forma elíptica, sin pubescencia y márgenes generalmente dentados, u ondulados en menor medida. En etapa de elongación del tallo floral, las hojas superiores se insertaron al mismo sin abrazarlo, siendo de forma lanceolada, mayormente liriadas, dentadas o raramente aserradas, con ápice redondeado o agudo en frecuencias similares. El tallo floral era glabro y la floración se desarrolló en forma muy uniforme, abarcando unos pocos días. Los pimpollos se ubicaron por encima de las flores abiertas en la totalidad de los individuos, como es característico de la especie. Las silicuas eran las de mayor tamaño promedio entre los tres biotipos, esto se debió al mayor largo de valva, y no al de su rostro. La relación largo de rostro:largo de valva (0,18 +/- 0,02) se ubicó dentro de lo esperado para la especie. Los frutos contenían, para las condiciones agroecológicas estudiadas, en su mayoría más de 11 semillas de color marrón oscuro a negro.

Tabla 1.3. Caracteres morfológicos métricos analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).

Carácter	NEX		FT		JUA	
	Media	EE	Media	EE	Media	EE
Largo de hoja (cm)	c 11,76	+/- 0,77	b 13,63	+/- 0,50	a 18,35	+/- 0,93
Ancho de hoja (cm)	b 6,61	+/- 0,34	b 6,93	+/- 0,22	a 8,13	+/- 0,41
Largo de valva (cm)	a 5,56	+/- 0,08	b 2,75	+/- 0,05	b 2,57	+/- 0,10
Ancho de valva (cm)	a 0,35	+/- 0,01	a 0,35	+/- 0,01	a 0,35	+/- 0,01
Largo de rostro (cm)	b 0,98	+/- 0,04	b 0,94	+/- 0,03	a 1,48	+/- 0,05
Relación largo de rostro/largo de valva	c 0,18	+/- 0,02	b 0,35	+/- 0,02	a 0,64	+/- 0,03
Largo de silicua (cm)	a 6,52	+/- 0,10	c 3,69	+/- 0,06	b 4,25	+/- 0,12
Altura (cm)	b 82,51	+/- 3,62	b 80,32	+/- 2,35	a 93,67	+/- 4,37

Los individuos de la población JUA presentaron las alturas más altas entre los tres biotipos estudiados, desde 38 cm hasta 140 cm. Las hojas basales de la roseta eran las de mayor tamaño (largo y ancho) entre los tres biotipos. Las mismas eran predominantemente verde violáceas o verde oscuras, ocasionalmente verdes, con presencia de tricomas, con nervadura central generalmente blanca, aunque en algunos individuos era de color verde claro o violáceo. La forma de la hoja basal era ovada o elíptica, de margen ondulado, dentado o aserrado. Las hojas superiores, como es característico en la especie, se insertaron sobre el tallo floral abrazándolo total o parcialmente, eran verde oscuras, ovadas, de margen dentado, u ondulado en menor medida, enteras o sinuadas y con

ápice mayormente redondeado. El tallo era glabro, raramente con un poco de pilosidad y la floración fue muy asincrónica, abarcando varias semanas. Como es común en *B. rapa*, los pimpollos se ubicaron por debajo de las flores abiertas. Las silicuas fueron de menor tamaño que las de NEX, debido a que sus valvas fueron más cortas, pero los rostros eran los de mayor tamaño entre los tres biotipos (de hasta 2,30 cm de largo). La relación largo rostro:largo valva fue de 0,64 +/- 0,03, característico de la especie *B. rapa*. En las condiciones agroecológicas estudiadas, los frutos presentaron en general entre 11 y 21 semillas por silicua, todas de color negro.

Los individuos FT seleccionados de la población de *B. rapa* lindante al cultivar de colza presentaron las plantas con menor altura, abarcando desde los 25 hasta los 134 cm, si bien se encontraron en promedio cercanos al control NEX. Las hojas basales eran en su mayoría color verde glauco, sin pubescencia o con pocos tricomas, de nervadura blanca, forma mayormente elíptica y márgenes dentados, u ondulados en menor medida. Las hojas superiores se insertaron, en su mayoría, sin abrazar el tallo o abrazándolo parcialmente. Eran verdes, de forma lanceolada u ovada, mayormente dentadas y sinuadas, con ápice en general más redondeado que agudo. El tallo floral era glabro o pocas veces con escasa pilosidad y la floración fue muy desuniforme, extendida en varias semanas. El 85% de los individuos poseían pimpollos por encima de las flores abiertas, lo cual es característico de *B. napus*. Las silicuas, fueron las más cortas entre las tres poblaciones, debido a valvas muy cortas y rostros similares a NEX. La relación largo de rostro:largo de valva fue de 0,39 +/- 0,11, característico de *B. rapa*. Los frutos contenían en su mayoría pocas semillas (menor a 10), con casos de hasta una única semilla por silicua. Las mismas eran de color marrón oscuro o negras.

Debido a que ciertas variables cualitativas (retención del cotiledón, hábito de crecimiento de la planta, ángulo de la hoja, color de pétalos, superficie de la silicua y actitud de la silicua) no presentaron variación entre poblaciones, fueron excluidas del análisis de coordenadas principales. Este análisis mostró una clara separación entre ambos controles, mientras que los individuos FT, presentaron mayor variabilidad y, se ubicaron en una región intermedia aunque más asociados al fenotipo de NEX (Figura 1.4). La mayor asociación entre NEX y FT también se detectó a través del análisis de coordenadas principales efectuado con un árbol de recorrido mínimo, el cual estimó una distancia entre NEX y FT de 3,01, mientras que la distancia JUA-FT fue de 4,78. Por otro lado, la distancia entre NEX y JUA fue de 5,83.

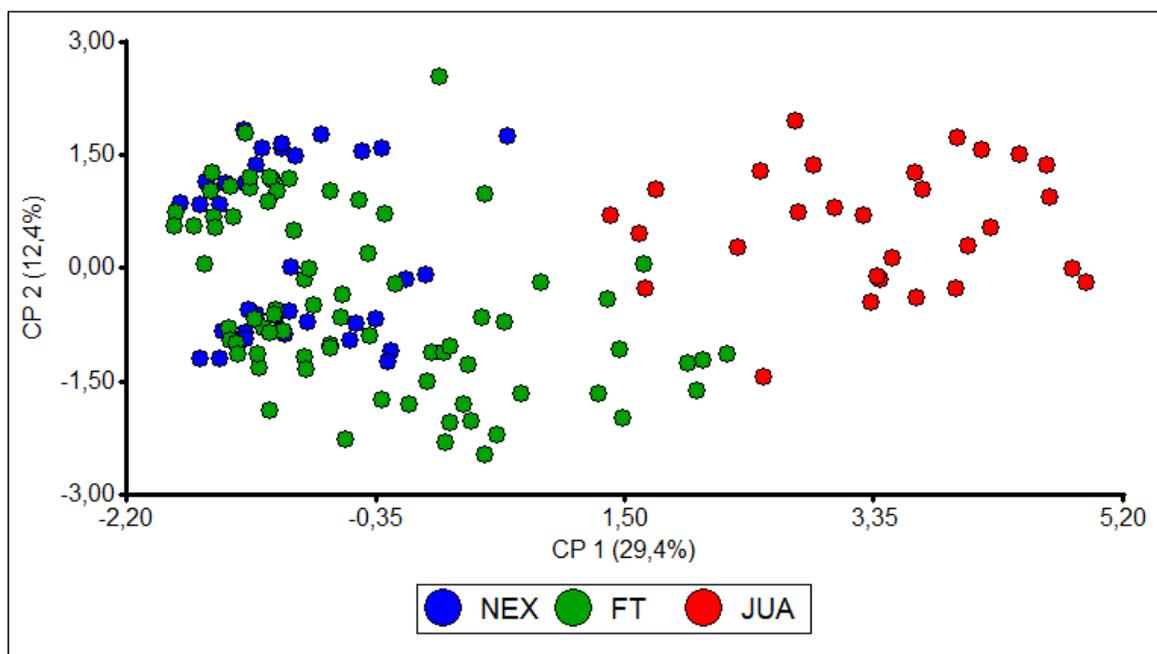


Figura 1.4. Análisis de coordenadas principales para *B. napus*, *B. rapa* y los individuos fuera de tipo, basado en datos morfológicos cualitativos.

En cuanto a los descriptores métricos, se encontraron diferencias significativas entre los tres biotipos para la mayoría de los caracteres, exceptuando el ancho de valva (Tabla 1.3). El análisis de componentes principales (Figura 1.5) incluyó más del 65% de la varianza total en los dos primeros componentes. El primero de ellos estuvo determinado principalmente por la relación largo de rostro:largo de valva, mientras que el segundo componente permitió una separación basada en el ancho de hoja, largo de hoja, largo de silicua y largo de valva. Ambos parentales se separaron claramente y los FT nuevamente presentaron la máxima variabilidad. Una particularidad que se observó en este análisis fue la presencia de dos sub-grupos dentro del biotipo JUA, debido principalmente a diferencias entre los dos ciclos en que se realizó el experimento. El sub-grupo correspondiente a la mayoría de las plantas sembradas en 2012 se dispuso hacia el centro inferior de la figura, coincidente con los mayores valores que mostró el conjunto de la población JUA en el largo de rostro y la relación largo de rostro:largo de valva, mientras que el otro sub-grupo, asociado a los individuos evaluados en 2016, se dispuso hacia el extremo superior derecho, debido a que en ese año se vieron plantas JUA con mayores tamaños de hoja y mayor altura que el ciclo anterior. Por otro lado, los individuos NEX se asociaron con el segundo componente, y dentro de estos lo hicieron mayoritariamente con el largo de valva y de silicua, variables en las que mostraron los mayores valores. Por último, los individuos FT se distribuyeron abarcando el rango de valores de los dos componentes, pero menos asociados al largo de valva y largo de silicua, variables en las que

presentaron los valores más bajos entre las tres poblaciones evaluadas. Contrariamente a lo ocurrido para los descriptores cualitativos, este biotipo se ubicó más cercano a JUA para los caracteres métricos.

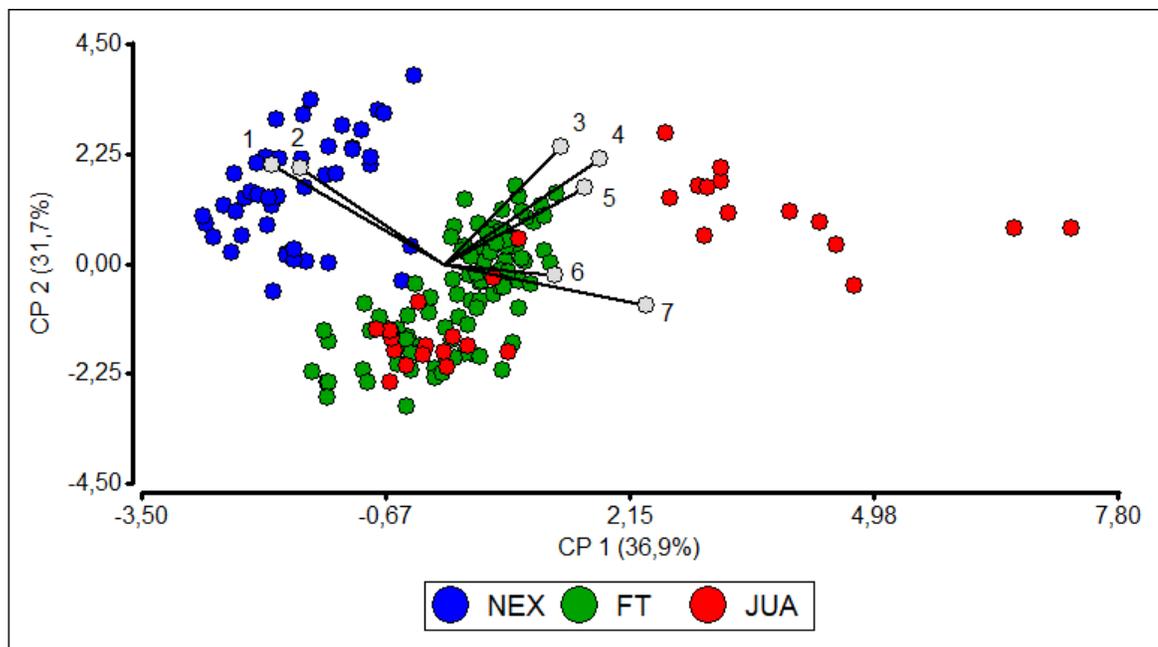


Figura 1.5. Análisis de componentes principales para NEX, JUA y los individuos fuera de tipo, basado en datos morfológicos cuantitativos. 1) Largo de silicua, 2) Largo de valva, 3) Ancho de hoja, 4) Largo de hoja, 5) Altura, 6) Largo de rostro, 7) Relación largo de rostro:largo de valva.

Determinación de requerimientos de vernalización

El análisis factorial del experimento de requerimiento de vernalización indicó que no existía interacción para las variables elongación del botón floral y antesis, mientras que si existían interacciones para el comienzo de madurez y el período en floración. Las sumas térmicas necesarias para alcanzar los estadios de elongación del botón floral y antesis, tanto en el cultivar NEX como en el biotipo FT, no mostraron diferencias significativas en ambas fechas de siembra (Figura 1.6 y 1.7).

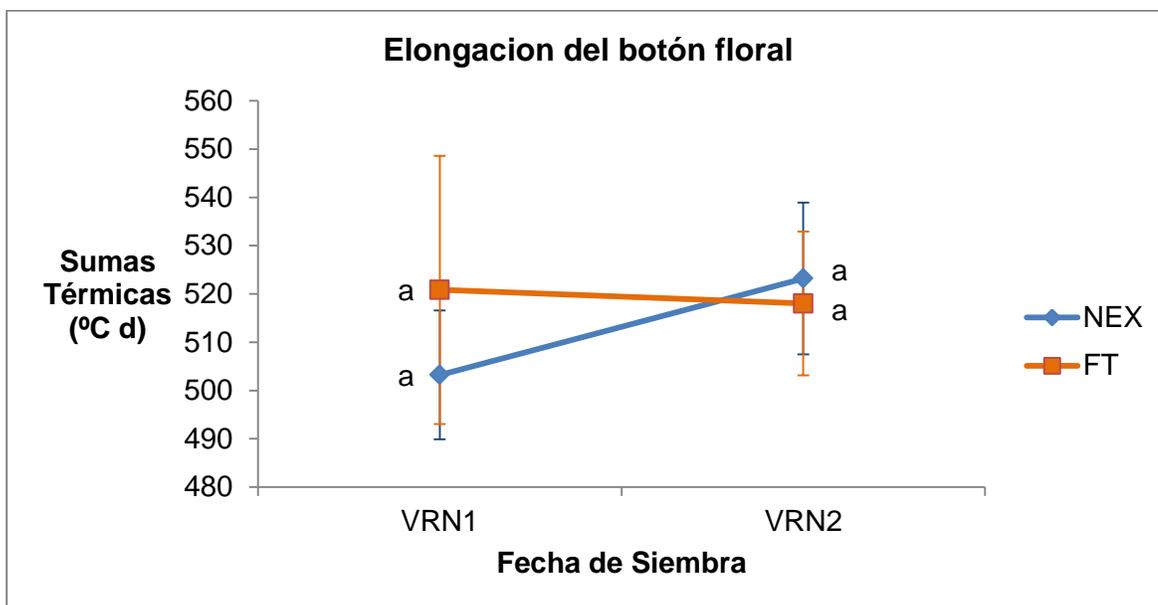


Figura 1.6. Medias y errores estándar de las sumas térmicas requeridas para alcanzar el estadio de elongación del botón floral para los biotipos NEX y FT en ambas fechas de siembra, analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).

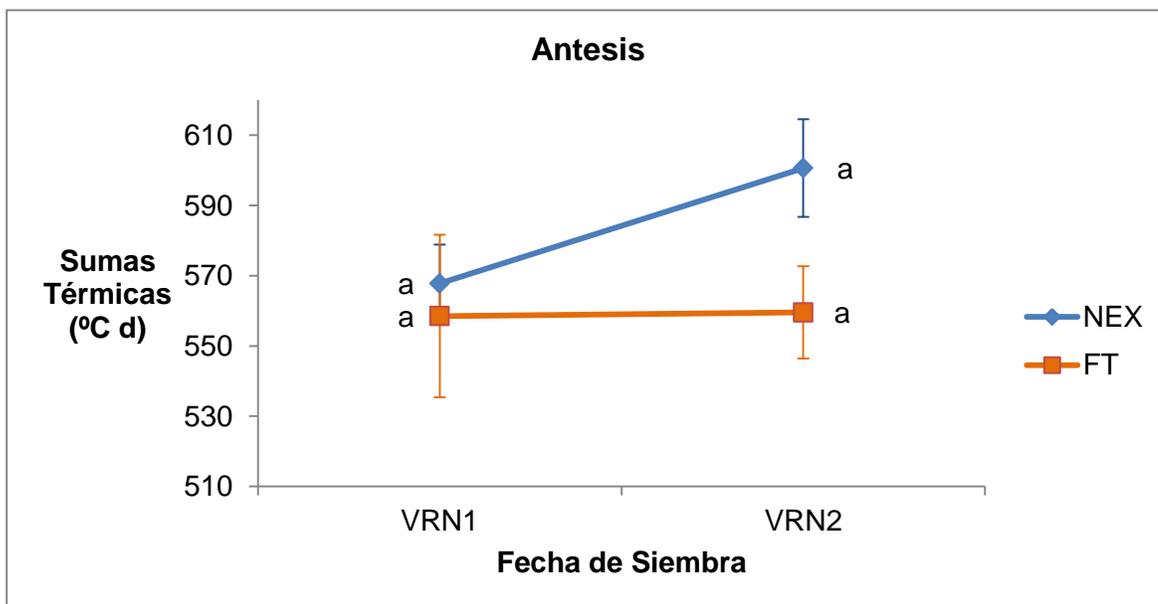


Figura 1.7. Medias y errores estándar de las sumas térmicas requeridas para alcanzar el estadio de antesis para los biotipos NEX y FT en ambas fechas de siembra, analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).

En el experimento VRN1 todos los individuos de los tres biotipos alcanzaron la etapa reproductiva. Cuando se analizaron los datos de esta fecha de siembra por separado, nuevamente no se encontraron diferencias significativas en los grados día a elongación del botón floral y a antesis para

NEX y FT, pero si existieron diferencias entre estos dos biotipos y el cultivar GOS debido a que este requirió de mayor cantidad de sumas térmicas para alcanzar estos dos estadios fenológicos. En el caso del comienzo de madurez, los individuos FT alcanzaron esta etapa con un valor de tiempo térmico elevado, en comparación a ambos cultivares, lo que aumentó considerablemente el período que estas plantas estuvieron en floración. Debido a esto, para esta variable se evidenció una diferencia significativa entre los híbridos y los dos cultivares de colza, los cuales presentaron valores dentro del rango esperado para la especie (Figura 1.8).

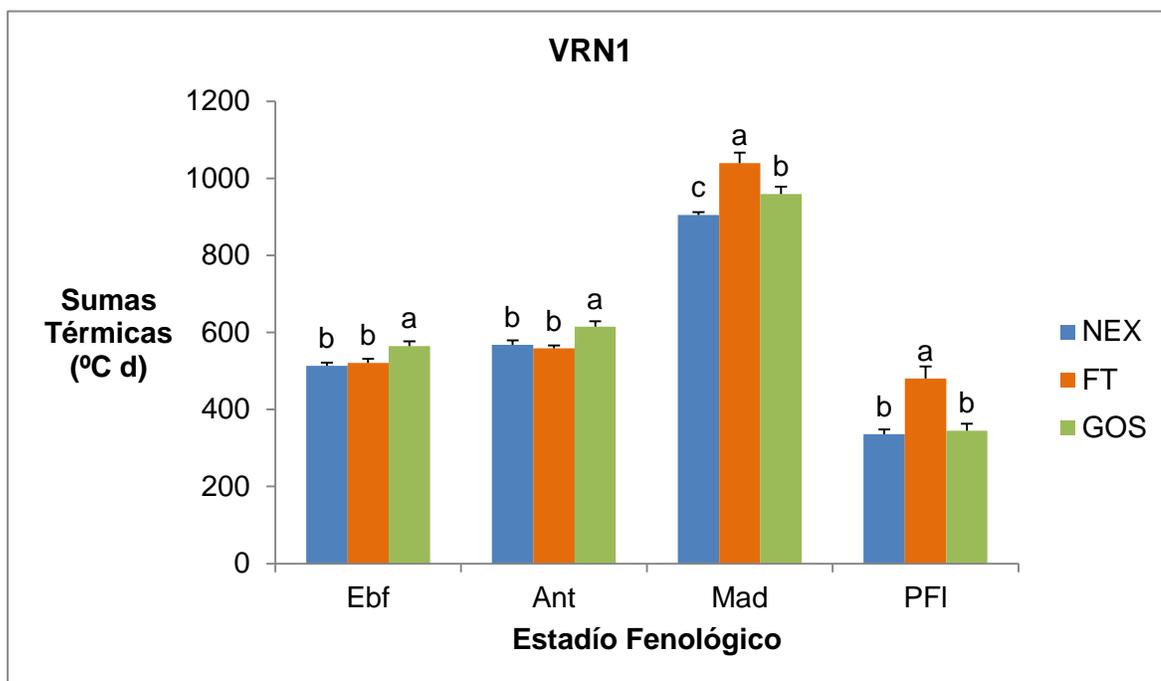


Figura 1.8. Medias y errores estándar de las sumas térmicas requeridas para alcanzar el estadio de elongación del botón floral (Ebf), antesis (Ant), comienzo de madurez (Mad) y duración del período de floración (PFI) para los biotipos NEX, GOS y FT correspondiente a la primera fecha de siembra, analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).

En el experimento VRN2, sembrado en una fecha tardía, los individuos provenientes del cultivar invernal GOS no alcanzaron a cubrir los requerimientos de vernalización y, por lo tanto, no florecieron. El meristema apical de estos individuos permaneció diferenciando hojas hasta, al menos 3005 °C d acumulados (250 DDS), cuando la experimentación fue finalizada (Figura 1.9).



Figura 1.9. A) Experimento VRN2 con individuos GOS en estado vegetativo, e individuos NEX en estado reproductivo luego de 862,5 °C d (81 DDS). B) Experimento VRN2 con individuos GOS en estado vegetativo, e individuos NEX en madurez luego de 1689,1 °C d (126 DDS).

Por su parte, todos los individuos NEX alcanzaron la etapa reproductiva en tiempo uniforme, mientras que respecto al biotipo FT, solamente el 1,9% de los individuos no alcanzó a cubrir las horas de frío necesarias para florecer, permaneciendo en estado vegetativo hasta que finalizó la experimentación, como lo hicieron las plantas del biotipo GOS (Figura 1.10). El resto de los individuos fuera de tipo alcanzó la etapa reproductiva de manera desuniforme durante un amplio período de tiempo térmico. En cuanto a los 20 individuos JUA, todos florecieron con un menor requerimiento de sumas térmicas que cualquiera de los genotipos incluidos en el experimento VRN2.



Figura 1.10. Individuo FT en estado vegetativo luego de 1689,1 °C d (126 DDS) junto a otras plantas del mismo biotipo que ya se encuentran en estado de fructificación (G4, CETIOM).

Debido a que el cultivar invernal no logro alcanzar la etapa reproductiva y, por lo tanto, no se contaban con datos de las variables estudiadas, solo se consideraron para el análisis estadístico los individuos NEX y FT que alcanzaron la etapa reproductiva. Ambos biotipos elongaron el botón floral en un promedio de tiempo térmico similar. Sin embargo, los individuos del biotipo FT requirieron de menor cantidad de sumas térmicas que el cultivar NEX respecto al momento de antesis (Figura 1.7). Lo contrario ocurrió para la culminación de la floración, en donde el cultivar NEX alcanzó la madurez con menos grados día que las plantas híbridas (Figura 1.11). La diferencia en estas últimas dos variables generó nuevamente que los individuos FT presentaran un período de floración significativamente mayor a NEX.

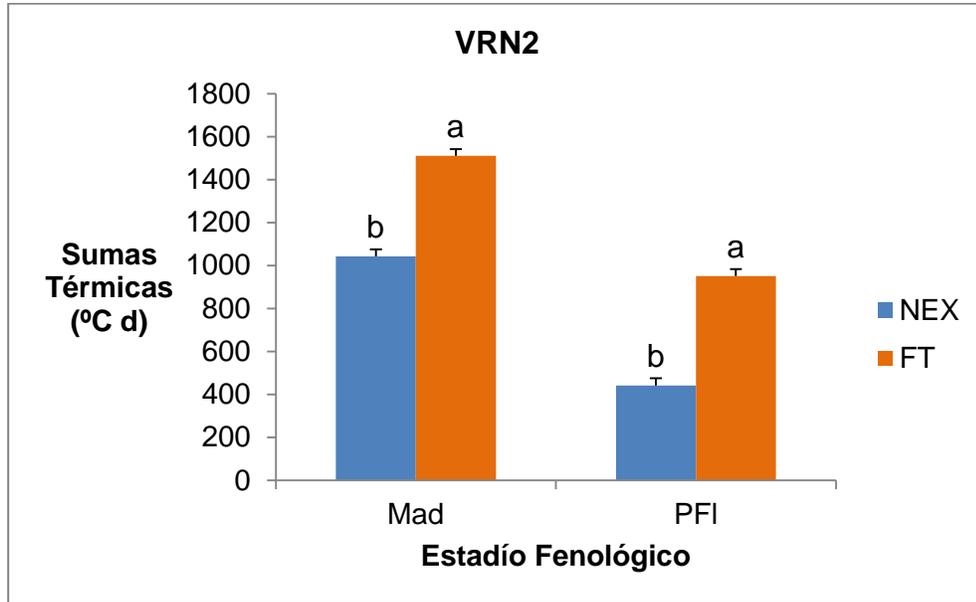


Figura 1.11. Medias y errores estándar de las sumas térmicas requeridas para alcanzar el estadio de comienzo de madurez (Mad) y duración del período de floración (PFI) para los biotipos NEX y FT correspondiente a la segunda fecha de siembra, analizados mediante test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,05$).

Discusión

Brassica rapa es una maleza ampliamente distribuida en el norte, centro y sur de la Argentina (Marzocca, 1976, 1994; Martínez Laborde, 1999; Zuloaga *et al.*, 2008). La hibridación entre *B. napus* y *B. rapa*, bajo invernadero y en condiciones de campo, ha sido registrada en diferentes países (Jorgensen y Andersen, 1994; Landbo *et al.*, 1996; Scott y Wilkinson, 1999; Halfhill *et al.*, 2002, 2004; Warwick *et al.*, 2003; Simard *et al.*, 2006; Luijten *et al.*, 2014). Sin embargo, en Argentina no existía ningún estudio dentro del género *Brassica* que documente la hibridación y flujo génico entre el cultivo y la maleza (Ureta *et al.*, 2017).

En Dinamarca, Landbo *et al.* (1996) encontraron a campo niveles de cruzamiento *B. rapa* x *B. napus* del 3%. Por otro lado en el Reino Unido, Scott y Wilkinson (1999) encontraron bajo condiciones naturales frecuencias de hibridación de entre 0,4-1,5%, mientras que Wilkinson *et al.* (2003) encontraron en promedio 1,9% de híbridos interespecíficos en distintos lotes de colza dispersados por toda Inglaterra. En Canadá, Warwick *et al.* (2003) y Simard *et al.* (2006) hallaron en cultivos de *B. napus* con presencia de nabo silvestre frecuencias de 13,6% y 1,1-17,5%, respectivamente. Por lo tanto, para las condiciones agroecológicas estudiadas, la tasa de hibridación obtenida en el establecimiento la Isaura en 2008 se ubicó dentro de los parámetros citados en la bibliografía.

La mayoría de las fecundaciones cruzadas ocurren entre plantas que se hallan a menos de 10 m, y raramente exceden una tasa del 1% a distancias mayores a 30 m (Husken y Dietz-Pfeilstetter, 2007). Es decir, que la presencia simpátrica de *B. napus* y *B. rapa* genera un riesgo de hibridación en las condiciones de cultivo de la región pampeana, debido a que un lote cultivado puede contener millones de plantas, mientras que poblaciones de nabo lindantes, que generalmente se encuentran bajo control químico, poseen unos pocos individuos. Esta situación produce relaciones cultivo:maleza elevadas, ocasionando una fuerte competencia del polen de *B. napus* sobre el de poblaciones autoincompatibles de *B. rapa*.

Contrariamente a lo que sucede en otros países como Canadá, Alemania, Reino Unido o Australia, la colza no es un cultivo relevante en la Argentina. En el partido de Balcarce entre las campañas de 2005 y 2007, se sembraron con colza menos de 400 ha (MAGyP, 2017). En el año 2008, esta superficie aumentó hasta 1500 ha, lo cual solo denota un 0,36% del área total del partido (Eldelberg, 1921). De acuerdo con los propietarios del establecimiento, la campaña del 2008 fue la primera vez que se sembró un cultivo de colza en esa zona, por lo que se podría considerar que la población de nabo silvestre no presentaba rasgos de *B. napus* introgresados previamente. Esto también indicaría que los individuos fuera de tipo encontrados corresponderían a híbridos de primera generación (F1).

El fenotipo de NEX y JUA se correspondió con lo citado en la bibliografía para su respectiva especie, exceptuando al descriptor de hoja completamente abrazadora que solo se observó en el biotipo de *B. rapa* y no en el de *B. napus*, como debería apreciarse según Mulligan (2008). Con respecto a los individuos FT, la presencia de hojas basales con forma elíptica, de coloración verde glauco y con ausencia de tricomas, fueron claros indicios de flujo génico desde *B. napus* y podrían ser de gran utilidad como criterio de detección temprana de híbridos cultivo-maleza a campo. En etapas reproductivas, la presencia de pimpollos por encima de las flores abiertas, el cual es un carácter diferencial de *B. napus* (Pascale, 1976; Marzocca, 1994), también es un indicador de flujo génico y se manifiesta como otro rasgo útil para la detección de híbridos en poblaciones de nabo silvestre. La disposición de las hojas superiores sobre el tallo floral no mostró un patrón de herencia tan disruptivo en la población FT, el cual se encontró en una relación aproximada de 2 a 1 de plantas no abrazadoras, respecto de individuos con hojas completamente abrazadoras. Otro carácter de la hoja superior como la forma lanceolada, característico de NEX, o la forma ovada, característico de JUA, se presentó dentro de la población FT en frecuencias cercanas al 50% para cada una. El estudio de los rasgos cualitativos permitió establecer que los híbridos putativos presentaron características intermedias, aunque más semejantes al parental cultivado, acorde a lo obtenido en estudios similares para rasgos morfológicos (Jorgensen y Andersen, 1994) y

moleculares (Luitjen *et al.*, 2014). Si consideramos que la mayoría de los híbridos interespecíficos entre *B. napus* (AACC) y *B. rapa* (AA) presentan una estructura genómica triploide (AAC) (U, 1935; Warwick, 2003; Gulden *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013; Luitjen *et al.*, 2014), la mayor semejanza observada con el genotipo cultivado sería una asociación esperable, debido a que los híbridos comparten con el cultivo gran cantidad de genes que se encuentran ubicados en el genoma C. A pesar de los resultados obtenidos, otros investigadores han reportado lo contrario en cuanto a la relación de semejanza de los híbridos *B. rapa* x *B. napus* (U, 1935; Warwick *et al.*, 2003), si bien dichas relaciones podrían estar influenciadas por los genotipos utilizados en los cruzamientos (Hauser *et al.*, 1998b). No obstante, algunos híbridos interespecíficos podrían haber sido descartados en el proceso de selección de individuos FT, debido a que este se realizó únicamente en base a la presencia de caracteres correspondientes al parental cultivado.

Por el contrario, cuando se consideró la morfología en base a los descriptores métricos, en este caso los híbridos se ubicaron dentro del espectro de valores de la maleza. Solo se encontraron valores intermedios a los biotipos parentales para la variable relación largo de rostro/largo de silicua, sin embargo, esta se ubicó dentro de los niveles típicos de la especie *B. rapa* (Mulligan, 2008). Los individuos FT presentaron en promedio los frutos con menor largo de silicua y largo de valva. Además, el número de semillas por silicua fue en casi la totalidad de los individuos inferior a 10, con muchos casos en los que se encontraba hasta una sola semilla por fruto. El bajo rendimiento por planta, evidenciada en un menor número de semillas por silicua en comparación a las especies parentales, podría estar asociado tanto a barreras post-zigóticas en la formación de las mismas como a una reducción en la viabilidad del polen (Riesberg y Carney, 1998). Los cruzamientos interespecíficos suelen resultar en progenie que exhibe una reducida fertilidad y las semillas producidas son generalmente más pequeñas que el promedio de la colza cultivada (Liu *et al.*, 2013). En poblaciones naturales, se ha encontrado que híbridos entre estas dos especies producen menos del 50% de la producción de semillas que su parental *B. rapa* debido a una menor viabilidad del polen (Allainguillaume *et al.*, 2006). En Argentina, Ureta *et al.* (2017) también encontraron reducidos valores de viabilidad del polen, menor a 70% en promedio, con valores mínimos de alrededor del 30%, consistente con lo observado en trabajos previos (Hauser *et al.*, 1998b; Warwick *et al.*, 2003).

La expresión de caracteres parentales o intermedios en los híbridos depende de la naturaleza del control genético de cada rasgo en particular, así como de la interacción con el ambiente. Los resultados indican que los individuos FT presentaron rasgos de ambos tipos de parentales, si bien fueron visualmente más semejantes al cultivo, debido a que compartían mayor cantidad de caracteres cualitativos. Una explicación posible podría ser que muchos de los rasgos morfológicos

presentaban patrones de herencia dominante (Riesberg y Carney, 1998), y por lo tanto las plantas FT heredaron alelos dominantes de *B. napus* y *B. rapa*. Además, los individuos FT expresaron un amplio rango de variabilidad en la mayoría de los descriptores fenotípicos empleados, característico en poblaciones de híbridos interespecíficos, mientras que las especies puras formaron grupos más uniformes (Riesberg y Carney, 1998).

La presencia de requerimientos de vernalización puede modificar el inicio de la floración en *B. napus* (Nanda *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2011; Gomez *et al.*, 2018). A pesar de la complejidad que caracteriza el estudio de rasgos cuantitativos como lo es el tiempo a floración (Wang *et al.*, 2011; Raman *et al.*, 2013, Nelson *et al.*, 2014), los experimentos realizados en fechas de siembra contrastantes permitieron comprobar la existencia de diferencias en los requerimientos de vernalización para los dos cultivares de colza sembrados en el establecimiento la Isaura en el año 2008.

En el experimento VRN1 se determinó que no existían diferencias entre el promedio de híbridos interespecíficos y el cultivar NEX para el tiempo térmico al momento de antesis. A partir de los resultados del experimento VRN2, se pudo determinar una proporción de individuos FT (1,9%) que provendrían del cruzamiento con el cultivar invernal, debido a que a igualdad de tiempo térmico y fotoperíodo con el resto de los individuos, hubo plantas que no florecieron. De acuerdo con Jorgensen y Andersen (1994), la accesión de *B. rapa* no presentó requerimientos de vernalización para alcanzar la etapa reproductiva, por lo que se descarta que la maleza haya aportado genes para este rasgo en los híbridos *B. rapa* x *B. napus*. Por otro lado, en *B. napus* se ha reportado que ciertos genes, como los genes FRI, en estado dominante confieren requerimientos de vernalización, y que varias mutaciones en los mismos causan una pérdida de función asociada a floración temprana (Wang *et al.*, 2011). En base a esto, se puede asumir que la mayor proporción de híbridos interespecíficos, colectados en el establecimiento la Isaura en el año 2008, provendrían del cruzamiento con el cultivar primaveral Nexera 8450, y serían resistentes a la aplicación de herbicidas IMI.

Una variable que presentó valores significativamente mayores en los híbridos interespecíficos respecto a ambos parentales cultivados tanto en VRN1 como en VRN2, fue el periodo durante el que este biotipo estuvo en floración. Así como las plantas voluntarias presentan sincronía floral con especies silvestres debido a que estas últimas suelen tener periodos de floración prolongados (Gruber y Claupein, 2007), la duración de la etapa reproductiva en los híbridos podría tener importantes consecuencias sobre los posibles retrocruzamientos con la maleza parental y la

introgresión del rasgo de IMI-resistencia en el genoma de la misma. Esta característica podría hacer tanto de las plantas voluntarias de la temporada siguiente como de los híbridos cultivo-maleza, una importante fuente para el flujo génico, formando corredores o puentes que faciliten el contacto entre las especies (Pessel *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en este capítulo permitirían inferir que los individuos FT eran híbridos F1 entre *B. napus* y *B. rapa* debido al cruzamiento interespecífico desde el cultivo hacia una población de *B. rapa* sin registros previos de contacto con colza cultivada. Además, el flujo génico hacia la maleza presumiblemente habría sido muy superior desde el cv. NEX IMI-resistente, y se pudo comprobar una mayor duración del periodo de floración en comparación a los dos cultivares de colza. La estimación de un índice de hibridación y la confirmación de caracteres diferenciales en los individuos FT representa el primer paso hacia un mejor entendimiento de las relaciones entre estas especies y del riesgo ambiental que conllevaría la incorporación exitosa de genes de resistencia a herbicidas en el material hereditario de la maleza invasora *B. rapa*.

A pesar de estas confirmaciones, la presencia de híbridos no representa un peligro en sí, y no necesariamente implica un daño ecológico irreparable. Esto se debe fundamentalmente a que los resultados de experimentos de *fitness* para retrocruzas con la maleza y especialmente para generaciones avanzadas de híbridos, indican que la fertilidad es menor en estos individuos que en sus especies parentales (Hauser *et al.*, 1998a). Para el caso de los F1, existen diversos resultados en donde estos presentan una producción de semillas intermedia entre *B. napus* y *B. rapa* (Hauser *et al.*, 1998b; Hauser *et al.*, 2003) o menor a ambas especies progenitoras (Warwick *et al.*, 2003; Allainguillaume *et al.*, 2006). Sin embargo, en el caso de que los híbridos y las plantas voluntarias percibieran una mayor intensidad de selección mediante herbicida, aumentaría considerablemente el riesgo potencial de introgresión del carácter de IMI-resistencia en la maleza. Por lo tanto, estudios de persistencia frente a la selección ambiental y/o antrópica, entre otros factores, deberían ser evaluados para poder efectuar una valoración más precisa del riesgo ambiental. De otra forma, la ocurrencia de retrocruzas entre híbridos F1 e individuos *B. rapa* podría generar plantas indistinguibles a la maleza con introgresión de genes de resistencia a herbicidas.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS CON RESISTENCIA A IMIDAZOLINONAS

Introducción

La obtención de cultivares con resistencia genética a herbicidas (RH), si bien es de gran utilidad, presenta el riesgo de generar biotipos de malezas resistentes a los mismos. Para la mayoría de estos biotipos RH, la resistencia es sitio específica y se basa en un único gen mayor con un alto grado de dominancia (Beckie, 2006a). La búsqueda de cultivares de colza-canola RH data de la década del 80', debido a que estos genotipos ofrecían nuevas oportunidades, principalmente la posibilidad de usar herbicidas post-emergentes dentro del cultivo (Krato y Petersen, 2012b).

La colza resistente a la familia de las imidazolinonas (IMI) se desarrolló en 1987 usando métodos de mejoramiento tradicional y fue liberada al mercado por primera vez en Canadá en 1995 (Tan *et al.*, 2005; Krato y Petersen, 2012a, b). Este cultivar y otros fueron desarrolladas por la empresa Cynamid (luego adquirida por BASF) y se los denomina *Clearfield*® o CL. Los mismos se generaron seleccionando cultivos de tejidos que se obtuvieron a partir de microsporas del cultivar canadiense "Topas". Las microsporas fueron posteriormente tratadas con mutágenos químicos originando dos líneas mutantes del gen *BnAHAS3* llamadas PM1 y PM2, de las que derivan todos los cultivares actuales de colza CL o IMI-resistente. La mutación PM1 está ubicada en el genoma C, contiene una sola alteración en el codón 653 (cambio de serina a asparagina, ser-653-asp) lo que le da resistencia únicamente a imidazolinonas. El factor de resistencia en la línea PM2, ubicado en el genoma A, está asociado a una mutación puntual en el codón 574 (cambio de triptófano a leucina, trp-574-leu). Esta mutación brinda un mayor grado de tolerancia, y, además, resistencia cruzada a sulfonilureas y triazolpirimidinas debido a que el aminoácido Trp-574 es importante no solo para definir la forma del sitio activo, sino también para anclar los herbicidas imidazolinonas y sulfonilureas a la enzima ALS (Powles y Yu, 2010). El nivel de tolerancia es superior cuando las dos mutaciones de cada alelo se encuentran presentes (Tranel y Wright, 2002; Tan *et al.*, 2005; Krato y Petersen, 2012a, b). La línea PM2 fue la que se utilizó para la obtención del cultivar NEXERA 8450 (información brindada por la empresa BASF).

Los genes del cultivo pueden incorporarse con éxito en el genoma de la maleza mediante cruzamientos interespecíficos y posterior retrocruzamiento con *B. rapa* en un proceso de introgresión (Hansen *et al.*, 2001). Es por esto que el desarrollo de cultivares de colza con rasgos

novedosos generó ciertas preocupaciones respecto a la posible hibridación de estos, o de plantas voluntarias, con el nabo silvestre, lo cual generaría poblaciones de *B. rapa* con el carácter de resistencia (Jorgensen y Andersen, 1994; Simard *et al.*, 2002; Gulden *et al.*, 2003a; Gruber y Claupein, 2007). De hecho, se ha confirmado la transferencia de resistencia a herbicidas a través de sucesivas generaciones (Snow *et al.*, 1999). Luego de dos o tres generaciones de retrocruza, las plantas se vuelven morfológica y citológicamente indistinguibles de la maleza pero los genes de resistencia continúan expresándose (Warwick *et al.*, 2008).

La colza es una especie autocompatible, si bien presenta niveles de entrecruzamiento entre un 12-47%. (Becker *et al.*, 1992). Esta especie, produce una gran cantidad de polen que puede ser dispersado tanto por insectos como a través del viento. El flujo génico mediado por polen en colza depende de varios factores entre los que se incluyen el período de floración, la dirección y velocidad del viento, el tipo y el movimiento de los insectos presentes, la distancia entre las poblaciones y el tamaño de la población donante de polen (Liu *et al.*, 2013). La mayoría de las polinizaciones cruzadas ocurren entre plantas que están a menos de 10 m, sin embargo, la distribución del polen de colza es aleatoria y se han detectado cruzamientos inclusive a varios kilómetros de distancia de la fuente de origen (Timmnos *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2013).

En el caso de la población del partido de Balcarce, tanto los híbridos interespecíficos como las plantas voluntarias provenientes del banco de semillas del suelo podrían haber actuado como fuente del gen de IMI-resistencia el año siguiente al cultivo de la colza CL. El banco de semillas de colza se genera inicialmente debido a las pérdidas por cosecha y/o por la contaminación de semilla proveniente de maquinarias agrícolas (Gulden *et al.*, 2003a; Gruber y Claupein, 2007). La pérdida de semillas debido a las operaciones de cosecha y trilla en *B. napus* pueden ir desde menos de un 1% hasta un 30% del rendimiento del cultivo (Beckie *et al.*, 2003). En Argentina, para la campaña 2012/13 se estimaron pérdidas promedio durante la cosecha mecánica de 160 kg ha⁻¹, lo cual representó un 9,4% del rendimiento medio nacional (Giordano *et al.*, 2013).

Una vez en el banco de semillas del suelo, su destino es bastante incierto. Cada simiente puede sufrir uno de los siguientes tres destinos: persistir, germinar exitosamente y emerger, o morir (Gulden *et al.*, 2003a). En el caso de los primeros dos, las plantas voluntarias pueden emerger del banco de semillas durante varios años y servir como fuente potencial de polen para dispersar genes hacia parientes silvestres y/u otros cultivares de *B. napus* que entran dentro de la rotación agrícola o se encuentran en cercanía. Un factor clave que favorece la persistencia es la presencia de dormición en las semillas (Gruber *et al.*, 2004a, b; Jorgensen *et al.*, 2007). Si bien las semillas de los

biotipos domesticados de *B. napus* no presentan dormición primaria, pueden desarrollar dormición secundaria cuando son expuestas a oscuridad y/o condiciones inhibitorias para la germinación como estrés hídrico, hipoxia o altas temperaturas (Landbo y Jorgensen, 1997; Pekrun *et al.*, 1998; Gulden *et al.*, 2008;). En contraste, sí muestran cierta dormición primaria biotipos de la maleza *B. rapa* (Landbo y Jorgensen, 1997; Hauser *et al.*, 1998a, b; Gulden *et al.*, 2008). Por otro lado, Landbo y Jorgensen (1997) encontraron en la progenie de cruzamientos recíprocos *B. napus* x *B. rapa* que el rasgo de ausencia de dormición primaria se transmitía desde el cultivo a los híbridos.

Generalmente, la densidad de población del banco de semillas de *B. napus* y *B. rapa* decrece rápidamente desde el último cultivo como se ha documentado en Canadá (Simard *et al.*, 2002; Gulden *et al.*, 2003a; Gulden *et al.*, 2004) y Europa (Lutman *et al.*, 2003). En lotes agrícolas de Canadá, se han encontrado plantas voluntarias en bajas densidades hasta tres o cinco años posteriores a un cultivo de colza (Simard *et al.*, 2002; Gulden *et al.*, 2003a), si bien se ha documentado un caso con una duración de hasta siete años (Beckie y Warwick, 2010). Por otro lado, en Europa algunos genotipos invernales pueden persistir hasta 4 años bajo sistemas agrícolas convencionales o más de 10 años en suelos sin cultivo (Lutman *et al.*, 2003). Esto sugiere que la persistencia de voluntarios provenientes del banco de semillas es limitada cuando compiten con otro cultivo.

En los sistemas agrícolas típicos, la colza se rota con otros cultivos de invierno (principalmente cereales), en donde el nabo silvestre junto a sus híbridos con *B. napus* son muy susceptibles de ser eliminados mediante prácticas mecánicas o a través de herbicidas. Asimismo, el sistema de labranza puede afectar la persistencia de las semillas en el banco del suelo (Pekrun *et al.*, 1998; Gulden *et al.*, 2003a; Gruber *et al.*, 2004b). Thomas *et al.* (2004) concluyeron a partir de 10 estudios sobre sistemas de labranza en las praderas canadienses, que la persistencia de las plantas voluntarias de colza estuvo más asociada a labranza cero o reducida y no a un sistema convencional. Si bien otros investigadores han obtenido resultados similares (Pekrun *et al.*, 1998; Lutman *et al.*, 2003), también se ha reportado que el entierro de semillas a través de una labranza favorecería la persistencia del banco del suelo a largo plazo debido a que las semillas inducen dormición secundaria (Gulden *et al.*, 2003a; Gruber *et al.*, 2004b). Contrariamente, la persistencia en el banco puede disminuir en el caso de labranza reducida ya que predadores como las aves consumen las semillas que se encuentran en superficie. Esta situación se ve favorecida a medida que las mismas permanecen por mayor tiempo al descubierto (Gruber *et al.*, 2004b). En todo caso, varios estudios han reportado que las generalizaciones al respecto de la dinámica de malezas sobre sistemas de cero o reducida labranza están lejos de ser definitivas (Gulden *et al.*, 2003a).

Luego de la germinación, el *fitness* de los híbridos F1 y de las generaciones avanzadas puede ser importante para determinar hasta qué punto ocurrirá la introgresión. Las generaciones tempranas generalmente exhiben menor producción de semillas que la especie pura *B. rapa* debido a desequilibrios meióticos asociados a la presencia de cromosomas C univalentes (U, 1935; Jorgensen y Andersen, 1994). Sin embargo, es esperable que estas desventajas en el *fitness* disminuyan con cada generación de retrocruza como se ha encontrado en experimentaciones bajo cámara de crecimiento (Snow *et al.*, 1999). Si este patrón se mantuviera para plantas en el campo, indicaría que luego de que los genes del cultivo se introgresan en el nabo silvestre por algunas generaciones, aquellos que no son fuertemente deletéreos y no están ligados a otros rasgos deletéreos, pueden persistir por muchas generaciones subsiguientes.

Asimismo, el gen de resistencia puede tener también una influencia en la aptitud biológica de las plantas híbridas y retrocruzadas, junto con los otros genes del cultivo (Landbo y Jorgensen, 1997). Se sabe que ciertas mutaciones genéticas que confieren resistencia a herbicidas con acción sitio específica pueden presentar una penalidad metabólica debido a efectos pleiotrópicos adversos (Vila-Aiub *et al.*, 2009). Sin embargo, el carácter de IMI-resistencia tendría un costo insignificante en el *fitness* ante la ausencia de la selección mediante herbicida (Tranel y Wright, 2002; Yu *et al.*, 2010).

En base a lo expuesto, el aumento de plantas introgresadas estables puede llevar muchas generaciones durante las cuales la selección reduce fuertemente la frecuencia de híbridos y su progenie en la población. La ausencia de dormición, el costo en la aptitud biológica debido a la hibridación, el número desigual de cromosomas acumulado a lo largo de las generaciones, y la recombinación o pérdida de los cromosomas donde se encuentra el locus de resistencia, haría improbable que el carácter de IMI-resistencia se disperse dentro y entre poblaciones a través de los híbridos cultivo-maleza (Liu *et al.*, 2013). El éxito de la perdurabilidad de la resistencia estará asociado a la posibilidad de incorporar este carácter en el genoma de la especie *B. rapa* a través de retrocruzas con los híbridos de primera generación, debido a que estos últimos, junto con las plantas voluntarias de *B. napus* tenderían a extinguirse en el ambiente agrestal estudiado.

El uso de marcadores moleculares para la detección de híbridos interespecíficos se ha difundido en los últimos años, especialmente aquellos basados en el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) debido a la naturaleza estable de la molécula de ADN y a la sensibilidad de esta tecnología (Demeke y Ratnayaka, 2008). Los microsatélites (SSR), son marcadores co-dominantes en los cuales se ha reconocido su utilidad para el análisis de poblaciones y otros propósitos en

varias especies (Gupta y Varshney, 2000). Para la detección molecular de individuos IMI-resistentes, Hu *et al.* (2017) desarrollaron *primers* para la amplificación de secuencias polimórficas específicas de la mutación try-574-leu (PM2) que luego son tratadas con enzimas de restricción (CAPS), y permiten detectar la presencia de esta mutación en individuos del género *Brassica*. Los CAPS descifran polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, causados por un cambio de un único nucleótido (SNP), una inserción o una delección, que modifica el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción en amplicones de PCR (Konieczny y Ausubel, 1993; Agarwald *et al.*, 2008). Estos marcadores moleculares son co-dominantes y locus específicos. Por lo tanto, han sido usados para distinguir plantas que son homocigotas o heterocigotas para determinado alelo (Konieczny y Ausubel, 1993; Agarwald *et al.*, 2008).

El objetivo de este capítulo fue determinar la presencia y proporción de individuos IMI-resistentes en la progenie de *B. rapa*, establecer su carácter híbrido y estudiar la evolución de la frecuencia de los mismos en la población del partido de Balcarce a lo largo de los años. Los objetivos particulares fueron: 1) Relevar la proporción de individuos IMI-resistentes en la población *B. rapa*; 2) Determinar el carácter híbrido de los individuos que resistan la aplicación del herbicida; 3) Determinar el origen de la mutación que confiere resistencia a imidazolinonas; 4) Analizar la evolución de la persistencia de individuos IMI-resistentes en el mismo sitio, durante la sucesión de años 2008-2014.

Materiales y Métodos

Registro de uso de herbicidas y material vegetal

En el establecimiento la Isaura del partido de Balcarce, la rotación se basó en una serie trigo-soja hasta el año 2008, con la inclusión de un único cultivo de girasol en los diez años previos. El registro de uso de herbicidas posterior al año 2008 incluyó tres sulfonilureas pero ninguna aplicación de imidazolinonas. El campo se encuentra bajo labranza cero desde el año 2001, por lo que el control químico en barbecho se ha realizado mediante glifosato y 2,4-D. En el trigo, las malezas se controlaron con dicamba y metsulfurón, mientras que en soja-RR se utilizó glifosato. No hubo aplicaciones repetidas de sulfonilureas en dos años consecutivos, y solo se aplicaron herbicidas imidazolinonas en el año 2008, durante el cultivo de colza resistente (Tabla 2.1). No existen registros de cultivos de colza en este establecimiento previo al 2008 y al menos hasta 1996 (12 años), y durante las campañas subsiguientes al año 2008 no se volvió a sembrar ningún cultivo de colza en cercanía.

Tabla 2.1. Registro de rotaciones y control de malezas de la serie 2008-2013 efectuado en un mismo lote del establecimiento la Isaura del partido de Balcarce.

Año	Cultivo	Herbicida	Principio activo	Dosis (g o cm ³ ia ha ⁻¹)	Modo de Acción	Familia
2008/09	Colza	Pívor	Imazetapir	100	Inhibidores de la síntesis de aminoácidos ramificados (1)	IMI
2008/09	Soja	Glifosato	Glifosato	2880	Inhibidores de la síntesis de aminoácidos aromáticos (2)	GLI
2009/10	Trigo	Misil	Metsulfurón + Dicamba	7 + 100	1 + reguladores de crecimiento (3)	SU + AB
2009/10	Soja	Glifosato	Glifosato	2880	2	GLI
2010/11	Soja	Glifosato	Glifosato + 2,4-D	2880 + 750	2 + 3	GLI + FE
2011/12	Trigo	Misil	Metsulfurón + Dicamba	7 + 100	1 + 3	SU + AB
2011/12	Soja	Glifosato	Glifosato	2880	2	GLI
2012/13	Cebada	Misil	Metsulfurón + Dicamba	7 + 100	1 + 3	SU + AB
2012/13	Soja	Glifosato	Glifosato	2880	2	GLI

IMI: Imidazolinonas; SU: Sulfonilureas; GLI: Glicinas; FE: Ácidos Fenoxi-carboxílicos; AB: Ácidos benzoicos.

Las accesiones de *B. rapa* utilizadas en la experimentación se colectaron en el período 2008-2014 (Tabla 2.2). Además, para el relevamiento de individuos resistentes se incluyeron el cv. NEX a modo de control resistente y la población JUA del partido de Benito Juárez, como control susceptible.

Tabla 2.2. Accesiones utilizadas en el experimento de evolución de la persistencia de individuos IMI-resistentes, colectadas dentro del establecimiento la Isaura, en el partido de Balcarce.

Accesión	Año de recolección	Generación	Ubicación
BAL 08-1 ¹	2008	G1a	Entre dos lotes de colza Nexera 8450.
BAL 08-2 ²	2008	G1b	Esquina de un lote de colza Nexera 8450.
BAL 09	2009	G2	Triángulo del lote, cerca a sitio de G1a.
BAL 11	2011	G4	Plantas aisladas dentro de un lote de trigo.
BAL 13	2013	G6	Dentro de lote de soja.
BAL 14	2014	G7	En el borde del lote.
JUA	2008		<i>B. rapa</i> del partido de Benito Juárez
NEX	2012		Cultivar NEXERA 8450

¹ BAL 08-1 corresponde a la accesión BAL1 del Capítulo 1.

² BAL 08-2 corresponde a la accesión BAL2 del Capítulo 1.

Screening de individuos resistentes a imidazolinonas

La siembra se realizó de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 1 de esta tesis. Las plantas se desarrollaron en invernáculo, con riego automático diario. El diseño fue completamente aleatorizado considerando a las accesiones como tratamientos y utilizando cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por una bandeja (128 celdas), mientras que los controles ocuparon un cuarto de bandeja en cada caso (32 celdas), además se incluyeron 4 unidades experimentales de 32 celdas del control susceptible que no fueron pulverizadas. Cuando se encontraban en un estadio de 2-3 hojas (B2-B3, CETIOM), se aplicó una doble dosis comercial (160 g i.a. ha⁻¹) del herbicida Arsenal Forestal ® (imazapir 48%) con un equipo experimental provisto por una pastilla Teejet 8001 EVB. Se trabajó a una velocidad de 1,45 km h⁻¹ con un caudal de 200 L ha⁻¹ y una presión de 345 kPa. La aplicación se realizó en conjunto con un tensioactivo no iónico, a razón de 0,35%. Veinte días después de la aplicación (DDA) se evaluó la supervivencia utilizando una escala binaria: 0 = sin síntomas visibles, 1 = muerte del meristema de crecimiento. Las observaciones se realizaron sobre plantas individuales, utilizando como control entre 5 y 10 plantas de los mismos biotipos no expuestos a la aplicación del herbicida. El monitoreo continuó durante 10 días para constatar la supervivencia de los individuos. La respuesta fue expresada como porcentaje de supervivencia sobre el control susceptible no tratado (adaptado de Moss *et al.*, 1999). Para ajustar los datos a una distribución normal los mismos se transformaron mediante la siguiente función (Ahrens *et al.*, 1990):

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

Luego se realizó el análisis estadístico mediante ANOVA simple y comparación de medias por prueba de LSD Fisher.

Las plantas sobrevivientes fueron trasplantadas 22 DDA a macetas de 15 cm de diámetro, a razón de dos individuos por maceta, con una mezcla de suelo y sustrato (75% suelo, 25% sustrato Grow Mix ® Terrafertil), bajo condiciones controladas en invernadero y con dos riegos diarios. Se aplicó fertilizante foliar Chase Li 533 (grado 5-3-3) a razón de 5 L ha⁻¹ y 50 kg ha⁻¹ de urea granulada. También se realizaron aplicaciones periódicas de insecticida para controlar la presencia de pulgón de las crucíferas (*Brevicoryne brassicae*). Los individuos IMI-resistentes fueron fenotipados a partir de los descriptores utilizados en el primer capítulo de esta tesis y analizados mediante técnicas de estadística multivariada.

Caracterización molecular

Luego del *screening* se realizó una evaluación molecular para determinar si todas las plantas sobrevivientes correspondían a híbridos entre el cultivo y la maleza. Con este fin, se colectaron hojas jóvenes de un subgrupo (n = 46) de las plantas que sobrevivieron al herbicida y de los respectivos controles. El tejido fue lizado, y con el mismo se realizó una extracción de ADN genómico mediante un método modificado de Doyle y Doyle (1987). A modo de control de la especie *B. napus* (BN) se utilizaron individuos del cv. NEX y el cv. GOS, mientras que para la especie *B. rapa* (BR) se utilizó la población JUA y la colección LDU, proveniente del partido de Necochea. Se analizaron los individuos mediante una PCR-multiplex (Henegariu *et al.*, 1997) utilizando un par de *primers* específico del genoma A y otro específico del genoma C (Tabla 2.3). El carácter híbrido de las plantas IMI-resistentes se confirmaría en el caso de que amplificaran las bandas correspondientes al genoma C (*B. napus*) y presentaran alelos específicos de cada especie parental en el genoma A.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador BioRad modelo *My Cycler™ Thermal Cycler*. En un volumen final de reacción de 20 µL se colocaron 30 ng de ADN, Buffer PCR 1X Gibco, MgCl₂ (0,05 nM), dNTP (0,625 nM de cada uno), *primer* Ap1C5Pr (F y R; 10 pM de cada uno) y *primer* BRMS005 (F y R; 21 pM de cada uno) y Taq polimerasa (1U), llevando a volumen con agua ultra pura. Las distintas concentraciones de los iniciadores se establecieron en forma empírica, aumentando la concentración del par de *primers* para el loci “débil” y disminuyéndola en los *primers* del loci “fuerte” (Henegariu *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2003). En la amplificación se utilizó un programa de PCR con *touchdown* (Don *et al.*, 1991) para minimizar la presencia de amplicones falsos. La desnaturalización inicial se realizó a 95°C durante 4 minutos, seguida de un ciclo compuesto por 94°C por 30 seg, T_A + 5°C (T_A = 55°C) por 45 seg y 72°C por 1 min. La temperatura de hibridación fue decreciendo un grado por ciclo en los siguientes ciclos hasta alcanzar T_A – 5°C. Luego de los 10 ciclos de *touchdown*, los productos de PCR fueron amplificados durante 30 ciclos a 94°C por 30 seg, T_A por 45 seg y 72°C por 1 min, con una extensión final de 20 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron posteriormente en geles de poliacrilamida 6% con buffer TBE 1X. Se sembraron 8 µl del producto de cada amplificación y se corrieron por 50 min a 40 W, seguido de 20 min a 50 W en una cuba de secuenciación BioRad modelo *PowerPac™HV Power Supply*. Se incluyó un marcador de peso molecular de 50 pb de la empresa Productos Bio-Lógicos. Las bandas SSR fueron visualizadas por tinción con nitrato de plata y luego escaneadas. La lectura de los fragmentos de ADN fue visual, asumiendo que cada banda representaba un locus simple co-dominante

Para determinar la presencia de la mutación PM2 del gen *BnAHAS3* que le confiere resistencia a imidazolinonas, se realizó una experimentación molecular sobre 10 individuos que sobrevivieron al experimento de *screening*, provenientes de las dos poblaciones (G1a y G1b). Para esto se utilizaron marcadores CAPS desarrollados por Hu *et al.* (2017). La primera etapa que consta de una amplificación mediante PCR, se realizó en tubos con un volumen final de reacción de 20 µL que contenían 30 ng de ADN, Buffer PCR 1X Gibco, MgCl₂ (0,05 nM), dNTP (0,625 nM de cada uno), *primer* BsrDI (F y R; 10 pM de cada uno) y Taq polimerasa (1U), llevando a volumen con agua ultra pura. Las condiciones de PCR constaron de los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos compuestos de 94°C por 30 seg, 56°C por 45 seg y 72°C por 1 min. Por último, una extensión final de 10 minutos a 72°C. La segunda etapa, clivaje con enzima de restricción, se llevó a cabo en un volumen de 25 µL compuesto por 8 µL de producto de PCR, 0,5 µL de enzima *BsrDI* (Catalogo: R0574S, New England Biolabs Inc.), 2,5 µL de Buffer 10X NEB 2.1, llevando a volumen con agua ultra pura. Los tubos de reacción fueron incubados por 1 h a 65°C, y luego, los productos de digestión se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 65 V por 1 h para posteriormente ser teñidos con bromuro de etidio para su visualización.

Tabla 2.3. Secuencia de los *primers* utilizados en la experimentación molecular y su ubicación en el genoma A o C correspondiente a las Brassicáceas.

<i>Primer</i>		Secuencia (5' - 3')	Genoma	Fuente
BRMS005	F	ACCTCCTGCAGATTCGTGTC	A	Suwabe <i>et al.</i> , 2002
	R	GCTGACCTTTCTTACCGCTC		
AP1C5Pr	F	GCGTAGGAGGTGGTAAAGATAGC	C	Allainguillaume <i>et al.</i> , 2006
	R	ACACCCACATTGCATTTTACCC		
BsrDI	F	GTTTGCGAGCAGGGGCTAAGA	A	Hu <i>et al.</i> , 2017
	R	GACATCCAACAGGTACGGTCCA		

Resultados

Screening de individuos resistentes a imidazolinonas

Se encontraron individuos resistentes a la aplicación de herbicidas de la familia de las imidazolinonas en las dos accesiones correspondientes a la primera generación de híbridos *B. rapa* x *B. napus* (G1a y G1b), sin embargo, la frecuencia de estos individuos fue baja, aunque estadísticamente diferente del control susceptible y a una doble dosis comercial. Al evaluar la persistencia de la resistencia en generaciones avanzadas recolectadas en el mismo establecimiento

(G2, G4, G6 y G7), no se encontraron individuos sobrevivientes a la aplicación de imidazolinonas, a excepción de una única planta en la colección G6. El herbicida fue letal en la totalidad de las plantas susceptibles JUA mientras que no tuvo ningún efecto sobre el cultivar NEX (Tabla 2.4). Los individuos IMI-resistentes presentaron caracteres morfológicos semejantes al cultivo NEX, con baja fertilidad y semillas de tamaño reducido, mostrando concordancia con los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis para los individuos FT.

Tabla 2.4. Supervivencia de individuos (% +/- EE) a una doble dosis comercial de imazapir sobre generaciones sucesivas recolectadas en el mismo establecimiento y sus respectivos controles.

Accesión	Año de recolección	Generación	Supervivencia (%)
BAL 08-1	2008	G1a	10,64 +/- 0,01 b
BAL 08-2	2008	G1b	3,64 +/- 0,01 cd
BAL 09	2009	G2	0,00 +/- 0,00 d
BAL 11	2011	G4	0,00 +/- 0,00 d
BAL 13	2013	G6	0,18 +/- 0,00 d
BAL 14	2014	G7	0,00 +/- 0,00 d
JUA	2008		0,00 +/- 0,00 d
NEX	2012		100,00 +/- 0,00 a

Letras distintas indican diferencias significativas según test de comparación de medias de Fisher ($p < 0,01$).

Caracterización molecular

Se desarrolló una técnica de PCR-Multiplex para dos marcadores SSR en el género *Brassica*. Los geles de poliacrilamida presentaron una buena resolución de los materiales cultivados, silvestres y los híbridos putativos entre ellos (Figura 2.1). La experimentación molecular permitió distinguir entre biotipos, identificando ambos controles correspondientes a las especies *B. napus* y *B. rapa*, y asignar la pertenencia genómica a los individuos objeto de estudio.

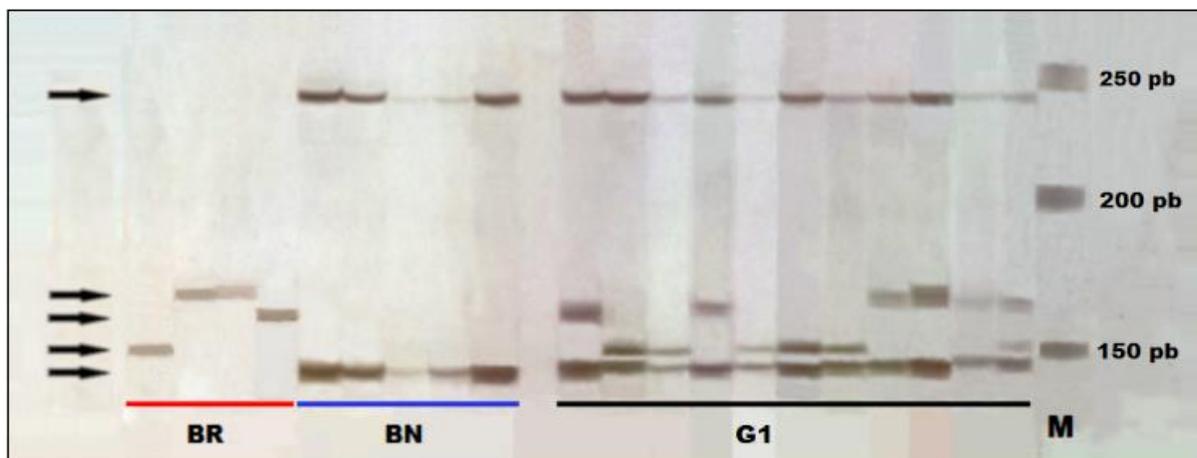


Figura 2.1. Patrón de amplificación correspondiente a la PCR-multiplex para individuos de los biotipos *B. napus*, *B. rapa* y G1. BR (calles 1-4): controles de la maleza (JUA y LDU); BN (calles 5-9): controles del cultivo (NEX y GOS); G1 (calles 11-21): individuos IMI-resistentes; M: Marcador de peso molecular. a) Alelo de 140 pb del SSR BRMS005. b) Alelo de 150 pb del SSR BRMS005. c) Alelo de 170 pb del SSR BRMS005. d) Alelo de 178 pb del SSR BRMS005. e) Alelo de 240 pb del SSR Ap1c5Pr.

De los dos loci SSR analizados solo el BRMS005 fue polimórfico con 4 alelos. Estos cuatro alelos se amplificaron en los individuos G1 IMI-resistentes, mientras que en los individuos control *B. rapa* se amplificaron tres alelos, y en *B. napus* solo uno. Por otro lado, el locus SSR AP1c5Pr fue monomórfico. Comparando las dos especies *B. rapa* y *B. napus*, se observó que el alelo de 140 pb correspondiente al locus BRMS005 solo se amplificó en *B. napus*. Asimismo, los alelos de 150 pb, 170 pb y 178 pb, de mayor peso, fueron exclusivos de la especie *B. rapa*, mientras que el SSR Ap1C5pr solo generó productos de amplificación en la especie *B. napus* (240 pb) y no en *B. rapa*, como era de esperarse (Tabla 2.5).

Se confirmó el carácter híbrido de la totalidad de individuos analizados de la G1 debido a que cumplieron con el doble requisito de: corroborar la presencia del genoma C, al amplificar segmentos de 240 pb correspondientes al SSR Ap1c5Pr; y presentar un patrón de bandas heterocigota para el locus BRMS005, conformado por un alelo específico de *B. napus* y otro de *B. rapa* en todos los casos. En cuanto al único individuo que sobrevivió a la aplicación de imidazolinonas en la G6, este presentó solo los alelos correspondientes a *B. napus* (BRMS005 140 pb, Apic5Pr 240 pb), por lo que sería un voluntario del cultivo de colza.

Tabla 2.5. Cantidad de individuos analizados y frecuencia alélica de los microsatélites utilizados (BRMS005, AP1C5pr) en los controles correspondientes a ambos parentales (BR y BN) y los individuos IMI-resistentes de la primera generación de híbridos *B. rapa* x *B. napus* (accesiones BAL 08A y BAL 08B), y el total de las dos poblaciones juntas.

		BR	BN	G1		G1
				a	B	a+b
Número de Individuos		8	8	31	15	46
Locus SSR	Alelo (pb)					
BRMS005	140	0,000	1,000	0,500	0,500	0,500
BRMS005	150	0,375	0,000	0,355	0,266	0,326
BRMS005	170	0,250	0,000	0,032	0,200	0,076
BRMS005	178	0,375	0,000	0,113	0,034	0,098
Ap1c5Pr	240	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000

El análisis molecular mediante marcadores CAPS en los individuos G1a y G1b, que sobrevivieron al herbicida, confirmó la presencia de la mutación PM2 del gen *BnAHAS3* en estado heterocigota en la totalidad de los individuos analizados. Los individuos NEX control generaron productos de amplificación, pero la enzima *BsrDI* no reconoció el sitio de restricción, por lo que presentaron el alelo mutante trp-574-leu en forma homocigota. Por otro lado, en los controles susceptibles JUA se produjo el clivaje del segmento de ADN previamente amplificado por PCR, por lo que fueron asignadas como susceptibles homocigotas (Figura 2.2).

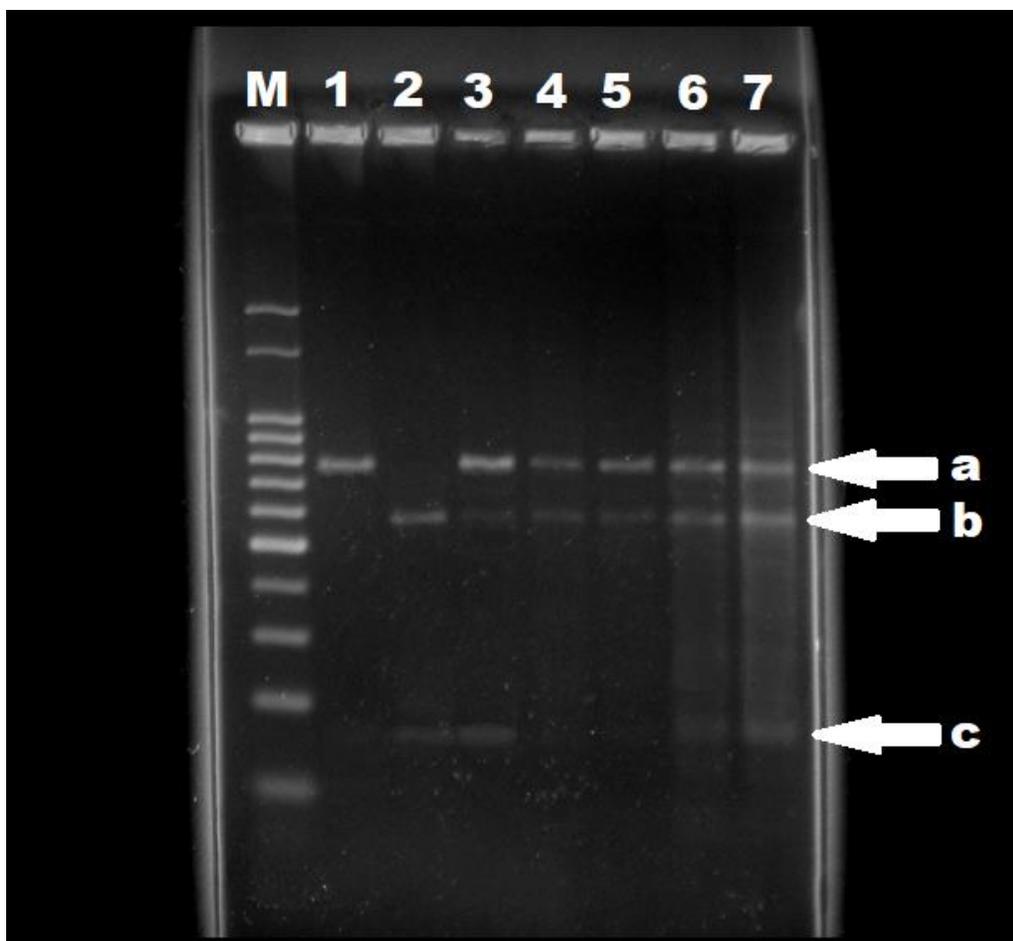


Figura 2.2. Caracterización molecular y detección de la mutación *BNAHAS3* en híbridos interespecíficos entre un cultivar de colza IMI-resistente y la maleza *B. rapa* mediante uso de marcadores CAPS. 1: control resistente (NEX); 2: control susceptible (JUA); 3-5: individuos G1a; 6-7: Individuos G1b; M: Marcador de peso molecular. a) Alelo de 766 pb. b) Alelo de 570 pb c) Alelo de 196 pb.

Discusión

Hasta la fecha, no se ha encontrado una mutación espontánea en individuos de la especie *B. rapa* que confiera resistencia a herbicidas inhibidores de la síntesis de ALS (Heap, 2018). El *screening* con imazapir descrito en este capítulo permitió detectar una proporción significativa de plantas resistentes a la aplicación del herbicida de la familia de las imidazolinonas, en la progenie de una población de *B. rapa* del partido de Balcarce. Este caso fue documentado en la Red de Conocimiento de Malezas Resistentes del AAPRESID (REM, 2014b) y en una publicación científica con referato (Ureta *et al.*, 2017).

A pesar de que las dos accesiones que presentaron individuos IMI-resistentes se colectaron en el mismo año y solo a poco más de 200 m de distancia, una de las dos mostró una frecuencia de individuos resistentes significativamente mayor a la otra. La accesión G1a (BAL1 en el primer capítulo) se ubicó entre dos lotes de colza Nexera 8450, mientras que G1b (BAL2) se encontró entre un lote de colza Gospel y otro Nexera. Como se ha mencionado previamente, la sincronía floral entre la maleza y los dos cultivares fue constatada en el establecimiento. Por otra parte, en estos cultivos no se colocaron colmenas de abejas, por lo que no hubo más polinizadores que los naturales. En el partido de Balcarce entre los meses de agosto y abril la frecuencia de viento suele ser predominante desde el norte hacia el sur (<https://www.weatherspark.com/y> <https://www.meteoblue.com/>). Esto indica que los individuos *B. rapa* sobre los que se cosechó la accesión G1a, se habrían visto favorecidos tanto por encontrarse entre dos lotes Nexera, como por una polinización predominante desde el lote de este cultivar que se encontraba hacia el nortee-noreste de la población. Por otro lado, la colección G1b limitaba hacia el norte con un lote en barbecho, y poseía el lote de Nexera y el de Gospel hacia el oeste y el este, respectivamente.

La caracterización molecular permitió una rápida identificación entre especies del género *Brassica* e híbridos interespecíficos. La presencia conjunta del genoma A y C en los individuos IMI-resistentes, y el estado heterocigota en el que se encontraba el alelo mutante (PM2) del gen *BnAHAS3*, permitieron confirmar que los individuos cultivo-maleza eran híbridos interespecíficos. Además, debido a que, según los registros del establecimiento, el último cultivo de colza se había realizado 12 años previos al caso de estudio; que el evento de resistencia a imidazolinonas en colza comenzó a estudiarse en el país en 2008; que los cultivares con esta resistencia no fueron liberados comercialmente sino hasta el año 2013 (INASE, 2017) y que las plantas híbridas eran progenie de la población *B. rapa* lindante al cultivar Nexera 8450, se considera que los individuos cosechados sobre las plantas *B. rapa* provenían de la primera generación de híbridos cultivo-maleza.

Por lo tanto, la presencia simpátrica del cultivar de colza CL y la maleza, sumado a la ausencia de individuos homocigotas para la mutación PM2, que indicaría algún nivel de segregación, corroboran que el carácter de IMI-resistencia fue adquirido a través de la hibridación espontánea entre el cultivar NEXERA 8450 hacia el nabo silvestre en el centro del área productiva de la Argentina.

Numerosos autores han alertado sobre el riesgo de que genes de la especie cultivada *B. napus* puedan introgresarse con éxito en el genoma de la especie *B. rapa* (Hansen *et al.*, 2001), incluyendo genes que confieren resistencia a herbicidas (Jorgensen y Andersen, 1994; Mikkelsen *et al.*, 1996a; Liu *et al.*, 2013). En poblaciones de malezas, la selección de biotipos resistentes a

herbicidas está gobernada por varios factores (Beckie, 2006a), si bien la presión de selección debido a aplicaciones repetidas de herbicidas con el mismo sitio de acción es el factor más importante en la evolución de biotipos resistentes (Beckie, 2006a; Neve *et al.*, 2014). En este sentido, el año siguiente al cultivo de colza CL se realizó una aplicación de Misil® en el mismo lote sobre un cultivo de trigo. Este producto químico incluye un herbicida inhibidor de la ALS (Metsulfuron-metil) y un ácido benzoico (Dicamba). El herbicida Dicamba se encuentra registrado para el control de *B. rapa* en Argentina (CASAFE, 2013/2015) y como la mayoría de los herbicidas auxínicos, presenta baja persistencia en el suelo. Este tipo de herbicidas suelen generar menos presión de selección que los que controlan sucesivos nacimientos durante la temporada de crecimiento (Beckie, 2006a). Por el contrario, el Metsulfuron-metil al mantener actividad residual en el suelo (Cobb y Reade, 2010), habría ejercido su acción fitotóxica durante un período mayor. Al producirse nuevas cohortes de híbridos interespecíficos, los biotipos susceptibles podrían haber sido continuamente eliminados, mientras que los resistentes habrían sobrevivido.

Sin embargo, a pesar de la aparición de individuos F1 IMI-resistentes, que se han reportado casos de retrocruzas entre híbridos *B. rapa* x *B. napus* con la maleza parental (Jorgensen *et al.*, 1996; Mikkelsen *et al.*, 1996b), y que la presión selectiva estuvo presente, no se detectaron individuos IMI-resistentes dentro de la población en los seis años siguientes.

La época del año en la que tiene lugar la emergencia de plántulas y el período durante el cual las semillas viables persisten en el suelo son factores importantes que afectan el éxito de las poblaciones naturales en distintos ambientes. Una posible explicación por la cual el gen de resistencia no habría perdurado en el tiempo podría ser debido al patrón de germinación post-hibridación. El destino de los individuos F1 se podría dividir, en base al momento de reclutamiento, en tres fracciones: La primera, que no presentó dormición primaria, habría germinado bajo condiciones favorables en los cultivos subsiguientes a la colza, los cuales fueron una soja de segunda seguida por un cultivo de trigo; la segunda fracción, podría haber desarrollado dormición secundaria y perdurar por más tiempo; mientras que la última fracción incluiría semillas que sufrieron muerte, predación o germinación letal (Gulden *et al.*, 2003a).

Como se ha mencionado previamente, los híbridos interespecíficos muestran un bajo nivel de dormición primaria (Landbo y Jorgensen, 1997). Es por esto que la fracción primaria, sin dormición, habría sido la mayoritaria, generando individuos F1 que germinaron ante un ambiente favorable una vez que culminó el ciclo de la maleza. Es sabido que cuando voluntarios *B. napus* crecen en cultivos de verano luego de la cosecha, debido al acortamiento del ciclo, producen muy pocas semillas

(Tolstrup *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2007). Esta fracción habría emergido en un cultivo de soja sobre el que se efectuó control químico mediante glifosato. Si bien este producto químico no está registrado para el nabo silvestre en Argentina (CASAFE, 2013/2015), es un herbicida total sobre el que se han citado controles cercanos o iguales al 100% sobre *B. rapa* (Pandolfo *et al.*, 2018) y *B. napus* convencional (Pandolfo *et al.*, 2016), por lo que es de esperarse que los individuos que germinaron sobre el cultivo siguiente hayan sido eliminados. Los resultados de Landbo y Jorgensen (1997) indican que el escape en el tiempo podría ser más factible en semillas F2, o a partir de la primera generación de retrocruzas con *B. rapa*, debido a que las semillas presentan mayor dormición.

En cuanto a los individuos de la segunda fracción, estos habrían estado representados por un número considerablemente menor, ya que según lo registrado en los viajes de colecta realizados en el verano del año siguiente, se detectaron unas pocas plantas *B. rapa* y todavía menos individuos con caracteres intermedios entre *B. napus* y *B. rapa* solo en los bordes de los lotes que habían sido cultivados con colza IMI. Debido a la poca cantidad de semilla disponible, estos últimos no pudieron ser debidamente caracterizados ni tampoco presentaron resistencia al herbicida, según los resultados del *screening*. La dormición secundaria es reducida en sistemas de labranza cero debido a que las condiciones para inducir la misma son menos propicias, por encontrarse las semillas más cercanas a la superficie (Pekrun *et al.*, 1998; Lutman *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2004a; Jorgensen *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2015). En consecuencia, la inducción de dormición secundaria con este sistema de labranza solo podría ocurrir por la incorporación al suelo a través del corte realizado por la sembradora del cultivo siguiente, al caer en grietas o poros del suelo o al ser movilizadas por animales (Gruber *et al.*, 2004b).

Aun si a través de la dormición secundaria, las semillas de los híbridos interespecíficos hubieran sobrevivido a la predación por aves e insectos, y hubieran escapado al control del herbicida dicamba que se aplicó sobre el trigo siguiente, las mismas exhibirían baja competitividad con este cultivo debido a su reducida aptitud biológica (Gulden *et al.*, 2008). Como se discutió en el Capítulo 1, existen diversos resultados en donde los híbridos entre *B. napus* y *B. rapa* presentan un *fitness* intermedio (Hauser *et al.*, 1998b; Hauser *et al.*, 2003) o menor a ambas especies progenitoras (Warwick *et al.*, 2003; Allainguillaume *et al.*, 2006). De hecho las plantas F1 de Balcarce exhibieron reducida fertilidad en comparación con las especies parentales. Por lo tanto, estas plantas habrían generado una baja reposición al banco de semillas lo cual disminuyó su persistencia.

Por último, en estudios previos se ha demostrado que los eventos de introgresión no están solo relacionados al *fitness* híbrido, sino también, a la frecuencia local de las especies parentales y de las diferentes generaciones de híbridos (F1, retrocruzas y generaciones avanzadas). Por lo tanto, la transmisión de genes desde los híbridos de primera generación hacia la maleza a través del polen es biológicamente más difícil y solo posible si las plantas F1 se encuentran en una frecuencia mayor a su parental *B. rapa* (Pertl *et al.*, 2002; Hauser *et al.*, 2003), lo cual no sucedió en la situación de Balcarce.

En conclusión, tanto la ausencia de dormición primaria, como la reducida aptitud biológica de los híbridos habrían actuado en contra del establecimiento de un gran número de individuos. Esto habría minimizado la posibilidad de retrocruzamiento con la maleza, evitando así perpetuar el gen de IMI-resistencia en generaciones avanzadas. El productor, al apostar a diversos cultivos junto con la combinación de distintos modos de acción, disminuyó considerablemente el riesgo potencial presente. Debido a esto, al cabo de una sola generación la presencia del gen de IMI-resistencia en el lote donde inicialmente se produjo la hibridación fue controlada.

CAPITULO III

RELEVAMIENTO DE POBLACIONES BRASICÉAS CON RESISTENCIA TRANSGÉNICA A GLIFOSATO Y GLUFOSINATO DE AMONIO

Introducción

El advenimiento de cultivos genéticamente modificados (GM) y su notable expansión en términos de área cultivada ha abierto intensos debates sobre su seguridad. Se han planteado inquietudes acerca de la liberación comercial de cultivos GM, y la posibilidad de que generen efectos ambientales y económicos adversos (Devos *et al.*, 2012).

En regiones donde el cultivo de colza transgénica se encuentra autorizado, como en Canadá, E.E. U.U. y Australia suelen aparecer poblaciones ferales de *B. napus* GM (Yoshimura *et al.*, 2006; Knispel y McLachlan, 2010; Schafer *et al.*, 2011; Devos *et al.*, 2012; Busi y Powles, 2016). Sin embargo, lo mismo se ha reportado en países donde los cultivares transgénicos no estaban autorizadas, como Japón, Bélgica y Suiza. Allí aparecen en zonas portuarias, caminos y vías férreas, posiblemente debido a la dispersión de propágulos por el manipuleo y transporte de granos importados (Saji *et al.*, 2005; Aono *et al.*, 2006; Nishizawa *et al.*, 2009; Devos *et al.*, 2012; Schoenenberger y D'Andrea, 2012; Hecht *et al.*, 2014; Schulze *et al.*, 2014). Inclusive se han citado casos de poblaciones ferales de *B. napus* con resistencia transgénica a glifosato, a glufosinato de amonio y a ambos herbicidas apilados en forma múltiple, sugiriendo en este último caso, la ocurrencia de flujo intraespecífico en los hábitats ferales y el apilamiento génico (Hall *et al.*, 2000; Beckie *et al.*, 2003; Beckie *et al.*, 2004; Aono *et al.*, 2006; Knispel *et al.*, 2008; Devos *et al.*, 2012). Asimismo, se han citado casos de híbridos *B. rapa* x *B. napus* con resistencia transgénica a glifosato (Yoshimura *et al.*, 2006; Aono *et al.*, 2011) y el caso de una población *B. rapa* con el transgen introgresado en forma estable, el cual perduró por 6 años en ausencia de presión de selección mediante herbicida (Warwick *et al.*, 2008).

El glifosato es el herbicida, por volumen y área tratada, más utilizado en el mundo (Duke y Dayan, 2011; Green, 2012). Es un herbicida sistémico que preferencialmente se trasloca a los destinos metabólicos como los tejidos meristemáticos, y es el único producto químico que inhibe la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, comúnmente conocida como EPSPS, la cual participa en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Padgett *et al.*, 1995; Powles y Yu, 2010; Duke y Dayan, 2011). El evento transgénico GT73 (o RT73) confiere a la colza resistencia al herbicida glifosato (Monsanto, 2002). Consiste en una construcción genética que

contiene dos genes: uno que codifica la enzima EPSPS insensible al herbicida, de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* CP4 (CP4 EPSPS) (Padgett *et al.*, 1995); mientras que el otro gen codifica la *glifosato-oxidorreductasa*, una enzima que degrada el glifosato en la planta (Barry y Kishore, 1995). La proteína CP4 EPSPS, reduce la afinidad entre el herbicida y el complejo enzima-sustrato, lo que permite que se catalicen normalmente las reacciones de síntesis de aminoácidos aromáticos (Green, 2009; Cobb y Reade, 2010). Los cultivares de colza con resistencia transgénica a glifosato se denominan comercialmente como Roundup Ready® o RR.

Para la detección y cuantificación de organismos GM, el método de PCR es ampliamente utilizado debido a la naturaleza estable de la molécula de ADN y a la sensibilidad de esta tecnología. Se han publicado métodos de PCR cuali y cuantitativa para la detección de eventos GM en colza-canola (Demeke y Ratnayaka, 2008). En este sentido, Monsanto ha desarrollado un protocolo para la detección del evento GT73 de canola (Monsanto, 2004), el cual fue validado por la Comisión Europea en el Protocolo *RT73-Community Reference Laboratory for GMO Food and Feeds* (Mazzara *et al.*, 2007).

El glufosinato de amonio, como el glifosato, es un herbicida de amplio espectro, e inhibe la enzima *glutamina sintetasa* (Cobb y Reade, 2010). Esta proteína está involucrada en la asimilación de amonio, catalizando la conversión del glutamato y el amonio en glutamina (Cobb y Reade, 2010). La inhibición de este proceso resulta en una rápida acumulación de amonio tóxico, agotamiento de glutamina y otros aminoácidos, un decaimiento rápido de la fijación de carbono y culmina con la muerte de la planta (Coetzer *et al.*, 2001; Sellers *et al.*, 2003; Duke y Dayan, 2011). Los genes *pat* y *bar*, provenientes de diferentes especies de *Streptomyces* sp., codifican enzimas que inactivan el glufosinato por acetilación (Wehrmann *et al.*, 1996) y han sido introducidas en muchas especies cultivadas, incluyendo a la colza (Beckie *et al.*, 2003; Duke y Dayan, 2011). Debido a un mayor costo y menor performance del herbicida respecto al glifosato, los cultivares resistentes a glufosinato de amonio (LL) han tenido un mercado más reducido. Sin embargo, actualmente su uso ha ido en aumento sobre todo en lotes infestados con malezas resistentes a glifosato (Duke y Dayan, 2011).

En Argentina, debido al riesgo que generaba la existencia de parientes silvestres naturalizados con los cuales podía ocasionarse flujo génico, se denegó en 1997 la solicitud para realizar actividades experimentales a campo con *B. napus* resistente a glifosato (SAGPYA, Resolución 228/97). Por otro lado, en el año 2007, el INASE (Instituto Nacional de Semillas) a través de la Resolución 305/07, prohibió la importación de colza portadora de eventos transgénicos no autorizados para su

producción y comercialización en el país, y, además, condicionó la solicitud de importación de semillas de esta especie al acompañamiento de un certificado de análisis que acredite que la misma se hallara libre de eventos transgénicos.

A pesar de la efectivización de estas medidas, en el año 2012 se hallaron poblaciones de *B. napus* con resistencia transgénica a glifosato en lotes del SE de la provincia de Buenos Aires que no contaban con historia reciente de cultivos de colza (Pandolfo *et al.*, 2016). Simultáneamente, poblaciones naturales de *B. rapa* con resistencia múltiple a glifosato e inhibidores de AHAS se detectaron en la misma región (Pandolfo *et al.*, 2018). El origen de estos biotipos es incierto, y pudo deberse a la siembra informal de colza RR o a la introducción accidental de semilla transgénica como contaminante de cultivares comerciales o de grano para industria importados al país, previo al año 2007. Hasta 2016, todos los cultivares de colza que se comercializaban en el país eran introducciones de los principales centros mundiales de mejoramiento, algunos de los cuales producen colza RR y LL (Canadá, EEUU y Australia) (Liliana Iriarte, comunicación personal; INASE, 2017). Chile es el país más cercano en donde se cultiva colza transgénica, solo para exportación. Sin embargo, los datos existentes revelan importaciones provenientes desde allí con posterioridad al año 2007 (INDEC, 2017), y tampoco existen reportes de *B. rapa* resistente en el mismo.

Debido a la presencia de biotipos ferales de *B. napus* GM con resistencia transgénica a glifosato, a que *B. rapa* tiene un alto potencial de hibridación con la colza cultivada en forma espontánea (Warwick *et al.*, 2003), y a que se han citado tasas de entrecruzamiento en esta especie que varían entre un 12% y un 47% (Becker *et al.*, 1992), existe la posibilidad de hallar nuevas poblaciones de *B. napus* y/o *B. rapa* con resistencia a glifosato o a glufosinato de amonio; y que el cruzamiento intraespecífico haya generado biotipos de colza con resistencia transgénica múltiple a ambos herbicidas. Por lo tanto, estas situaciones deben ser estudiadas.

Los objetivos de este capítulo fueron: a) Detectar la presencia del evento GT73 en distintas poblaciones Brassicáceas de la Región Pampeana; b) Evaluar la respuesta a glufosinato de amonio en poblaciones de *B. napus* y *B. rapa* con resistencia transgénica a glifosato.

Materiales y Métodos

Screening de individuos resistentes a glifosato y glufosinato de amonio

Para el relevamiento de individuos resistentes a glifosato (GLI) se utilizaron diez accesiones de la especie *B. napus* (BN) y dos accesiones de la especie *B. rapa* (BR) provenientes de distintos lotes

agrícolas de la región pampeana (Tabla 4.1). La siembra se realizó sobre macetas de 15 cm de diámetro (unidad experimental) compuestas de una mezcla de suelo y sustrato comercial (Grow Mix® Terrafertil) en una proporción 3:1. Las plantas se desarrollaron en invernáculo, con riego automático diario. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado considerando a las accesiones como tratamientos. Se utilizaron 10 repeticiones para las accesiones BN, excepto en el caso de la accesión PIE y las colecciones BR en las que la cantidad de semilla disponible solo alcanzó para completar 5 repeticiones. Se utilizó un control resistente y un control susceptible según Moss *et al.* (1999). Debido a la normativa que prohíbe importar cultivares de colza RR, a modo de control resistente se utilizó la población feral GER de *B. napus*, la cual fue caracterizada por Pandolfo *et al.* (2016). El control susceptible se sembró con el doble de repeticiones que el resto de las accesiones debido a que 10 unidades experimentales fueron tratadas con herbicida y las 10 restantes se utilizaron como control no pulverizado.

A los 28 días después de la siembra (DDS), cuando las plantas se encontraban en un estadio de 2-3 hojas (B2-B3, CETIOM), se hizo un recuento y raleo de individuos para alcanzar $n = 10$ en cada unidad experimental y posteriormente se realizó la aplicación del herbicida. Se utilizó una doble dosis comercial ($2X = 2,16 \text{ kg e.a. ha}^{-1} = 6 \text{ L P.C. ha}^{-1}$) del herbicida Credit® (glifosato formulado como sal isopropilamina al 48%) con un equipo experimental provisto por una pastilla Teejet 8001 EVB. Se trabajó a una velocidad de $1,45 \text{ km h}^{-1}$ con un caudal de 195 L ha^{-1} y una presión de 290 kPa. Luego de 31 días de la aplicación (DDA) se evaluó la supervivencia de las plantas a través de la escala binaria: 0 = sin síntomas visibles, 1 = muerte del meristema de crecimiento, se cosecho el tejido aéreo remanente de las plantas y este fue secado en estufa a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar peso constante.

En forma similar al experimento GLI, se realizó un *screening* de individuos resistentes a glufosinato de amonio (GLU). Para el mismo se utilizaron 2 accesiones de la especie *B. napus* y 2 accesiones correspondientes a *B. rapa*, colectadas dentro de lotes de soja en la región pampeana y de probada resistencia transgénica al herbicida glifosato (Tabla 3.1; Figura 3.1) (Pandolfo *et al.*, 2016; Pandolfo *et al.*, 2018). La siembra y el diseño experimental se realizaron de la misma manera que para el experimento GLI, con 15 repeticiones para todos los tratamientos. En este experimento, debido a la ausencia de biotipos resistentes a glufosinato en el país, se incluyó un control susceptible que no fue tratado por el herbicida (JUA-C) en forma adicional a los dos controles susceptibles de cada una de las especies, los cuales fueron pulverizados con el herbicida. A los 54 DDS, cuando las plantas se encontraban en un estadio de 3-4 hojas (B3-B4, CETIOM), se realizó el raleo de individuos para alcanzar $n = 10$ en cada unidad experimental y posteriormente se pulverizó con el herbicida.

Utilizando el mismo equipo y condiciones de pulverizado que en GLI se aplicó una doble dosis comercial ($2X = 0,8 \text{ kg i.a. ha}^{-1} = 4 \text{ L P.C. ha}^{-1}$) del herbicida Liberty® (glufosinato de amonio formulado al 20%). Luego de 21 DDA, se evaluó la supervivencia de los individuos de la misma manera que en el experimento GLI y a los 33 DDA se cosecharon las plantas para ser secadas en estufa. La respuesta en ambas experimentaciones fue expresada como porcentaje del total de plantas sin síntomas visibles, y como porcentaje de reducción del peso de la materia seca respecto del control susceptible no tratado (adaptado de Moss *et al.*, 1999).

Tabla 3.1. Acciones utilizadas en el *screening* de resistencia a glifosato y glufosinato de amonio, especie a la que pertenecen, año de recolección, origen y experimentos en los que participó.

Especie	Recolección	Accesión	Origen	Experimento
<i>Brassica napus</i>	2008	PRI	Pringles	GLI
<i>Brassica napus</i>	2009	RIO	Río Cuarto	GLI
<i>Brassica napus</i>	2009	BAL a	Balcarce	GLI
<i>Brassica napus</i>	2009	BAL b	Balcarce	GLI
<i>Brassica napus</i>	2011	AZU a	Azul	GLI
<i>Brassica napus</i>	2011	LOB	Lobería	GLI
<i>Brassica napus</i>	2011	PIE	Pieres	GLI
<i>Brassica napus</i>	2013	DOR	Dorrego	GLI
<i>Brassica napus</i>	2013	GVI	General Villegas	GLI
<i>Brassica napus</i>	2013	ENE	Energía	GLI
<i>Brassica napus</i>	2015	SMA	San Mayol	GLI
<i>Brassica napus</i>	2008	NEX	Cv. comercial	GLI Control S
<i>Brassica napus</i>	2013	GER	Gonzales Chaves	GLI Control R
<i>Brassica rapa</i>	2011	TAN	Tandil	GLI
<i>Brassica rapa</i>	2015	LDU	La Dulce	GLI
<i>Brassica napus</i>	2015	SMA	San Mayol	GLU
<i>Brassica napus</i>	2008	NEX	Cv. comercial	GLU Control S
<i>Brassica napus</i>	2013	GER	Gonzales Chaves	GLU
<i>Brassica rapa</i>	2015	LDU	La Dulce	GLU
<i>Brassica rapa</i>	2016	AZU b	Azul	GLU
<i>Brassica rapa</i>	2009	JUA	Benito Juárez	GLU Control S

GLI corresponde al experimento de *screening* de individuos resistentes a glifosato.

GLU corresponde al experimento de *screening* de individuos resistentes a glufosinato de amonio.

En ambas actividades experimentales, para ajustar los datos a una distribución normal, fueron transformados mediante la siguiente función (Ahrens *et al.*, 1990):

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

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA y las medias se compararon a través de la prueba de Fisher ($p \leq 0,05$). Una colección era considerada como resistente si se diferenciaba estadísticamente del control susceptible, y si además presentaba menos de un 80% de reducción de la biomasa, como fue descrito por Moss *et al.* (1999).



Figura 3.1. Arriba: Individuos *B. rapa* en distintos ambientes con deficiente control mediante glifosato. A) Individuos de la población LDU creciendo cerca de una alcantarilla de la Ruta Prov. N° 86 luego de la aplicación de glifosato; B) Plantas de de la población AZU b dentro de un lote de soja en madurez fisiológica. Abajo: Individuos *B. napus* en lotes de soja con deficiente control mediante glifosato. C) Individuos de la población GER en estado reproductivo dentro de una soja en estado vegetativo en 2012. D) La misma población GER en estado de fructificación dentro de una soja en R5-R6 durante el año 2014.

Caracterización molecular

Sobre las colecciones que sobrevivieron al experimento GLI, se realizó un análisis molecular para determinar si la resistencia al mismo se debía a la presencia del evento transgénico GT73. Por lo tanto, se volvió a realizar la siembra con las accesiones resistentes, y se aplicó nuevamente el herbicida en las mismas condiciones que para el experimento inicial, con el objeto de descartar de la población individuos que fueran susceptibles. Luego de 32 DDA se tomó la hoja más joven de un subgrupo (n = 3) de las plantas resistentes de cada accesión. A modo de control susceptible se utilizó el cv. NEX y como control resistente se empleó la accesión GER, ambos de la especie *B. napus*. El protocolo de extracción de ADN fue el mismo que el utilizado en el Capítulo 1 y 2 de esta tesis. La presencia del transgen que confiere resistencia a glifosato se detectó mediante una PCR basada en el método desarrollado para la detección del evento GT73 (Monsanto, 2004) y validado por la Comisión Europea (Mazzara *et al.*, 2007). Los *primers RT73*⁴ utilizados amplifican un producto de 108 pb que comprende la región recombinante entre la construcción transgénica y el genoma de la colza. La integridad del ADN fue previamente chequeada mediante el par de *primers* BRMS005, específicos del genoma A de *Brassica*.

La PCR se llevo a cabo en un ciclador BioRad modelo *My Cycler™ Thermal Cycler*. En un volumen de reacción final de 20 µL se colocaron: 30 ng de ADN, Buffer PCR 1X Gibco, MgCl₂ (0,05 nM), dNTP (0,625 nM de cada uno), *primers RT73* (10 pM de cada uno) y Taq polimerasa (1U), llevando a volumen con agua ultra pura. La desnaturalización inicial se realizó a 95°C durante 5 minutos, seguida de un ciclo compuesto por 94°C por 30 seg, 54°C por 45 seg y 72°C por 1 min, con una extensión final de 20 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron posteriormente en geles de agarosa TAE 2%. Se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pb de la empresa Productos Bio-Lógicos. La corrida electroforética se desarrolló a 75 V por 1:30 h, posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio para su visualización. La lectura de los fragmentos de ADN fue visual, asumiendo que la banda de 108 pb representa la presencia del evento transgénico GT73.

Resultados

Screening de individuos resistentes a glifosato y glufosinato de amonio

En el *screening* GLI, la accesión GER presentó un nivel de resistencia elevado, con un 94,4% de individuos resistentes y un 5% de reducción de la materia seca remanente respecto al control sin

⁴5'-CCATATTGACCATCATACTCATTGCT-3' y 5'-GCTTATACGAAGGCAAGAAAAGGA-3'

pulverizar, en concordancia con lo obtenido en experimentaciones previas, y validando su elección como control resistente. En cuanto a las poblaciones bajo estudio, se encontraron individuos resistentes a la aplicación del herbicida glifosato en una de las diez accesiones BN evaluadas. La población SMA presentó un 37,4% de supervivencia, mientras que los individuos de las poblaciones restantes mostraron síntomas de fitotoxicidad típica del herbicida y muerte del meristema de crecimiento en todas las unidades experimentales (Figura 3.2). Exceptuando a SMA, la proporción de biomasa remanente fue significativamente menor al control susceptible sin tratar en todos los casos. Por el lado de las colecciones BR, solamente se encontraron plantas con resistencia al herbicida en la población LDU, la cual presentó un 68,9% de los individuos con el meristema de crecimiento intacto. Tanto en SMA como en LDU la biomasa remanente no se diferenció significativamente del control GER (Figura 3.3).



Figura 3.2. A) Mortalidad observada 15 DDA por la aplicación de $2,16 \text{ kg e.a. ha}^{-1}$ de glifosato sobre individuos no resistentes al herbicida. B) Comparación visual de los efectos del herbicida sobre la accesión resistente GER y otra susceptible, con mortalidad total de los individuos.

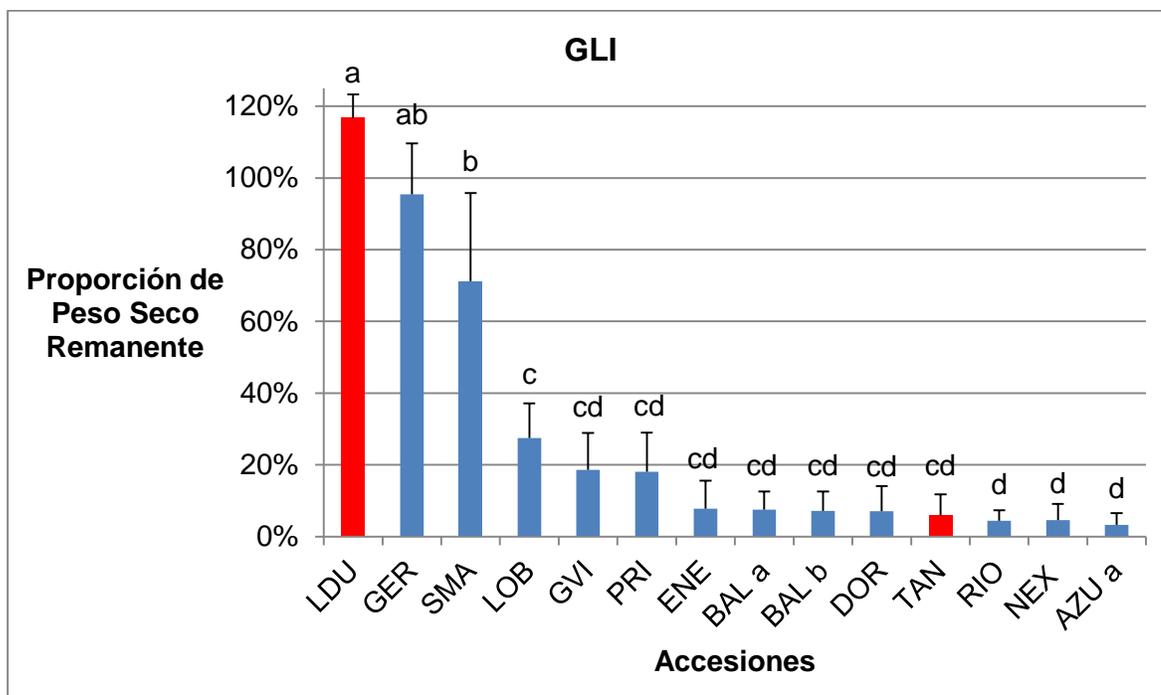


Figura 3.3. Proporción del peso seco remanente (media y error estándar) en las accesiones BN (azul) y BR (rojo) respecto del control no pulverizado 31 DDA de glifosato. Barras con distinta letra presentan diferencias significativas según prueba de Fisher ($p > 0,05$).

Control susceptible: NEX. Control resistente: GER.

Por otra parte, ninguna de las poblaciones evaluadas de *B. napus* y *B. rapa* presentaron individuos con resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Los síntomas de clorosis y marchitamiento de hojas aparecieron a los pocos días de efectuado el tratamiento y en la estimación visual realizada 21 DDA se determinó un control total de los individuos correspondientes a las accesiones evaluadas (Figura 3.4). En cuanto a la biomasa remanente, si bien SMA, LDU y NEX 8450 presentaron niveles de reducción de la misma por debajo del umbral del 80%, todas las colecciones se diferenciaron estadísticamente del control no tratado (JUA-C) (Figura 3.5).



Figura 3.4. A) Mortalidad observada 21 DDA en todos los biotipos pulverizados con 0,8 kg i.a. ha⁻¹ de glufosinato de amonio. B) Comparación visual de la mortalidad en un biotipo pulverizado y el control no pulverizado.

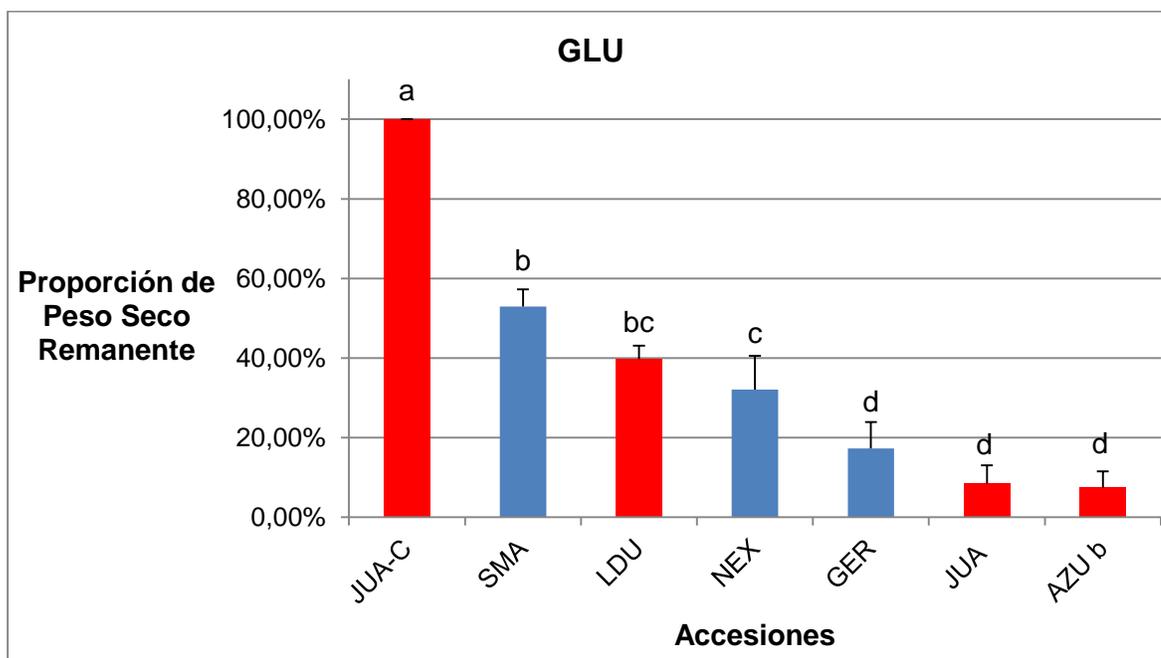


Figura 3.5. Proporción del peso seco remanente (media y error estándar) del control sin tratar (JUA-C), y de las accesiones BN (azul) y BR (rojo) respecto del control no pulverizado 33 DDA. Barras con distinta letra presentan diferencias significativas según prueba de Fisher ($p > 0,05$).

Control susceptible BR: JUA. Control susceptible BN: NEX.

Caracterización molecular

A partir de los resultados obtenidos en GLI, se realizó la experimentación molecular sobre las colecciones SMA y LDU. Todos los individuos evaluados de ambas colecciones amplificaron el fragmento de 108 pb correspondiente al evento GT73, confirmando el origen transgénico de la resistencia al herbicida. Como era de esperarse, el control resistente GER presentó el fragmento

correspondiente al evento, mientras que el producto no fue amplificado en ninguno de los individuos susceptibles del cv. NEX (Figura 3.6).

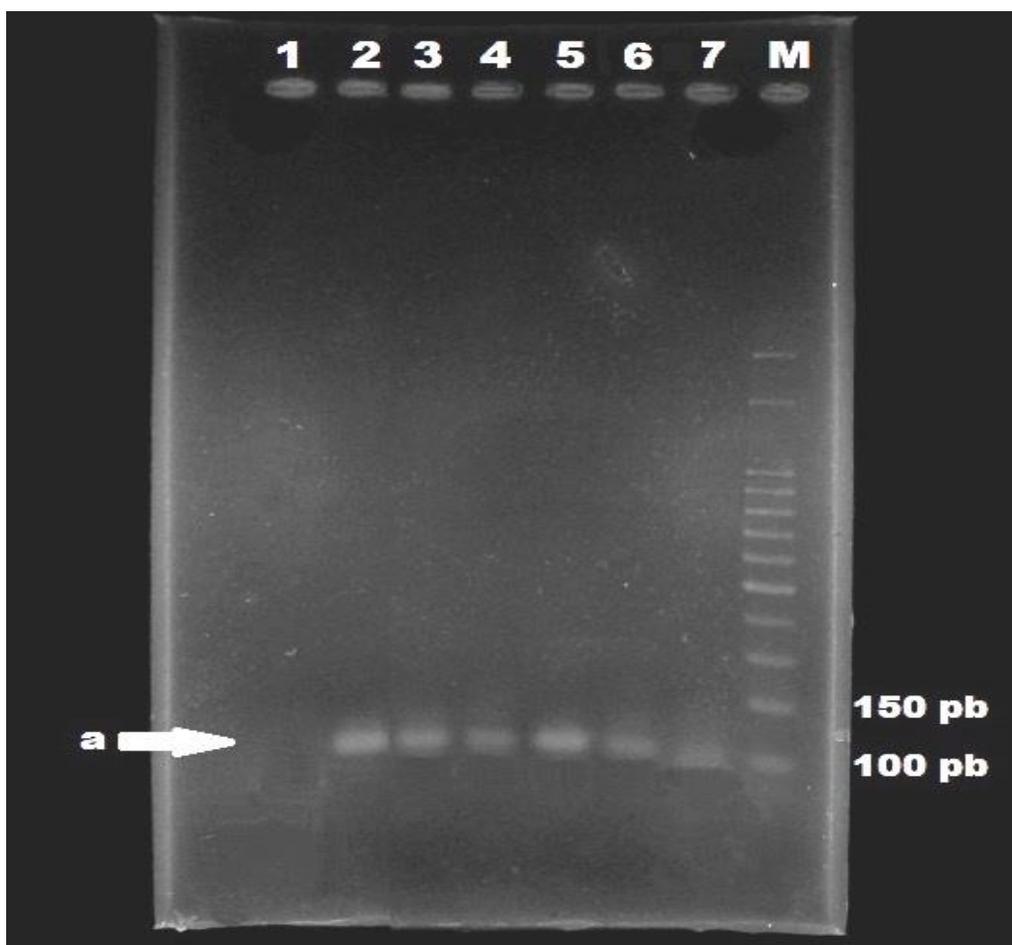


Figura 3.6. Patrón de amplificación obtenido mediante el *primer* RT73 para el cultivar NEX (1), la población *B. napus* feral de GER (2), y las accesiones LDU (3-4) y SMA (5-6). La 7ma calle corresponde a un control negativo. a) Alelo de 108 pb.

Discusión

Del total de poblaciones *B. napus* y *B. rapa* evaluadas solo una accesión de cada especie, provenientes de los partidos de Necochea y Tres arroyos, mostraron niveles de resistencia elevados al herbicida glifosato en experimentos controlados. El origen transgénico de la resistencia fue confirmado a partir de marcadores moleculares en ambos casos.

La presencia de poblaciones naturales de *B. rapa* con eventos transgénicos puede deberse a flujo génico desde *B. napus* RR, o por la presencia adventicia de individuos de la maleza con el evento,

como contaminantes de semilla importada. Si bien en 1998 se liberó en Canadá un cultivar de *B. rapa* RR, la misma fue prohibida en el año 2003, por lo que desde hace más de 14 años la única especie que se ha comercializado con el evento GT73 es *B. napus* (ISAAA, 2018). Así como en países donde la producción de cultivares transgénicos no estaba permitido, la presencia de *B. napus* feral resistente a glifosato se ha reportado recientemente en Argentina (Pandolfo *et al.*, 2016). Su origen, podría deberse al cultivo informal de colza transgénica o la introducción de contaminantes dentro de la semilla importada, previo al año 2007, cuando la legislación nacional reguló como obligatorio el análisis probatorio de ausencia de material GM (INASE, 2007).

La población SMA fue colectada en 2015 en estado de fructificación, de un lote en barbecho químico, dentro del mismo establecimiento y a menos de 1,8 km del sitio donde en 2012 se había detectado una población de *B. napus* con resistencia transgénica a glifosato. De acuerdo a información brindada por el productor, en la campaña 2006/2007 se había sembrado una colza de origen incierto, de la que luego emergieron plantas voluntarias resistentes (Pandolfo *et al.*, 2016). La población de colza transgénica hallada en 2012 presentaba valores intermedios entre el cultivo y la maleza para el contenido de glucosinolatos y ácido erúxico (Claudio Pandolfo, comunicación personal). Debido a que la accesión colectada en el año 2015 presentaba rasgos de *B. rapa* en su fenotipo (datos no mostrados), no se descarta que haya existido un evento de hibridación con esta especie en años previos y, por lo tanto, los individuos resistentes de la accesión *B. napus* de SMA podrían ser individuos de generaciones avanzadas de este cruzamiento. Esto explicaría el nivel de segregación observado en el rasgo de resistencia.

El origen de la población LDU estaría asociado a flujo génico con colza RR y posterior introgresión del transgen. Esta accesión presentó una estabilidad mayor a SMA en la proporción de individuos resistentes y un contenido cromosómico diploide. Asimismo, no existen registros de poblaciones ferales de colza en su cercanía (Pandolfo *et al.*, 2018). Estas características sugieren que el proceso de introgresión se encontraba en etapas avanzadas al momento de la recolección. Por lo tanto, se hipotetiza que los individuos *B. rapa* introgresados fueron introducidos accidentalmente al país, desde alguno de los países donde la producción de colza GM está autorizada.

La presencia accidental de individuos fuera de tipo en Canadá no es infrecuente en lotes de semilla certificada. Allí, en evaluaciones sobre esta clase de semilla, se encontraron hasta un 0,30% de individuos con resistencia transgénica múltiple a glifosato y glufosinato de amonio, cuando el umbral de plantas fuera de tipo para esta clase en ese país es de 0,25% (Beckie *et al.*, 2003). En tanto Friesen *et al.* (2003) hallaron en lotes de semilla de colza convencional contaminación con

individuos GM por encima de un 2,0%. Una vez introducida en Argentina, la semilla pudo haberse dispersado largas distancias a través de la maquinaria agrícola, durante la cosecha o por la caída de semillas en el transporte (von der Lippe y Kowarik, 2007).

La existencia de casos de resistencia múltiple a glifosato y glufosinato en *B. napus* (Hall *et al.*, 2000; Beckie *et al.*, 2003; Aono *et al.*, 2006) y *B. rapa* (Yoshimura *et al.*, 2006; Warwick *et al.*, 2008; Aono *et al.*, 2011), permite suponer que, en estas especies, el potencial de apilamiento de transgenes con resistencia a herbicidas mediante el flujo de genes es elevado. El experimento GLU evidenció la ausencia de resistencia al herbicida glufosinato de amonio en poblaciones de colza y nabo provenientes de la región pampeana. Tampoco se ha reportado hasta la fecha la presencia de biotipos con resistencia a este herbicida en el país (<http://www.aapresid.org.ar/rem/>; <http://www.weedscience.com/>; Heap, 2018), por lo que este producto químico continúa siendo una buena alternativa para controlar poblaciones resistentes.

La ausencia de biotipos con resistencia a glufosinato se podría atribuir a dos factores. El primero, se debe al área sembrada con cultivares resistentes a este herbicida en las regiones donde está autorizado, debido a que la colza LL no ha captado tanto mercado como si lo hicieron los cultivares RR (Reddy y Nandula, 2012). En Canadá, uno de los principales países desde donde se importa semilla y grano para industria a nuestro país (INDEC, 2017), los cultivares de colza con resistencia a glufosinato no presentan menor importancia que sus contrapartes resistentes a glifosato, y ocupan un 32% del área sembrada con cultivares resistentes a herbicidas respecto al 50% cultivado con genotipos RR (Beckie *et al.*, 2006b). Si bien biotipos de colza LL se han detectado en diversos países donde no estaba autorizada como Japón y Bélgica, desde los cuales también se han realizado importaciones de semilla en forma casual durante los últimos 15 años (INDEC, 2017), las poblaciones resistentes aparecen allí en ambientes ruderales, asociadas principalmente a la pérdida de propágulos durante el transporte de granos importados, y no dentro de campos cultivados (Devos *et al.*, 2012), por lo que la proporción de semilla GM presente en lotes de exportación sería casi nula. El segundo factor, y tal vez el más importante, se debería a la falta de presión de selección intensa y continua a través de este producto químico en nuestro país. La consolidación en la región pampeana de un modelo productivo basado en escasas o nulas rotaciones y en una dependencia casi exclusiva del glifosato (Vitta *et al.*, 2004; Papa y Tuesca, 2014) ocasiona que, en relación al mismo, el uso de principios activos alternativos sea muy inferior. De todas maneras, la utilidad del glufosinato de amonio como herbicida alternativo para el control de biotipos resistentes a glifosato podría no ser suficiente para erradicar los mismos y su perdurabilidad como alternativa de control estaría sujeta al éxito en las barreras de control de colza importada. Incluso pequeños

niveles de impurezas pueden no ser detectadas bajo los actuales límites y sin embargo ser causantes de introducciones accidentales de plantas GM en ambientes libres de ellas (Schulze *et al.*, 2015).

En la actualidad, la presencia de poblaciones *B. napus* y *B. rapa* con resistencia transgénica a glifosato en Argentina representa un escenario ambiental negativo, debido a la liberación de un transgén en ambientes naturales (Pandolfo *et al.*, 2018). A su vez, debido a la amplia distribución de *B. rapa* en el país, se genera un riesgo futuro, ya que la persistencia de poblaciones RH incrementa el riesgo de cruzamiento inter e intraespecífico. Estudios previos han demostrado que, en sistemas agrícolas caracterizados por el intenso uso de glifosato, la invasividad de poblaciones *B. napus* GM se acrecienta por la acción selectiva del herbicida, estableciendo un banco de semillas y pudiendo persistir hasta 7 años post-cultivo (Beckie y Warwick, 2010). En ambientes ruderales, la probabilidad de persistencia a largo plazo es menor, debido a que la colza es un competidor débil, y, por lo tanto, su presencia o persistencia en banquinas estará sujeta a derrames recurrentes de semilla y la capacidad de las mismas de competir en la comunidad circundante (Yoshimura *et al.*, 2006). En Australia, se encontró una pequeña población de colza con resistencia transgénica a glifosato en un área natural que logró persistir por tres años. La extinción de esta población se vinculó al decaimiento progresivo en el número de plantas emergidas (Busi y Powles, 2016). Además de aumentar la eficiencia en los análisis de semillas certificadas que ingresan al país, para reducir el riesgo de futuras introducciones de eventos transgénicos, los esfuerzos deberían avocarse en minimizar el derrame de granos importados durante la descarga y el transporte (Schulze *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

La población *B. rapa* que se encontró en floración simultánea con colza IMI-resistente y convencional, en el establecimiento de Balcarce, presentó plantas fuera de tipo en su progenie. La caracterización fenotípica de estas poblaciones puso de manifiesto evidencias de flujo génico entre *B. napus* y el nabo silvestre en condiciones naturales. Al igual que en otras regiones del mundo, donde se ha comprobado hibridación entre estas especies del género *Brassica*, el grado de entrecruzamiento hacía la maleza fue bajo. Asimismo, para este ambiente en particular, la frecuencia de hibridación habría sido ampliamente superior desde el cultivar resistente a imidazolinonas que desde su contraparte susceptible.

La caracterización de los híbridos cultivo-maleza permitió identificar ciertos rasgos que pueden ser utilizados para su detección a campo. En el estado de roseta, la forma de hoja elíptica, de color verde glauco y sin tricomas, mientras que en etapas reproductivas la presencia de pimpollos por encima de las flores abiertas, es característico de este tipo de plantas. En los viajes de colecta que acontecieron posteriormente, el grupo de investigación los ha utilizado regularmente para detectar híbridos interespecíficos dentro de las poblaciones parentales.

Asimismo, se confirmó la transferencia de la resistencia a herbicidas a una fracción de la población *B. rapa*. La proporción de plantas resistentes fue similar a las encontradas para los híbridos detectados a través de rasgos morfológicos. Estas plantas fueron caracterizadas a partir de marcadores moleculares, y junto con la información de los registros de campo, permitieron determinar que correspondían a híbridos interespecíficos cultivo-maleza de primera generación.

Pese a que la resistencia a imidazolinonas fue transferida a la progenie de *B. rapa*, las condiciones para que este rasgo persista en el ambiente no ocurrieron. La frecuencia de los individuos F1 fue insuficiente para introgresar el gen en la maleza a través de sucesivas retrocruzas. Factores como la ausencia de dormición primaria y la reducida aptitud biológica habrían favorecido esta situación. De esta manera, al cabo de una sola generación la presencia del rasgo de IMI-resistencia en el lote donde inicialmente se produjo la hibridación fue controlada.

Por otro lado, se comprobó a partir de análisis moleculares, el origen transgénico de la resistencia a glifosato en poblaciones ferales de *B. napus* y poblaciones silvestres de *B. rapa*, colectadas en diversos sitios de la región pampeana. El origen de las poblaciones de *B. napus* es incierto, debido a que en nuestro país rige hace más de 20 años una prohibición para cultivar variedades con eventos transgénicos. El hallazgo del transgen en *B. rapa* implicaría la ocurrencia de flujo génico

con poblaciones ferales de colza que presentaban este rasgo, o la introducción como contaminante de semilla. Contrariamente a lo que suele ocurrir en otros países con eventos biotecnológicos asociados, no se detectaron poblaciones de *B. napus* y *B. rapa* con resistencia a glufosinato de amonio. Sin embargo, la perdurabilidad como alternativa de control de este herbicida se encuentra sujeta al éxito en las barreras de control de colza importada.

Proyecciones de Trabajo

Para determinar de forma más precisa los efectos de la ausencia de dormición primaria y la aptitud biológica sobre el éxito reproductivo de las poblaciones naturales en distintos ambientes, se continuará la investigación tanto sobre el biotipo de Balcarce, como en otras poblaciones que segregan para la resistencia a herbicidas. De esta forma, se estudiará el patrón de emergencia de biotipos resistentes y susceptibles a herbicidas bajo diversos disturbios durante una secuencia de dos años.

Por otro lado, el estudio de biotipos con resistencia transgénica a herbicidas, será abordado con ensayos de aptitud biológica en poblaciones con y sin resistencia. Además, se evaluará la persistencia de este carácter en sucesivas generaciones y se investigarán alternativas químicas para el control de biotipos resistentes. En última instancia, se plantea ejercer un programa de difusión orientado principalmente a empresas semilleras, con el objetivo de informar acerca de la problemática y las zonas que son de alto riesgo para la producción de semilla comercial.

CONSIDERACIONES FINALES

La maleza *B. rapa* se encuentra ampliamente difundida en el país, y no sólo en el área donde actualmente se cultiva colza en la Argentina. Tanto el cultivo comercial, como el ingreso y dispersión involuntaria de semillas de colza resistente a herbicidas representan un riesgo de transferencia de esta característica a las poblaciones silvestres de la maleza.

La creciente aparición a escala mundial de poblaciones de malezas con resistencias de tipo simple y múltiple, inevitablemente demandará por parte de todos los actores del sector, mayor conocimiento, tiempo, planificación, costos y riesgos que los requeridos en el pasado, de manera que se logre evitar tanto el origen, como la propagación y dispersión de estos biotipos resistentes.

De los resultados obtenidos en esta tesis surge claramente que se deben mejorar las medidas preventivas, para evitar el ingreso de biotipos resistentes que se encuentran prohibidos, como así también promover medidas de control que permitan reducir el aumento de las poblaciones resistentes y su dispersión. Hoy en día se sabe que cualquier método o práctica que sea aplicada en forma aislada será superado por la adaptación de las malezas. Por lo tanto, se debe incitar desde nuestro sector a un enfoque integrador de diversas medidas en las distintas etapas de control.

En base a una revisión bibliográfica (Pekrun *et al.*, 1998; Thomas, 2001; Gulden *et al.*, 2002; Beckie *et al.*, 2003; Beckie *et al.*, 2004; Schulze *et al.*, 2015; Pandolfo *et al.*, 2016; Pascher *et al.*, 2017; Pandolfo *et al.*, 2018) y a la experiencia desarrollada por el grupo de trabajo luego de investigar por varios años las relaciones entre las malezas y sus cultivos emparentados, se proponen las siguientes medidas de prevención y control para reducir las poblaciones voluntarias de *B. napus* y silvestres de *B. rapa* resistentes a herbicidas:

1. Al importar semilla, hacerlo de lotes certificados por OECD para reducir el riesgo de presencia de individuos fuera de tipo con rasgos de resistencia a herbicidas. Esto se debe aplicar tanto para semillas de colza como de otros cereales (trigo y cebada), debido a que es común que en los lotes de producción se encuentren malezas del género *Brassica*.
2. En los vehículos utilizados para el transporte, tapar con grasa de litio o cinta adhesiva todos aquellos puntos por donde pudieran producirse filtraciones de semillas.
3. Cubrir con lonas de manera muy prolija la carga, ya que el viento producido durante el transporte puede generar que la semilla se vuele.

4. Efectivizar un programa de monitoreo sobre las zonas de carga y descarga de semilla en puertos e industrias de procesamiento y sobre las rutas de transporte que utilizan tanto el sistema ferroviario como el automotor desde los puertos.
5. Realizar limpiezas periódicas sobre las zonas de carga de camiones y trenes, y de las que estén destinadas al almacenamiento en puertos o molinos.
6. Controlar periódicamente, en los casos que este permitido, las banquinas de las rutas, los caminos vecinales y las vías férreas, de manera de prevenir la aparición de poblaciones ferales. En tal sentido, se deberá brindar mayor importancia a las rutas o vías que se encuentren en cercanía de zonas portuarias.
7. Controlar periódicamente los bordes de los lotes para prevenir la presencia de nabo silvestre que florezca simultáneamente con los cultivos o las plantas voluntarias no controladas.
8. Minimizar la pérdida de semilla en la cosecha mediante el hilerado en el momento correcto de desarrollo, y calibrar debidamente los equipos de cosecha.
9. Realizar una limpieza exhaustiva de la cosechadora, carros graneleros y demás equipos de cosecha al desplazarse entre lotes de un mismo campo o hacia otros campos.
10. Dejar las semillas sobre o cerca de la superficie del suelo por el mayor tiempo posible luego de la cosecha, debido a que un alto porcentaje de estas serán consumidas por aves e insectos o germinarán en el verano-otoño siguiente y morirán por efecto de sequías y/o heladas. Las semillas que sean incorporadas al suelo pueden desarrollar dormición secundaria y de esta manera aumentar su persistencia.
11. Realizar un aislamiento apropiado para cultivares con resistencia convencional (no transgénica) a herbicidas y de esta manera reducir el entrecruzamiento.
12. Sembrar un cereal luego del cultivo de colza y rotar la misma en una secuencia de cultivos cada 4 años para agotar la población de voluntarios y malezas Brasicáceas del banco de semillas del suelo. Utilizar el manejo y prácticas agronómicas (elección de especies y cultivares, densidades de siembra, aplicación precisa de fertilizantes, etc.) que permitan desarrollar cultivos competitivos para reducir la interferencia de estos individuos. Esta rotación también facilita el uso de herbicidas alternativos con diferentes modos de acción.
13. Eliminar en forma manual plantas voluntarias o malezas no controladas por los productos químicos previniendo la formación de semillas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwald, M, Shrivastava, N. y Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27: 617-631.
- Aherens, W.H., Cox, D.J. y Budhwar, G. 1990. Use of the arcsine and square root transformations for subjectively determined percentage data. *Weed Sci* 38: 452-458.
- Allainguillaume, J., Alexander, M., Bullock, J.M., Saunders, M., Allender, C.J., King, G., Ford, C.S. y Wilkinson, M.J. 2006. Fitness of hybrids between rapeseed (*Brassica napus*) and wild *Brassica rapa* in natural habitats. *Mol Ecol* 15 (4): 1175–1184.
- Aono, M., Wakiyama, S., Nagatsu, M., Kaneko, Y., Nishizawa, T., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kubo, A. y Saji, H. 2011. Seeds of a possible natural hybrid between herbicide-resistant *Brassica napus* and *Brassica rapa* detected on a riverbank in Japan. *GM Crops* 2: 201-210.
- Aono, M., Wakiyama, S., Nagatsu, M., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kubo, A. y Saji, H. 2006. Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environ Biosafety Res* 5 (2): 77–87.
- Appelqvist, L.-A. 1972. Historical Background. En: Appelqvist, L. Y Ohlson, R. (eds.) *Rapeseed. Cultivation, Composition, Processing and Utilization*. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, pp. 1-8.
- Arnoud, F. 1989. Colza: Sélection – Variétés. Cahier technique. C.E.T.I.O.M. París, Francia.
- Barry, G.F. y Kishore, G.M. 1995. Glyphosate tolerant plants. United States, Patent No. 5463175.
- Becker, H.C., Karle, R., Han, S.S. 1992. Environmental variation for outcrossing rates in rapeseed (*Brassica napus*). *Theor and App Genet* 84: 303-306.
- Beckie, H.J y Warwick, S.I. 2010. Persistence of an oilseed rape transgene in the environment. *Crop Prot* 29: 509-512.
- Beckie, H.J. 2006a. Herbicide Resistant Weeds: Management Tactics and Practices. *Weed Technol* 20: 793-814.
- Beckie, H.J., Harker, K.N., Hall, L.M., Warwick, S.I., Légère, A., Sikkema, P.H., Clayton, G.W., Thomas, A.G., Leeson, J.Y., Séguin-Swartz, G. y Simard, M.-J. 2006b. A decade of herbicide-resistant crops in Canada. *Can J Plant Sci* 86: 1243–1264.
- Beckie, H.J., Séguin-Swartz, G., Warwick, S.I. y Johnson, E. 2004. Multiple herbicide-resistant canola can be controlled by alternative herbicides. *Wees Sci* 52: 152-157.
- Beckie, H.J., Warwick, S.I., Nair, H. y Séguin-Swartz, G. 2003. Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). *J Ecol Appl* 13 (5): 1276–1294.
- Boswell, B.R. 1949. Our vegetable travellers. *Nat Geogr Magaz* 96 (2): 134-217.

- Busch, L., Gunter, V., Mentele, T. Tachikawa, M., Tanaka, K. 1994. Socializing Nature: Technoscience and the Transformation of Rapeseed into Canola. *Crop Science* 34 (3): 607-614.
- Busi, R. y Powles, S.B. 2016. Transgenic glyphosate-resistant canola (*Brassica napus*) can persist outside agricultural fields in Australia. *Agric Ecosyst Environ* 220:28–34.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes de la República Argentina (CASAFE). 2013/2015. Guía de Productos Fitosanitarios. 16° Ed. Tomo 1: Generalidades – Herbicidas – Fertilizantes.
- Cobb, A.H. y Reade J.P.H. 2010. *Herbicides and Plant Physiology*, 2nd Ed. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Coetzer, E., Al-Khatib, K. y Loughin, T.M. 2001. Glufosinate efficacy, absorption, and translocation in amaranth as affected by relative humidity and temperatura. *Weed Sci* 49 (1): 8-13.
- Crawley, M. J. y Brown, S. L. 1995. Seed Limitation and the Dynamics of Feral Oilseed Rape on the M25 Motorway. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 259 (1354) :49–54.
- Demeke, T. y Ratnayaka, I. 2008. Multiplex qualitative PCR assay for identification of genetically modified canola events and real-time event-specific PCR assay for quantification of the GT73 canola event. *Food Control* 19: 893-897.
- Devos, Y., de Schrijver, A. y Reheul, D. 2009. Quantifying the introgressive hybridisation propensity between transgenic oilseed rape and its wild/weedy relatives. *Environ Monit Asses* 149(1-4): 303-322.
- Devos, Y., Hails, R., Messean, A., Perry, J. y Squire, G. 2012. Feral genetically modified herbicide tolerant oilseed rape from seed import spills: are concerns scientifically justified? *Trans Res* 21 (1): 1–21.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. y Mattick, J.S. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.
- Doyle, J. y Doyle, J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11–15.
- Duke, S.O. y Dayan, F.E. 2011. Bioactivity of Herbicides. En: *Comprehensive Biotechnology*, 2nd Ed. Vol 4: 23-35.
- Dyer, W.E. 1994. Herbicide-resistant crops: A weed scientist's Perspective. *Phytoprotection* 75: 71–77.
- Edelberg, G. 1921. Plano Catastral del Partido de Balcarce. Provincia de Buenos Aires.

- Ellstrand, N.C. 2003. Dangerous liaisons?. When cultivated plants mate with their wild relatives. Johns Hopkins University Press, Baltimore MD.
- FAOSTAT, 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: <http://faostat.fao.org>
- Friesen, L., Nelson, A. y Van Acker, R. 2003. Evidence of contamination of pedigree canola (*Brassica napus*) seedlots in western Canada from genetically engineered herbicide resistance traits. *Agron J* 95: 1342-1347.
- Giordano, J. Peiretti, J. Sanchez, F y Bragachini, M. 2013. Cosecha eficiente de colza. Informe técnico INTA PRECOP, 4 páginas. Ed. Manfredi. INTA EEA Manfredi.
- Gómez, N.V. y Miralles, D.J. 2006. Colza. *En*: E.B. de la Fuente, A. Gil y otros eds. *Cultivos Industriales*: 181-216. Editorial Facultad de Agronomía UBA. Buenos Aires.
- Gómez, N.V. y Miralles, D.J. 2011. Factors that modify early and late reproductive phases in oilseed rape (*Brassica napus* L.): Its impact on seed yield and oil content. *Indl Crops Prod* 34: 1277-1285.
- Gómez, N.V., Miralles, D.J., Mantese, A.I., Menéndez, D.P. y Rondanini, D.P. 2018. Colza: Un cultivo con historia en la FAUBA. *Rev Facultad de Agronomía UBA* 38 (1): 23-26.
- Gómez-Campo, C. y Prakash, S. 1999. Origin and Domestication. *En*: Gomez-Campo, C. (Ed), *Biology of Brassica coenospecies*: 33-58. Elsevier Science, Madrid.
- Green, J.M. 2009. Evolution of Glyphosate-Resistant Crop Technology. *Weed Science* 2009 57: 108–117
- Green, J.M. 2012. The Benefits of Herbicide Resistant Crops. *Pest Manag Sci* 68 (10): 1323-31.
- Gruber, S. y Claupein, W. 2007. Fecundity of volunteer oilseed rape and estimation of potential gene dispersal by a practice-related model. *Agric Ecosyst Environ* 119: 401-408.
- Gruber, S., Pekrun, C. y Claupein, W. 2004a. Population dynamics of volunteer oilseed rape (*Brassica napus* L.) affected by tillage. *Eur J Agron* 20: 351-361.
- Gruber, S., Pekrun, C. y Claupein, W. 2004b. Seed persistence of oilseed rape (*Brassica napus*): variation in transgenic and conventionally bred cultivars. *J Agric Sci* 142: 29-40.
- Gulden, R., Warwick, S. I. y Thomas, A. 2008. The Biology of Canadian Weeds. 137. *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. *Canadian Journal of Plant Science* 88 (5): 951–996.
- Gulden, R.H., Shirliffe, S.J. y Thomas, A.G. 2002. Evidence of cyclical dormancy behaviour in spring *B. napus*. *En* Bernier, D., Campbell, R.A. y Cloutier, D. (Eds.). pp 41–44. *Proceedings of the 2001 National Meeting of the Expert Committee on Weeds/Comité d'experts en malherbologie*, Quebec City, QC, Canada. Sainte-Annede-Bellevue, Canada: ECW-CEM.

- Gulden, R.H., Shirliffe, S.J. y Thomas, A.G. 2003a. Secondary seed dormancy prolongs persistence of volunteer canola in western Canada. *Weed Sci* 51 (6): 904-913.
- Gulden, R.H., Shirliffe, S.J. y Thomas, A.G. 2003b. Harvest losses of canola (*Brassica napus*) cause large seed bank inputs. *Weed Science* 51(1): 83–86.
- Gulden, R.H., Thomas, A.G. y Shirliffe, S.J. 2004. Relative contribution of genotype, seed size and environment to secondary dormancy potential in Canadian spring rape (*Brassica napus*). *Weed Res* 44: 97-106.
- Gulden, R.H., Warwick, S.I. y Thomas A.G. 2008. The Biology of Canadian Weeds. 137. *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. *Can J Plant Sci* 88: 951- 996.
- Gupta, P.K. y Varshney, R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euph* 113:163-185.
- Gupta, S. y Pratap, A. 2007. History, origin, and evolution. En: S. Gupta (ed.) *Advance in Botanical Research*, Volume 45: Rapeseed Breeding. Academic Press - Elsevier Ltd. San Diego, USA., pp. 1–20.
- Halfhill, M., Zhu, B., Warwick, S., Raymer, P., Millwood, R., Weissinger, A. y Stewart, C.J. 2004. Hybridization and backcrossing between transgenic oilseed rape and two related weed species under field conditions. *Environ Biosafety Res* 3: 73–81.
- Halfhill, M.D., Millwood, R.J., Raymer, P.L. y Stewart Jr, C.N. 2002. Bt-transgenic oilseed rape hybridization with its weedy relative, *Brassica rapa*. *Environ Biosafety Res* 1(1): 19–28.
- Hall, L., Rahman, H., Gulden, R. H., Thomas, G. 2005. Volunteer Oilseed Rape – Will Herbicide-Resistance Traits Assist Fertility? En: J. Gressel (Ed.), *Crop Fertility and Volunteerism*: 59-79. Taylor & Francis Group, USA.
- Hall, L., Topinka, K., Huffman, J., Davis, L. y Good, A. 2000. Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B. napus* volunteers. *Weed Sci* 48 (6): 688–694.
- Hansen, L.B., Siegismund, H.R. y Jorgensen, R.B. 2001. Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. *Genet Resour Crop Evol* 48: 621-627.
- Hansen, L.B., Siegismund, H.R. y Jorgensen, R.B. 2003. Progressive introgression between *Brassica napus* (oilseed rape) and *B. rapa*. *Heredity* 91: 276-283.
- Harlan, J.R. 1992. *Crops & Man*. Amn Soc Agron 2da ed. Madison, USA.
- Harlan, J.R. y de Wet, J.M.J. 1965. Some Thoughts About Weeds. *Econ Bot* 19 (1): 16-24.

- Hauser, T.P., Damgaard, C. y Jorgensen, R.B. 2003. Frequency-dependent fitness of hybrids between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. rapa* (*Brassicaceae*). *Am J of Bot* 90 (4): 571-578.
- Hauser, T.P., Jorgensen, R.B. y Ostergard, H. 1998a. Fitness of backcross and F2 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 81: 436-443.
- Hauser, T.P., Shaw, R.G. y Ostergard, H. 1998b. Fitness of F1 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 81: 429-435.
- Hawkins, G.P., Deng, Z., Kubik, T.J. y Johnson- Flanagan, A.M. 2002. Characterization of freezing tolerance and vernalization in Vern-, a spring-type *Brassica napus* line derived from a winter cross. *Planta* 216: 220-226.
- Heap, I. 2005. Criteria for Confirmation of Herbicide-Resistant Weeds - with specific emphasis on confirming low level resistance. URL: <http://www.weedscience.org/Documents/ResistanceCriterion.pdf>
- Heap, I. 2018. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Consultado el 12/03/2018. URL: <http://www.weedscience.org>.
- Hecht, M., Oehen, B., Schulze, J., Brodmann, P. y Bagutti, C. 2014. Detection of feral GT73 transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) along railway lines on entry routes to oilseed factories in Switzerland. *Environ Sci Pollut Res Int* 21 (2): 1455–1465.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H. y Vogt, P.H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Bio Techniques* 23: 504-511.
- Holt, J.S., Powles, S.B., Holtum, J.A.M. 1993. Mechanisms and Agronomic Aspects of Herbicide Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 203–229.
- Hu, M., Pu, H., Gao, J., Long, W., Chen, F., Zhou, X., Zhang, W., Peng, Q., Chen, S. y Zhang, J. 2017. Inheritance and molecular characterization of resistance to AHAS-inhibiting herbicides in rapeseed. *J Integr Agr* 16 (0): 60345-7.
- Hüsken, A., Dietz-Pfeilstetter, A. 2007. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Transgenic Res* 16: 557–569.
- Ibarra, F.E. 1937. Malezas más comunes del trigo y del lino. En: *Almanaque del Ministerio de Agricultura*, Buenos Aires, pp 405–410.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). 1990. Descriptors for *Brassica* and *Raphanus*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). 2017. Sistema de consulta de comercio exterior de bienes. Consultado el 17/11/2017. URL: <https://comex.indec.gov.ar/search>.
- Instituto Nacional de Semillas (INASE). 2007. Resolución N° 305. Secretaria de Agricultura

- Ganadería, Pesca y Alimentos. Ministerio de Economía y Producción.
- Instituto Nacional de Semillas (INASE). 2017. Catalogo Nacional de Cultivares. Consultado el 10/04/2017. URL: <http://www.inase.gov.ar>.
- International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). 2018. GM approval database. Consultado el 14/12/2018. URL: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=10>.
- Iriarte, L., López, Z. 2014. Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Colza Campaña 2014. INTA, Informe Técnico. URL: <http://inta.gob.ar/documentos/red-nacional-de-evaluacion-de-cultivares-de-colza.-campana-2014>
- Iriarte L. y Valetti O. 2002. El cultivo de Colza en Argentina. Revista IDIA XXI 3: 160-166.
- Iriarte, L. y Valetti, O. 2008. Cultivo de Colza. Chacra Experimental Integrada Barrow. Convenio MAAyP – INTA, Argentina, Primera edición.
- James, C. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief. No. 52. Ithaca, NY.
- Jorgensen, R.B. y Andersen, B. 1994. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (*Brassicaceae*): A risk of growing genetically modified oilseed rape. *Am J Bot* 81 (12): 1620-1626.
- Jorgensen, R.B., Andersen B., Landbo L. y Mikkelsen T.R. 1996. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy relatives. *Acta Hort* 407: 193-200.
- Jorgensen, T., Hauser, T.P. y Jorgensen R.B. 2007. Adventitious presence of other varieties in oilseed rape (*Brassica napus*) from seed banks and certified seed. *Seed Sci Res* 17 (2): 115-125.
- Knispel, A. L. y McLachlan, S. M. 2010. Landscape-scale distribution and persistence of genetically modified oilseed rape (*Brassica napus*) in Manitoba, Canada. *Environ Sci Pollut Res Int* 17 (1): 13–25.
- Knispel, A.L., McLachlan, S.M., Van Acker, R.C. y Friesen, L.F. 2008. Gene flow and multiple herbicide resistance in escaped canola populations. *Weed Sci* 56: 72–80.
- Kocabiyik H., Aktas, T. y Kayisoglu, B. 2004. Porosity rate of some kernel crops. *J Agron* 3: 76-80.
- Konieczny, A. y Ausubel, F.M. 1993. Procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4: 403–410.
- Krato, C. y Petersen, J. 2012a. Competitiveness and yield impact of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*) in Winter and spring wheat (*Triticum aestivum*). *J Plant Dis Protect* 119 (2): 74-82.
- Krato, C. y Petersen, J. 2012b. Gene flow between imidazolinone-tolerant and – susceptible winter oilseed rape varieties. *Weed Res* 52: 187-196.

- Kumar, A., Banga, S.S., Meena, P.D. y Kumar, P.R. 2015. Brassica oilseeds: Breeding and Management. CABI, Wallingford, UK.
- Landbo, L. y Jorgensen, R.B. 1997. Seed germination in weedy *Brassica campestris* and its hybrids with *B. napus*: implications for risk assessment of transgenic oilseed rape. *Euphytica* 97: 209-216.
- Landbo, L., Andersen, B. y Jorgensen, R.B. 1996. Natural hybridization between oilseed rape and a wild relative: hybrids among seeds from *B. campestris*. *Hereditas* 125: 89-91.
- Legere, A. 2005. Risks and consequences of gene flow from herbicide-resistant crops: Canola (*Brassica napus* L.) as a case study. *Pest Manag Sci* 61: 292-300.
- Liu, Y., Wei, W., Ma, K., Li, J., Liang, Y. y Darmency, H. 2013. Consequences of gene flow between oilseed rape (*Brassica napus*) and its relatives. *Plant Sci* 211: 42-51.
- Luijten, S.H., Schidlo, N.S., Meirmans, P.G. y de Jong, T.J. 2014. Hybridisation and introgression between *Brassica napus* and *Brassica rapa* in the Netherlands. *Plant Biol* 17 (1): 262-266.
- Lutman, P.J.W., Freeman, S.E. y Pekrun, C. 2003. The long-term persistence of seeds of oilseed rape (*Brassica napus*) in arable fields. *J Agric Sci* 141:231-240.
- MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Pesca). 2017. Sistema Integrado de Informacion Agropecuaria. URL: www.siiia.gov.ar.
- Martínez-Laborde, J.B. 1999. Brassicaceae. En (eds. F.O. Zuloaga & O. Morrone) Catálogo de las Plantas Vasculares de la Argentina. II. Acanthaceae - Euphorbiaceae (Dicotyledoneae). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 74: 411–416.
- Marzocca, A. 1976. Manual de malezas. 4ta edición. Hemisferio Sur SA, Buenos Aires, 564 p.
- Marzocca, A. 1994. Guía descriptiva de malezas del cono sur. INTA, Buenos Aires, 304 p.
- Mazzara, M., Grazioli, E., Savini, C. y Van dan Eede, G. 2007. Event-specific Method for the quantification of oilseed rape line RT73 using real-time PCR, Validation report and protocol. Community Reference Laboratory for GM Food and Feed, Institute for Health and Consumer Protection, European Commission. Ispra, Italia.
- Mikkelsen, T.R., Andersen, B. and Jorgensen, R.B. 1996a. The risk of crop transgene spread. *Nature* 380: 31.
- Mikkelsen, T.R., Jensen, J. and Jørgensen R.B. 1996b. Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus*) RAPD markers in a backcross progeny with *Brassica campestris*. *Theor Appl Genet* 92: 492-497.
- Ministerio de Agronindustria (MAGyP). 2017. Datos Abiertos Agroindustria. Consultado: 17/05/2017. URL: <https://datos.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>

- Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences. 2004. A recommended procedure for real-time quantitative TaqMan PCR for Roundup Ready canola GT73. URL: <http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods/MONArt47-pcrGT73rapeseed.pdf>
- Monsanto. 2002. Safety Assessment of Roundup Ready® Canola Event GT73. URL: <http://cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/docs/decdocs/02-269-005.pdf>
- Moss, S.R., Clarke J.H., Blair, A.M., Culley, T.N., Read, M.A., Ryan, P.J. y Turner, M. 1999. The occurrence of herbicide-resistant grass-weeds in the United Kingdom and a new system for designating resistance in screening assays. 179–184. *En Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference on Weeds*. Brighton, UK, pp. 179–184.
- Mulligan, G.A. 2008. Key to the Brassicaceae (Cruciferae) of Canada and Alaska. URL: <http://www.brassica.info/info/publications/guidewild/BrassKey.pdf>
- Nanda, R., Bhargava, S.C., Tomar, D.P.S. y Rawson, H.M. 1996. Phenological development of *Brassica campestris*, *B. juncea*, *B. napus* and *B. carinata* grown in controlled environments and from 14 sowing dates in the field. *Field Crops Res* 46 (1-3): 93-103.
- Nelson, M.N., Rajasekaran, R., Smith, A., Chen, S., Beeck, C.P., Siddique, K.H.M. y Cowling, W.A. 2014. Quantitative Trait Loci for Thermal Time to Flowering and Photoperiod Responsiveness Discovered in Summer Annual-Type *Brassica napus* L. *PLoS ONE* 9 (7): e102611.
- Neve, P., Busi, R., Renton, M. y Vila-Aiub, M. 2014. Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistant research. *Pest Manag Sci* 70 (9): 1385-93.
- Nichols, V., Verhulst, N., Cox, R. y Govaerts, B. 2015. Weed dynamics and conservation agriculture principles: a review. *Field Crops Res* 183: 56-68.
- Nishizawa, T., Nakajima, N., Aono, M., Tamaoki, M., Kubo, A. y Saji, H. 2009. Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations. *Environ Biosafety Res* 8: 33-44.
- Norsworthy, J.K., Ward, S.M., Shaw, D.R., Llewellyn, R.S., Nichols, R.L., Webster, T.M., Bradley, K.M., Frisvold, G., Powles, S.B., Burgos, N.R., Witt, W.W. y Barrett, M. 2012. Reducing the Risks of Herbicide Resistance: Best Management Practices and Recommendations. *Weed Sci* 60 (sp1):–62
- Office of Gene Technology Regulator (OGTR). 2002. The biology and ecology of canola (*Brassica napus*). Australia.
- Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD). 1997. Consensus document on the biology of *Brassica napus* L. (oilseed rape). En: Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology. Paris, Francia.
- Orr, H.A. 2009. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet* 10 (8): 531-539.

- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., Lavalley, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B. y Kishore, G.M. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci* 35: 1451–1461.
- Pandolfo, C., Presotto, A., Migasso, J., Mock, F. y Cantamutto, M. 2013. Identificación de un biotipo feral de *B. napus* con resistencia a glifosato. III Jornada de Intercambio de Producción Científico-Tecnológico (III JIPCiTe). Departamento de Agronomía-CERZOS, Bahía Blanca. Libro de Resúmenes, pp. 44-45. URL: <http://www.boletin.cerzosconicet.gob.ar/images/numero24/LIBRO-RESUMENES-III-JIPCiTe.pdf>
- Pandolfo, C.E., Presotto, A., Torres Carbonell, F., Ureta, S., Poverene, M. y Cantamutto, M. 2016. Transgenic glyphosate-resistant oilseed rape (*Brassica napus*) as an invasive weed in Argentina: detection, characterization, and control alternatives. *Environ Sci Pollut Res* 23: 24081-24091.
- Pandolfo, C.E., 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. *Environ Sci Pollut Res* 25 (7): 6251-6264.
- Pascher, K., Hainz-Renetzeder, C., Gollman, G. y Schneeweiss, G.M. 2017. Spillage of Viable Seeds of Oilseed Rape along Transportation Routes: Ecological Risk Assessment and Perspectives on Management Efforts. *Front Ecol Evol* 5: 104.
- Papa, J.C. y Tiesca, D. 2014. Los problemas actuales de malezas en la región sojera núcleo argentina: origen y alternativas de manejo. *Para Mejorar la Producción* 52. INTA EEA Oliveros.
- Pascale, N. 1976. Colza. Su cultivo, mejoramiento y usos. En: Kugler, W. (ed.) *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería – Tomo II*. Editorial Acme (2da edición). Buenos Aires.
- Patino, V. M. 1963 *Plantas cultivadas y animales domesticos en America Equinoccia IIV: Plantas introducidas*. Editorial Imprenta Departamental. Cali, Colombia.
- Pekrun, C., Hewitt, J.D.J. y Lutman, P.J.W. 1998. Cultural control of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). *J Agric Sci* 130: 155–163.
- Pertl, M., Hauser, T.P., Damgaard, C. y Jorgensen, R.B. 2002. Male fitness of oilseed rape (*Brassica napus*), weedy *B. rapa* and their F1 hybrids when pollinating *B. rapa* seeds. *Heredity* 89: 212-218.

- Pessel, D., Lecomte, J., Emeriau, V., Krouti, M., Messean, A., Gouyon, P. H. 2001. Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *Theor Appl Genet* 102 (6-7): 841–846.
- Pivard, S., Adamczyk, K., Lecomte, J., Lavigne, C., Bouvier, A., Deville, A., Gouyon, H., Huet, S. 2008. Where do the feral oilseed rape populations come from? A large scale study of their possible origin in a farm land area. *Journal of Applied Ecology* 45: 476-485.
- Poverene, M. y Ureta, S. 2004. Flujo génico mediado por polen y su posible impacto ambiental. *En: Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal: 399-408. Editorial INTA. Buenos Aires.*
- Powles, S.B. y Yu, Q. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu Rev Plant Biol* 61: 317-347.
- Prakash, S., Wu, X., Bhat, S.R. 2012. History, Evolution, and Domestication of *Brassica* Crops. *Plant Breeding Reviews* 35: 19–82.
- Prioletta, S., Iriarte, L. y Clemente, G. 2015. Evaluación del comportamiento de genotipos de colza frente a *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*). Informe Técnico. CEI Barrow, INTA.
- Raman, H., Raman, R., Eckermann, P., Coombes, N., Manoli, S., Zou, X., Edwards, D., Meng, J., Prangnell, R., Stiller, J., Batley, J., Luckett, D., Wratten, N. y Dennis, E. 2013. Genetic and physical mapping of flowering time loci in canola (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 126: 119-132.
- Red de Conocimiento en Malezas Resistentes (REM). 2014a. Alerta Roja: *Brassica napus*. URL: <http://www.aapresid.org.ar/rem/brassica-napus-colza-canola>.
- Red de Conocimiento en Malezas Resistentes (REM). 2014b. Alerta Roja: *Brassica rapa*. URL: <http://www.aapresid.org.ar/rem/alerta-roja-brassica-rapa-nabo/>
- Reddy, K.N. y Nandula, V.K. 2012. Herbicide resistant crops: History, development and current technologies. *Ind J Agron* 57 (1): 1-7.
- Riesberg, L.H. y Carney, S.E. 1998. Plant hybridization. *Tansley Review No. 102. New Phytol* 140: 599-624.
- Saji, H., Nakajima, N., Aono, M., Tamaoki, M., Kubo, A., Wakiyama, S., Hatase, Y., Nagatsu, M. 2005. Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environ Biosafety Res* 4 (4): 217–222.
- Schafer, M.G., Ross, A.A., Londo, J.P., Burdick, C.A., Lee, E.H., Travers, S.E., Van de Water, P.K. y Sagers, C.L. 2011. The establishment of genetically engineered canola populations in the U.S. *PLoS One* 6: e25736.

- Schoenenberger, N. y D'Andrea, L. 2012. Surveying the occurrence of spontaneous glyphosate-tolerant genetically engineered *Brassica napus* L. (Brassicaceae) along Swiss railways. *Environ Sci Eur* 24 (1): 23.
- Schulze, J., Brodmann, P., Oehen, B. y Bagutti, C. 2015. Low level impurities in imported wheat are a likely source of feral transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) in Switzerland. *Environ Sci Pollut Res* 22: 16936–16942.
- Schulze, J., Frauenknecht, T., Brodmann, P. y Bagutti, C. 2014. Unexpected Diversity of Feral Genetically Modified Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Despite a Cultivation and Import Ban in Switzerland. *PLoS ONE* 9 (12): e114477.
- Schwab, M.I. 2010. Comportamiento agronómico de Colza según fechas de siembra. Trabajo final, Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina. URL: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/comportamiento-agronomico-colza-fechas-siembra.pdf>
- Scott, S.E. y Wilkinson, M.J. 1999. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nat Biotechnol*, 17 (4): 390-392.
- Scursoni, J.A. 2009. Malezas: concepto, identificación y manejo con sistemas cultivados. 1ra ed. Buenos Aires. UBA.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA). 1997. Solicitud de ensayo a campo de canola tolerante al herbicida glifosato. Resolución N° 228. CONABIA.
- Sellers, B.A., Smeda, R.J. y Johnson, W.G. 2003. Diurnal fluctuations and leaf angle reduce glufosinate efficacy. *Weed Technol* 17 (2): 302-306.
- Senior I. J. y Dale P. J. 2002. Herbicide-tolerant crops in agriculture: oilseed rape as a case study. *Plant Breed* 121: 97-107.
- Simard, M.J., Legere, A., Pageau, D., Lajeunesse, J. y Warwick, S. 2002. The frequency and persistence of canola (*Brassica napus*) volunteers in Quebec cropping systems. *Weed Technol* 16: 433-439.
- Simard, M-J., Legere, A. y Warwick, S.I. 2006. Transgenic *Brassica napus* fields and *Brassica rapa* weeds in Quebec: sympatry and weed-crop in situ hybridization. *Can J Bot* 84 (12): 1842-1851.
- Snow, A.A., Andersen, B. y Jorgensen, R.B. 1999. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Mol Ecol* 8: 605–615.
- Suwabe, K., Iketani, H., Nunome, T., Kage, T. y Hirai, M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theor Appl Genet* 104: 1092-1098.

- Tan, S.Y., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., Shaner, D.L. 2005. Imidazolinone tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag Sci* 61: 246–257.
- Tang, S., Kishore, V.K. y Knapp, S.J. 2003. PCR-Multiplexes for a genome wide framework of simple sequence repeat marker loci in cultivated sunflower. *Theor Appl Genet* 107: 6-19.
- Tenembaum, J. 1937. El Nabo. Su cultivo en el pais. En: *Almanaque del Ministerio de Agricultura*, Buenos Aires, pp. 329–334.
- Thomas, A.G., Derksen, D.A., Blackshaw, R.E., Van Acker, R.C., Legere, A., Watson, P. R. y Turnbull, G.C. 2004. A multistudy approach to understanding weed population shifts in medium-to long-term tillage systems. *Weed Sci* 52: 874-880.
- Thomas, P. 2001. You Can Control Multiple-Resistant Canola Volunteers. *Canola Guide*, April 2001. Winnipeg, MB, Canada: Farm Business Communications. URL: www.agcanada.com.
- Timmons, A.M., O'Brien, E.T., Charters, Y.M., Dubbels, S.J. y Wilkinson, M.J. 1995. Assessing the risks of wind pollination from fields of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Euphytica* 85: 417-423.
- Tolstrup, K., Andersen, S.B., Boelt, B., Buus, M., Gylling, M., Holm, P.B., Kjellsson, G., Pedersen, S., Ostergard, H. y Mikkelsen, S.A. 2003. Report from the Danish working group on the co-existence of genetically modified crops with conventional and organic crops. *DIAS Report Plant Production N° 94*. Tjele, Danish Institute of Agricultural Sciences.
- Tranel, P. y Wright, T. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned?. *Weed Sci* 50: 700–712.
- Turck, F., Fornara, F. y Coupland, G. 2008. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu Rev Plant Biol* 59: 573–594.
- U, N. 1935. Genomic analysis of *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and its peculiar mode of fertilization. *Jap J Botany* 7: 389-452.
- Ureta, M.S., Torres Carbonell, F., Pandolfo, C., Presotto, A.D., Cantamutto, M.A. y Poverene, M. 2017. IMI resistance associated to crop-weed hybridization in a natural *Brassica rapa* population: characterization and fate. *Environ Monit Asses* 189: 101.
- Vila-Aiub, M.M., Neve, P. y Powles, S.B. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytol* 184: 751–767.
- Vitta, J., Tuesca, D., Puricelli, E. 2004. Widespread use of glyphosate tolerant soybean and weed community richness in Argentina. *Agric Ecosyst Environ* 103: 621-624.
- Von der Lippe, M. y Kowarik, I. 2007. Crop seed spillage along roads: a factor of uncertainty in the containment of GMO. *Ecography* 30 (4): 483–490.

- Wang, N., Qian, W., Suppanz, I., Wei, L., Mao, B., Long, Y., Meng, J., Müller, A.E., Jung, C. 2011. Flowering time variation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) is associated with allelic variation in the *FRIGIDA* homologue *BnaA.FRI.a*. *J Exp Bot* 62: 5641–5658.
- Warwick, S.I. 2011. *Brassicaceae* in Agriculture. En: Schmidt, R. & Bancroft, I. (Eds.), *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*: 33-66. Springer, New York.
- Warwick, S.I., Francis, A., Al-Shehbaz, I.A. 2006. *Brassicaceae*: species checklist and database on CD-Rom. *Plant Syst Evol* 259:249–258.
- Warwick, S.I., Legere, A., Simard, M.-J. y James, T. 2008. Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Mol Ecol* 17 (5): 1387–1395.
- Warwick, S.I., Simard, M.-J., Legere, A., Beckie, H.J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Seguin-Swartz, G. y Stewart, C.N. 2003. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.). *O.E. Schulz. Theor Appl Genet* 107 (3): 528–539.
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J. y Schulz, A. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat Biotechnol* 14: 1274-1278.
- Weymann, W., Bottcher, U., Sieling, K. y Kage, H. 2015. Effects of weather conditions during different growth phases on yield formation of winter oilseed rape. *Field Crops Res* 173: 41-48.
- Wilkinson, M. J., Elliott, L. J., Allainguillaume, J., Shaw, M.W., Norris, C., Welters, R., Alexander, M., Sweet, J., Mason, D. C. 2003. Hybridization between *Brassica napus* and *B. rapa* on a national scale in the United Kingdom. *Science* 302: 457-9.
- Yoshimura, Y., Beckie, H. J. y Matsuo, K. 2006. Transgenic oilseed rape along transportation routes and port of Vancouver in western Canada. *Environ Biosafety Res* 5 (2): 67-75.
- Yu, Q., Han, H., Vila-Aiub, M.M. y Powles, S.B. 2010. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *J Exp Bot* 61 (14): 3925-3934.
- Zuloaga, F.O, Morrone, O.E. y Belgrano, M.J. (Eds.). 2008. Catálogo de las plantas vasculares del cono sur. Volumen 1: *Pteridophyta*, *Gymnospermae*, *Monocotyledoneae*. Género *Brassica*. Missouri Botanical Garden Press. URL: <http://www.darwin.edu.ar/>

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA EN EL TRANSCURSO DE ESTA TESIS

Publicaciones en revistas con referato

1. Pandolfo C.E., Presotto A., **Torres Carbonell F.**, Ureta S., Poverene M., Cantamutto M. 2016. Transgenic glyphosate-resistant oilseed rape (*Brassica napus*) as an invasive weed in Argentina: detection, characterization, and control alternatives. *Environ Sci Pollut Res* 23: 24081-24091.
2. Ureta M.S., **Torres Carbonell F.**, Pandolfo C., Presotto A.D., Cantamutto M.A., Poverene M. 2017. IMI resistance associated to crop-weed hybridization in a natural *Brassica rapa* population: characterization and fate. *Environ Monit Assess* 189: 101.
3. Pandolfo, C.E., 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. *Environ Sci Pollut Res* 25 (7): 6251-6264.

Trabajos publicados en congresos

1. Ureta MS, **Torres Carbonell F**, Pandolfo C, Cantamutto M, Poverene M. Caracterización de plantas fuera de tipo en una población de *Brassica rapa* lindante a Colza *B. napus*. XLII Congreso Argentino de Genética. Salta, Argentina, 20-23 octubre de 2013. *Journal of Basic and Applied Genetics Supl.* vol XXIV (1) 2013, p. 224.
2. **Torres Carbonell F**, Ureta MS, Pandolfo C, Cantamutto M, Poverene M. Fenotipado de Individuos *Brassica rapa* expuestos a flujo génico de Colza Imi-resistente. XLIII Congreso Argentino de Genética. Bariloche, Argentina, 19-22 octubre de 2014. *Journal of Basic and Applied Genetics Supl.* vol XXV (1) 2014, p. 244.
3. Hernandez M, Ureta MS, **Torres Carbonell F**, Pandolfo C, Poverene M. Comparación de la aptitud biológica de híbridos de colza y la maleza *B. rapa* con y sin resistencia a imidazolinonas. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Argentina, 13-16 septiembre de 2015. *Journal of Basic and Applied Genetics Supl.* vol XXVI (1) 2015, p. 113.
4. Pandolfo C, Presotto A, **Torres Carbonell F**, Ureta MS, Poverene M, Cantamutto M. Detección del transgen GT73 de resistencia a glifosato en poblaciones naturales de *Brassica napus* y *B. rapa*. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Argentina, 13-16 septiembre de 2015. *Journal of Basic and Applied Genetics Supl.* vol XXVI (1) 2015, p. 175.

5. **Torres Carbonell F**, Presotto A, Pandolfo C, Ureta MS, Poverene M. Uso de microsatélites para la identificación de *Brassica napus*, *B. rapa* y sus híbridos interespecíficos. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Argentina, 13-16 septiembre de 2015. Journal of Basic and Applied Genetics Supl. vol XXVI (1) 2015, p. 172.
6. Vercellino B, **Torres Carbonell F**, Pandolfo C, Ureta MS, Cantamutto MA, Presotto A. Presencia de la mutación TRP-574 en poblaciones de *Raphanus sativus* resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS en el sudoeste bonaerense. XLV Congreso Latinoamericano de Genética. Montevideo, Uruguay, 9-12 de Octubre de 2016. Journal of Basic and Applied Genetics Supl. vol XXVII (1) 2016, p. 174.
7. **Torres Carbonell F**, Presotto A, Ureta MS. Flujo génico diferencial en híbridos *Brassica napus* L. x *B. rapa* L. XLVI Congreso Argentino de Genética. San Fernando del Valle de Catamarca, Argentina, 1-4 de Octubre de 2017. Journal of Basic and Applied Genetics Supl. vol XXVIII (1) 2017, p. 76.

Partes de libros

1. **Torres Carbonell F**. Los riesgos del flujo génico. Malezas e Invasoras de la Argentina. Tomo III. Eds: Fernández, O.A., Leguizamón, E. y Acciaresi, H.A. Ediuns, 2018. ISBN 978-987-655-193-9.

APENDICE



Imagen 1. Sitio de colección de la accesión JUA, correspondiente a la especie *B. rapa* en el partido de Benito Juárez en 2008.

Tabla 1. Temperatura media diaria (T) en °C, durante el periodo en que se condujo el experimento de vernalización (desde el 18/05/2016 hasta el 31/03/2017). Fuente: <https://www.tutiempo.net>

Mayo		Junio		Julio		Agosto		Septiembre		Octubre		Noviembre		Diciembre		Enero		Febrero		Marzo	
Día	T	Día	T	Día	T	Día	T	Día	T	Día	T	Día	T	Día	T	Día	T	Día	T	Día	T
		1	9,2	1	6,5	1	7,8	1	5,5	1	12,6	1	12,9	1	27,9	1	23,8	1	21,2	1	23,9
		2	9,3	2	3,8	2	7,3	2	4,2	2	16,2	2	12,6	2	24,3	2	24,4	2	18,6	2	19,2
		3	7,7	3	8,6	3	10,9	3	5,3	3	16,3	3	19,4	3	19,6	3	24,9	3	25,6	3	17,6
		4	8,4	4	8,9	4	12,9	4	4,7	4	14,3	4	22,0	4	24,1	4	21,8	4	21,6	4	20,0
		5	6,5	5	5,9	5	11,1	5	6,1	5	12,8	5	25,2	5	22,3	5	18,7	5	16,8	5	18,4
		6	7,6	6	6,4	6	9,9	6	4,7	6	12,0	6	22,7	6	19,0	6	21,9	6	16,3	6	19,4
		7	7,5	7	7,2	7	9,1	7	7,2	7	10,8	7	14,9	7	18,2	7	27,6	7	22,3	7	16,8
		8	6,1	8	11,1	8	13,3	8	14,3	8	10,0	8	18,4	8	16,6	8	22,5	8	23,1	8	19,8
		9	5,3	9	11,6	9	10,1	9	12,9	9	14,7	9	18,1	9	24,8	9	21,9	9	22,0	9	19,3
		10	4,6	10	9,5	10	14,9	10	11,4	10	13,4	10	16,4	10	22,2	10	19,6	10	23,6	10	17,7
		11	4,4	11	10,1	11	14,3	11	14,4	11	16,8	11	18,8	11	20,3	11	23,2	11	23,7	11	16,1
		12	5,9	12	9,1	12	9,4	12	12,4	12	18,6	12	16,8	12	24,4	12	26,8	12	25,0	12	15,3
		13	10,6	13	8,5	13	13,4	13	9,7	13	17,6	13	23,0	13	14,7	13	25,4	13	21,1	13	17,3
		14	9,2	14	9,0	14	10,7	14	10,3	14	13,1	14	22,3	14	15,4	14	22,4	14	19,1	14	21,9
		15	9,8	15	6,9	15	11,4	15	11,2	15	14,6	15	20,2	15	26,3	15	23,0	15	22,4	15	21,2
		16	7,7	16	5,7	16	12,7	16	14,9	16	12,8	16	12,0	16	29,3	16	27,2	16	25,4	16	14,4
		17	7,0	17	2,1	17	12,0	17	11,7	17	12,7	17	11,9	17	26,6	17	26,1	17	24,4	17	15,1
18	5,1	18	5,7	18	2,7	18	10,2	18	9,0	18	11,8	18	15,9	18	21,2	18	23,6	18	22,2	18	18,2
19	6,9	19	4,2	19	5,9	19	8,0	19	12,2	19	11,6	19	22,2	19	24,1	19	28,0	19	25,4	19	20,4
20	9,4	20	3,9	20	6,6	20	6,1	20	14,0	20	10,2	20	17,7	20	30,0	20	26,9	20	28,9	20	19,3
21	9,4	21	7,7	21	9,6	21	4,9	21	19,5	21	12,8	21	13,6	21	25,4	21	29,4	21	29,3	21	18,7
22	7,9	22	9,9	22	9,3	22	11,6	22	16,9	22	17,1	22	19,2	22	23,4	22	23,2	22	27,9	22	19,7
23	6,0	23	9,2	23	10,7	23	15,5	23	9,1	23	18,1	23	23,7	23	21,7	23	27,7	23	23,3	23	21,2
24	9,9	24	6,5	24	4,3	24	16,8	24	8,5	24	15,5	24	25,3	24	25,2	24	23,4	24	27,6	24	23,2

25	9,9	25	4,2	25	7,1	25	17,8	25	12,9	25	14,4	25	25,6	25	26,6	25	17,2	25	25,4	25	23,5
26	10,4	26	3,0	26	6,9	26	12,9	26	17,9	26	13,9	26	19,7	26	22,5	26	18,3	26	22,1	26	22,8
27	9,4	27	5,8	27	5,8	27	6,4	27	19,1	27	11,7	27	17,7	27	23,3	27	27,4	27	23,3	27	19,8
28	9,5	28	9,7	28	7,3	28	7,1	28	11,9	28	13,2	28	19,7	28	26,7	28	28,2	28	25,4	28	22,3
29	9,7	29	11,1	29	9,1	29	6,8	29	9,5	29	21,1	29	20,8	29	29,2	29	30,8			29	21,2
30	10,6	30	9,2	30	9,1	30	14,7	30	10,6	30	21,3	30	24,9	30	29,1	30	29,1			30	19,7
31	9,6			31	6,9	31	11,6			31	18,3			31	24,4	31	22,2			31	18,5

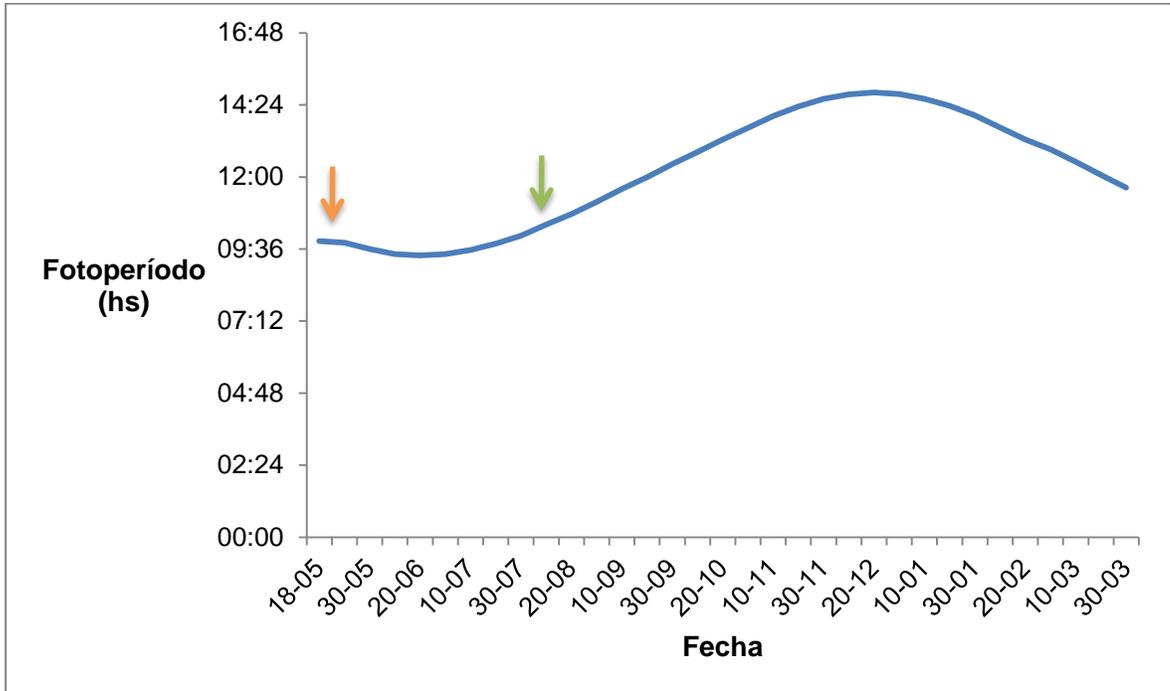


Imagen 2. Fotoperíodo de los días durante los cuales transcurrió el experimento de vernalización graficados en los días 10, 20 y 30 de cada mes (exceptuando el día 18/05/2016 en el que comenzó la experimentación). Las flechas (, ) indican el momento en el que comenzaron los experimentos VRN1 y VRN2, respectivamente.



Imagen 3. Planta aislada en estado reproductivo de una población *B. rapa* resistente a glifosato creciendo dentro de un lote de soja RR en el partido de Necochea.



Imagen 4. Planta aislada en estado de fructificación de una población *B. rapa* resistente a glifosato dentro de un lote de soja RR en el partido de Azul.