

XXII Congreso de la ALAM I Congreso de la ASACIM

DETECCIÓN DE RESISTENCIA TRANSGÉNICA A GLIFOSATO EN POBLACIONES NATURALES DE *Brassica napus* L. y *B. rapa* L.

Claudio E. Pandolfo¹, Alejandro Presotto¹, Miguel Cantamutto²

¹Dpto. de Agronomía, UNS; CONICET Bahía Blanca. San Andrés 800, 8000 Bahía Blanca.

cpandolfo@cerzos-conicet.gob.ar; apresotto@uns.edu.ar

²EEA INTA Ascasubi. Ruta 3 Km 794, 8142 Hilario Ascasubi. cantamutto.miguel@inta.gob.ar

RESUMEN

Brassica rapa L. y *B. napus* L. son dos especies crucíferas, ampliamente cultivadas a nivel mundial. La colza (*B. napus*), uno de los principales cultivos oleaginosos del mundo, cuenta con cultivares transgénicos resistentes a glifosato en Canadá, Estados Unidos, Australia, Japón y Chile. La forma silvestre de *B. rapa* es una maleza invasora de gran cantidad de cultivos en todo el mundo. En 2012, en la provincia de Buenos Aires fueron halladas poblaciones ferales de *B. napus* con probada resistencia a glifosato. Durante 2014 se hallaron poblaciones de *B. rapa* en la misma región, que no eran controladas con la aplicación de glifosato a dosis comercial. Estas plantas fueron caracterizadas morfológicamente y se determinó el perfil ácido de sus semillas. Todos los caracteres evaluados correspondieron con lo descrito para *B. rapa*. Ensayos de dosis-respuesta demostraron que el biotipo fue altamente resistente a glifosato. Se demostró además que este biotipo presentó resistencia múltiple a herbicidas inhibidores de la AHAS. El origen transgénico de la resistencia a glifosato de este biotipo de *B. rapa* y de biotipos de *B. napus* fue comprobado mediante un test inmunológico, que confirmó la expresión de la proteína C4 EPSPS. Este descubrimiento sugiere que la resistencia a glifosato podría provenir de cultivos de colza transgénica realizados de manera informal en el país o de individuos ingresados como contaminante de semilla, e implicaría la ocurrencia de flujo génico entre poblaciones ferales de *B. napus* y *B. rapa*.

Palabras clave: nabo silvestre, colza, transgénesis, feralidad, flujo génico.

SUMMARY

Brassica rapa L. and *B. napus* L. are two Brassicaceae species cultivated worldwide. Oilseed rape (*B. napus*) is one of the most important sources of vegetable oil. Transgenic glyphosate-resistant cultivars are grown in Canada, USA, Australia, Japan and Chile. Wild *B. rapa* is an invasive species that occurs as a weed in several countries. In 2012, feral populations of *B. napus* with glyphosate resistance were found in Buenos Aires province. During 2014 wild *B. rapa* populations that were not controlled with glyphosate were found in the same area. These plants were morphologically characterized and the acidic profile of their seeds was determined. All characters agreed with the description for *B. rapa*. Dose-response assay showed that the biotype was highly resistant to glyphosate. It was also probed that it had multiple resistance to AHAS-inhibiting herbicides. The transgenic origin of the glyphosate resistance of *B. rapa* and *B. napus* biotypes was tested by an immunological test which confirmed the expression of C4 EPSPS protein. This finding suggests that glyphosate resistance might come from GM oilseed rape crops cultivated illegally in the country or as a contaminant of seed, and implies gene flow between feral populations of GM *B. napus* and wild *B. rapa*.

Keywords: wild turnip, oilseed rape, transgenesis, ferality, gene flow.

INTRODUCCIÓN

Brassica rapa L. y *B. napus* L. son dos especies anuales de la familia de las Brassicaceae (Cruciferae), cultivadas desde hace siglos como hortícolas u oleaginosas [1]. *B. napus* (colza tipo argentino) se destaca por su elevada participación en la producción

mundial de aceites comestibles [2]. El cultivo cuenta con cultivares transgénicos resistentes a glifosato en Canadá, Estados Unidos, Australia, Japón y Chile [3]. En nuestro país, el cultivo de estas variedades fue prohibido debido a la existencia de parientes silvestres naturalizados, con los cuales puede haber flujo genético [4, 5]. La forma silvestre de *B. rapa*, de la cual se originaron las variedades de nabo alimenticio y colza tipo polaco, es una maleza altamente invasora de una gran cantidad de cultivos en todo el mundo [6]. En Argentina es una maleza común en cultivos de cereales, oleaginosas y hortícolas de la región pampeana, conocida como nabo silvestre [7].

B. napus no se conoce en estado silvestre, pero bajo condiciones especiales suelen producirse escapes de plantas de los cultivos de colza, que forman poblaciones ferales persistentes [8, 9]. En regiones donde está autorizado el cultivo de colza transgénica, como en Canadá y Estados Unidos, suelen ocurrir poblaciones ferales de *B. napus* genéticamente modificadas [10, 11]. Ello también se ha observado en regiones donde el cultivo de estas variedades no estaba autorizado, pero en las cuales existe intenso tráfico de granos de colza importados, como Japón, Bélgica y Suiza [12–14]. En las mismas zonas donde se han encontrado poblaciones ferales de *B. napus* transgénica, se ha comprobado la presencia de híbridos con la especie silvestre *B. rapa*, y transferencia del transgen de resistencia a glifosato [10, 15–17].

En 2012 fueron halladas poblaciones ferales de *B. napus* con resistencia a glifosato en lotes sin registros de cultivo de colza-canola, en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. En uno de estos biotipos se cuantificó una supervivencia al glifosato de hasta 30 veces la dosis comercial ($DL_{50}=27,4 \text{ kg e.a. ha}^{-1}$) [18, 19]. Durante 2014 se hallaron poblaciones de *B. rapa* (nabo) en la misma región, que no eran controladas con la aplicación de glifosato a dosis comercial. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta a glifosato y a varios herbicidas alternativos en una población natural de *B. rapa*, y determinar el origen de la resistencia a glifosato en este biotipo y en las poblaciones ferales de *B. napus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se caracterizó mediante marcadores morfológicos y composición química del grano una población de *B. rapa* (LDU), con posible resistencia a glifosato, hallada en lotes del sudeste de la provincia de Buenos Aires. Como control se utilizaron poblaciones naturales de la misma especie y cultivares de *B. napus*.

Se caracterizó la resistencia del biotipo de *B. rapa* LDU a glifosato mediante un ensayo de dosis-respuesta. La progenie de los individuos sobrevivientes en el campo fue criada en macetas, a razón de 10 plantas por maceta. Se aplicaron dosis crecientes del herbicida glifosato (formulado al 39,6%), desde 0 hasta 30 veces la dosis comercial ($X=1,29 \text{ kg e.a. ha}^{-1}=3,60 \text{ L P.C. ha}^{-1}$). Como control se empleó un biotipo de *B. rapa* (JUA) obtenido de un ambiente sin selección por herbicidas y de conocida susceptibilidad. La aplicación fue realizada al estado de 3-4 hojas, usando un equipo de CO_2 a presión constante, con pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB), velocidad de $1,45 \text{ km h}^{-1}$ y caudal de 161 L ha^{-1} . Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro réplicas. La supervivencia se evaluó cuatro semanas después de la pulverización utilizando una escala de daño visual, y la respuesta fue expresada como porcentaje de supervivencia. Los datos se ajustaron a un modelo de regresión log-logístico no lineal con tres parámetros. Las curvas de dosis-respuesta se realizaron utilizando el paquete drc del software estadístico R3.1.3 [20]. Se estimó la dosis requerida para matar el 50% de las plantas (DL_{50}). Este valor fue utilizado para calcular el factor de resistencia (FR), que se definió como la relación entre las DL_{50} de los biotipos resistente y susceptible.

Se exploró la sensibilidad del biotipo de *B. rapa* LDU a tres herbicidas alternativos al glifosato, pertenecientes a distintas familias químicas de inhibidores de la enzima AHAS. La progenie de los individuos sobrevivientes en el campo fue criada de igual forma que en el ensayo anterior. Se aplicó imazapir ($X=80 \text{ g p.a. ha}^{-1}$), metsulfurón ($X=6 \text{ g p.a. ha}^{-1}$) y diclosulam ($X=25,2 \text{ g p.a. ha}^{-1}$), a doble dosis comercial (2X), en igual forma que para el ensayo de dosis-respuesta. Se evaluó daño visual y se analizó mediante anova y test de

comparación de medias (Tukey), con el software estadístico R3.1.3.

Para detectar la presencia del transgen de resistencia a glifosato se utilizó un kit comercial (QuickStik™ Kit for Roundup Ready® Canola Leaf & Seed) diseñado para detectar la expresión de la proteína CP4 EPSPS en los tejidos. Se utilizaron hojas frescas de 8 individuos del biotipo feral de *B. napus* resistente a glifosato GER y 12 individuos del biotipo de *B. rapa* LDU. Las plantas se encontraban en condiciones de invernáculo, en el estadio de dos hojas verdaderas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos de las plantas del biotipo LDU correspondieron con lo descripto para *B. rapa*. El análisis químico de las semillas de LDU mostró un perfil ácido similar al de otras poblaciones naturales de *B. rapa*. Los valores de ácido erúico (22:1) y glucosinolatos fueron mayores a 47% y 39 mmoles gr⁻¹ (base 8,5%), valores congruentes con los observados en el nabo silvestre.

El biotipo de *B. rapa* LDU mostró elevada resistencia a glifosato, y fue significativamente diferente a la población susceptible usada como control. La DL₅₀ de LDU fue de 13,99 kg e.a. ha⁻¹ (cerca a 11 veces la dosis comercial=39,6 L.P.C. ha⁻¹), mientras que la del biotipo susceptible fue menor a 0,01 kg e.a. ha⁻¹ (menos de 1/100 la dosis comercial), lo que constituyó un factor de resistencia mayor a 1500 (Figura 1). La supervivencia del biotipo LDU fue mayor al 15% a la dosis más alta evaluada, equivalente a 30 veces la dosis comercial (38,4 kg e.a. ha⁻¹=108,0 L.P.C. ha⁻¹).

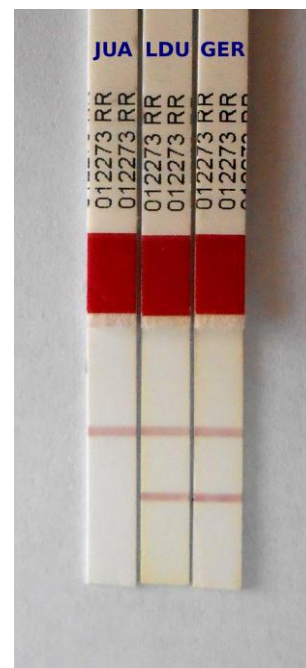
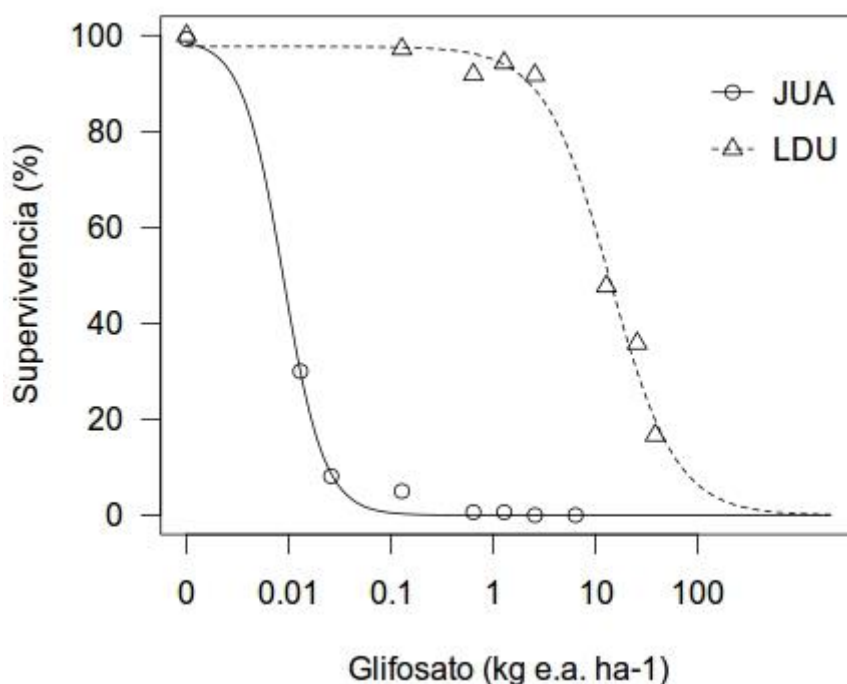


Figura 1. Izquierda: Curva de dosis-respuesta de un biotipo resistente (LDU) y una población susceptible (JUA) de *B. rapa*. Derecha: Resultados del test inmunológico confirmando la presencia del transgen de resistencia a glifosato en una población de *B. rapa* (LDU) y en un biotipo feral de *B. napus* (GER), en contraste con un control negativo de *B. rapa* (JUA).

El biotipo de *B. rapa* LDU fue además resistente a varios herbicidas inhibidores de la enzima AHAS, pertenecientes a tres familias químicas distintas. La supervivencia fue superior al 90% para todos los herbicidas aplicados, diferenciándose del biotipo susceptible que fue totalmente controlado por los herbicidas.

Los resultados revelaron que la totalidad de los individuos del biotipo feral de *B. napus* mostraron respuesta positiva al test, confirmando que poseían la enzima CP4 EPSPS

proveniente de *A. tumefaciens*. Por su parte, 10 individuos de los 12 evaluados en la población de *B. rapa* LDU fueron positivos. Todos los individuos usados como control presentaron una sola línea superior, indicando la ausencia de la proteína y la validez del test (Figura 1).

CONCLUSIONES

La población de *Brassica rapa* no controlada por glifosato a nivel de campo mostró elevada resistencia a este activo en ensayos bajo condiciones controladas, incluso a dosis 30 veces por encima de la dosis comercial. Por otra parte, este mismo biotipo presentó resistencia a herbicidas inhibidores de la AHAS. Se comprobó que tanto estas plantas, como las de la población feral de *B. napus* descrita por Pandolfo et al. (2013) [18], presentaron resistencia a glifosato de origen transgénico. El origen de estos biotipos es incierto, debido a la prohibición existente en nuestro país para el cultivo de variedades de colza-canola con el evento de transgénesis que confiere resistencia a glifosato. Este carácter podría provenir de cultivos de colza transgénica realizados de manera informal en el país o de individuos ingresados como contaminante de semilla importada antes de 2007, año a partir del cual se solicita análisis probatorio de ausencia de material OGM [4]. El hallazgo del transgen en poblaciones naturales de la maleza *B. rapa* implicaría el flujo génico con poblaciones ferales de *B. napus* que presentan este rasgo, o la introducción del biotipo como contaminante de semilla. La presencia de estas poblaciones con resistencia a glifosato en Argentina reafirma la conveniencia de rotar herbicidas con diferente sitio de acción. La invasividad de estos biotipos en ambientes agrícolas se ve aumentada por la presencia de resistencia a herbicidas. Este carácter le confiere una clara ventaja en sistemas agrícolas basados en el empleo intensivo de glifosato.

REFERENCIAS

- [1]. Brassicaceae in agriculture (2011). En: Genetics and Genomics of the Brassicaceae, 33-66 pp. Springer Berlin Heidelberg.
- [2]. FAOSTAT (2015). En: <http://faostat3.fao.org>
- [3]. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops (2012). ISAAA. 44p.
- [4]. Resolución 305/2007 (2007). SENASA.
- [5]. Resolución N° 228 (1997). CONABIA-SAGPyA.
- [6]. Canadian Journal of Plant Science, (2008), 88 (5), pp. 951–996.
- [7]. Guía descriptiva de malezas del Cono Sur (1994). INTA. 304p.
- [8]. Transgenic Research, (2012), 21 (1), pp. 1–21.
- [9]. Theoretical and Applied Genetics, (2001), 102 (6-7), pp. 841–846.
- [10]. Environmental Biosafety Research, (2006), 5 (2), pp. 67–75.
- [11]. PLoS One, (2011), 6 (10), pp. e25736.
- [12]. Environmental Biosafety Research, (2005), 4 (4), pp. 217–222.
- [13]. Environmental Sciences Europe, (2012), 24 (1), pp. 23.
- [14]. Environmental Science and Pollution Research, (2014), 21 (2), pp. 1455–1465.
- [15]. GM Crops, (2012), 2 (3), pp. 201–210.
- [16]. Molecular Ecology, (2008), 17 (5), pp. 1387–1395.
- [17]. Canadian Journal of Botany, (2006), 84 (12), pp. 1842–1851.
- [18]. Identificación de un biotipo feral de *B. napus* con resistencia a glifosato (2013). En: Libro de Resúmenes, III JIPCT, p. 44–45. CERZOS-CONICET.
- [19]. Journal of Basic and Applied Genetics, (2014), 25(Suppl1), pp. 275.
- [20]. R: A language and environment for statistical computing (2015). En: <http://www.r-project.org/>