

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS GENÓMICAS PARA LA DETECCIÓN DE OGM Y MONITOREO DEL IMPACTO AMBIENTAL EN ESPECIES BLANCO DE OGM

DEVELOPMENT OF GENOMIC TOOLS FOR GMOS DETECTION AND MONITORING OF THEIR ENVIRONMENTAL IMPACT ON TARGET SPECIES

Viviana Pedroarias (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar), **Luis Fernández** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar), **Noelia Ulrich** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar), **Lucila Peluffo** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar), **María Carolina Martínez** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar, FCEyN-UBA), **Ana J. Distéfano** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar, FCEyN-UBA, CONICET), **Marcela Medina** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar), **Vanesa Fretes** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar), **Luis de Haro** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar, CONICET), **Alicia Sciocco** (IMYZA-CICVyA-INTA), **Esteban Hopp** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar, FCEyN-UBA) y **Daniela Tosto** (Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar, FCEyN-UBA).

Resumen: La Argentina es uno de los países con mayor adopción de cultivos genéticamente modificados. Se constituye en el tercero a nivel mundial, con el 18 % de la superficie global de organismos genéticamente modificados (OGM). Cuenta con una superficie sembrada de 24,4 millones de hectáreas. Hasta el momento, se encuentran aprobados para la comercialización en el país 29 cultivos genéticamente modificados: 21 eventos para maíz, 5 para soja y 3 para algodón.

Ante este escenario es fundamental contar con herramientas que permitan la detección de OGM y el monitoreo del impacto ambiental de los OGM liberados.

Se proponen el desarrollo y la adaptación de distintos protocolos que involucran metodologías moleculares para la detección de OGM presentes y futuros, así como también OGM aprobados para su comercialización, regulados y no autorizados en la Argentina.

El cultivo de OGM resistentes a herbicidas o a insectos tiene un impacto complejo en los agroecosistemas, e involucra presión de selección sobre las especies blanco de estas tecnologías, con el consecuente surgimiento y proliferación de variantes resistentes de las especies blanco. En este contexto es fundamental el desarrollo de herramientas genómicas para el monitoreo del impacto de los OGM liberados comercialmente, realizando investigaciones sobre la genómica y dinámica poblacional de insectos plaga y malezas afectadas por su utilización. Se plantea el estudio de la maleza *Sorghum halepense* reportada como resistente a glifosato en diversas regiones del país, y de *Diatraea saccharalis* (barrenador del tallo, blanco del maíz Bt) colectados en maíz, en hospedantes alternativos y en maíces "refugio".

Summary: Argentina is one of the countries with the highest adoption of GM crops, becoming the third country in the world, with 18% of the global area of genetically modified organisms (GMOs). It has a planted area of 24.4 million hectares. So far, 27 GM crops have been approved for marketing in the country: 21 events for corn, 5 for soybean and 3 for cotton. Given this scenario, it is essential to develop genomic tools for the detection of GMOs and to monitor the environmental impact of the released ones. The development and adaptation of different protocols involving molecular methods for the detection of present and future GMOs, as well as GMOs approved for marketing, regulated and unauthorized in Argentina, is proposed. The cultivation of herbicide- or insect-tolerant GMOs and has a complex impact on agroecosystems involving selection pressure on target species of these technologies and the consequent emergence and spread of their resistant strains. In this context, it is essential to develop genomic tools for monitoring the impact of commercially released GMOs, conducting research on genomics and population dynamics of insect pests and weeds affected by their utilization. We propose the study of *S. halepense*, a weed that has been reported resistant to glyphosate in various regions of the country, and *D. saccharalis* collected in maize, in alternate hosts and in "refuge" maize.

Los resultados esperados son:

- La evaluación, el desarrollo y la adaptación de distintas metodologías moleculares para el establecimiento de protocolos para la detección de OGM presentes y futuros, desregulados, regulados y no autorizados en la Argentina.
- Obtención de marcadores moleculares en ambas especies blanco (*D. saccharalis* y *S. halepense*) que permitan llevar a cabo el monitoreo del impacto de los OGM.
- El conjunto de resultados obtenidos permitirá dar apoyo a las políticas de bioseguridad y a programas de trazabilidad genética, así como también monitorear el impacto ambiental de los OGM.

Palabras clave: detección de OGM, organismos blanco, sorgo de Alepo, *Diatraea saccharalis*.

The expected results are:

- The assessment, development and adaptation of different molecular methodologies for establishing protocols for the detection of present and future GMOs, those regulated, non regulated and unauthorized ones in Argentina
- Obtaining molecular markers in both target species (*D. saccharalis* and *S. halepense*) that allow the monitoring of the impact of GMOs
- The set of results obtained will allow to support biosafety policies and genetic traceability programs, as well as to monitor the environmental impact of GMOs.

Keywords: GMO detection, target organisms, johnsongrass, *Diatraea saccharalis*.

Este artículo presenta el diseño de un proyecto de investigación sobre el *Monitoreo de OGM e impacto sobre organismos blanco de la tecnología OGM*, que resultó galardonado en el marco de los «Premios Senasa a la investigación, transferencia y comunicación de la sanidad, la calidad y la inocuidad agroalimentarias 2014». El proyecto propone desarrollar herramientas genómicas para la detección de Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y para el monitoreo del impacto ambiental de aquellos liberados comercialmente, con investigaciones de base sobre la genómica y dinámica poblacional de insectos plaga y malezas afectadas por la utilización de OGM.

Relevancia y justificación del proyecto

La Argentina es el tercer país a nivel mundial con mayor adopción de cultivos genéticamente modificados, con el 18% de la superficie global de OGM. Cuenta con una superficie sembrada de 24,4 millones de hectáreas correspondientes a maíz, soja y algodón. Hasta el momento, se encuentran aprobados para la comercialización en el país 29 cultivos genéticamente modificados, que corresponden a 21 eventos para maíz, 5 para soja y 3 para algodón (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca y Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria).

Prácticamente el 100 % de la superficie de soja fue sembrada con soja tolerante al herbicida glifosato, mientras que el maíz y el algodón transgénicos ocuparon el 74 % y el 90 % del área destinada a esos cultivos, respectivamente. De esta manera la producción agrícola hoy está basada en cultivos transgénicos y debe analizarse su sustentabilidad en el tiempo (Bourguet *et al.*, 2000). Estos constan fundamentalmente de dos caracteres: la resistencia a insectos por expresión de genes de tipo cry1A presentes en los eventos Mon810, Bt11 y 176 y cry1F en el evento

TC 1507 (todos procedentes de *Bacillus thuringiensis*) y la resistencia a glifosato por expresión de un gen (de la cepa cp4 de *Agrobacterium* sp. presente en el evento de soja GTS 40-3-2) codificante para la enol-piruvato-shiquimato-fosfato sintasa (EPSPS).

Dada la importancia de la Argentina como país agroexportador y la alta adopción de este tipo de cultivos, surgen dos necesidades de intervención: por un lado, se requiere del desarrollo constante de nuevos y rigurosos métodos analíticos destinados a la detección, la identificación y la cuantificación de los cultivos modificados genéticamente y de sus derivados, ajustándose a la trazabilidad exigida para este tipo de productos. Por otro lado, se requiere del monitoreo de la sustentabilidad de los cultivos OGM, que puede verse amenazada debido al surgimiento y la proliferación de variantes resistentes de las especies blanco de estas tecnologías.

Desarrollo de herramientas genómicas para la detección de OGM

La adopción de esta tecnología no sigue la dicotomía tradicional entre países desarrollados y en vías de desarrollo. Así, mientras los alimentos genéticamente modificados (alimentos GM) fueron rápidamente aceptados en América, en Europa existe una gran reticencia hacia estos. Las normas europeas son extremadamente estrictas en la comercialización y la trazabilidad de los organismos y alimentos genéticamente modificados: la cantidad máxima permitida de OGM en un producto alimenticio para evitar el etiquetado debe ser menor al 0,9 %. Los métodos de detección de OGM más usados involucran la detección de la proteína expresada por el gen introducido a través de su anticuerpo específico (Bonfini *et al.*, 2001) o bien la de la secuencia de ADN usada para la modificación genética mediante PCR (James *et al.*, 2003). La técnica de PCR es la más utilizada, pues detec-

ta pequeñas cantidades de OGM en materiales crudos y en alimentos procesados (Germi *et al.*, 2004). Se emplea en sus dos variantes: PCR Multiplex (James *et al.*, 2003) y PCR en tiempo real, que permite cuantificar la proporción de ADN transgénico en una muestra (Bonfini *et al.*, 2001). Se trata de un área de investigación muy activa, en la que las tecnologías rápidamente pueden pasar a ser obsoletas y existe una búsqueda permanente de superación en las técnicas disponibles (JCR, 2013).

Monitoreo del impacto ambiental de los OGM liberados comercialmente

El monitoreo y la evaluación del impacto de los cultivos OGM en los agroecosistemas es de importancia y requiere de la participación de distintas disciplinas. El trabajo propuesto se enfoca en los aspectos moleculares y se encuentra dentro del marco de la Comisión Nacional Asesora sobre Plagas Resistentes (Conapre-Senasa) y de un plan de manejo de resistencia de insectos (MRI), priorizado por la Comisión Nacional Asesora sobre Biotecnología Agropecuaria (CONABIA).

La sustentabilidad de los cultivos OGM puede verse amenazada debido al surgimiento y la proliferación de variantes resistentes de las especies blanco de estas tecnologías. En este contexto es fundamental el desarrollo de herramientas genómicas para el monitoreo del impacto de los OGM liberados comercialmente con investigaciones sobre la genómica y dinámica poblacional de insectos plaga y malezas afectadas por la utilización de estos.

La resistencia a glifosato (RG) en soja, colza, algodón y maíz constituye el carácter más difundido en cultivos transgénicos y la presión de selección que se ejerce sobre las malezas que son blancos de la acción del herbicida son únicas en la historia. La selección de malezas resistentes como consecuencia del uso de este tipo de transgénicos constituye un riesgo ambiental muy significativo, y su monitoreo resulta fundamental para analizar la sustentabilidad de esta combinación OGM-herbicida. Diversos estudios comenzaron a reportar la resistencia en malezas que son blanco de la acción del herbicida (Heap, 2005 y Owen, 2008). El sorgo de Alepo es una de las diez malezas más importantes del mundo (Holm *et al.*, 1977) y en la Argentina ya se comunicaron focos de resistencia a glifosato en distintos puntos del país. Estos biotipos resistentes no poseen aún ningún tipo de atributo morfológico que permita su diferenciación visual.

El maíz Bt presenta resistencia a insectos mediada por la expresión de genes cry. Recientemente se ha documentado un caso de evolución de la resistencia a campo a las proteínas Bt (Gassmann *et al.*, 2011) y se espera que esta ocurra en mayor frecuencia dado que en laboratorio fue posible seleccionar varios aislamientos resistentes en distintas especies de insectos (*Plutella xylostella*, *Pectinophora gossypiella* y *He-*

licoverpa armigera (Ferré y Van-Rie 2002); *Ostrinia nubilalis* (Bourguet *et al.*, 2003); *Chrysomela tremulae* (Génissel *et al.*, 2003; Augustin *et al.*, 2004); *Diatraea saccharalis* (Wu *et al.*, 2009). En particular en la Argentina, en el 2013, se reportó un foco de resistencia (INASE, 2013) que también es tema de estudio del presente proyecto.

Los resultados obtenidos en cuanto a la detección de OGM serán transmitidos a los organismos oficiales de control (Senasa, Inase), productores de semillas, empresas, productores orgánicos, certificadoras, etcétera. Se está trabajando junto con organismos públicos interesados en la conformación del Sistema Metrológico Nacional de Referencia para la detección y cuantificación de OGM, que incluirá provisión de materiales de referencia, armonización de metodologías y organización de interlaboratorios. De la misma manera, se está trabajando en la configuración y formación de la «Red Latinoamericana y del Caribe de laboratorios de detección de OGM», cuyo objetivo es establecer métodos, materiales y comparación para lograr resultados comparables en toda la región.

Los marcadores más adecuados que se definan para la caracterización y monitoreo de la variación en las frecuencias alélicas en *D. saccharalis* serán puestos a disposición para su utilización por los distintos organismos oficiales de control. De esta forma se podría establecer un sistema de estudio y monitoreo de la dinámica poblacional en distintas regiones del país. Del mismo modo, los resultados obtenidos respecto al surgimiento de la resistencia / tolerancia al glifosato en el sorgo de Alepo se comunicarán al Senasa y a otros organismos oficiales, aportando una información crítica a la hora de tomar decisiones respecto del manejo de la maleza.

El presente proyecto propone el desarrollo de herramientas moleculares que permitan la detección de OGM respondiendo a las demandas del mercado (por ejemplo las altas exigencias de certificación del mercado europeo) que, de no cumplimentarse, podrían restringir las agroexportaciones con el consiguiente perjuicio económico. Por otro lado, propone herramientas para el monitoreo de la resistencia en organismos blanco, algo fundamental para evaluar la sustentabilidad del sistema y para evitar, por ejemplo, la implementación de barreras paraarancelarias por parte de los países destinatarios de las semillas debido a un rechazo de exportaciones de granos con malezas resistentes.

De esta manera los estudios y desarrollos propuestos son de importancia para contribuir al monitoreo y a la evaluación de la sustentabilidad de esta tecnología de importancia regional, en cuanto a que atiende una problemática que cada vez más se hace presente en la región.

Objetivos y resultados esperados

Objetivo general

Desarrollar herramientas moleculares para la detección de OGM y el monitoreo del impacto ambiental de los OGM liberados comercialmente, realizando investigaciones de base sobre la genómica y la dinámica poblacional de insectos y malezas afectadas

Objetivos específicos

1- Evaluar, desarrollar y adaptar distintas metodologías moleculares para la detección de OGM liberados y en vías de liberación, autorizados y no autorizados en la Argentina, cubriendo los aspectos de apoyo de las políticas de bioseguridad del MAGYP y de programas de trazabilidad genética.

Los productos esperados son sistemas de detección molecular rápidos y eficientes para la detección simultánea e independiente de los distintos eventos OGM aprobados para su comercialización, regulados o no autorizados en el país en distintas matrices optimizados y desarrollados.

2- Desarrollar y sistematizar la técnica de microsatélites y análisis de secuencias de cloroplastos (u otro marcador molecular) en *S. halepense* para el análisis de la dinámica poblacional y la filogeografía de malezas resistentes a glifosato.

El producto esperado es la obtención de marcadores moleculares y secuencias nucleotídicas informativas para monitorear el impacto ambiental del uso del glifosato

3- Desarrollar y sistematizar marcadores moleculares y análisis de secuencias mitocondriales en *D. saccharalis* para el análisis de la dinámica poblacional y la filogeografía de insectos plaga blanco de la tecnología Bt.

El producto esperado es la obtención de marcadores moleculares y secuencias nucleotídicas informativas en *D. saccharalis* para monitorear el impacto ambiental del uso del maíz Bt OGM.

Resultados esperados

Disponer de sistemas de detección molecular rápidos y eficientes, de costos razonables, que ofrezcan resultados armonizados a nivel nacional, regional e internacional, para la detección o cuantificación, simultánea o independiente de los distintos eventos OGM aprobados para su comercialización, regulados y no autorizados en la Argentina, en las diferentes matrices, optimizados o desarrollados localmente. Respecto al impacto de los OGM, se espera la obtención de marcadores moleculares en especies blanco (como por ejemplo el barrenador del tallo *D. saccharalis* y la maleza resistente a glifosato sorgo de Alepo) que permitan llevar a cabo ese monitoreo.

Metodología

Dada la problemática planteada para este proyecto, se procura lograr el desarrollo y la implementación de herramientas genómicas para la detección de OGM y para el monitoreo del impacto ambiental de los OGM liberados comercialmente con investigaciones sobre la genómica y la dinámica poblacional de insectos plaga y malezas afectadas por la utilización de estos.

El Laboratorio de Detección de OGM del INTA es considerado uno de los principales laboratorios del país y es donde se realizan gran parte de los análisis de detección de OGM de la Argentina. Las constantes y continuas mejoras en la detección y la cuantificación de los OGM, así como el desarrollo de normas internacionales que permitan unificar los criterios de análisis, obligan a una permanente actualización en la metodología utilizada, por medio del desarrollo y la optimización de nuevas técnicas de detección y de cuantificación. En ese sentido, se evaluarán protocolos validados internacionalmente mediante la aplicación de las metodologías sugeridas.

El aumento en el número de eventos que se aprueban a nivel internacional, y también en la Argentina, obliga a diseñar nuevos sistemas de detección simultánea e individual para los distintos requerimientos de la producción agropecuaria (orgánica, exportación a Europa, monitoreo de refugios, industria semillera, importación de semillas, granos y alimentos, etc.). En este contexto se evaluará la posibilidad de distintas alternativas de multiplexado y se comparará su sensibilidad y costo relativo con las actuales tecnologías de PCR en tiempo real y final.

Las distintas tecnologías por implementar son:

1- Real Time PCR: Las metodologías más empleadas son aquellas que se basan en la detección de secuencias específicas presentes en los transgenes mediante la amplificación en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa. Emplea reactivos químicos fluorescentes como agentes intercalantes (SybrGreen) o sondas específicas (Taqman). La fortaleza de esta metodología se basa en la sensibilidad y la especificidad de detección.

2- PCR Convencional: Permite desarrollar herramientas para la detección cualitativa de OGM en las muestras. Esta técnica es apropiada cuando se desea detectar presencia/ausencia de OGM sin necesidad de cuantificar. La ventaja es que presenta un bajo costo.

3- PCR Multiplex: Se evaluará la implementación de distintas alternativas de multiplexado (uso del secuenciador automático, previa marcación fluorescente de oligonucleótidos específicos para cada transgén, utilización de tecnología Illumina Veracode basada en nanotecnología) y se comparará su sensibilidad y su costo relativo con las actuales tecnologías de PCR en tiempo real y final.

4- Se optimizarán las técnicas de las que se dispone actualmente (puntos 1 y 2) con el fin de mejorar la sensibilidad e incertidumbre de los resultados, acorde a las normativas internacionales (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>).

Nuevos eventos: Conforme se introduzcan en el mercado nuevos eventos de OGM, se deberán ir diseñando y ensayando nuevos reactivos (fundamentalmente oligonucleótidos iniciadores, pero también los controles positivos y negativos de cuantificación) que permitan detectarlos y diferenciarlos en forma específica. Posteriormente se adaptarán las condiciones de PCR en tiempo real o final con las que se estandarizarán los protocolos para el escalado (scaling up) que requiere el análisis de grandes cantidades de muestras, así como su adecuación a normas de calidad ISO.

En cuanto al impacto de los OGM, el proyecto plantea el análisis de un sistema formado por OGM, malezas e insectos, entre otros, con una dinámica ecoevolutiva propia. El problema abordado en este proyecto es un emergente de la dinámica de un sistema artificial en la naturaleza donde los procesos evolutivos siguen operando. Se plantea el análisis mediante la implementación de herramientas moleculares del surgimiento de resistencia en los distintos organismos blanco de los OGM (*D. saccharalis* y *S. halepense*) como una respuesta del sistema.

El estudio de la caracterización filogeográfica y dinámica poblacional en sorgo de Alepo y *D. saccharalis* se llevará a cabo mediante la utilización de distintos marcadores moleculares (AFLP Fragment Length Polymorphisms y SSR Simple Sequence Repeats), así como también mediante el análisis de secuencias de cloroplastos y mitocondriales.

El análisis molecular de sorgos reportados tanto resistentes como susceptibles a glifosato permitirá seguir trabajando en las hipótesis del posible origen único o múltiple de la resistencia (Fernández *et al.*, 2013; Vila-Aiub *et al.*, 2012). Muestras de sorgo de Alepo sospechosas de poseer tolerancia/resistencia a tratamiento con glifosato provistas por el Senasa, por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes EEAOC) y recolectadas a campo por distintas estaciones experimentales del INTA, se cultivarán vegetativamente para obtener masa vegetal con la cual poder extraer ADN de calidad para los análisis y, eventualmente, semillas para el análisis genético del carácter. Se continuará con la transferencia de marcadores microsatélites descriptos para *S. bicolor* a *S. halepense* y se analizarán en el secuenciador automático —sistema ABI 3130x/Genetic Analyzer—. Con el fin de inferir hipótesis filogeográficas, se evaluará la información provista por secuencias de cloroplastos (Shaw *et al.*, 2005 y 2007; Heinze, 2007) provenientes de muestras resistentes y sensibles provenientes de distintos lugares

En cuanto a los marcadores moleculares para *D. saccharalis*, se cuenta con la experiencia y puesta a punto de algunos

sistemas que fueron desarrollados en el laboratorio IB INTA Castelar (Parody *et al.*, 2010). En particular en este estudio se utilizarán los marcadores más adecuados para la problemática emergente como por ejemplo los AFLP (marcadores neutros y anónimos que permiten analizar un gran número de loci por reacción combinando el análisis de polimorfismo sobre la base de la variabilidad en los sitios de restricción y la versatilidad de la amplificación por PCR) y el estudio de secuencias mitocondriales. Para su realización, se utilizará el secuenciador automático —sistema ABI 3130x/Genetic Analyzer—.

Las poblaciones de *D. saccharalis* serán colectadas en distintas regiones del país con especial atención a la zona donde se reportó el primer foco de insectos resistentes. Este muestreo también incluirá insectos colectados de hospedantes alternativos (caña de azúcar, sorgo, etc.) y de maíces no Bt del área “refugio”.

También se plantea explorar la transferencia de microsatélites desarrollados en especies de lepidópteros relacionadas a *D. saccharalis*, como *Ostrinia nubilalis* (Kim *et al.*, 2008; Coates *et al.*, 2005) y *Cydia pomonella* (Contreras *et al.*, 2008). Hoy en día los métodos basados en ADN ofrecen ventajas insustituibles para el estudio de la variabilidad y la estructura genética de las poblaciones. En el presente estudio se plantea la adaptación, el desarrollo y la implementación de este tipo de marcadores para realizar estudios a nivel poblacional (Krumm, 2008; Guzman *et al.*, 2007) y filogeográficos (Mirabello, 2006) en las dos especies blanco.

Para la realización del proyecto y la implementación de las distintas metodologías se utilizarán los equipos disponibles en el Instituto de Biotecnología: equipos de PCR convencional y en tiempo real, entre estos el equipo StepOnePlus™ Real Time PCR que utiliza la tecnología de HRM high resolution melting, la cual permite el genotipado a baja escala. También se cuenta con el equipo Illumina BeadXpress, que emplea la tecnología VeraCode, plataforma de rendimiento intermedio que permite el análisis de hasta 384 SNP. También están disponibles dos secuenciadores automáticos (ABI 3130XL/ABI 3500 XL), acreditados bajo la norma ISO 17025.

Bibliografía

- Augustin, S.; Courtin, C.; Rejasse, A.; Lorme, P.; Genissel, A. y D. Bourguet (2004), «Genetics of resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* poplars in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae)», *Journal of Economic Entomology*, vol. 97, n.º 3, pp. 1058-64.
- Bonfini, L.; Heinze, P.; Kay, S. y G. Van den (2001), *Review of GMO detection and quantification techniques*, European Commission, Joint Research Centre.

- Bourguet, D., Chaufaux, J.; Séguin, M.; Buisson, C.; Hinton, J. L.; Stodola, T. J.; Porter, P.; Cronholm, G.; Buschman, L. y Andow, D. A. (2003), «Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*», *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 106, n.º 7, pp. 1225-33.
- Coates, B. S.; Hellmich II, R. L.; y Lewis, L. C. (2005), «Polymorphic CA/GT and GA/CT microsatellite loci for *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae)», *Molecular Ecology Notes*, vol. 5, n.º 1, pp. 10-12.
- Fernández, L.; de Haro, L.; Distéfano, A. J.; Martínez, M. C.; Lía, V.; Papa, J. C.; Olea, I.; Tosto, D. y H. E. Hopp (2013), «Population Genetics Structure of Glyphosate-Resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense* L. Pers) does not support a single origin of the Resistance», *Ecology and Evolution*, vol. 3, n.º 10, pp. 3388–3400.
- Ferré, J. y Van Rie, J. (2002), «Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*», *Annual Review of Entomology*, vol. 47, pp. 501-533.
- Fuentes-Contreras, E.; Espinoza, J. L.; Lavandero, B. y C. C. Ramírez (2008), «Population genetic structure of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from apple orchards in central Chile», *Journal of Economic Entomology*, vol. 101, n.º 1, pp. 190-198.
- Gassmann, A.; Petzold-Maxwell, J. L., Ryan S. Keweshan y M. W. Dunbar (2011), «Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm», *Plos One*, vol. 6, n.º 7, pp. 226-29.
- Génissel, A.; Augustin, Courtin, S.; Pilate, G.; Lorme, Ph. y Denis Bourguet (2003), «Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*», *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 270 (1517), pp. 791-797.
- Germini, A.; Zanetti, A.; Salati, C.; Rossi, S.; Forré, C.; Schmid, S.; Marchelli, R. y C. Fogher (2004), «Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, pp. 3275-3280.
- Guzman, N.; Lia, V.; Lanteri, A. y V. Confalonieri (2007), «Population structure of the boll weevil in cotton fields and subtropical forests of South America: A bayesian approach», *Genetica*, vol. 131, pp. 11-20.
- Heap, I. (2006), HRAC. The herbicide Resistance Action Committee [www.weedscience.org].
- Heinze, B. (2007), «A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants», *Plant Methods*, vol. 3, n.º 4, pp. 1-7.
- Holm, L.; Plucknett, D. L.; Pancho, J. V. y J. P. Herberger (1977), *Sorghum halepense* (L.) Pers, *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*, The University Press of Hawaii, Honolulu, pp. 64-61.
- Instituto Nacional de Semillas (INASE) (2013), Resolución N.º 328/2013 [en línea]. Dirección URL: <http://www.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/215000-219999/219950/norma.htm> [Consulta: 2013].
- James, D.; Schmidt, A.M.; Wall, E.; Green, M. y S. Masri (2003), «Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, n.º 20, pp. 5829-5834.
- Kim, K. S.; Coates, B. S.; Hellmich II, R. L.; Sumerford, D.V. y T. W. Sappington (2008), «Isolation and Characterization of Microsatellite Loci from the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Insecta: Lepidoptera: Crambidae)», *Molecular Ecology Resources*, vol. 8, n.º 2, pp. 409-411.
- Krumm, J. T.; Hunt, T. E.; Skoda, S. R.; Hein, G. L.; Lee, D. J.; Clark, P. L. y J. E. Foster (2008), «Genetic Variability of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*, Suggests Gene Flow Between Populations in the Midwestern United States», *Journal of Insect Science*, vol. 72, pp. 1-12.
- Mirabello, L. y J. E. Conn (2006), «Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America», *Heredity*, vol. 96, n.º 4, pp. 311-321.
- Owen M. D. K. (2008), «Weed species shifts in glyphosate-resistant crops pest management», *Science*, vol. 64, n.º 4, pp. 377-387.
- Parody, B. P.; Martínez, M. C.; Flores, F.; Trumper, E.; Pons, D.; Pocovi, M.; Collavino, G.; Mariotti, J.; Hopp, H.E. y D. Tosto (2010), «Genetic characterization of *Diatraea saccharalis* populations in Argentina and insect resistance management for Bt corn», 11th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms (ISBGMO), Buenos Aires, 15 al 19 de noviembre.
- Shaw, J. y R. L. Small (2005), «Chloroplast DNA phylogeny and phylogeography of the North American plums (*Prunus* subgenus *Prunus* section *Prunocerasus*; Rosaceae)», *American Journal of Botany* vol. 92, n.º 12, pp. 2011-2030.
- Shaw, J.; Lickey, E. B.; Schilling, E.E. y R. L. Small (2007), «Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III», *American Journal of Botany*, vol. 94, n.º 3, pp. 275-288.

Vila-Aiub, M.; Balbi, M. C. y Distéfano, A. J. (2012), «Glyphosate resistance in perennial Sorghum halepense (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake», Pest Management Science, vol. 68, n.º 3, pp. 430-436.

Wu, X.; Rogers Leonard, B.; Zhu, Y. C.; Abel, C. A.; Head, G. P. y F. Huang (2009), «Susceptibility of Cry1Ab-resistant and susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four Bacillus thuringiensis toxins», Journal of Invertebrate Pathology, vol. 100, n.º 1, pp. 29-34.