



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A
INHIBIDORES ALS Y GLIFOSATO EN UNA SUBPOBLACIÓN DE
Amaranthus palmeri IDENTIFICADA A CAMPO**

Lic. VALERIA E. PALMIERI

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTORA: Dra. VALERIA E. PEROTTI

CO-DIRECTOR: Dr. HUGO R. PERMINGEAT

2019

**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A INHIBIDORES ALS Y
GLIFOSATO EN UNA SUBPOBLACIÓN DE *Amaranthus palmeri* IDENTIFICADA A
CAMPO**

Valeria Esther Palmieri

Licenciada en biotecnología – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR, durante el período comprendido entre febrero del 2015 y noviembre del 2019, bajo la dirección de la Dra. Valeria E. Perotti y la co-dirección del Dr. Hugo R. Permingeat.

Valeria E. Palmieri
-Tesisista-

Valeria E. Perotti
-Directora-

Hugo R. Permingeat
-Co-Director-

Defendida: _____

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de Tesis fue posible gracias a la colaboración de numerosas personas a quienes quiero agradecer de manera muy especial.

A **Vale**, mi directora, por enseñarme con tanta pasión a hacer ciencia. Por estar siempre incondicionalmente, por tu paciencia, por confiar en mí y por ayudarme a que yo también lo haga. Gracias por ser mi mentora durante estos años. Me enseñaste mucho como directora y como persona.

A **Hugo**, mi co-director, por abrirme las puertas de esta hermosa Facultad. Gracias por guiarme, por confiar en mí y por ayudarme siempre que lo necesité.

A mis amigos, los pipeteadores, **Andre, Alvarito, Nico, Caro, Mariano, Lui, Albert, Lucas, Cele, Agos** y **Mari** por aliviar las horas en el laboratorio y por todos esos momentos hermosos que compartimos a lo largo de estos años. Gracias estar siempre para escucharme (que no es poco), aconsejarme, contenerme y ayudarme en todo.

A **Dani, Silvina, Juan, Lore, Juli, Vero** y **Lu** por brindarme siempre su ayuda y compartir conmigo sus conocimientos.

A **Emanuel**, los **chicos no docentes** y **Cami**, por la ayuda desinteresada que me dieron para realizar los ensayos con las plantas.

A **Daniel Tuesca** por facilitarme el material para la tesis y ayudarme con los experimentos de curvas dosis-respuesta.

A mi novio, **Alejandro**, por todas las horas que tuvo que soportar mis cambios de humor, por animarme, por estar siempre ahí, ayudándome incondicionalmente en todo y en definitiva por darme su amor en todo momento.

A **mis papás** y a **mi hermana**, por su amor, apoyo incondicional y confianza.

A mis amigos de la facu, **Gabi, Rami, Nata, Juan, Mavi, Juli L, Juli B, Alcho, Estefi, Cin, Emi, Sele** y **Mati**, que están siempre para darme ánimo en las dificultades y compartir las alegrías.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Artículos en revistas con referato

Perotti VE, Larran AS, **Palmieri VE**, Martinatto AK, Permingeat HR (2020). Herbicide resistant weeds: a call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. *Plant Sci.* 290: 110255.

Perotti VE, Larran AS, **Palmieri VE**, Martinatto AK, Alvarez CE, Tuesca D, Permingeat HR (2019) A novel triple amino acid substitution in the EPSPS found in a high-level glyphosate-resistant *Amaranthus hybridus* population from Argentina. *Pest Manag. Sci.* 75: 1242-1251.

Larran A, **Palmieri V**, Perotti V, Lieber L, Tuesca D, Permingeat HR (2017) Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina. *Pest Manag. Sci.* 73: 2578-2584.

Presentaciones a congresos nacionales e internacionales

Palmieri, VE; Larran AS; Martinatto, AK; Permingeat, HR; Perotti VE. "Efectos de las mutaciones A205V y D376E en la resistencia a inhibidores de la ALS en *Amaranthus palmeri*". XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. Noviembre, 2019.

Larran, A; **Palmieri, V**; Perotti, V; Tuesca, D; Permingeat, H. "Estudio de los mecanismos de resistencia a glifosato en dos poblaciones de *Amaranthus palmeri* de Argentina con resistencia múltiple". XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. Noviembre, 2018.

Palmieri, VE; Papa, JC; Tuesca, D; Permingeat, H; Perotti, V. "Confirmación de la resistencia a inhibidores ALS que confieren dos mutaciones en el gen *als* (A205V y D376E) de *A. palmeri*". II Congreso Argentino de Malezas-ASACIM. Rosario. Junio, 2018.

Palmieri, VE; Permingeat, H; Perotti, V. "Expresión recombinante, purificación y caracterización de una isoforma resistente de la enzima Acetolactato sintasa de *Amaranthus palmeri*". II Congreso Argentino de Malezas-ASACIM. Rosario. Junio, 2018.

Larran, A; **Palmieri, V**; Perotti, V; Lieber, L; Tuesca, D; Permingeat, H. "Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina". Plant Sciences Symposium 2017. USA. Septiembre, 2017.

Perotti, V; **Palmieri, VE**, Martinatto, A, Monasterolo, L, Permingeat, H. "Obtención de individuos genéticamente idénticos por clonado de *Sorghum halepense* y *Amaranthus*

palmeri para la identificación de alelos de resistencia a herbicidas del grupo A y B, respectivamente". REDBIO. Bahía Blanca. Septiembre, 2017.

Palmieri, VE; Martinatto, A; Monasterolo, L; Tuesca, D; Permingeat, H; Perotti, V. Póster "Caracterización bioquímica y molecular del mecanismo de resistencia de un biotipo de *Amaranthus palmeri* resistente a inhibidores ALS hallado en lotes de producción". XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Corrientes. Noviembre, 2016.

Palmieri, VE; Martinatto, A; Monasterolo, L; Tuesca, D; Perotti, V; Permingeat, H. "Evaluación *in vivo* e *in vitro* de la respuesta a inhibidores ALS y glifosato de un biotipo de *Amaranthus palmeri* resistente hallado a campo". XVII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. IV Jornada Latinoamericana. II Jornadas de Ciencia y Tecnología. I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. Casilda-Zavalla. Septiembre, 2016.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	V
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Herbicidas del grupo B.....	8
1.2 Herbicidas del grupo G	13
1.3 <i>Amaranthus palmeri</i> en Argentina.....	17
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos	21
Hipótesis.....	21
2. CAPÍTULO 1	22
2.1 INTRODUCCIÓN:.....	23
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS:.....	26
2.2.1 Material vegetal.....	26
2.2.2 Compuestos químicos.....	26
2.2.3 Ensayos de dosis-respuesta	27
2.2.4 Ensayo de inhibición de la actividad enzimática ALS <i>in vitro</i>	28
2.2.5 Análisis de las bases moleculares de la resistencia	29
2.2.5.1 Extracción de ADN genómico	29
2.2.5.2 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	29
2.2.5.3 Clonado en el vector pGEM-T Easy y transformación genética de células bacterianas con ADN plasmídico	30
2.2.5.4 Secuenciación y análisis	31
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	32
2.3.1 Niveles de resistencia <i>in vivo</i> a herbicidas inhibidores de la ALS en la subpoblación de Totoras.....	32

2.3.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad enzimática ALS en presencia de herbicidas del grupo B.....	34
2.3.3 Identificación de los alelos del gen blanco de los herbicidas inhibidores de la ALS.....	35
2.4 CONCLUSIONES:	39
3. CAPÍTULO 2	40
3.1 INTRODUCCIÓN:	41
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS:	46
3.2.1 Subclonado en vector pET-32a (+)	46
3.2.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	46
3.2.2.1 Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes y obtención de extractos celulares de <i>E. coli</i>	46
3.2.2.2 Purificación de las proteínas recombinantes	46
3.2.3 Digestión del extremo amino terminal de las proteínas de fusión	48
3.2.4 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes	48
3.2.5 Inmunodetección de proteínas (Western blot).....	48
3.2.6 Estimación de parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes	49
3.2.7 Compuestos químicos.....	50
3.2.8 Ensayo de inhibición de la actividad enzimática ALS <i>in vitro</i>	51
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	52
3.3.1 Expresión y purificación de distintas versiones recombinantes de la enzima ALS de <i>A. palmeri</i>	52
3.3.2 Parámetros cinéticos de las enzimas ALS recombinantes	55
3.3.3 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad ALS en presencia de herbicidas del grupo B.....	58
3.4 CONCLUSIONES:	66
4. CAPÍTULO 3	67
4.1 INTRODUCCIÓN:	68
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS:	70
4.2.1 Material vegetal.....	70
4.2.2 Identificación de plantas con sustitución A122S, D376E o A205V en la enzima ALS...70	70

4.2.2.1 Selección de individuos.....	70
4.2.2.2 Extracción de ADN genómico	70
4.2.2.3 Búsqueda de individuos portadores de la sustitución A122S mediante dCAPS	71
4.2.2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida.....	71
4.2.2.5 Amplificación, clonado en vector pGEM-T Easy y secuenciación del gen ALS.....	72
4.2.3 Obtención de clones vegetativos a partir de individuos con las sustituciones A122S, D376E o A205V en la enzima ALS	72
4.2.4 Obtención de semillas a partir de individuos con sustitución A122S en la enzima ALS.....	72
4.2.5 Ensayos de dosis-respuesta	72
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	73
4.3.1 Niveles de resistencia <i>in vivo</i> a herbicidas inhibidores de la ALS en plantas multiplicadas vegetativamente con las sustituciones A122S, D376E o A205V.....	74
4.3.2 Niveles de resistencia <i>in vivo</i> a herbicidas inhibidores de la ALS en plantas con la sustitución A122S obtenidas a partir de semillas	80
4.4 CONCLUSIONES:	84
5. CAPÍTULO 4	85
5.1 INTRODUCCIÓN:	86
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS:	88
5.2.1 Material vegetal.....	88
5.2.2 Ensayos de dosis-respuesta	88
5.2.3 Análisis de las bases moleculares de la resistencia	88
5.2.3.1 Extracción de ADN genómico	88
5.2.3.2 Digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas (dCAPS)	88
5.2.3.3 Secuenciación y análisis	89
5.2.3.4 PCR cuantitativa en tiempo real (real-time qPCR)	90
5.2.4 Acumulación de ácido shikímico en tejido foliar de plantas tratadas con glifosato.....	91
5.2.5 Acumulación de ácido shikímico en discos de hojas incubados con glifosato <i>in vitro</i> ..	91
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	93

5.3.1 Niveles de resistencia <i>in vivo</i> a glifosato en la subpoblación de <i>A. palmeri</i> de Totoras	93
5.3.2 Bases moleculares de la resistencia a glifosato	95
5.3.3 Análisis comparativo de la acumulación de ácido shikímico por aplicación de glifosato <i>in planta</i> versus aplicación en disco de hojas	97
5.4 CONCLUSIONES:	102
6. CONCLUSIONES GENERALES:	103
7. BIBLIOGRAFÍA:	106

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A282D: sustitución de la alanina 282 de la ALS por aspartato

A122S: sustitución de la alanina 122 de la ALS por serina

A205V: sustitución de la alanina 205 de la ALS por valina

AA: aminoácidos

ACCase: acetil-CoA carboxilasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNcec: ADN circular extra-cromosomal

ADNg: ADN genómico

AHAS: acetohidroxiácido sintasa

ALS: acetolactato sintasa

ANOVA: análisis de la variancia

AS: auxinas sintéticas

AtAHAS: AHAS de *Arabidopsis thaliana*

ATP: adenosín trifosfato

BCIP: 5-bromo 4-cloro-3-indol-fosfato

CAT: catalasa

CTAB: bromuro de

hexadeciltrimetilamonio

Cyt P450: citocromo P450

dCAPS: derived Cleaved Amplified

Polymorphic Sequence, digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas

dNTPs: desoxirribonucleótidos

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EPSPS: 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa

FAD: flavina adenina dinucleótido

FR: factor de resistencia

g i.a./ha: gramos de ingrediente activo/hectárea

g: fuerza centrífuga

gpf: gramos de peso fresco

GR₅₀: Growth Rate 50, reducción del crecimiento media

GST: glutatión S-transferasa

GT: glicosil-transferasa

h: hora

HRAC: Herbicide Resistance Action Committee, Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas

I₅₀: inhibición de la actividad enzimática media

IMI: imidazolinonas

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido

k_{cat}: constante catalítica

kDa: kilodalton

Ki: constantes de inhibición

K_m: constante de Michaelis-Menten

L/ha: litros por hectáreas

LB: Luria-Bertani

LD ₅₀ : Lethal Dose 50, dosis letal media	s: segundo
mA: miliamperio	SCT: sulfonilaminocarbonil triazolinonas
mg/ml: miligramos por mililitros	SDS: dodecilsulfato sódico
Mg ²⁺ : ion magnesio	SU: sulfonilureas
mM: milimolar	TBE: tampón Tris-borato-EDTA
MoA: modo de acción	TBS: buffer Tris salino
NBT: azul de nitrotetrazolio	ThDP: tiamina bifosfato
nm: nanometros	Tot: Totoras
°C: grados Celsius	TP: triazolopirimidinas
P106S: sustitución de la prolina 106 de la EPSPS por serina	TPP: tiamina pirofosfato
P/V: peso en volumen	Tuc: Tucumán
p: probabilidad	U/mg: unidades de enzima por miligramo
pb: pares de bases	UA: unidad de absorbancia
PCR: Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa	µl: microlitros
PEP: fosfoenolpiruvato	µM: micromolar
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo	µmol: micromoles
POD: peroxidasa	V/V: volumen en volumen
PPO: protoporfirinógeno oxidasa	VM: Vicuña Mackenna
PTB: ácidos pirimidiniltiobenzoicos	V _{máx} : velocidad máxima de la reacción
RG: resistente a glifosato	W574L: sustitución del triptófano 574 de la ALS por leucina
RNT: resistencia no target	WSSA: Weed Science Society of America, Sociedad Americana de Malezas
RT: resistencia target	Wt: wild type, salvaje
S653N: sustitución de la serina 653 de la ALS por asparagina	X: dosis de herbicida recomendada a campo

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A INHIBIDORES ALS Y GLIFOSATO EN UNA SUBPOBLACIÓN DE *Amaranthus palmeri* IDENTIFICADA A CAMPO

La aparición de poblaciones de malezas con resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y glifosato trajo como consecuencia la reducción en la utilidad práctica y económica de estas herramientas químicas e importantes pérdidas en la producción. *Amaranthus palmeri* S. Watson es una especie muy competitiva que, en los últimos años, se ha convertido en un grave problema en los cultivos de soja de la zona núcleo de nuestro país. *A. palmeri* se caracteriza por tener alta tasa de crecimiento, elevada tolerancia a los ambientes adversos, gran variabilidad genética y facilidad para desarrollar resistencia a herbicidas. Esta maleza se detectó por primera vez en Argentina durante la campaña 2011-2012 en el sur-oeste de la provincia de Córdoba.

En *A. palmeri*, la mayoría de los casos de resistencia a inhibidores de la ALS son debido a cambios en la secuencia de bases del gen de la ALS, mientras que la resistencia a glifosato se debe principalmente a la amplificación del gen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (*EPSPS*). Fundamentalmente en el caso de los inhibidores de la ALS, una misma mutación en el gen blanco puede causar resistencia a más de un principio activo (resistencia cruzada). Si éste es el caso, el espectro de herramientas químicas factibles para el control de la población en cuestión se acota notablemente. Asimismo, si se identifica una mutación puntual que genera resistencia sólo a una determinada familia química, se puede plantear el uso de alguna de las otras familias de herbicidas, aumentando las posibilidades de éxito en el manejo de dicha maleza.

Así, la dilucidación de las bases moleculares que explican el fenotipo de resistencia de diferentes subpoblaciones de malezas halladas a campo es de gran utilidad para el diseño racional de estrategias de control. Además, la obtención de información genética novedosa que pueda ser transferida a especies de interés agronómico constituye una potencial herramienta biotecnológica para abordar una de las principales problemáticas de la agricultura actual. El objetivo de esta tesis doctoral consistió en identificar las bases moleculares responsables del fenotipo de resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS y glifosato observado en plantas de *A. palmeri* halladas a campo, con énfasis en el hallazgo y la caracterización de nuevas mutaciones en el sitio de acción de los herbicidas inhibidores de la ALS.

Mediante estudios de dosis-respuesta, bioquímicos y moleculares, se confirmó que la subpoblación de *A. palmeri* hallada en lotes con cultivo de soja en la localidad de Totoras tiene resistencia cruzada a imazetapir, clorimurón-etil y diclosulam y que la resistencia a inhibidores de la ALS se debe a un mecanismo asociado al sitio de acción, de mutación de punto en la secuencia codificante del gen *ALS*. Se identificaron dos sustituciones de aminoácidos (W574L y S653N) en la enzima ALS previamente reportadas en la especie y cuatro sustituciones (A122S, A282D, D376E y A205V) detectadas por primera vez en *A. palmeri* en este trabajo de tesis.

Las distintas versiones de la enzima ALS halladas fueron expresadas de forma heteróloga en sistemas procariontes y posteriormente purificadas a fin de evaluar su cinética y respuesta inhibitoria frente a los herbicidas, con énfasis en la sustitución A122S, que sólo se había observado en levaduras hasta el momento. Los resultados obtenidos demuestran que la sustitución A122S disminuye la susceptibilidad de la enzima frente a herbicidas de cuatro familias químicas diferentes y que la sustitución A282D no proporciona resistencia a los herbicidas del grupo B. También se detectó una disminución en la eficiencia catalítica en las enzimas con las sustituciones A122S, S653N, A205V, y W574L; al tiempo que las dos últimas fueron las únicas que produjeron una disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato.

Por otro lado, se obtuvieron individuos propagados asexualmente con las sustituciones en la enzima ALS: A122S, A205V o D376E reportadas por primera vez en esta especie en este trabajo de tesis y se evaluó el nivel de resistencia *in vivo* que proporciona cada una de ellas. Las tres sustituciones otorgan resistencia cruzada a los herbicidas del grupo B, siendo la primera vez que se informa que la sustitución A205V confiere resistencia a un herbicida de la familia de las triazolopirimidinas.

Por último, mediante ensayos fenotípicos y moleculares se confirmó la resistencia a glifosato de la subpoblación *A. palmeri* de Totoras. La resistencia es causada principalmente por una mutación puntual en el gen *EPSPS* (P106S). Además, se detectó la contribución de un mecanismo ajeno al sitio blanco, en concordancia con lo reportado para una población cercana (geográficamente) a la estudiada. Futuros experimentos son necesarios para caracterizar este mecanismo. Dada la propensión de *A. palmeri* a desarrollar resistencia a múltiples modos de acción, es importante detectar rápidamente nuevos casos de poblaciones resistentes y determinar el mecanismo de resistencia involucrado, con el fin de diseñar estrategias de manejo sostenibles.

Palabras clave: *Amaranthus palmeri*; resistencia a glifosato; inhibidores de la ALS; mecanismos de resistencia.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF RESISTANCE MECHANISM TO ALS INHIBITORS AND GLYPHOSATE IN AN *Amaranthus palmeri* SUBPOPULATION IDENTIFIED IN A FIELD

The emergence of weed populations with resistance to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides and glyphosate led to a reduction in practical and economic utility of these chemical tools and to significant losses in production systems. *Amaranthus palmeri* S. Watson is a very competitive species that has become a serious problem in soybean crops in our country. In most cases, resistance to ALS-inhibiting herbicides is caused by an altered ALS enzyme in *A. palmeri*, while *EPSPS* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) gene amplification is the most common glyphosate resistance mechanism. The goal of this doctoral thesis was to identify molecular bases responsible for resistance phenotype to ALS inhibitors and glyphosate observed in *A. palmeri* plants focusing in characterization of new mutations.

Cross-resistance to imazetapyr, chlorimuron-ethyl and diclosulam was confirmed in the *A. palmeri* subpopulation upon study by *in vivo*, biochemical and molecular assays. This resistance is caused by a target-site resistance mechanism. Two amino acid substitutions reported previously in other species (W574L and S653N) were identified in the ALS enzyme, and four substitutions (A122S, A282D, D376E and A205V) were detected as a novelty in this thesis work.

Different versions of the ALS enzyme were heterologously expressed to evaluate their kinetic and inhibiting parameters, with emphasis in the A122S substitution. Results showed that this substitution confers cross-resistance to four herbicides families. The A122S, S653N, A205V and W574L substitutions decrease the catalytic efficiency, and A205V and W574L mutations also produced a decrease in the substrate affinity.

Asexually propagated individuals were obtained with substitutions in the ALS enzyme: A122S, A205V or D376E. All three substitutions showed cross-resistance to the four chemical families tested, and it is the first time that A205V substitution is reported to confer resistance to diclosulam.

Glyphosate resistance of this subpopulation was confirmed by phenotypic and molecular tests. Resistance is mainly caused by a point mutation in the *EPSPS* gene (P106S). Besides, some not-target-site resistance mechanism was also involved in the resistance, but future experiments are necessary to characterize it.

Because of the propensity of *A. palmeri* to evolve multiple resistance, the knowledge

of molecular bases explaining weeds' resistance phenotypes is crucial for the rational design of control strategies.

Keywords: *Amaranthus palmeri*; glyphosate resistance; ALS inhibitors; resistance mechanisms.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La creciente demanda de alimentos a nivel mundial es un factor de gran importancia en la transformación de los sistemas agropecuarios actuales. Estos deben maximizar los rendimientos, logrando inmejorables condiciones ecofisiológicas para el desarrollo de los cultivos. Por lo tanto, cualquier amenaza para los sistemas de producción afecta directamente la sostenibilidad global. Una de estas amenazas, si no la principal, es la infestación de cultivos por malezas (Powles y Yu, 2010).

Las malezas son poblaciones vegetales que crecen en ambientes perturbados por el hombre sin haber sido sembradas (Leguizamón, 2008). En los agroecosistemas, son las plantas que crecen en un cultivo y que no corresponden a la especie o al genotipo cultivado. Por consiguiente, tanto una planta de maíz como una de yuyo colorado se consideran malezas en un cultivo de soja.

La presencia de malezas en los agroecosistemas causa considerables pérdidas en el rendimiento y calidad del cultivo e incrementa los costos de producción. Esta disminución en el rendimiento y la calidad se debe a que las malezas compiten con las plantas cultivadas por los recursos ambientales, hospedan insectos y microorganismos que pueden transmitir enfermedades y/o liberan compuestos químicos que inhiben el crecimiento del cultivo. Además, obstruyen el proceso de cosecha, lo que incrementa los costos de tales operaciones y contaminan la producción (Labrada et al., 1994).

Los perjuicios económicos asociados a la infestación de los cultivos por malezas motivaron las prácticas de control de éstas desde el origen de la agricultura. Estas prácticas han progresado desde el desmalezado manual y el empleo de herramientas como métodos mecánicos, el uso de sales y ácidos inorgánicos como primeros métodos químicos, hacia las aplicaciones de compuestos orgánicos de síntesis como los actuales herbicidas (Radosevich et al., 1997).

En la agricultura actual, el control químico de las malezas se realiza por medio de la aplicación de herbicidas, siendo la principal herramienta en todos los programas de manejo de malezas (Anderson, 1996; Owen, 2016). Los herbicidas son productos químicos capaces de alterar la fisiología de la planta causando la muerte o desarrollo anormal de la misma. El efecto letal de éstos se debe a que actúan sobre un sitio primario de acción y generan una serie de efectos secundarios y terciarios que conllevan a la muerte de la planta (Diez de Ulzurrun, 2013).

El uso extensivo de los herbicidas en la agricultura se debe a que son productos

altamente fiables y eficaces, de fácil manejo y económicamente rentables. Además, son agronómicamente versátiles, es decir, ofrecen al agricultor la posibilidad de elegir cuándo y cómo controlar el problema de las malezas, permitiendo un margen de uso que va desde la presembrado hasta la postemergencia tardía y diversas opciones de tratamiento en cada cultivo (Bastida y Menéndez, 2001).

Los herbicidas pueden clasificarse de diferentes maneras, según: el momento de aplicación (presembrado, preemergencia y postemergencia del cultivo), la selectividad (hace referencia a qué plantas daña y a cuáles no), la movilidad en la planta (sistémicos, se transportan por xilema y floema, o de contacto, tienen transporte limitado), la persistencia (tiempo que permanecen en el ambiente, pueden ser residuales o no residuales), el modo de acción (MoA) y la familia química (Peterson et al., 2001).

El MoA de un herbicida consiste en la secuencia de eventos que ocurren desde que éste es absorbido por la planta hasta la aparición de fitotoxicidad. Los efectos fisiológicos afectados por los herbicidas en las plantas pueden radicar en la regulación del crecimiento, la inhibición de la división celular, la inhibición de la respiración y/o fotosíntesis, o la interrupción de procesos metabólicos complejos (Diez de Ulzurrun, 2013).

La Sociedad Americana de Malezas (WSSA, Weed Science Society of America) y el Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas (HRAC, Herbicide Resistance Action Committee) desarrollaron esquemas de clasificación basados en el modo de acción de los herbicidas. La WSSA asignó a los herbicidas con similar modo de acción un número, mientras que el HRAC publicó una clasificación similar usando letras. Dicha clasificación de herbicidas facilita la rotación de modos de acción, lo cual es fundamental en el control de las malezas, para variar la presión de selección ejercida y así, retrasar la aparición de malezas resistentes.

Actualmente existen 25 grupos diferentes para los más de 200 herbicidas (algunos cuyo sitio de acción es desconocido). La Tabla I muestra la clasificación de los herbicidas por modo de acción según WSSA y HRAC (WSSA, 2019).

Criterio HRAC	Criterio WSSA	Sitio(s) de acción	Vía afectada
A	1	Inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase)	Biosíntesis de ácidos grasos
B	2	Inhibición de la acetolactato sintasa (ALS)	Biosíntesis de aminoácidos (Leu, Ile, Val)
C1,C2,C3	5,7,6	Inhibición de la proteína D1 del fotosistema II	Fotosíntesis (transferencia de

			electrones)
D	22	Desvío de los electrones transferidos por la ferredoxina del fotosistema I	Fotosíntesis (transferencia de electrones)
E	14	Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Fotosíntesis (biosíntesis del grupo hemo)
F1,F2,F3,F4	12,27,11,13	Inhibición de la fitoeno desaturasa, la hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, proteína desconocida o la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa	Fotosíntesis (biosíntesis de carotenoides)
G	9	Inhibición de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)	Biosíntesis de aminoácidos (Phe, Trp, Tyr)
H	10	Inhibición de la glutamina sintasa	Biosíntesis de aminoácidos (Gln)
I	18	Inhibición de la dihidropteroato sintasa	Biosíntesis de tetrahidrofolato
K1,K2,K3	3,23,15	Bloqueo de la polimerización de tubulina, inhibición la división celular y formación de microtúbulos e inhibición de la ácido graso sintasa	División celular (Mitosis)
L	20,21,29	Inhibición de la celulosa sintasa	Biosíntesis de pared celular
M	24	Desacople de la fosforilación oxidativa	Biosíntesis de ATP
N	8	Inhibición de la ácido graso elongasa	Biosíntesis de ácidos grasos
O	4	Estimulación de la proteína 1 de respuesta al inhibidor de transporte	Regulación de los genes de respuesta a auxina
P	19	Inhibición del transporte de auxinas	Señalización hormonal de largo alcance
R	30	Inhibición de la tirosina aminotransferasa	Fotosíntesis (biosíntesis de carotenoides)
Z	26,28	Desconocido	

Tabla I. Clasificación de los herbicidas de acuerdo a su modo de acción, según criterios de HRAC y WSSA.

Cuando se aplica un herbicida, se crean artificialmente condiciones ambientales negativas extremas para la vegetación en general. Dentro de una comunidad o dentro de la población de una especie existe, en general, una gran diversidad, lo que implica que algunos genotipos, eventualmente, puedan sobrevivir frente a esa agresión. Si este ambiente, artificialmente generado, persiste y/o se reitera en el tiempo lo que se logra es

una reducción significativa en la frecuencia de los genotipos susceptibles y un incremento de los resistentes o tolerantes (Papa, 2002). Por lo tanto, el uso continuo del mismo herbicida o la aplicación de herbicidas con el mismo MoA inevitablemente condujo a la selección de poblaciones de malezas resistentes (Shaner, 2014).

La resistencia de malezas a herbicidas es un proceso evolutivo y, según Powles y Yu (2010), su dinámica e impacto dependen de los factores genéticos, la biología de las especies de malezas, el herbicida y los aspectos técnicos (Figura I).

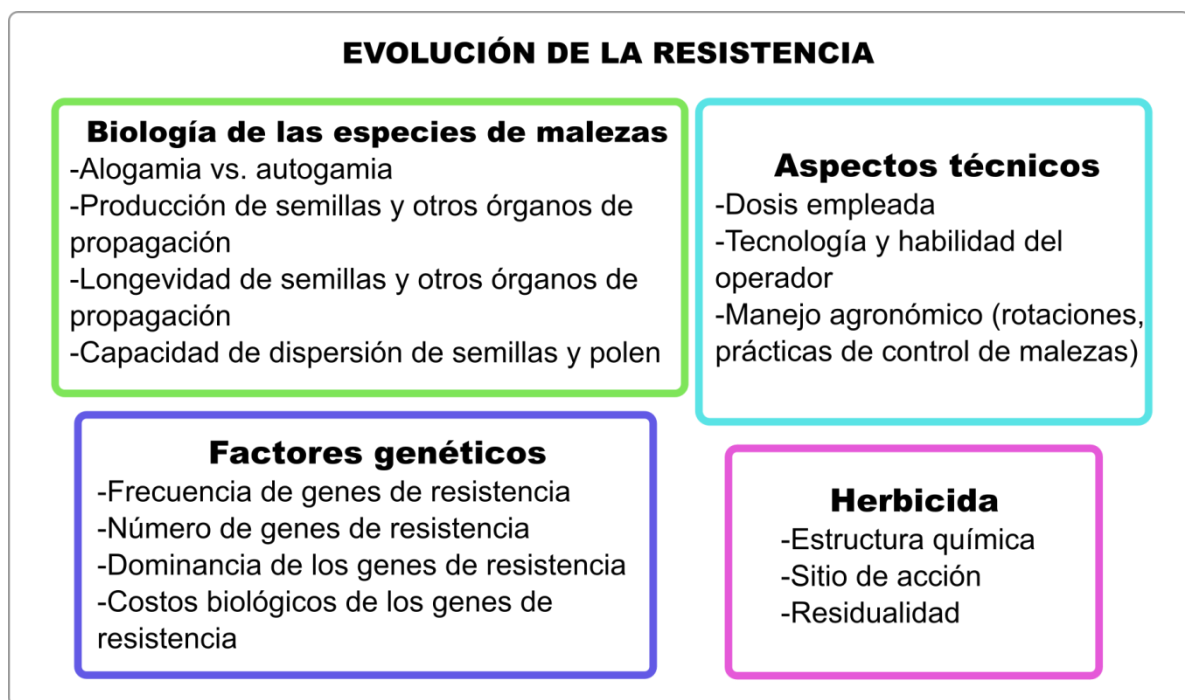


Figura I. Resumen de los factores que influyen en la evolución de las malezas resistentes a herbicidas. Adaptado de Powles y Yu, 2010.

La frecuencia, el número y la dominancia de los genes de resistencia (pre-existentes a las aplicaciones de un herbicida) condicionarán el tiempo en que éstos se vuelven “relevantes” en la población, provocando la detección de un nuevo caso de resistencia. Además, los costos biológicos o efectos de estos genes sobre la capacidad reproductiva y/o vegetativa de la especie, podrían tener inherentemente un impacto en la tasa de evolución de la resistencia, dada la habilidad competitiva diferente que pueden presentar las plantas resistentes en ausencia de la presión de selección (Neve et al., 2003; Ashigh y Tardif, 2009; Wang et al., 2010; Vercellino et al., 2018).

Por otro lado, la biología de las especies de malezas condiciona la difusión de la resistencia en la población. El porcentaje de alogamia y autogamia, la producción de semillas y su longevidad en el banco de semillas del suelo y el flujo génico por medio de

semillas y polen cobran trascendencia al considerar sus efectos sobre la dispersión y frecuencia de genes de resistencia (Jasieniuk et al., 1996; Busi et al., 2008).

Además, el herbicida utilizado y su tipo de acción fisiológica son factores importantes a ser considerados. La estructura química, sitio de acción y residualidad del herbicida modularán la probabilidad con que los genes de resistencia incrementen su frecuencia, ya que son aspectos que condicionan de la presión selección (Tranel y Wright, 2002).

Por último, los aspectos técnicos que incluyen las dosis empleadas, la tecnología y la habilidad del operador para llevar a cabo la tarea de control químico junto a otros factores de manejo agronómico (prácticas alternativas de control de malezas, rotación de cultivos y principios activos) son de gran importancia y estos factores son los primeros sobre los que se puede actuar para minimizar los riesgos de aparición de malezas resistentes (Jasieniuk et al., 1996, Norsworthy et al., 2012).

Las malezas pueden ser tolerantes o adquirir resistencia a un herbicida particular, por lo cual resulta relevante diferenciar estos dos conceptos que muy frecuentemente son confundidos. La tolerancia es la capacidad natural y heredable que tienen todos los individuos de una especie de soportar la dosis de uso de un herbicida debido a características morfológicas y/o fisiológicas que le son propias; por lo tanto, las poblaciones tolerantes a un herbicida nunca fueron susceptibles (Papa, 2002). La resistencia en cambio, es la capacidad natural y heredable de un subgrupo de individuos dentro de una población de una especie de no ser controlada por un herbicida que con anterioridad le afectaba intensamente (WSSA, 1998). Así, la resistencia representa una capacidad adquirida de sobrevivir y reproducirse frente a la acción fitotóxica de un herbicida.

Las malezas resistentes comenzaron a ser un problema en la década de 1970 y a principios de la década de 1980 debido a las aplicaciones repetidas de atrazina y simazima en los cultivos de maíz. Los productores recurrieron a los herbicidas inhibidores de la ALS y de la ACCasa en la década del '80 para controlar las malezas resistentes a las triazinas; y luego, a cultivos transgénicos resistentes a glifosato, en la década de 1990, para controlar las malezas resistentes a inhibidores de la ALS, ACCasa y triazinas. La adopción extensiva de cultivos transgénicos resistentes a herbicidas llevó a la industria agroquímica a invertir menos en el desarrollo de nuevos principios activos y menos aún en nuevos MoA. La rápida eficacia combinada con la simplicidad de operación de estos sistemas resultó en el uso excesivo de un pequeño número de herbicidas, lo que favoreció el aumento del número de casos de malezas resistentes (Heap, 2014).

Para que un herbicida pueda actuar y controlar las malezas afectando los procesos

fisiológicos y bioquímicos de éstas, debe penetrar al interior de las plantas, translocarse al lugar donde se encuentra su proteína blanco (sitio de acción) a una dosis letal y unirse a ésta. Múltiples mecanismos de resistencia que interfieren con la acción del herbicida han evolucionado en las malezas (Figura II). Estos mecanismos se pueden dividir en dos categorías amplias: los mecanismos asociados al sitio de acción (o target) y los mecanismos no asociados al sitio de acción (o no target).

La resistencia target (RT) ocurre cuando los herbicidas alcanzan el sitio de acción a una dosis letal, pero hay cambios en el mismo que limitan el impacto del herbicida; mientras que la resistencia no target (RNT) implica mecanismos que minimizan la cantidad de herbicida activo que llega al sitio de acción, o bien protegen contra daños derivados de la acción del herbicida (Délye et al., 2013; Délye et al., 2015; Powles y Yu, 2010). A diferencia de la RT, se sabe poco de los mecanismos que producen RNT, pero parece ser una respuesta adaptativa más general al uso de herbicidas (Délye et al., 2013).

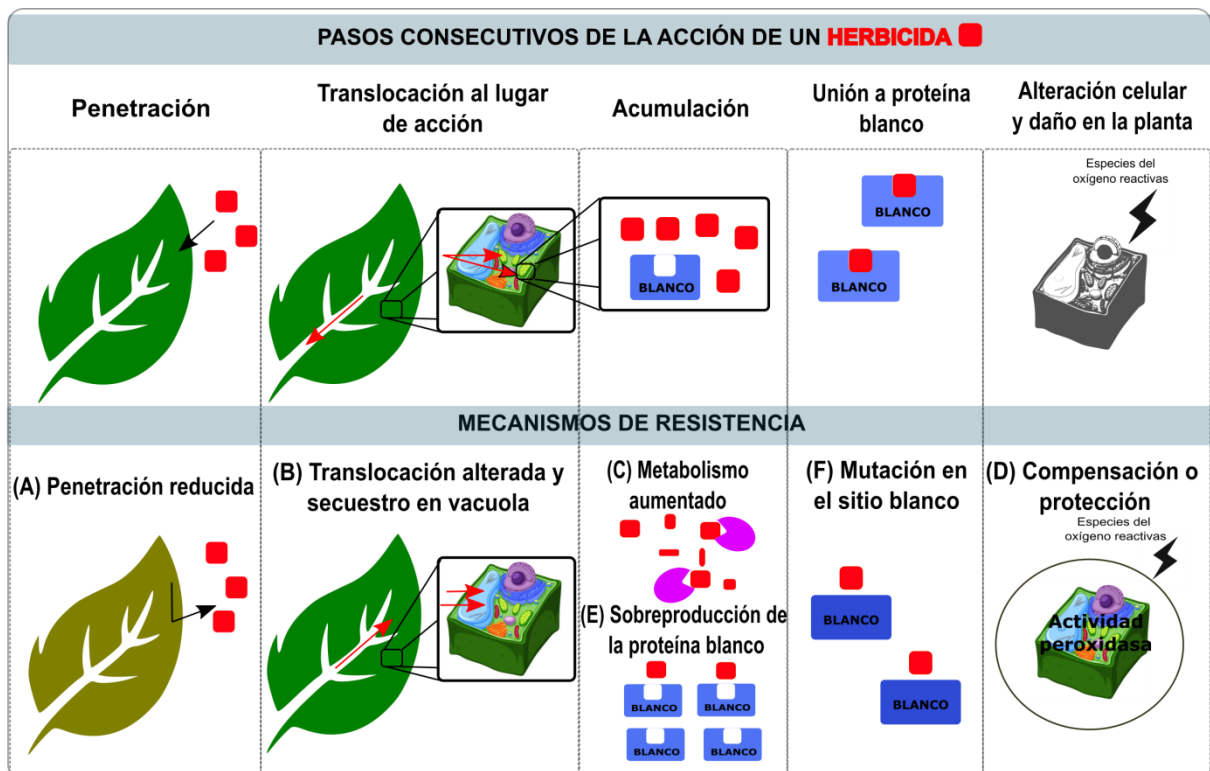


Figura II. Etapas en la acción de un herbicida y mecanismos de resistencia. La acción de los herbicidas seguida de su aplicación (superior) y los mecanismos de resistencia identificados en malezas (inferior). A, B, C y D mecanismos no asociados al sitio de acción. E y F mecanismos asociados al sitio de acción. Figura adaptada de Délye et al., 2013.

Los mecanismos de RT incluyen: una sobreproducción de la proteína blanco por mutaciones en regiones regulatorias o por amplificación génica (E), y/o mutaciones que

modifican la organización tridimensional y las propiedades electroquímicas de la proteína blanco (F). En el caso de la RNT, los mecanismos incluyen: una reducción en la penetración del herbicida por alteraciones en las propiedades de la cutícula de la planta (A), una translocación reducida del herbicida hacia el sitio de acción (B), una degradación metabólica aumentada del herbicida (C), o una neutralización aumentada de moléculas citotóxicas generadas por la acción del herbicida (D) (Délye et al., 2013).

Las malezas pueden tener resistencia a más de un herbicida. Cuando esta resistencia está causada por más de un mecanismo, se denomina “resistencia múltiple”, mientras que si un solo mecanismo es responsable de dicho fenotipo, se la llama “resistencia cruzada”. Esta última frecuentemente involucra a herbicidas con el mismo modo de acción (Délye et al., 2013).

Actualmente, la base de datos de malezas resistentes a herbicidas www.weedscience.com (Heap, 2019) informa que existen a nivel mundial 259 especies resistentes. Se ha desarrollado resistencia a 23 de los 26 sitios de acción de herbicidas conocidos y a 167 herbicidas, siendo los grupos más problemáticos los inhibidores de la ACCasa, de la ALS, de la EPSPS, de la PPO, del fotosistema II y las auxinas sintéticas (AS).

En Argentina, el sistema agro-productivo está basado desde hace más de 20 años en el cultivo de soja transgénica resistente a glifosato (RG) (ya sea en monocultivo, o bien, en una rotación con maíz transgénico tolerante) junto con la aplicación del herbicida glifosato, en algunos casos mezclado con otra clase de herbicidas (Lanfranconi et al., 2012). La confianza excesiva en este sistema llevó a una creciente selección de malezas RG. Si bien el primer caso de resistencia a glifosato en el país fue detectado en 2005 (Heap, 2019), al día de la fecha se reportaron 18 casos de resistencia a glifosato confirmados en un total de 14 especies. La mayoría de los casos de resistencia reportados en nuestro país son a los herbicidas inhibidores de la ALS (grupo B) y a glifosato (grupo G) (Tabla II).

Especie	Nombre común	Año*	Sitio(s) de acción
<i>Amaranthus hybridus</i>	Yuyo colorado	1996	ALS
		2013	EPSPS
		2014	ALS + EPSPS
		2016	AS
		2016	EPSPS + AS
<i>Sorghum halepense</i>	Sorgo de alepo	2005	EPSPS
		2015	ACCasa
		2015	EPSPS + ACCasa
<i>Lolium perenne</i> spp. <i>multiflorum</i>	Raigrás criollo	2007	EPSPS
		2009	ACCasa
		2010	ALS + EPSPS

<i>Lolium perenne</i>	Raigrás perenne	2008	EPSPS
<i>Cynodon hirsutus</i>	Gramilla mansa	2008	EPSPS
<i>Raphanus sativus</i>	Nabón	2008	ALS
<i>Echinochloa colona</i>	Capím	2009	EPSPS
<i>Avena fatua</i>	Avena guacha	2010	ACCasa
<i>Eleusine indica</i>	Pata de ganso	2012	EPSPS
<i>Conyza bonariensis</i>	Rama negra	2012	EPSPS
<i>Brassica rapa</i>	Nabo	2012	ALS + EPSPS
<i>Hirschfeldia incana</i>	Nabo amarillo	2013	ALS
		2016	ALS + AS
<i>Digitaria insularis</i>	Pasto amargo	2014	EPSPS
<i>Amaranthus palmeri</i>	Yuyo colorado	2013	ALS
		2015	EPSPS
<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla criolla	2017	EPSPS
<i>Urochloa panicoides</i>	Brachiaria	2017	EPSPS
<i>Carduus acanthoides</i>	Cardo platense	2019	EPSPS + AS

Tabla II. Malezas resistentes a herbicidas en Argentina. *El año generalmente corresponde al momento en que se reportó oficialmente la resistencia, pudiendo no coincidir con el año de detección a campo. Los datos fueron tomados de la base de datos de weedsciense.org (Heap, 2019). Abreviaturas: ACCasa: acetil-CoA carboxilasa; ALS: acetolactato sintasa; AS: auxinas sintéticas; EPSPS: 5-enolpiruvil-shikimato-3-fostato sintasa.

1.1 Herbicidas del grupo B

El sitio de acción de los herbicidas pertenecientes al grupo B es la enzima acetolactato sintasa (ALS) o acetohidroxiácido sintasa (AHAS) (EC 2.2.1.6). Esta enzima está involucrada en el primer paso de la biosíntesis de aminoácidos con cadena lateral ramificada (valina, isoleucina y leucina) (Figura III) tanto en plantas como en microorganismos (Subramanian et al., 1990), catalizando dos reacciones en paralelo (Duggleby et al., 2008):

- i. La condensación de dos moléculas de piruvato para dar lugar a una molécula de 2-acetolactato (de allí el nombre de ALS, acetolactato sintasa). Esta vía deriva en la síntesis de los aminoácidos valina y leucina.
- ii. La condensación de una molécula de piruvato y una de 2-cetobutirato para dar lugar a una molécula de 2-aceto-2-hidroxiacetato (de allí el nombre de AHAS, acetohidroxiácido sintasa). Esta vía deriva en la síntesis de isoleucina.

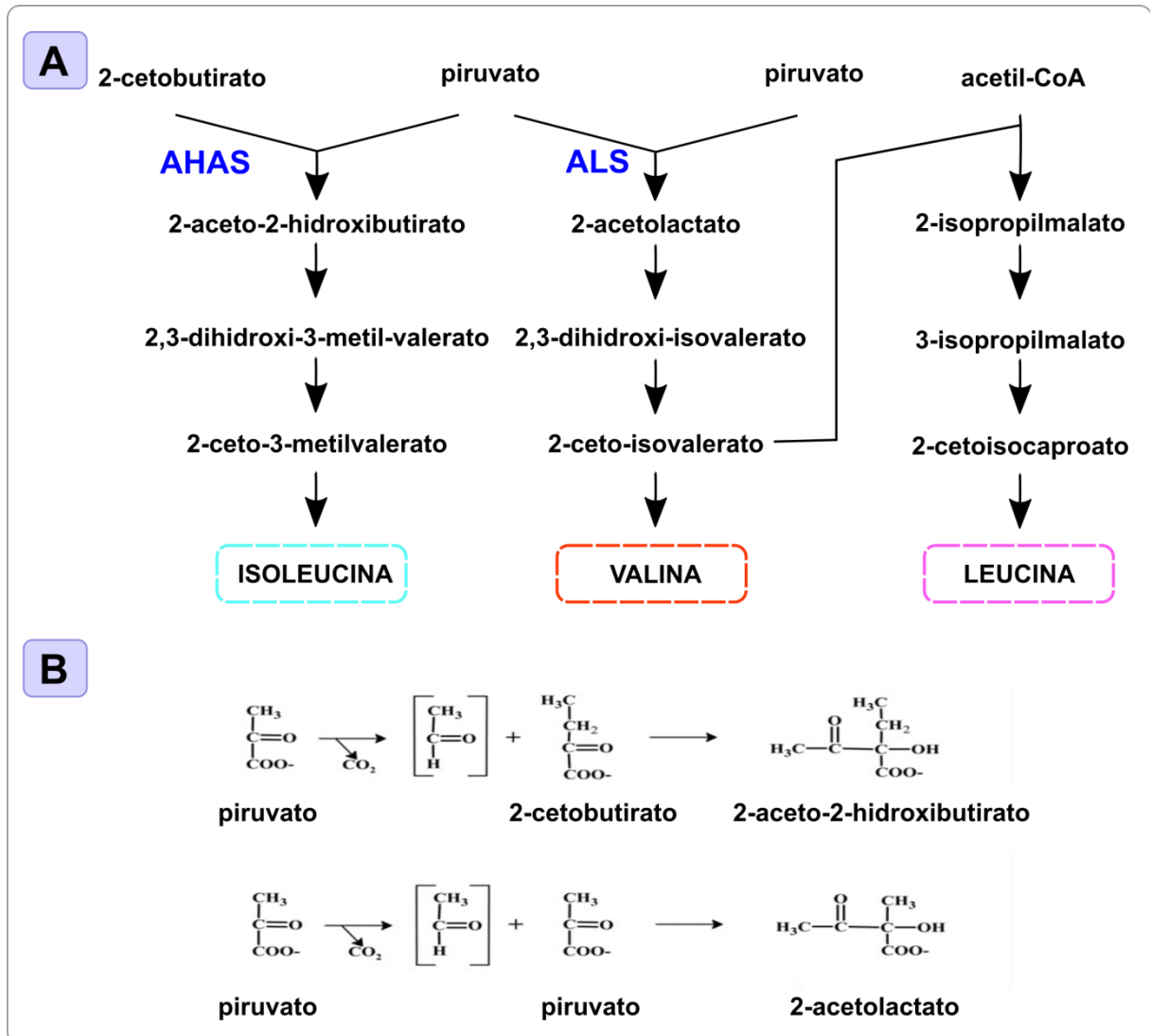


Figura III. Vía biosintética de aminoácidos de cadena lateral ramificada. **A-** Reacciones implicadas en la síntesis de los aminoácidos isoleucina, valina y leucina **B-** Reacciones catalizadas por ALS/AHAS. Figura adaptada de Duggleby et al., 2008.

La enzima ALS está compuesta por dos tipos de subunidades, una denominada catalítica y la otra regulatoria. La subunidad catalítica es activa por sí sola y su tamaño varía entre 59 y 64 kDa en eucariotas. La subunidad regulatoria (9-54 kDa), en cambio, no posee actividad ALS sino que estimula la actividad de la subunidad catalítica y participa en la regulación por retroalimentación negativa, lo que implica que la enzima es inhibida por los productos finales de la vía (isoleucina, valina y leucina) (Lee y Duggleby, 2001). McCourt et al. (2006) resolvieron la estructura cristalina de la subunidad catalítica de la ALS de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (denominada AtAHAS), concluyendo que la AtAHAS es un homotetrámero. A su vez, la actividad de la ALS depende de la presencia de tres cofactores, tiamina difosfato (ThDP), ion magnesio (Mg^{2+}) y flavina adenina dinucleótido (FAD).

En las plantas, los genes que codifican ambas subunidades se encuentran en el genoma nuclear. La subunidad catalítica es codificada por genes que se caracterizan por no presentar intrones. La ALS lleva a cabo su función en los cloroplastos y su nivel de expresión puede variar entre diferentes tejidos y distintos estadios del desarrollo, siendo mayor en los tejidos meristemáticos metabólicamente activos (Duggleby y Pang, 2000).

La inhibición de la ALS conduce a la inanición de la planta por los aminoácidos de cadena lateral ramificada y se cree que la misma es el mecanismo principal por el cual los herbicidas del grupo B causan la muerte de las plantas. Sin embargo, otros efectos secundarios como la acumulación de 2-cetobutirato/ 2-aminobutirato (tóxicos para las plantas) y la interrupción de la síntesis de proteínas y del transporte de fotoasimilados también estarían implicados en el mecanismo de la muerte vegetal (Tranel y Wright, 2002).

Los inhibidores de la ALS son utilizados para el manejo de malezas latifoliadas y gramíneas en una gran variedad de cultivos agronómicos. La popularidad de su utilización radica en que son herbicidas que presentan una amplia selectividad de cultivos, son eficaces para el control de un gran espectro de malezas a dosis bajas, presentan una muy baja toxicidad en mamíferos y poseen una actividad residual significativa. La aplicación de estos herbicidas puede realizarse en preemergencia o en postemergencia, ya que son absorbidos por hojas y raíces y son sistémicos, es decir, transportados por xilema y floema (Tranel y Wright, 2002).

Dentro de este grupo B se ubican más de 50 herbicidas comerciales que pueden ser agrupados en cinco familias químicas: sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), ácidos pirimidiniltiobenzoicos (PTB) y sulfonilaminocarbonil triazolinonas (SCT). La Figura IV muestra las estructuras moleculares de un representante de cada una de las cinco familias.

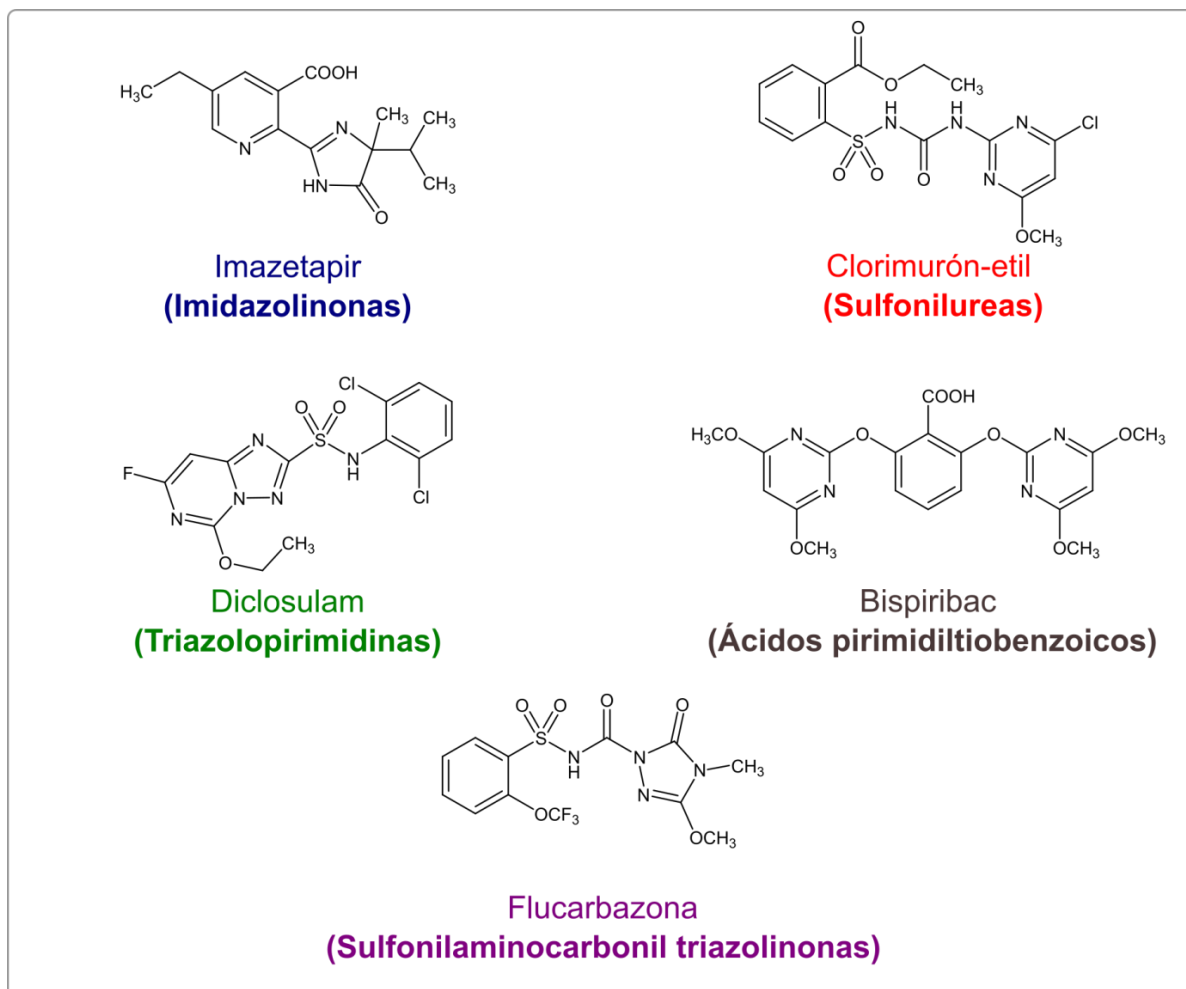


Figura IV. Estructuras moleculares de herbicidas de las cinco familias químicas correspondientes al grupo de herbicidas inhibidores de la ALS.

Las plantas tratadas con estos herbicidas luego de 7-14 días detienen su crecimiento, se marchitan y adquieren un color rojizo debido a la acumulación de antocianinas inducidas por el estrés. En gramíneas se observan clorosis o amarillamientos internervales y coloraciones rojizas en las hojas nuevas, en tanto que en latifoliadas se observa clorosis, acortamiento de entrenudos y coloraciones moradas en las nervaduras (Diez de Ulzurrun, 2013).

Los herbicidas inhibidores de la ALS se encuentran entre los herbicidas más utilizados en el mundo. Coherentemente, éstos superan a todos los demás grupos de herbicidas en términos del número de especies de malezas resistentes que se han reportado (Figura V). Actualmente hay 162 especies resistentes a nivel mundial y en nuestro país se encuentran 6 de dichas especies (Heap, 2019).

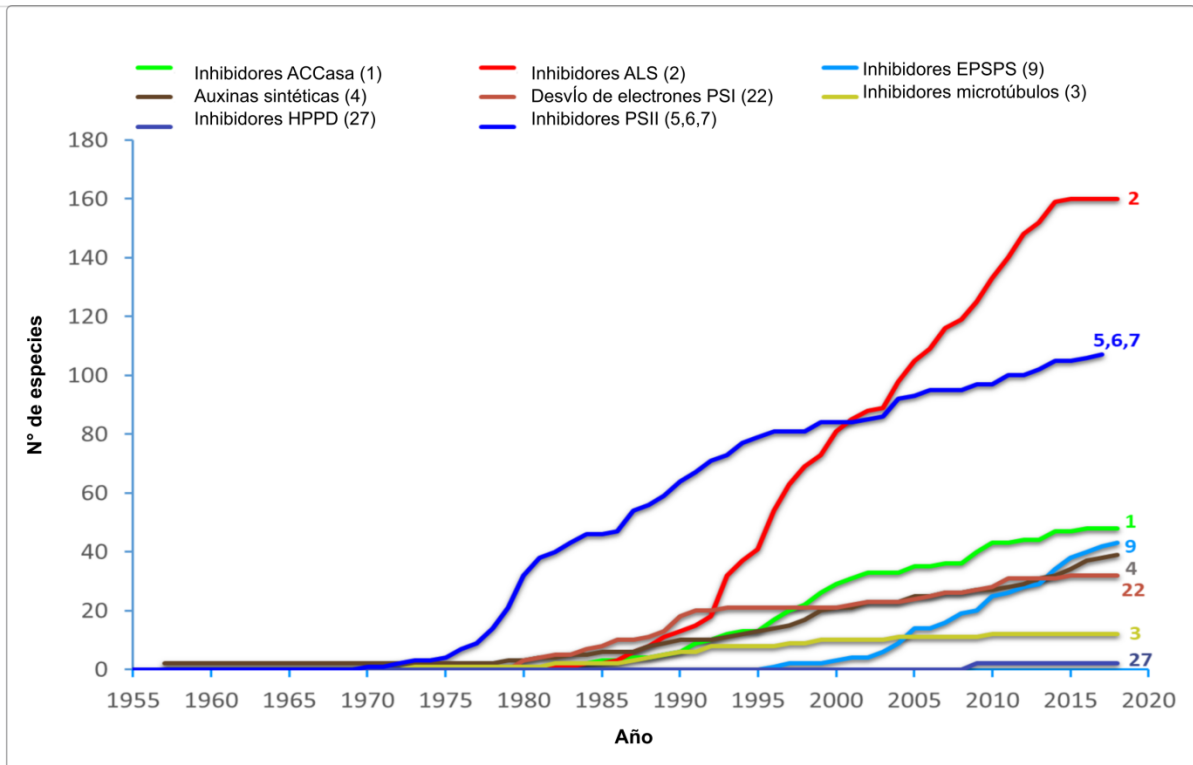


Figura V. Evolución cronológica de la resistencia a los principales grupos de herbicidas en las distintas especies a nivel mundial. Los números entre paréntesis corresponden a la clasificación WSSA. Figura tomada de Heap, 2019.

La resistencia a los herbicidas del grupo B puede estar asociada tanto a mecanismos de RT como RNT. Las mutaciones puntuales en el gen *ALS* que disminuyen la afinidad de unión de la enzima por el herbicida son el principal mecanismo de RT (Yu y Powles, 2014). Por otro lado, una degradación metabólica aumentada del herbicida (Christopher et al., 1994; Yun et al., 2005; Duhoux et al., 2015; Yang et al., 2016; Zhao et al., 2017; Zhao et al., 2019a) parece ser el mecanismo de RNT predominante. A modo de resumen, todos los mecanismos de resistencias informados para este grupo de herbicidas se describen en la Tabla III.

Bases genéticas del mecanismo	Molécula/ estructura involucrada	Efecto bioquímico/ fisiológico
RT, sustitución de AA en <i>ALS</i> : A122T/V/Y/S/N; P197T/H/R/L/Q/S/A/I/N/E/Y/M/K/W; A205V/F; D376E; R377H; W574L/G/M/R; S653T/N/I; G654E/D	ALS	Reducida sensibilidad de la <i>ALS</i> al herbicida
RT, sobreexpresión del gen <i>ALS</i>	ALS	¿Mayor actividad <i>ALS</i> ?

RNT, bases desconocidas	¿Ceras epicuticulares?	Reducida absorción foliar
RNT, bases desconocidas	Cyt P450	Metabolismo aumentado
RNT, sobreexpresión de genes: CYP71AK2; CYP72A254	Cyt P450	Metabolismo aumentado
RNT, sobreexpresión de genes: CYP81A12; CYP81A21	Cyt P450	Metabolismo aumentado
RNT, sobreexpresión de genes: CYP71A; CYP71B; CYP81D	Cyt P450	Metabolismo aumentado
RNT, sobreexpresión de genes: CYP94A1; CYP71A4	Cyt P450	Metabolismo aumentado
RNT, sobreexpresión de genes: CYP72A; CYP81B1; GST; GT	Cyt P450; GST; GT	Metabolismo aumentado
RNT, sobreexpresión de genes: CYP96A13; ABCC1	Cyt P450; Transportador ABC	Metabolismo aumentado
RNT, sobreexpresión de genes: esterasa; GST (U1, U6); GT; POD (5, 65); CAT (1, 2)	Esterasa; GST; GT; POD; CAT	Metabolismo aumentado y protección contra daños colaterales

Tabla III. Mecanismos de resistencia a inhibidores de la ALS. Abreviaturas: AA: aminoácidos; ALS: acetolactato sintasa; Cyt P450: citocromo P450; GST: glutatión S-transferasa; GT: glicosil-transferasa; POD: peroxidasa; CAT: catalasa. Tabla adaptada de Perotti et al., 2020.

1.2 Herbicidas del grupo G

Como se mencionó anteriormente, el otro grupo de herbicidas con mayor número de casos de resistencia registrados en nuestro país es el grupo G, cuyo único representante es el glifosato.

El sitio de acción del glifosato es la enzima 3-fosfoshikimato-1-carboxiviniltransferasa (EC 2.5.1.19), ampliamente conocida bajo su sinónimo 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). La EPSPS es una de las enzimas implicadas en la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina, que son necesarios para la síntesis de proteínas que llevan al crecimiento de la planta. Esta enzima forma parte de la ruta metabólica del ácido shikímico, ya que, cataliza la transferencia de una unidad de enolpiruvil desde el fosfoenolpiruvato (PEP) hacia el shikimato-3-fosfato, formando los productos 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato y fosfato inorgánico (Figura VI) (Steinrücken y Amrhein, 1980).

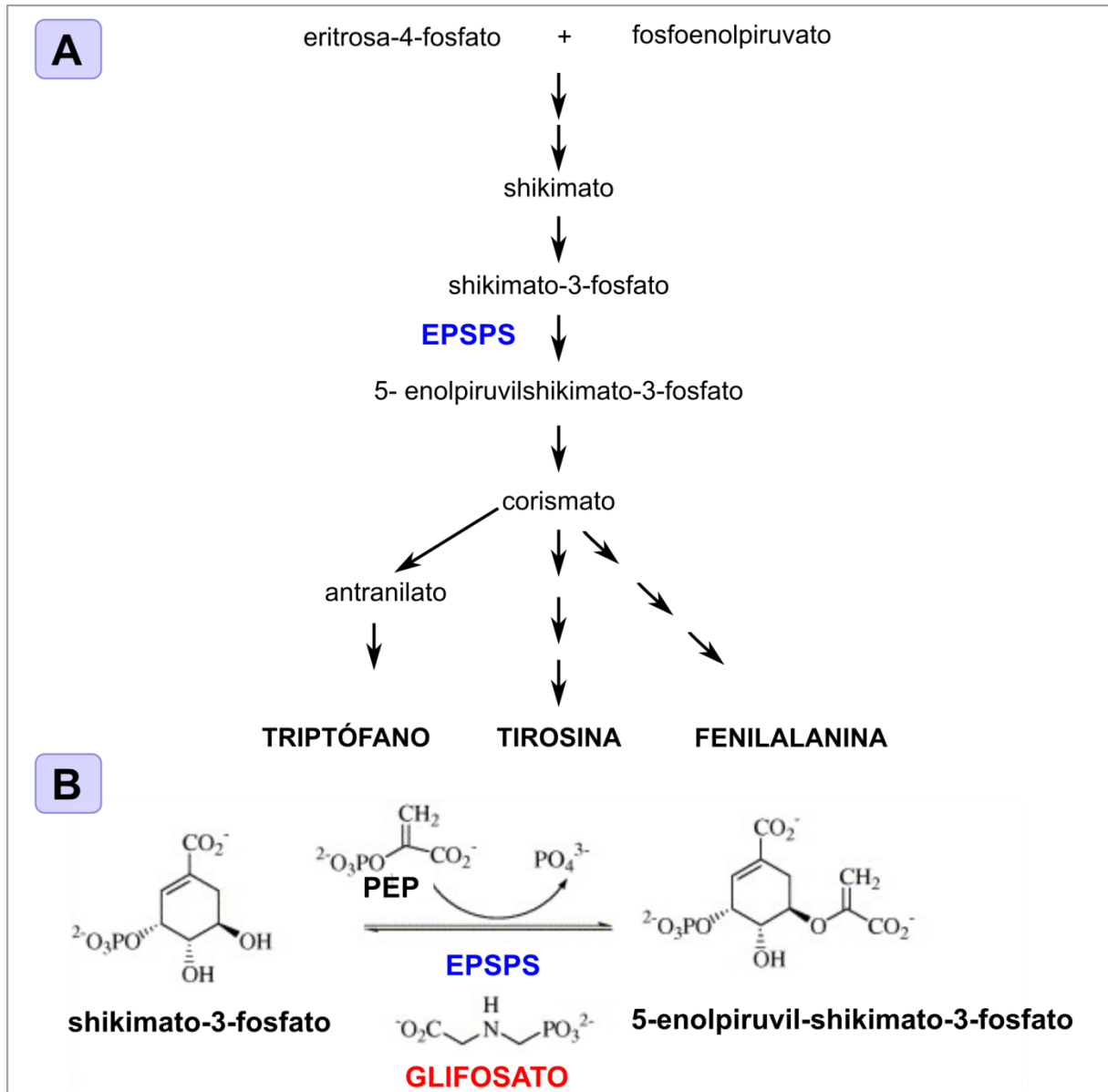


Figura VI. Vía de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. **A-** Reacciones implicadas en la síntesis de los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina. **B-** Reacción catalizada por EPSPS y estructura del glifosato.

En plantas, la EPSPS está localizada primariamente en cloroplastos y otros plastidios (Mousdale y Coggin, 1993), aunque se han reportado formas citoplásmicas (Baylis, 2000). La enzima es sintetizada como un precursor citoplasmático con una secuencia N-terminal que codifica para el péptido señal. El péptido señal es requerido para la translocación de la enzima al estroma de los plastidios, donde luego es clivado para dar lugar a la proteína madura (Della-Cioppa et al., 1986). La EPSPS es monomérica, posee un peso molecular de 46 kDa y se pliega en dos dominios similares, cada uno compuesto de tres repeticiones de la unidad de plegamiento $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$ (Stallings et al., 1991).

El efecto del glifosato en el metabolismo de la planta se traduce en la inhibición de la acción de la enzima blanco por competir con el PEP por el sitio de unión a la EPSPS (Schönbrunn et al., 2001), desencadenando la acumulación de ácido shikímico (Pline et al., 2002) y afectando varios procesos fisiológicos (Cole, 1985).

El glifosato es un herbicida postemergente, no selectivo que no tiene acción en el suelo puesto que se adsorbe rápidamente. Es usado ampliamente para el control de malezas perennes con reproducción vegetativa, ya que al ser altamente sistémico, se transporta a toda la planta (Rosales-Robles y Sánchez de la Cruz, 2006). La aparición de los primeros síntomas visibles de fitotoxicidad, clorosis y marchitamiento ocurre a los 4-7 días post-aplicación del herbicida en aquellas plantas altamente susceptibles, mientras que en las menos sensibles los síntomas se evidencian entre los 10-20 días de realizado el tratamiento. Finalmente, la clorosis progresa hasta alcanzar una coloración pardo-rojiza evidenciando la muerte de la planta (Senseman, 2007).

A diferencia de otros principios activos, recién luego de 22 años del lanzamiento del glifosato se registró el primer caso de una maleza resistente (Powles et al., 1998), clasificándose a este principio activo dentro de los herbicidas menos propensos al desarrollo de resistencia. Sin embargo, la acción conjunta de la adopción masiva de la siembra directa, la introducción de los cultivares de soja resistente a glifosato, el monocultivo de soja empleando principalmente esos cultivares y la sustitución de los herbicidas tradicionales por el glifosato, determinó que se ejerza una invariable presión de selección sobre la comunidad de malezas, dirigida fundamentalmente a especies adaptadas al no laboreo (Papa, 2002). Actualmente, existen 47 especies resistentes a glifosato a nivel mundial (Figura VII).

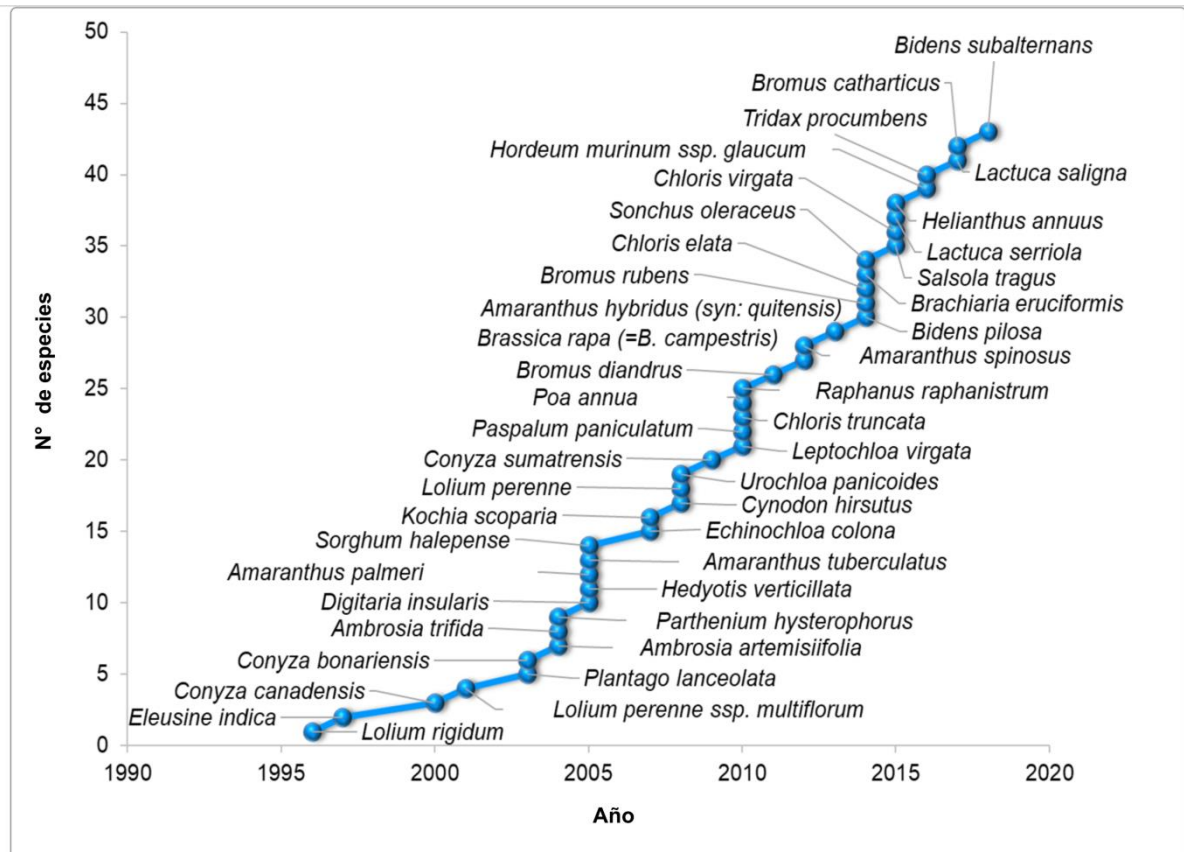


Figura VII. Evolución cronológica del número de especies resistentes a glifosato a nivel mundial. Figura tomada de Heap, 2019.

La resistencia a glifosato está asociada tanto a mecanismos de RT como RNT. Las sustituciones de una prolina en la posición 106 de la enzima y la amplificación del gen *EPSPS* son los mecanismos de RT más reportados (Sammons y Gaines, 2014), aunque recientemente se informaron algunos otros mecanismos que involucran otras sustituciones simples, dobles y triples en la *EPSPS* (Nandula et al., 2013; Yu et al., 2015; Alcántara-de la Cruz et al., 2016; Ngo et al., 2018; Perotti et al., 2019).

Por otro lado, los mecanismos de RNT incluyen el secuestro activo del glifosato en vacuola, la absorción y translocación reducida del mismo y la necrosis rápida (Peng et al., 2010; Yuan et al., 2010; Nol et al., 2012; Vila-Aiub et al., 2012; Van Horn et al., 2018; Moretti et al., 2018). A modo de resumen, se describen en la Tabla IV todos los mecanismos de resistencia a glifosato informados.

Bases genéticas del mecanismo	Molécula/estructura involucrada	Efecto bioquímico/fisiológico
RT, sustituciones de AA en <i>EPSPS</i> : P106S/A/T/L; T102S	<i>EPSPS</i>	Reducida sensibilidad de <i>EPSPS</i> al herbicida

RT, doble sustitución de AA en EPSPS: T102I + P106S; T102I+ P106T	EPSPS	Reducida sensibilidad de EPSPS al herbicida
RT, triple sustitución de AA en EPSPS: T102S + A103V + P106S	EPSPS	Reducida sensibilidad de EPSPS al herbicida
RT, amplificación génica (ADNcec)	EPSPS	Mayor actividad EPSPS
RT, amplificación génica (duplicación en tándem mediada por transposón)	EPSPS	Mayor actividad EPSPS
RT, amplificación génica (mecanismo desconocido)	EPSPS	Mayor actividad EPSPS
RNT, bases desconocidas	Desconocido	Absorción foliar y translocación reducidas
RNT, bases desconocidas	Desconocido	Translocación reducida
RNT, bases desconocidas	¿Transportador ABC?	Translocación reducida
RNT, sobreexpresión de genes: M10; M11; M7; P3; ABCG29; ABCC3; ABCG42	Transportador ABC	Translocación reducida
RNT, bases desconocidas	Desconocido	Muerte celular rápida
RNT, bases desconocidas	Desconocido	Metabolismo aumentado
RNT, sobreexpresión de genes: CYP82D47	Cyt P450	¿Metabolismo aumentado?

Tabla IV. Mecanismos de resistencia a glifosato. Abreviaturas: AA: aminoácidos; EPSPS: 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa; ADNcec: ADN circular extra-cromosomal; Cyt P450: citocromo P450. Tabla adaptada de Perotti et al., 2020.

1.3 *Amaranthus palmeri* en Argentina

La Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (Aapresid), en el año 2017, relevó la superficie afectada a nivel nacional por las principales malezas resistentes y tolerantes a glifosato. El relevamiento indicó que más del 50% de la superficie evaluada está infestada por malezas y que algunos lotes presentan más de una especie (REM, 2017). Recientemente volvieron a relevar 29 millones de hectáreas, que representan casi la totalidad de la superficie con cultivos extensivos a nivel nacional e informaron que en estos dos años hubo un incremento del 35% en la superficie afectada por malezas (REM, 2019). Este incremento se debe a que la dispersión de malezas no se limita sólo a las vías naturales (viento, agua, animales, gravedad, etc.), sino que el hombre también interviene a través del movimiento de animales domésticos, empleo de semillas de cultivos contaminadas, movimiento de maquinarias, transporte de granos, etc. De esta forma, un problema de malezas que evolucionó en un determinado lugar puede afectar a otros sistemas productivos ubicados a distancias considerables. La Figura VIII muestra la superficie afectada por malezas en nuestro país, de acuerdo a los relevamientos en los años

2017 y 2019.

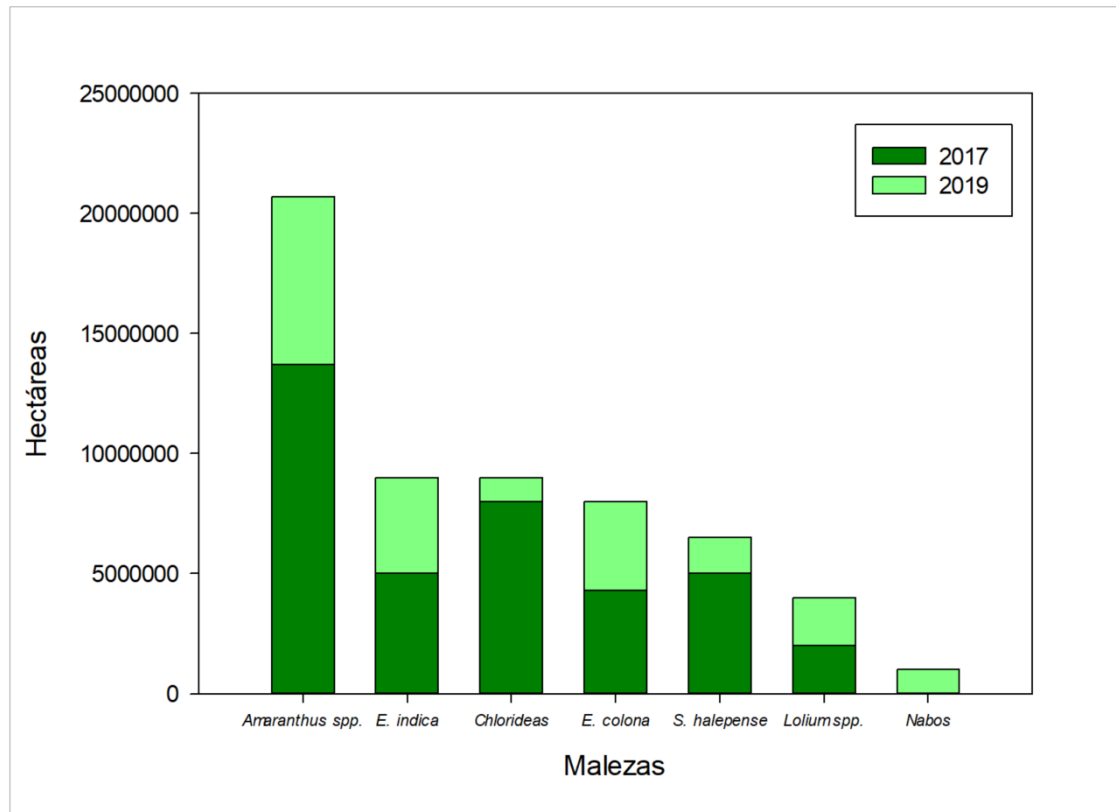


Figura VIII. Superficie afectada por malezas en Argentina. Figura adaptada de REM, 2019.

El yuyo colorado (*Amaranthus spp.*) es la maleza de mayor abundancia en nuestro país, con 20,5 millones de hectáreas afectadas, la cual tuvo un crecimiento de 7 millones de hectáreas entre los dos años evaluados. Las provincias más afectadas por esta maleza son Córdoba, Buenos Aires y Santa Fe, que concentran el 75% de la superficie (REM, 2019).

Amaranthus palmeri S. Watson es una especie anual, diclino dioica (plantas unisexuales, pies femeninos y masculinos separados), detectada en los últimos años en Argentina y que se ha transformado junto con *Amaranthus hybridus* L. (sin. *A. quitensis*) en una de las malezas más problemáticas del país. Esta maleza es una planta de metabolismo C4 con alta capacidad fotosintética, nativa del sudoeste de los Estados Unidos y Norte de México (Steyermark, 1963). Se ha registrado un crecimiento diario en esta especie de 2-4 cm/día (plantas erectas pueden alcanzar una altura superior a los 2,5 m), siendo este crecimiento y también su ganancia de biomasa mayor al de otras especies del género *Amaranthus* (Horak y Loughin, 2000; Sellers et al., 2003). Este rápido crecimiento implica un mayor consumo de agua y nutrientes, favorecido por su sistema radicular profundo y

ramificado (Black et al., 1969), y una mayor competencia por el espacio y la luz, para lo cual *A. palmeri* destina gran parte de su biomasa hacia sus hojas (Hartzler, 2013).

Al ser una especie dioica, la polinización es cruzada, lo que incrementa la variabilidad genética y la tasa de evolución de los mecanismos de resistencia, ya que además puede hibridar con otras especies del género (Trucco et al., 2007). Recientemente, se observó que el estrés hídrico afecta la sincronía de floración y la expresión sexual en *A. palmeri*. Bajo condiciones de estrés hídrico se produce un desfase en el período de antesis entre las plantas con flores masculinas y femeninas y un aumento en la relación pies femeninos/ masculinos (Mesgaran et al., 2019). Las plantas de *A. palmeri* pueden producir hasta 600.000 semillas, las cuales son capaces de germinar durante toda la estación de crecimiento (Jha et al., 2007; Tuesca et al., 2013). Estas características biológicas convierten a *A. palmeri* en una maleza sumamente agresiva y muy difícil de manejar eficazmente con los recursos tecnológicos actualmente disponibles (Tuesca et al., 2016).

En nuestro país, hasta el momento, se ha confirmado la presencia de poblaciones de *A. palmeri* con resistencia a inhibidores de la ALS o a glifosato (Berger et al., 2016; Palma-Bautista et al., 2019; Kaundun et al., 2019); sin embargo, existe la sospecha de que hay también poblaciones con resistencia múltiple a inhibidores de la ALS y glifosato, pero esto todavía no se confirmó científicamente. Dada la alta tendencia de *A. palmeri* a adquirir resistencia a varios mecanismos de acción (ya se han reportado, a nivel mundial 60 casos de resistencia a 6 sitios de acción distintos) es relevante confirmar las resistencias reportadas a campo e intensificar los estudios sobre las bases moleculares de dichas resistencias.

La información de los mecanismos moleculares es clave para el diseño de tácticas de control geo-localizadas que permitan a los productores entender, prevenir y eventualmente sobrellevar de manera sustentable el problema de resistencia en malezas, sin contribuir a la generación de un problema similar a largo plazo.

Además, comprender las bases moleculares de la resistencia a herbicidas es un paso clave en el entendimiento del proceso evolutivo que causa este fenómeno y en el diseño de estrategias que permitan un control exitoso. El estudio de los efectos del medio ambiente (temperatura, estrés abiótico, etc.) sobre la aptitud de las plantas resistentes en condiciones de cultivo actuales y futuras podría identificar condiciones bajo las cuales disminuya la frecuencia de los alelos de resistencia en la población (Vila-Aiub et al., 2013).

Por otro lado, el conocimiento de las bases moleculares de la resistencia se puede utilizar para el desarrollo de variedades de cultivos o estrategias que permitan a los cultivos

competir mejor con las malezas.

La resistencia a herbicidas en malezas es hoy uno de los problemas más importantes que enfrentan los sistemas agropecuarios en todo el mundo (Heap, 2014). La rápida evolución de múltiples mecanismos de resistencia en las últimas décadas tiene un impacto tanto en la producción de cultivos como en el medio ambiente y representa un gran desafío para los agricultores, los científicos y el sector de la agroindustria. Una comprensión mejorada y más integrada de la resistencia en todas las escalas (genotípica, poblacional y a nivel de ecosistema) será la clave para enfrentar el desafío global de resistencia a los herbicidas.

Objetivo general

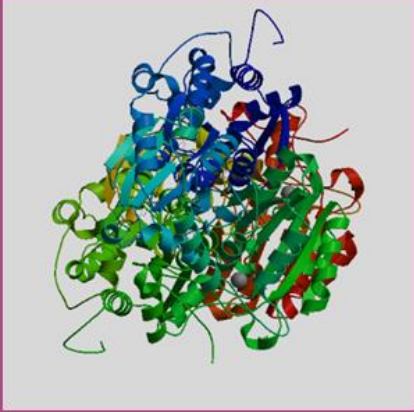
Identificar las bases moleculares responsables del fenotipo de resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS y glifosato observado en plantas de *A. palmeri* halladas a campo, con énfasis en el hallazgo y la caracterización de nuevas mutaciones en el sitio de acción de los herbicidas inhibidores de la ALS.

Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de resistencia *in vivo* e *in vitro* a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y glifosato e identificar las distintas variantes alélicas de los genes que codifican para las enzimas blanco presentes en una subpoblación de *A. palmeri* resistente a sulfonilureas, imidazolinonas y glifosato.
2. Obtener clones vegetativos a partir de distintos individuos seleccionados de la subpoblación de *A. palmeri* resistente a sulfonilureas, imidazolinonas y a glifosato.
3. Determinar los niveles de resistencia y caracterizar bioquímica y molecularmente el mecanismo de resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS y a glifosato de los diferentes individuos seleccionados de *A. palmeri*.
4. Clonar, expresar y purificar las distintas versiones resistentes y susceptible de las enzimas acetolactato sintasa en forma recombinante para su posterior evaluación mediante ensayos inhibitorios.

Hipótesis

- 1) La resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS (herbicidas del grupo B) de las plantas de *Amaranthus palmeri* halladas en la localidad de Totoras se debe a un mecanismo target de mutación de punto sobre el gen *ALS*.
- 2) La resistencia a glifosato (herbicida del grupo G) de las plantas de *Amaranthus palmeri* halladas en la localidad de Totoras se debe a un mecanismo target de amplificación del número de copias del gen *EPSPS*.



Capítulo 1

Caracterización de la resistencia a inhibidores de la acetolactato sintasa en una subpoblación de *A. palmeri* identificada en Totoras

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A INHIBIDORES DE LA ACETOLACTATO SINTASA EN UNA SUBPOBLACIÓN DE *A. palmeri* IDENTIFICADA EN TOTORAS**2.1 INTRODUCCIÓN:**

Entre las malezas de difícil control en los sistemas agrícolas de Argentina, los “yuyos colorados” (*Amaranthus* spp.) constituyen el grupo de especies latifoliadas más problemático en los cultivos estivales (soja, maní, sorgo y maíz) (Tuesca et al., 2016). Su impacto sobre la producción agrícola es importante, debido a su distribución, abundancia y dificultad de manejo (Metzler y Papa, 2015). Dentro de este género, *A. hybridus* y *A. palmeri* se encuentran como especies dominantes en nuestro país (REM, 2015).

A. palmeri comienza a detectarse en los cultivos estivales en el sur de las provincias de Córdoba y San Luis a partir del año 2012, aunque existen algunos indicios de que se hallaba presente desde 2004-2005, pero era confundida con *A. hybridus*, que es muy común en la zona. Probablemente, la introducción de esta especie al país esté asociada con la importación de semillas de cereales, oleaginosas o forrajeras contaminadas con semillas de *A. palmeri* y/o a través de maquinaria agrícola introducida al país desde Estados Unidos (Morichetti et al., 2013). Actualmente, a esta especie se la encuentra también en las provincias de La Pampa, Buenos Aires, Santa Fe, Tucumán, Chaco y Salta, y probablemente en otras del norte del país (Montoya et al., 2015).

Esta maleza tiene características germinativas, de crecimiento, de desarrollo y de reproducción que la hacen una especie altamente invasiva y adaptable, convirtiéndola en un perfecto vector para la resistencia a herbicidas (Ward et al., 2013). A nivel mundial, se han reportado 64 casos de resistencia a seis modos de acción (B, C1, G, K1, O y F2) diferentes (Heap, 2019). En Argentina se ha informado la presencia de poblaciones de *A. palmeri* resistentes a herbicidas con dos de estos modos de acción: B y G, como se mencionó anteriormente en la Introducción de esta Tesis.

En la mayoría de los casos informados, la resistencia asociada a los herbicidas inhibidores de la ALS (grupo B) se debe a mutaciones puntuales en el gen *ALS* (subunidad catalítica), que reducen la sensibilidad de la enzima por estos químicos, manteniendo la funcionalidad de la misma. Esto se debe a que los herbicidas del grupo B no se unen al sitio catalítico de la enzima (McCourt et al., 2006); por lo tanto, existe una gran variedad de mutaciones que pueden conferir resistencia.

La variabilidad entre alelos es causada en gran medida por mutaciones espontáneas. La alta tasa de mutación en la ALS, en relación con otros sitios de acción de los herbicidas, podría explicar la alta frecuencia de resistencia a los herbicidas del grupo B (Tranel y Whight, 2002). Además, en presencia de los herbicidas, los genes de resistencia se vuelven rápidamente “relevantes” en la población debido a que su frecuencia inicial es alta, su herencia es dominante y a que generalmente no producen un costo biológico (Yu y Powles, 2014).

Actualmente se han identificado alrededor de 31 sustituciones a lo largo de ocho sitios de la secuencia aminoacídica de la ALS que le otorgan resistencia a los herbicidas del grupo B. Estos sitios corresponden a los siguientes aminoácidos y posiciones: Ala 122 (A122), Pro 197 (P197), Ala 205 (A205), Asp 376 (D376), Arg 377 (R377), Trp 574 (W574), Ser 653 (S653) y Gly 654 (G654) (Powles y Yu, 2010; Yu y Powles, 2014; Brosnan et al., 2016; Panozzo et al., 2017). Los aminoácidos están numerados según la secuencia de la ALS de *A. thaliana*. Cabe destacar que la resistencia que confieren estas mutaciones en el gen ALS dependen de la posición en la que ocurre, del aminoácido que reemplaza al original, de la familia química del herbicida, del herbicida en particular y, en muchos casos, de la especie de la maleza.

Los mecanismos de RNT asociados a los herbicidas del grupo B dilucidados a la fecha incluyen la protección contra daños colaterales generados por la acción del herbicida (Zhao et al., 2019b), una absorción reducida (White et al., 2002) y la degradación metabólica aumentada del herbicida (Christopher et al., 1994; Yun et al., 2005; Duhoux et al., 2015; Yang et al., 2016; Zhao et al., 2017; Zhao et al., 2019a), siendo este último el más frecuentemente reportado.

En *A. palmeri* se han encontrado varias sustituciones en el gen ALS que confieren resistencia a estos herbicidas: A122T, P197S/A, W574L y S653N (Molin et al., 2016; Küpper et al., 2017; Nakka et al., 2017; Singh et al., 2019). Sin embargo, para esta especie sólo se ha informado un caso de mecanismo de RNT para los herbicidas del grupo B y se debe a una degradación metabólica aumentada (Nakka et al., 2017).

Una misma mutación en el gen ALS puede causar resistencia a más de un principio activo, dentro de las cinco familias que componen el grupo B de herbicidas (resistencia cruzada) (Yu y Powles, 2014), lo cual acota notablemente el espectro de herramientas químicas factibles para el control de la población en cuestión. Asimismo, si se identifica una mutación puntual que genera resistencia sólo a una determinada familia química, se puede plantear el uso de principios activos pertenecientes a alguna de las otras familias,

aumentando las posibilidades de éxito en el manejo de dicha maleza.

Por otro lado, los mecanismos de RNT pueden dar resistencia a herbicidas con diferentes modos de acción. Sin embargo, sólo unos pocos de estos mecanismos han sido dilucidados a nivel molecular. Esto se debe a que los procesos bioquímicos que los regulan son intrínsecamente complicados, tienen una naturaleza cuantitativa que está controlada por múltiples genes y la información genómica disponible para las especies de malezas es limitada.

Así, la confirmación de la resistencia y la dilucidación de las bases moleculares que explican este fenotipo en las subpoblaciones de malezas halladas a campo son de gran utilidad para el diseño racional de estrategias de control.

El objetivo de este capítulo es determinar los niveles de resistencia *in vivo* e *in vitro* a herbicidas inhibidores de la ALS e identificar los alelos del gen que codifica para la enzima blanco presentes en una subpoblación de *A. palmeri* con resistencia múltiple a herbicidas del grupo B y G.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS:

2.2.1 Material vegetal

Las muestras de semillas de *A. palmeri* utilizadas fueron proporcionadas por la Cátedra de Malezas, específicamente por el grupo del Prof. Daniel Tuesca. Éstas se colectaron de lotes con cultivo de soja de dos campos, uno localizado en Totoras y el otro en Tucumán. Se muestrearon al menos 50 plantas de *A. palmeri* de cada campo y se obtuvo una única muestra de semillas de cada uno. En el primer campo se habían detectado fallas en el control de esta maleza al emplear los herbicidas Derby® (i.a.: imazetapir 10% P/V, Gleba), VRILEC® (i.a.: clorimurón-etil 25% P/P; Agrofina), inhibidores de la ALS, y Roundup full® II (sal potásica 66,2 g, equivalente ácido de glifosato 54% P/V, Monsanto), durante al menos cinco campañas seguidas. El segundo campo (Tucumán), nunca había sido aplicado con inhibidores de la ALS, pero sí con glifosato, por lo tanto, la subpoblación de yuyo colorado obtenida de este campo se utilizó como control susceptible sólo para los ensayos con herbicidas inhibidores de la ALS. Las geolocalizaciones y nomenclaturas de cada subpoblación se resumen en la Tabla 1.

Subpob.	Localidad	Coordenadas	R glifosato?	R ALS?
Tot	Totoras	32°34'59.88"S, 61°10'59.88"W	Sí	Sí
Tuc	Tucumán	27°17'45.36"S, 65°0'3.37"W	Sí	No

Tabla 1. Subpoblaciones de *A. palmeri* estudiadas.

2.2.2 Compuestos químicos

Los ensayos de resistencia *in vivo* e *in vitro* se realizaron con tres clases de herbicidas inhibidores de la ALS. La familia química y el ingrediente activo de cada herbicida utilizado se resumen en la Tabla 2.

Familia química	Abreviatura	Ingrediente activo	Marca	Empresa
Imidazolinonas	IMI	Imazetapir 10% P/V	DERBY®	Gleba
Sulfonilureas	SU	Clorimurón-etil 25% P/P	VRILEC®	Agrofina
Triazolopirimidinas	TP	Diclosulam 84% P/P	SPIDER®	Dow Agro-Ciencias

Tabla 2. Herbicidas inhibidores de la ALS evaluados en los ensayos de resistencia *in vivo* e *in vitro*.

2.2.3 Ensayos de dosis-respuesta

Se realizaron curvas de dosis-respuesta de las subpoblaciones de *A. palmeri* (Tot y Tuc). Se obtuvieron aproximadamente 120 plantas de cada subpoblación en cámaras de cultivo a 25°C con un fotoperíodo de 16:8 horas día/noche y una intensidad lumínica de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. El sustrato consistió en una mezcla de tierra, arena y perlita (70-20-10%, respectivamente) contenido en macetas de 500 cm^3 . Las plantas fueron tratadas con cada herbicida cuando alcanzaron el estadio de 4-6 hojas. Las dosis de herbicida que se utilizaron fueron: 0,0625X; 0,125X; 0,250X; 0,5X; 1X; 2X; 4X; 8X y 16X, siendo X= 100 g i.a./ha para imazetapir, X= 50 g i.a./ha para clorimurón-etil, X= 30 g i.a./ha para diclosulam. Estas últimas dosis corresponden a las recomendadas en el marbete de cada herbicida. Además, en cada subpoblación se incluyó un control sin aplicación de herbicida (dosis 0X). La aplicación de los herbicidas se llevó a cabo utilizando un equipo aspersor de presión constante con boquillas de ventilador planas a 206,84 kPa, calibrada para suministrar 116 L/ha. Se registró el número de plantas sobrevivientes tres semanas después del tratamiento. También se determinó el peso seco, luego de colocar las muestras cosechadas de las plantas sobrevivientes en la estufa a 60°C durante 48 horas. Los datos se expresaron como porcentaje de supervivencia y peso seco en relación al control no tratado. El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones por dosis, donde cada maceta con tres plantas fue la unidad experimental.

Se obtuvieron las curvas dosis-respuesta por ajuste a un modelo de regresión no lineal utilizando el software SigmaPlot (versión 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y = \frac{\min + (\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{b}\right)^a}$$

donde **y** representa el porcentaje de respuesta (supervivencia o peso seco) a las dosis de herbicidas, **x** es la concentración de herbicida, **min** es la asíntota inferior o respuesta a una dosis de herbicida infinitamente alta; **max** representa la asíntota superior o respuesta cuando la dosis de herbicida es cero, **a** es la pendiente de la curva en el punto de inflexión y **b** es la concentración de herbicida requerida para producir una reducción del crecimiento del 50% (GR₅₀) o una reducción del 50% de la supervivencia (LD₅₀).

Los datos se analizaron mediante la prueba t-Student para comparar los LD₅₀ y GR₅₀ de las dos subpoblaciones.

El factor de resistencia (FR) se calculó dividiendo el valor LD₅₀ o GR₅₀ determinado

de la subpoblación resistente por el de la subpoblación susceptible.

2.2.4 Ensayo de inhibición de la actividad enzimática ALS *in vitro*

Se realizaron ensayos de inhibición de la actividad ALS en extractos proteicos parcialmente enriquecidos en dicha enzima. Se obtuvieron los extractos a partir de hojas jóvenes de seis plantas de cada subpoblación. Se trituraron seis gramos de tejido en morteros conteniendo nitrógeno líquido, se resuspendió en dos volúmenes de buffer de extracción (fosfato de potasio 100 mM pH 7,5; cloruro de magnesio 0,5 mM; TPP 0,5 mM; FAD 10 μ M; piruvato de sodio 10 mM; glicerol 10% V/V) y se enriqueció en la proteína de interés mediante precipitación con sulfato de amonio, de acuerdo a Poston et al. (2002).

La actividad enzimática se determinó midiendo la cantidad de acetoína formada en presencia de diferentes concentraciones de imazetapir, clorimurón-etil y diclosulam, según el método de Westerfeld con algunas modificaciones (Yu et al., 2010). Este método consiste en la conversión del acetolactato (producto de la reacción catalizada por la ALS) en acetoína, en medio ácido y la formación de un complejo rosado-rojo en presencia de α -naftol y creatina.

Se ensayó la actividad ALS en 200 μ l de volumen final, que contenían 40 μ l de extracto en buffer de reacción (fosfato de potasio 50 mM pH 7,5; cloruro de magnesio 20 mM; TPP 2 mM; FAD 20 μ M; piruvato de sodio 200 mM) y 5 μ l de herbicida. Las concentraciones finales ensayadas fueron: 0; 0,25; 1; 5; 250 y 1000 μ M para imazetapir y 0; 0,025; 0,1; 0,25; 1; 5; 25 y 250 μ M para clorimurón-etil y diclosulam. Las reacciones se incubaron durante una hora a 37°C y luego se detuvieron con el agregado de 16 μ l de ácido sulfúrico 6 N e incubación durante 15 minutos a 60°C. Se añadió α -naftol (5,5% P/V, disuelto en hidróxido de sodio 5 N) y creatina (0,55% P/V) y luego de una incubación de 15 minutos a 60°C se determinó el contenido de acetoína de cada mezcla de reacción a 490 nm mediante un lector de microplacas BioTek (ELX 800).

En cada ensayo se incluyeron controles de acetolactato inicial, impidiendo la reacción mediante el agregado de ácido sulfúrico 6 N a tiempo cero. Además, se realizó un control negativo agregándole al extracto hidróxido de sodio 5 N una vez finalizado el tiempo de incubación. Este control negativo se utiliza para cuantificar otros procesos celulares que eventualmente pudieran estar ocurriendo (piruvato descarboxilasa y otras múltiples enzimas formadoras de acetoína) (Forlani et al., 1999; Dayan et al., 2015). Los datos corregidos por los controles se expresaron como porcentaje de actividad residual en relación a la actividad en ausencia de herbicida. La inhibición enzimática se calculó como I_{50} , que representa la

concentración de herbicida a la cual la actividad enzimática se reduce a la mitad de la actividad en ausencia de herbicida. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y se repitieron tres veces los experimentos.

Los datos de actividad residual se ajustaron a una curva logística de tres parámetros, utilizando SigmaPlot (version 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA), bajo la siguiente ecuación:

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{I_{50}}\right)^b}$$

donde **y** es el porcentaje de actividad residual a cada concentración de herbicida en relación al control (en ausencia del herbicida), **x** es la concentración de herbicida, **a** es la asíntota superior o respuesta cuando la dosis de herbicida es cero, **b** es la pendiente de la recta en el punto I_{50} e I_{50} es la concentración de herbicida a la cual la actividad enzimática se reduce a la mitad de la actividad en ausencia de herbicida (50% de actividad residual).

Los datos se analizaron mediante la prueba t-Student para comparar los I_{50} de las dos subpoblaciones.

El factor de resistencia (FR) se calculó dividiendo el valor I_{50} determinado de la subpoblación resistente por el de la subpoblación susceptible.

2.2.5 Análisis de las bases moleculares de la resistencia

2.2.5.1 Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN genómico (ADNg) a partir de hojas jóvenes de diez plantas de cada subpoblación. Las extracciones se llevaron a cabo utilizando el kit “GenElute TM Plant Genomic DNA Miniprep”, según instrucciones del fabricante (Sigma, Cat. G2N350). La concentración de las soluciones de ADNg se estimaron mediante comparación visual de una fracción de la muestra corrida en geles de agarosa al 1% P/V teñidos con bromuro de etidio, junto con un patrón de digestión de ADN del fago lambda sembrado en una cantidad conocida. La concentración incógnita se estimó por comparación de las intensidades de las bandas observadas en el gel al exponer el mismo a luz UV. Este proceso también sirvió para verificar la integridad del ADNg.

2.2.5.2 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Se utilizaron muestras compuestas de ADNg como molde para la amplificación del gen *ALS* (subunidad catalítica) con cebadores específicamente diseñados sobre secuencias

disponibles de especies cercanas (McNaughton et al., 2005; Patzoldt y Tranel, 2007). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µl conteniendo: 0,2 mM mezcla de dNTPs, 0,5 µM cebadores, buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima), buffer enhancer 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 1 U de Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs New England, Cat. M0491S). El gen ALS completo fue amplificado mediante los siguientes cebadores:

ALSfBamHI sentido: 5´ - GTC**GGATCC**CTTCAAGCTTCAACAATGG - 3´

ALSrSacl antisentido: 5´ - GTC**GAGCTC**CTACAAAAAGCTTCTCCT - 3´

Se realizó la amplificación del gen mediante el siguiente protocolo: 2 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos compuestos por tres etapas: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C y 2 minutos a 72°C; y una etapa de 10 minutos a 72°C. Los productos se incubaron 15 minutos a 72°C con la enzima GoTaq® ADN Polimerasa (Promega, Cat. M3001) para el agregado de desoxiadenosina trifosfato terminal y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1% P/V teñidos con bromuro de etidio.

2.2.5.3 Clonado en el vector pGEM-T Easy y transformación genética de células bacterianas con ADN plasmídico

Se ligaron los fragmentos de interés obtenidos por PCR al vector pGEMT Easy, según las instrucciones del fabricante (Promega, Cat. A3600). La mezcla de ligación se realizó en un volumen final de 10 µl conteniendo buffer de ligación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima), 3 U de T4 ADN ligasa (Promega, Cat. M180A) y diferentes relaciones de vector: producto de amplificación purificado. La reacción se incubó durante toda la noche a 4°C. Se prepararon células *Escherichia coli* DH5α químicamente competentes y se transformaron de acuerdo a Sambrook y Russell (2001). Las células transformadas se seleccionaron en placas con medio Luria-Bertani (LB) agar con ampicilina (100 µg/ml) y el análisis de las colonias con el ADN plasmídico de interés se realizó por PCR colonia específica utilizando cebadores específicos para el gen. Las colonias en las que se observó un producto de PCR del tamaño esperado, se utilizaron para inocular 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y luego de incubarse durante toda la noche a 37°C con agitación, se extrajo el ADN plasmídico mediante el kit GenElute™ Plasmid Miniprep según instrucciones del fabricante (Sigma, Cat. NA1060). Posteriormente, se analizó este ADN plasmídico digiriéndolo con endonucleasas de restricción (BamHI y SacI, Promega Cat.

R6021, R6061) que produjeran un patrón distintivo de fragmentos de ADN por la migración en un gel de agarosa 1% P/V.

2.2.5.4 Secuenciación y análisis

Las construcciones obtenidas se secuenciaron a través del servicio proporcionado por Macrogen Inc. (Corea del Sur). La secuenciación se realizó con los primers T7 y SP6 para el vector p-GEM-T easy y un cebador específico (p14als): 5' - CCTGAATGGCGTATTGCGGAGG - 3', para cubrir la región interna del inserto.

Se alinearon las lecturas de secuenciación con las secuencias de referencia del género *Amaranthus* obtenidas del NCBI. El alineamiento se realizó utilizando el algoritmo Cluster W del software Unipro Ugene v1.11.2. Todas las secuencias fueron traducidas y alineadas para buscar sustituciones de aminoácidos.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

2.3.1 Niveles de resistencia *in vivo* a herbicidas inhibidores de la ALS en la subpoblación de Totoras

Con el objetivo de confirmar y cuantificar la sospechada resistencia de la subpoblación Tot a inhibidores de la ALS se llevaron a cabo ensayos dosis-respuesta. Si bien a campo no fue utilizado ningún tratamiento con triazolopirimidinas, se decidió incluir igualmente esta tercera familia de inhibidores de la ALS en nuestro ensayo, dada las altas probabilidades de encontrar resistencia cruzada en el modelo bajo estudio. El porcentaje de supervivencia de la subpoblación Tot a la dosis de herbicida recomendada a campo (imazetapir 100 g i.a./ha, clorimurón-etil 50 g i.a./ha, diclosulam 30 g i.a./ha) fue mayor al 80% del control para todos los herbicidas (Figura 1, A-C). Además, la biomasa remanente de las plantas sobrevivientes a esta dosis varía entre el 100 y 85% del control para clorimurón-etil y diclosulam mientras que para imazetapir es alrededor del 45% (Figura 1, D-F). Cabe destacar que, con los herbicidas clorimurón-etil y diclosulam no se logró reducir al 50% la supervivencia de la subpoblación Tot aun cuando se utilizó una dosis 16 veces mayor a la recomendada a campo.

Los factores de resistencia (FR) obtenidos a partir de los GR_{50} o LD_{50} son significativamente mayores a 1 para todos los herbicidas testeados (Tabla 3). Así, por ejemplo, para imazetapir se debería incrementar 121 veces la dosis aplicada sobre la subpoblación Tot para equiparar el control logrado sobre las plantas susceptibles.

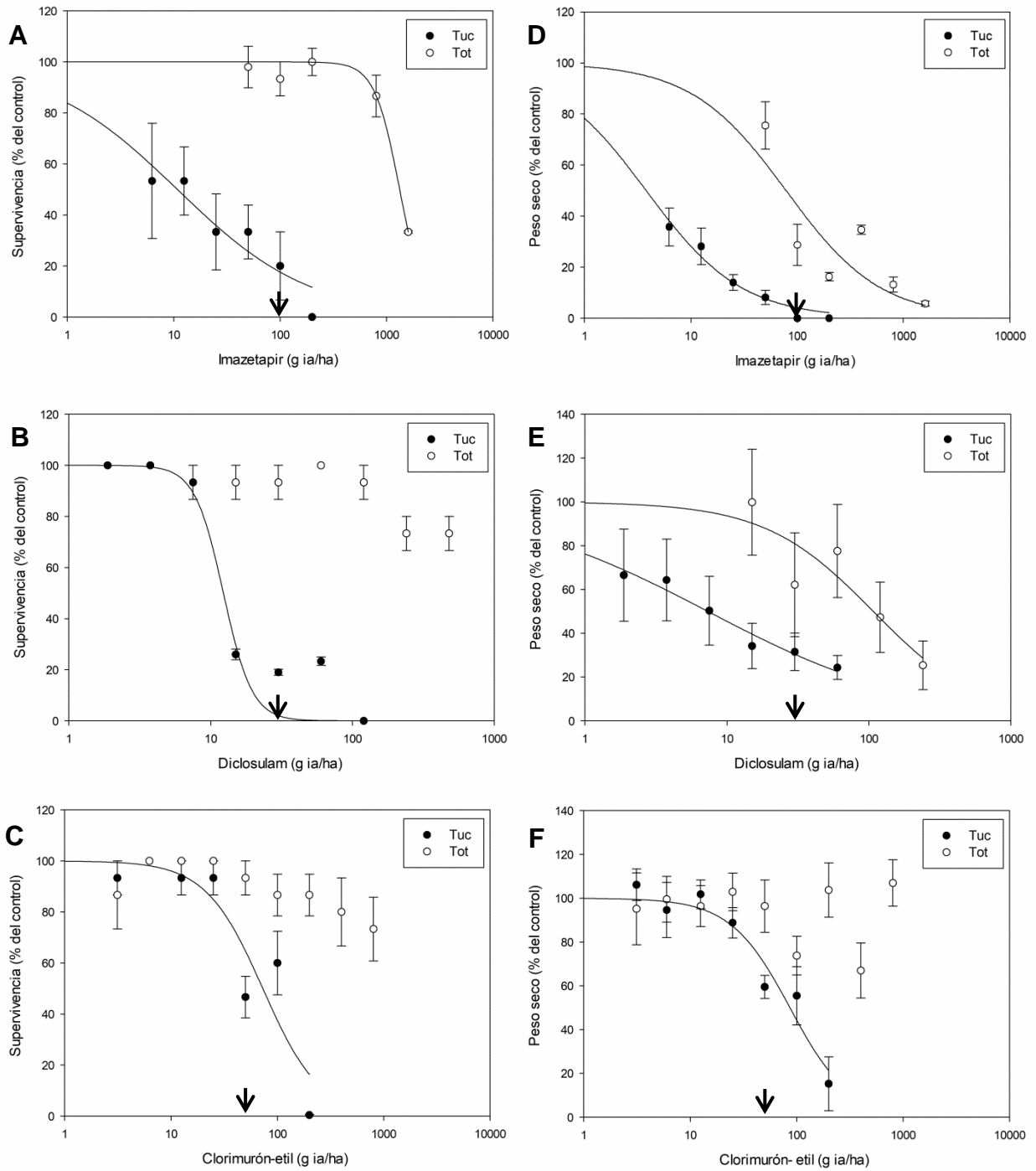


Figura 1. Efecto de los herbicidas inhibidores de la ALS sobre la supervivencia y biomasa de *A. palmeri*. Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia (A-C) y peso seco (D-F) relativo a los controles no tratados. En algunos casos (B, C y F) las dosis del herbicida aplicado no provocaron una reducción sustancial de las variables en estudio, lo cual imposibilitó el ajuste de los datos a la curva paramétrica. Las flechas sobre el eje x indican la dosis aplicada a campo (1X) de cada principio activo. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

Herbicida	Subpoblación	Peso seco			Supervivencia		
		GR ₅₀	FR	R ²	LD ₅₀	FR	R ²
Imazetapir	Tot	79±26*	20,8	0,88	1327±50*	120,6	0,99
	Tuc	3,8±0,6	-	0,99	11±3	-	0,95
Diclosulam	Tot	107±27*	14,6	0,87	>480	>40	-
	Tuc	7,3±0,8	-	0,99	12±2	-	0,94
Clorimurón-etil	Tot	> 800	>9,3	-	>800	>11	-
	Tuc	86±11	-	0,95	73±17	-	0,86

Tabla 3. Respuesta a herbicidas del grupo B de las subpoblaciones Tot y Tuc. Parámetros de las curvas dosis-respuesta. Los valores de GR₅₀ (reducción del crecimiento media) y LD₅₀ (dosis letal media) están expresados en g i.a./ha. Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los parámetros de GR₅₀ y LD₅₀ de las subpoblaciones Tot y Tuc. R² representa el coeficiente de determinación del ajuste utilizado. Los * indican diferencias estadísticamente significativas para cada herbicida entre las subpoblaciones ensayadas (prueba t-Student, p< 0,05).

Estos resultados demuestran que la subpoblación Tot tiene resistencia cruzada a tres herbicidas inhibidores de la ALS pertenecientes a diferentes familias químicas: imidazolinonas (imazetapir), triazolopirimidinas (diclosulam) y sulfonilureas (clorimurón-etil) y confirma lo observado a campo. La resistencia cruzada a distintos herbicidas del grupo B también se ha observado en poblaciones de yuyo colorado de otros países, donde el mecanismo asociado al sitio de acción fue el más reportado como responsable de esta resistencia (Burgos et al., 2001; Wise et al., 2009; Netto et al., 2016; Nakka et al., 2017; Küpper et al., 2017; Singh et al. 2019). En la zona de producción de maní de nuestro país, se confirmó la presencia de poblaciones de *A. palmeri* con resistencia cruzada a las mismas tres familias químicas de herbicidas evaluadas en este trabajo (Berger et al., 2016). Sin embargo, el mecanismo de resistencia de dichas poblaciones aún no se ha dilucidado.

2.3.2 Evaluación *in vitro* de la actividad enzimática ALS en presencia de herbicidas del grupo B

Se realizaron ensayos de inhibición de la actividad ALS en extractos proteicos parcialmente enriquecidos en dicha enzima para determinar la sensibilidad de la ALS de la subpoblación Tot a los herbicidas del grupo B y establecer el nivel de resistencia a éstos.

No hubo diferencias significativas en los niveles de actividad de ALS *in vitro* entre las subpoblaciones en ausencia de los herbicidas. La actividad específica de los controles no tratados osciló entre 0,02-0,04 U mg⁻¹, similar a los valores reportados para extractos crudos de otras especies (Forlani et al. 1991; Durner et al., 1991).

Sobre la base de los valores de I₅₀ obtenidos a partir de las curvas de inhibición enzimática (Tabla 4), se puede afirmar que la subpoblación Tot tiene una isoforma de la

enzima ALS con una sensibilidad reducida a los tres herbicidas testeados, comparado con la subpoblación Tuc. De acuerdo a los valores de FR, la resistencia es considerablemente alta para imazetapir (FR= 44 veces), moderada para clorimurón-etil (FR= 9,3 veces) y baja aunque significativa para el diclosulam (FR= 2,8 veces). Estos resultados coinciden con lo observado anteriormente en las curvas dosis-respuesta y apoyan firmemente la hipótesis de que la resistencia a sulfonilureas, imidazolinonas y triazolopirimidas de la subpoblación Tot se debe principalmente a la presencia de un mecanismo asociado al sitio de acción.

Herbicida	Subpoblación	Parámetros				
		a	b	I ₅₀	FR	R ²
Imazetapir	Tot	102±6	0,6±0,1	22±6*	44	0,98
	Tuc	96±15	0,9±0,1	0,5±0,3	-	0,97
Diclosulam	Tot	100±7	0,15±0,04	0,017±0,003*	2,8	0,94
	Tuc	103±2	0,42±0,05	0,0060±0,0006	-	0,98
Clorimurón-etil	Tot	100±2	0,30±0,03	0,014±0,005*	9,3	0,99
	Tuc	101±1	0,53±0,03	0,0015±0,0004	-	0,99

Tabla 4. Sensibilidad a herbicidas del grupo B de la ALS de las subpoblaciones Tot y Tuc. Parámetros de las curvas de inhibición de la actividad ALS. Abreviaturas: a: asíntota superior (% Actividad residual); b: pendiente de la recta en el punto I₅₀ (% Actividad residual μM^{-1}) y I₅₀: inhibición de la actividad media (μM). Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los valores de I₅₀ de las subpoblaciones Tot y Tuc. Los * indican diferencias estadísticamente significativas para cada herbicida entre las subpoblaciones ensayadas (prueba t-Student, $p < 0,05$).

La resistencia a inhibidores de la ALS, en la mayoría de las malezas, se debe principalmente a mecanismos de RT asociados a mutaciones puntuales en el gen ALS (Yu y Powles, 2014), tal como se ha reportado en poblaciones de *A. palmeri* (Molin et al., 2016; Küpper et al., 2017; Singh et al., 2019) y en otras especies (White et al., 2003; McNaughton et al., 2005; Ashigh y Tardif, 2007; Matzrafi et al., 2017). En nuestro país se ha informado este tipo de mecanismo en poblaciones de *A. hybridus* con resistencia cruzada a los herbicidas del grupo B (Larran et al., 2018). Todo esto da indicios de que el mecanismo de RT en la subpoblación Tot podría deberse a cambios en la secuencia de bases nucleotídicas del gen de la ALS.

2.3.3 Identificación de los alelos del gen blanco de los herbicidas inhibidores de la ALS

Se realizó el clonado y la secuenciación del gen ALS completo (subunidad catalítica) para identificar los alelos de dicho gen presentes en la subpoblación de *A. palmeri* de Totoras y analizar la presencia de mutaciones que confieran resistencia a los herbicidas del grupo B. El estudio de las secuencias de clones individuales permitió determinar si

diferentes mutaciones están en el mismo o distintos alelos y un análisis comparativo de la variabilidad entre las subpoblaciones Tot y Tuc y dentro de cada una. El gen *ALS* de *A. palmeri* tiene 2007 pb, no posee intrones y codifica para una proteína de 669 AA.

Todas las secuencias de genes *ALS* de la subpoblación Tuc mostraron una identidad de aminoácidos del 100% entre ellas (presentando sólo algunas mutaciones silentes), mientras que para la subpoblación Tot, varios clones presentaron mutaciones que producen sustituciones de aminoácidos. Todas las sustituciones encontradas en el marco de lectura abierto completo se muestran en la Tabla 5, así como también los números de acceso para las secuencias completas cargadas en las bases de datos del NCBI. Se identificaron ocho alelos con mutaciones para el gen *ALS* en la subpoblación resistente. Si bien se trabajó con muestras de ADN genómico proveniente de varias plantas como molde (“pool” de ADNg) para la amplificación del gen *ALS*, el número de alelos diferentes identificados fue mayor al esperado, teniendo en cuenta que *A. palmeri* es una especie diploide con una copia única del gen *ALS* (Ferguson et al., 2001). Esta alta variabilidad alélica en la subpoblación resistente podría explicarse por diversos factores tales como la alta presión de selección ejercida por el control químico, la naturaleza de polinización cruzada obligada de esta especie y la gran cantidad de mutaciones capaces de conferir resistencia a inhibidores de la ALS dentro del gen en estudio (McCourt et al., 2006).

Subpoblación	Alelos	Sustitución ALS	<i>A. palmeri</i>	Número de Acceso (GenBank)
Tuc	Wt	-	-	KY781916
Tot	R1	D376E	D375E	-
	R2	A205V	A200V	-
	R3	A122S-A282D	A117S-A282D	KY781920
	R4	A282D	A282D	KY781917
	R5	W574L	W573L	KY781918
	R6	S653N	S652N	KY781923
	R7	A282D-S653N	A282D-S652N	KY781921
	R8	P84H-A282D-S653N	P84H-A282D-S652N	KY781922

Tabla 5. Diferencias de aminoácidos detectadas en el marco de lectura abierto de la ALS de la subpoblación resistente (Tot) en comparación con la susceptible (Tuc). Los aminoácidos están numerados según la secuencia de ALS de *A. thaliana*, con la excepción de A282D, que es numerada según la secuencia de ALS de *A. retroflexus* debido a la presencia de un indel en la secuencia de *A. thaliana*.

En la subpoblación Tot se encontraron sustituciones en cinco de los ocho sitios conocidos de la secuencia aminoacídica de la ALS que le otorgan resistencia a los herbicidas del grupo B: A122, A205, D376, W574 y S653. También se observó un cambio en

la posición A282, que se localiza dentro de una región poco conservada, cercana a un fragmento ausente en la secuencia de referencia de *A. thaliana*; y otra sustitución en la posición 84, cercana al límite del péptido señal predicho. Las sustituciones A122T, P197A, P197S, W574L y S653N ya habían sido informadas para esta especie como responsables de la resistencia a los herbicidas del grupo B (Molin et al., 2016; Küpper et al., 2017, Nakka et al., 2017; Singh et al., 2019). En cambio, las sustituciones A122S, A205V, A282D, D376E fueron reportadas por primera vez en *A. palmeri* en este trabajo de investigación.

De las 31 sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a herbicidas a la ALS de plantas, se ha demostrado que las sustituciones W574L y D376E son las únicas que proporcionan resistencia a todas las familias de herbicidas inhibidores de la ALS (Whaley et al., 2007; Beckie y Tardif, 2012).

Con respecto a la sustitución S653N, ésta causa alta resistencia a herbicidas de la familia de las IMI, pero baja o nula a herbicidas de las familias de las SU y TP (Tranel et al., 2019). Recientemente, en Brasil se han detectado poblaciones de *A. palmeri* con esta sustitución en heterocigosis y resistencia a herbicidas de la familia de las SU; sin embargo, no se estudió la resistencia cruzada a otros herbicidas (Küpper et al., 2017).

La sustitución A205V en ALS es poco común; se ha encontrado sólo en cinco especies: *Xanthium strumarium* L., *Helianthus annuus* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Solanum ptychanthum* Dunal Solpt y *Conyza canadensis* (L.) Cronquist (Woodworth et al., 1996; White et al., 2003; McNaughton et al., 2005; Ashigh y Tardif, 2007; Matzrafi et al., 2017). Esta mutación confiere una alta resistencia a las IMI y una baja o nula resistencia a las SU dependiendo de la especie. En *A. retroflexus* específicamente, el cambio A205V proporciona resistencia a imazetapir (IMI) pero no a tifensulfuron-metil (SU) (McNaughton et al., 2005).

Por último, en la posición A122 se han informado varias sustituciones (T, V, Y y N) que confieren resistencia a los herbicidas del grupo B (Tranel et al., 2019). Sin embargo, esta es la primera vez que se detecta la sustitución de la alanina por una serina en esta posición en plantas. Esta mutación, anteriormente observada sólo en levaduras (Falco et al., 1989), confiere resistencia a las SU. No obstante, las demás sustituciones en esta posición pueden conferir resistencia tanto a las IMI como a las SU (Yu y Powles, 2014). Recientemente, se ha reportado que la sustitución A122N encontrada en *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv proporciona también resistencia a TP y a los ácidos pirimidiniltiobenzoicos (PTB) (Panozzo et al., 2017). En *A. palmeri*, se encontró la sustitución A122T en poblaciones de Arkansas pero aún no se determinó a qué familias de herbicidas confiere

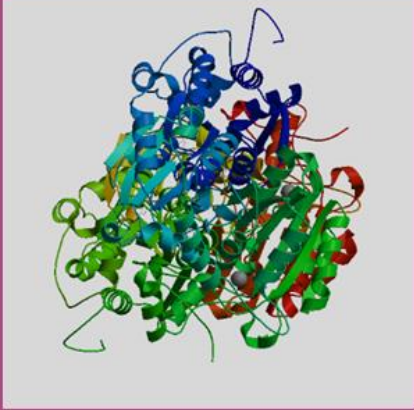
resistencia (Singh et al., 2019).

Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la resistencia cruzada a herbicidas del grupo B en la subpoblación Tot se debe a la presencia de múltiples alelos del gen *ALS*, que confieren resistencia a diferentes herbicidas en distintos niveles. El mayor nivel de resistencia que se observa en los ensayos *in vitro* para las IMI (imazetapir) podría deberse a que la subpoblación Tot presenta al menos seis alelos del gen *ALS* con mutaciones que confieren principalmente alta resistencia a las IMI, sin considerar la frecuencia alélica de cada uno de los ocho alelos identificados. Paralelamente, si bien no hay indicios para sospechar de la presencia de mecanismos no asociados al sitio de acción, una contribución de los mismos no puede ser descartada.

Finalmente, la presencia de sustituciones que confieren resistencia a las cinco familias de herbicidas inhibidores de la ALS limitan las posibilidades de control de *A. palmeri* con herbicidas de este modo de acción en la zona muestreada. No obstante, la caracterización *in vivo* e *in vitro* de las sustituciones A122S, A282D, D376E y A205V, reportadas por primera vez en *A. palmeri* en este trabajo de tesis, es de importancia para determinar a qué herbicidas confieren resistencia en esta especie y en qué niveles.

2.4 CONCLUSIONES:

A través de la metodología aplicada fue posible confirmar la resistencia cruzada a inhibidores de la ALS de tres familias químicas (IMI, SU y TP) en la subpoblación de *A. palmeri* hallada en Totoras. Se determinaron las bases moleculares que explican el fenotipo de resistencia, demostrando que está asociada principalmente a mecanismos de RT, específicamente a cambios en la secuencia de bases del gen de la ALS. Producto de esta investigación, se encontró que la subpoblación presenta dos sustituciones de aminoácidos (W574L y S653N) en la enzima ALS previamente informadas en la especie y cuatro sustituciones (A122S, A282D, D376E y A205V) detectadas por primera vez en *A. palmeri*. Cabe destacar, además, que la sustitución A122S sólo se había observado en levaduras hasta el momento. Debido a que la subpoblación Tot posee múltiples sustituciones en la enzima ALS que confieren resistencia a diferentes herbicidas del grupo B, es probable que esta subpoblación tenga resistencia cruzada también a otros herbicidas y familias químicas no estudiadas en este trabajo de investigación, lo cual hace que los herbicidas con ese modo de acción posiblemente ya no sean una opción para el control de *A. palmeri* en la zona muestreada.



Capítulo 2

Estudio comparativo de siete isoformas de la enzima acetolactato sintasa halladas en la subpoblación de Totoras

CAPÍTULO 2

**ESTUDIO COMPARATIVO DE SIETE ISOFORMAS DE LA ENZIMA ACETOLACTATO
SINTASA HALLADAS EN LA SUBPOBLACIÓN DE TOTORAS****3.1 INTRODUCCIÓN:**

La acetolactato sintasa (ALS) o acetohidroxiácido sintasa (AHAS), proteína blanco de los herbicidas del grupo B pertenece a la superfamilia de las enzimas dependientes de tiamina bifosfato (ThDP). En la reacción catalizada por la ALS, este cofactor reacciona con el piruvato formando un intermediario (hidroxietil-ThDP-enzima) y luego con el aceptor 2-cetoácido (2-cetobutirato o piruvato) para formar el correspondiente acetohidroxiácido (2-aceto-2-hidroxiacetato o 2-acetolactato). El ThDP está unido al sitio activo por un ion metálico divalente, Mg^{2+} , que coordina al grupo bifosfato del ThDP y a tres residuos altamente conservados en estas proteínas. La ALS requiere también de flavina adenina dinucleótido (FAD) como cofactor, aunque éste no participa de las reacciones principales (Duggleby et al., 2008).

La ALS es de codificación nuclear, la traducción ocurre en ribosomas citosólicos y la enzima madura se localiza en cloroplastos (Mifflin, 1971; Jones et al., 1985). Al igual que en otras proteínas de localización cloroplástica, la ALS es sintetizada como un precursor de mayor peso molecular que la forma madura, el cual es subsecuentemente translocado y procesado (Bascomb et al., 1987). La secuencia N-terminal de la proteína madura de especies de plantas aún no ha sido determinada con precisión, pero diversos grupos de investigación propusieron que el corte del péptido señal involucra la remoción de los primeros 70-85 aminoácidos, dependiendo de la especie vegetal (Wiersma et al., 1989; Rutledge et al., 1991; Chang y Duggleby, 1997).

La enzima ALS está compuesta por dos tipos de subunidades, una denominada catalítica y la otra regulatoria. La subunidad catalítica es activa por sí sola y la subunidad regulatoria, en cambio, estimula la actividad de la subunidad catalítica (no posee actividad ALS) y participa en la regulación por retroalimentación negativa, lo que implica que la enzima es inhibida por los productos finales de la vía (isoleucina, valina y leucina) (Lee y Duggleby, 2001).

Se ha determinado la estructura cristalina de la subunidad catalítica de la ALS de *Arabidopsis thaliana* (denominada AtAHAS) unida a distintos herbicidas de las cinco familias químicas del grupo B (IMI, SU, TP, PTB y SCT) (códigos PDB: 1YBH, 1YHY, 1YHZ, 1YI0, 1YI1, 1Z8N, 5K20, 5K3S, 5K6T, 5K6R y 5WJ1; McCourt et al., 2006; Garcia et al., 2017;

Lonhienne et al., 2018). Sin embargo, hasta el momento no se ha podido resolver su estructura cristalina en ausencia de herbicidas, siendo esta ya obtenida para *Saccharomyces cerevisiae* (Pang et al., 2002). McCourt et al. (2006) resolvieron por primera vez la estructura cristalina de AtAHAS en presencia de SU e IMI, concluyendo que su subunidad catalítica es un homotetrámero. Cada polipéptido de la subunidad consiste en tres dominios, α (residuos 86-280), β (residuos 281-451), γ (residuos 463-639) y una cola C-terminal; y asociado a cada monómero se encuentran los cofactores FAD y Mg-ThDP y una molécula de SU o IMI.

En la interfase de los monómeros se localiza el sitio activo de la enzima, por consiguiente, el requerimiento mínimo para la actividad de la enzima es que se encuentre como dímero (Duggleby et al., 2008). El sitio activo de la ALS se encuentra al final de un canal hidrofóbico. Los herbicidas del grupo B se unen a dominios de unión al herbicida que se encuentran en el acceso al canal, bloqueando así el ingreso del sustrato al sitio catalítico (Yu y Powles, 2014).

Recientemente se ha informado que la inhibición de la ALS por los herbicidas del grupo B se debe también a efectos específicos que los herbicidas inducen, tales como la inactivación oxidativa de la enzima y la alteración química del cofactor ThDP (Garcia et al., 2017; Lonhienne et al., 2018).

La inactivación oxidativa de la enzima es un proceso que implica la oxidación del cofactor FAD, inhibiendo así la enzima. La oxidación del FAD se da por una serie de reacciones de oxidación desencadenadas por especies reactivas del oxígeno, las cuales son producidas por una reacción lateral oxigenasa de la ALS (Lonhienne et al., 2016). Con respecto a la alteración química del cofactor ThDP, se ha demostrado que los herbicidas pueden generar una forma degradada u oxidada del cofactor. El cofactor modificado no es activo y la única manera de restaurar la actividad de la ALS es reemplazarlo por uno intacto. Se ha propuesto que este modo de inhibición es importante en condiciones fisiológicas donde la concentración de ThDP libre es baja, como en los tejidos meristemáticos de las malezas (Garcia et al., 2017).

Los herbicidas estructuralmente diferentes se orientan de distintas maneras en el dominio de unión al herbicida, con una superposición parcial. Esta superposición ocurre principalmente en la parte más profunda del canal, donde se insertan los anillos heterocíclicos de los herbicidas. Cabe destacar que las IMI son la única familia química que se une en la entrada del canal de acceso al sitio activo, disponiendo su parte de mayor tamaño hacia la superficie de la proteína (Garcia et al., 2017).

Los herbicidas del grupo B son inhibidores no competitivos o incompetivos que se unen preferentemente al intermediario hidroxietil-ThDP-enzima (Duggleby et al., 2008). Estos herbicidas se describieron como herbicidas de unión lenta (el porcentaje de inhibición aumenta con el tiempo) (Durner et al., 1991; Chang y Duggebly, 1997). Sin embargo, recientemente se determinó que el efecto que se observaba por la posible unión lenta se debería en realidad a un mecanismo de inhibición acumulativo inducido por el herbicida, como se describió anteriormente. Este mecanismo es dependiente del tiempo, reversible y produce la inactivación oxidativa de la enzima (Garcia et al., 2017; Lonhienne et al., 2016; Lonhienne et al., 2018).

Las constantes de inhibición (K_i) de la enzima AtAHAS se determinaron para herbicidas de las cinco familias químicas (Garcia et al., 2017; Lonhienne et al., 2018). El imazaquin (IMI) tiene una K_i significativamente mayor (>1000) a las K_i de los demás herbicidas, lo que implica una baja afinidad de la enzima por dicho herbicida. No obstante, este herbicida tiene una potencia igual que los demás y requiere una dosis de aplicación similar. Esto se puede explicar en parte por el mecanismo de inhibición acumulativo sumado al metabolismo lento de las IMI que permite que actúen por más tiempo (Garcia et al., 2017).

Existen un gran número de mutaciones en el gen de la ALS que confieren resistencia a los herbicidas del grupo B, ya que producen un cambio en la estructura de la enzima que afecta la interacción con el herbicida (Yu y Powles, 2014). Por lo tanto, es muy probable que algunas mutaciones que confieren resistencia perjudiquen la funcionalidad de la ALS. De hecho, para otros herbicidas se sabe que ciertas mutaciones que otorgan resistencia reducen la actividad enzimática (Vila-Aiub et al., 2019; Yu et al., 2007a), pero la situación es compleja para la ALS. Dependiendo de la especie y de la sustitución en particular que confiere resistencia, hay estudios que muestran diferentes efectos sobre la actividad ALS, como por ejemplo una reducción (Ashigh y Tardif, 2007), un aumento (Yu et al., 2003; Yu et al., 2007b) o sin cambios (Preston et al., 2006). Es importante señalar que, de las 31 sustituciones de aminoácidos conocidas que confieren resistencia a los herbicidas del grupo B en especies de malezas, solo unas pocas han sido evaluadas por su impacto tanto en la funcionalidad de la ALS como en el crecimiento de las plantas.

Conocer a qué familia de herbicidas da resistencia cada sustitución en la ALS y su efecto en los parámetros cinéticos de la enzima nos da información del costo-beneficio de cada mutación. Esto es, si una mutación proporciona altos niveles de resistencia a distintos herbicidas, pero afecta considerablemente la cinética de la enzima, esta mutación podría tener un impacto (costo biológico) en la supervivencia y/o reproducción de las plantas

resistentes, lo cual reduce su frecuencia en comparación con la de las plantas sin alelos de resistencia, en ausencia del herbicida. Entonces, la mutación sería beneficiosa sólo en presencia del herbicida. Así, la identificación de las mutaciones en el gen *ALS*, el estudio de la resistencia que confieren y su efecto sobre la eficiencia catalítica de la enzima proporcionan información útil para la predicción del costo biológico asociado a la resistencia en especies de malezas y en nuevos cultivos transgénicos, así como también para el desarrollo de estrategias de control eficientes.

La validez de cualquier medición de las propiedades catalíticas de una enzima depende de un ensayo de actividad adecuado. En la mayoría de los estudios sobre la enzima *ALS*, su actividad se mide utilizando un ensayo colorimétrico discontinuo en el cual las muestras se incuban durante un tiempo fijo, entre 30 minutos-2 horas, y luego se dosa el acetolactato producido por la enzima convirtiéndolo en acetoína, que forma un complejo coloreado por reacción con creatina y α -naftol (Westerfeld, 1945). La gran ventaja de este ensayo es su excelente sensibilidad que permite medir rutinariamente actividades de 10^{-4} U de enzima. Sin embargo, su principal desventaja es su naturaleza discontinua: si la formación del producto no es lineal en el tiempo, la velocidad medida entonces no será la inicial y esto lo hace inadecuado para el estudio de la cinética de la enzima (Duggleby y Pang, 2000).

Para el estudio de la cinética de la *ALS* existe un método continuo basado en la disminución de la absorbancia a 333 nm debido al consumo del piruvato. Este ensayo es aproximadamente 1000 veces menos sensible que el ensayo discontinuo y sólo es adecuado para enzimas purificadas que están disponibles en grandes cantidades (Duggleby y Pang, 2000).

La purificación de la *ALS* a partir de tejido vegetal es dificultosa y resulta en un muy bajo rendimiento debido a su alta labilidad y baja abundancia. La expresión de enzimas en sistemas heterólogos como *Escherichia coli* es una herramienta de gran utilidad para la obtención de grandes cantidades de proteínas que permiten su caracterización. Además, mediante esta tecnología se puede obtener fácilmente una muestra que contenga sólo la proteína de interés (*ALS* con la sustitución específica) y no otras versiones de la misma, como sería el caso de extractos de plantas heterocigotas o aun de homocigotas conteniendo más de una isoforma de la enzima. Si bien esto último estaría descartado, dado que el gen de *ALS* es de copia única en *A. palmeri*, obtener una mutante homocigota para cada sustitución no resulta sencillo, dado que se trata de una especie vegetal diclino dioica con una gran variabilidad alélica poblacional.

Por todo lo expuesto, este capítulo tiene como objetivo obtener las distintas versiones resistentes y susceptible de la enzima ALS en forma recombinante de la especie *A. palmeri* para su posterior evaluación mediante ensayos inhibitorios y caracterización cinética.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS:

3.2.1 Subclonado en vector pET-32a (+)

Se procedió al subclonado de siete alelos del gen *ALS* (R1, R2, R3, R4, R5, R6 y Wt) en el vector de expresión pET32a (+) (Novagen, Cat. 69015-3). La mezcla de ligación se realizó en un volumen final de 10 μ l conteniendo buffer de ligación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima), 3 U de T4 ADN ligasa (Promega, Cat. M180A) y diferentes relaciones de vector: inserto. La reacción se incubó durante toda la noche a 4°C. Se prepararon células *E. coli* DH5 α químicamente competentes y se transformaron de acuerdo a Sambrook y Russell (2001). Las células transformadas se seleccionaron en placas LB agar con ampicilina (100 μ g/ml). El análisis de las colonias con el ADN plasmídico de interés se realizó como se describe en la sección 2.2.5.3.

3.2.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

3.2.2.1 Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes y obtención de extractos celulares de *E. coli*

Los plásmidos con las distintas versiones *ALS* se utilizaron para transformar bacterias químicamente competentes *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus. Las células transformadas se seleccionaron en placas LB agar con cloranfenicol (50 μ g/ml) y ampicilina (100 μ g/ml).

Las colonias transformadas con cada plásmido se crecieron a 37°C en 8 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y cloranfenicol (50 μ g/ml), durante toda la noche en agitación. Cada cultivo fue utilizado para inocular 400 ml de medio LB en presencia de los antibióticos correspondientes y se creció a 30°C con agitación hasta alcanzar una DO (600 nm) de 0,6 UA. Luego de tomar una alícuota control antes de inducir (AI), se indujo la expresión agregando el inductor IPTG en una concentración final de 100 μ M y se continuó la incubación a 25°C en agitación toda la noche. Después de 1 hora (DI1) y de 16 horas (DI16) de crecimiento inductivo se tomaron también alícuotas y el resto del cultivo se utilizó para la purificación de la proteína, previo análisis de fracciones proteicas (fases soluble e insoluble del extracto celular).

3.2.2.2 Purificación de las proteínas recombinantes

Después de 16 horas de crecimiento, los cultivos se centrifugaron a 4000 x *g* a 4°C durante 20 minutos. Se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets

celulares en 5 ml de buffer de lisis compuesto por buffer de unión (fosfato de potasio 10 mM pH 7,5; cloruro de magnesio 5 mM; imidazol 10 mM; cloruro de sodio 150 mM; EDTA 1 mM; glicerol 10% V/V), PMSF 1 mM, DTT 1 mM y cocktail inhibidor de proteasas (Promega, Cat. G6521). La ruptura de las células se llevó a cabo mediante sonicación (6 pulsos de 20 segundos 50% Amp, con intervalos de 1 minuto en hielo entre cada pulso). Luego, se centrifugó a velocidad máxima a 4°C durante 20 minutos y se guardaron alícuotas del sobrenadante (fracción soluble) y del pellet (fracción insoluble) para el análisis de las fracciones proteicas. Los sobrenadantes obtenidos de los lisados bacterianos se filtraron con un filtro de 0,2 µm Minisart® (Sartorius) y fueron usados para la posterior purificación.

La purificación de las proteínas se realizó por medio de cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel-agarosa, ya que las secuencias codificantes se expresaron fusionadas a una secuencia de 6 histidinas (6xHis o hexa-Histidina) en el extremo amino terminal, la cual es afín al níquel complejado a la resina de la columna. La resina que se utilizó fue Profinity TM IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad, Cat. 1560131) y se equilibró con buffer de unión (se lavó con al menos 6 volúmenes, previo a la siembra). Se sembró el sobrenadante y se recirculo tres veces, para aumentar el rendimiento (maximizando la capacidad de retención). La elución de la proteína de interés se realizó en un solo paso, utilizando una concentración de imidazol de 155 mM, tras realizar un lavado con al menos 5 volúmenes con el buffer de unión luego de la siembra. Las fracciones se recogieron cada 1,5 ml; para su posterior chequeo y se almacenaron a -80°C.

Los extractos celulares (AI, DI1 y DI16), las distintas fracciones (soluble e insoluble) y las diferentes alícuotas de la purificación de cada versión ALS, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posterior tinción con azul de Coomassie 0,1% P/V (Biopack). A su vez, la identidad de las proteínas de interés se corroboraron mediante inmunodetección (Western blot).

Se realizó el cambio de buffer de cada proteína en tubos Amicon Vivaspin 20 (GE Healthcare) con un tamaño de poro de 50 kDa, agregando un volumen de buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,5 conteniendo cloruro de magnesio 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 0,2 mM y PMSF 1 mM en cada ciclo de concentración y centrifugando a 8000 x g a 4°C. En total se realizaron 3 ciclos (cambios), lo que asegura un desalado del 99%, según instrucciones del fabricante. Por último, se le agregó a cada muestra glicerol 20% V/V y se las almacenó a -80°C hasta su posterior utilización.

La concentración de las proteínas se determinó utilizando el kit comercial Protein Assay (Bio-Rad, Cat. 5000002), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una

solución de albúmina sérica bovina como patrón para la construcción de la curva de calibración.

3.2.3 Digestión del extremo amino terminal de las proteínas de fusión

Cada proteína de fusión fue tratada con la proteasa trombina (Sigma Aldrich), para remover el extremo amino terminal agregado por el vector. Se determinaron las condiciones óptimas de corte ensayando distintas temperaturas, tiempos de digestión y relaciones proteasa: proteína de fusión. Finalmente, se utilizó una relación trombina: proteína de fusión 1:10, con un tiempo de incubación de 2 horas a 25°C. La reacción de digestión se cortó con PMSF 1 mM y las digestiones fueron analizadas por SDS-PAGE.

3.2.4 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizaron utilizando un equipo Bio-Rad Mini-PROTEAN III de acuerdo al sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). Las concentraciones finales de acrilamida fueron 8% P/V para el gel de separación y 4% P/V para el gel de concentración. Las muestras fueron desnaturalizadas mediante la adición de 1/4 volumen de buffer de siembra 5X (Tris-HCl 100 mM; glicerol 25% V/V; SDS 5% P/V; 2-mercaptoetanol 0,7 M; azul de bromofenol 0,02% P/V; pH 6,8) y posterior desnaturalización a 100°C durante 3 minutos antes de ser sembradas en el gel. Las corridas electroforéticas se realizaron a 30 mA (no superando los 200V).

El análisis de los geles se realizó por tinción con azul de Coomassie o por Western blot luego de ser electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa, como se describe a continuación (Bollag y Edelstein, 1991).

Para la estimación de la masa molecular de cada polipéptido se comparó su movilidad electroforética con la observada para las siguientes proteínas recombinantes de masa molecular: 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15, 10 kDa (Promega, Cat. V8491).

3.2.5 Inmunodetección de proteínas (Western blot)

La electrotransferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa Trans-Blot® Transfer Medium (Bio-Rad) se llevó a cabo utilizando la celda Trans-Blot SD Semi-Dry (Bio-Rad). La membrana, el gel y las almohadillas de transferencia se incubaron durante 10 minutos con buffer de transferencia 1X (Tris 15,6 mM; glicina 120 mM; metanol 20% V/V; pH

8,8) y luego se realizó la electrotransferencia durante 20 minutos a 20 V. Una vez finalizada la transferencia, se evaluó la eficiencia de este paso mediante la tinción reversible con una solución de rojo de Ponceau (Ponceau S 0,5% P/V; ácido acético 1% V/V). Esta tinción se utilizó también para detectar y marcar con lápiz las bandas correspondientes a los marcadores de masa molecular. Posteriormente, la membrana se bloqueó con una solución 5% P/V de leche en polvo descremada en buffer TBS 1X (Tris-HCl 10 mM; cloruro de magnesio 150 mM; pH 7,5) durante una hora en agitación. Luego de tres lavados exhaustivos de 10 minutos cada uno con TBS 1X, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios anti-HIS de conejo 1:1000 (Abcam, Cat. ab18184) durante toda la noche en agitación. Se repitieron los lavados con TBS 1X y se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Bio-Rad, Cat. 1706518) diluido 1:3000 en solución TBS 1X.

Finalmente, la membrana se lavó tres veces con TBS 1X y se reveló por medio de una reacción de color desarrollada en un medio de revelado compuesto por buffer sustrato 1X (Tris-HCl 100 mM; cloruro de sodio 100 mM; cloruro de magnesio 5 mM; pH 9,5) suplementado con NBT 0,1 mg/ml en dimetilformamida 70% y BCIP 0,05 mg/ml en dimetilformamida 100%, sin agitación. La adición del medio de revelado se efectuó previa incubación de la membrana con el buffer sustrato durante 5 minutos, permitiéndose luego el desarrollo de la reacción en oscuridad hasta aparición de bandas de color púrpura. La reacción se detuvo por lavados sucesivos con agua destilada.

3.2.6 Estimación de parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes

La determinación de los parámetros cinéticos se realizó variando la concentración de piruvato, manteniendo constantes y saturantes las concentraciones de los cofactores. Bajo estas condiciones, las velocidades iniciales observadas dependen de la concentración del sustrato variable de acuerdo a lo expresado en la ecuación de Michaelis-Menten. Los estudios cinéticos se realizaron midiendo la actividad ALS mediante un ensayo continuo que monitorea directamente el consumo del piruvato a 340 nm (Chang y Duggleby, 1997).

La actividad ALS se ensayó en un lector de microplacas, a 280 μ l de volumen final, que contenían 49 μ l de la enzima recombinante (0,8-1,7 mg/ml). Se incubó la enzima a 37°C durante 10 minutos en el buffer de reacción (fosfato de potasio 50 mM pH 7,5; cloruro de magnesio 20 mM; TPP 2 mM; FAD 20 μ M) y luego se inició la reacción con el agregado del sustrato. Las concentraciones de piruvato que se ensayaron fueron: 2,5; 5; 10; 25; 50; 75 y 100 mM.

Los valores K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se obtuvieron mediante ajuste no lineal de los datos obtenidos experimentalmente a la ecuación de Michaelis-Menten usando la aplicación Enzyme kinetics wizard de SigmaPlot:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

donde v es la velocidad de reacción que corresponde a la concentración de piruvato, $V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima de la reacción, $[S]$ es la concentración de piruvato, K_m es la constante de Michaelis-Menten.

La constante catalítica (k_{cat}) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E]}$$

donde $V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima de la reacción y $[E]$ es la concentración de la enzima.

Los datos se analizaron mediante la prueba t-Student, comparando los parámetros cinéticos de cada versión resistente de la enzima ALS respecto a la salvaje (Wt). Estos análisis se realizaron con el software SigmaPlot (versión 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

3.2.7 Compuestos químicos

Los ensayos de resistencia *in vitro* se realizaron con cinco clases de herbicidas inhibidores de la ALS. La familia química y el ingrediente activo de cada herbicida evaluado se resumen en la Tabla 6.

Familia química	Abreviatura	Ingrediente activo	Marca	Empresa
Imidazolinonas	IMI	Imazetapir 10% P/V	DERBY®	Gleba
Sulfonilureas	SU	Clorimurón-etil 25% P/P	VRILEC®	Agrofina
Triazolopirimidinas	TP	Diclosulam 84% P/P	SPIDER®	Dow Agro-Ciencias
Sulfonilaminocarbonil triazolinonas	SCT	Flucarbazona de sodio 70% P/P	EVEREST 70WDG®	Arysta LifeScience
Ácidos pirimidiniltiobenzoicos	PTB	Bispiribac sódico 40% P/V	NOMINEE GOLD®	SummitAgro

Tabla 6. Herbicidas inhibidores de la ALS evaluados en los ensayos de resistencia *in vitro*.

3.2.8 Ensayo de inhibición de la actividad enzimática ALS *in vitro*

Se determinó la actividad de cada enzima recombinante midiendo la cantidad de acetoína formada en presencia de diferentes concentraciones de imazetapir, clorimurón-etil, diclosulam, flucarbazona de sodio y bispiribac sódico, según el protocolo descrito en la sección 2.2.4. Las concentraciones ensayadas fueron: 0,015; 0,05; 0,15; 1,5; 5 y 15 μM para imazetapir, 0,02; 0,2; 0,5; 1; 2 y 20 nM para clorimurón-etil, 2,5; 5; 10; 20; 40 y 80 nM para diclosulam y 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 50; 100; 500 μM para flucarbazona de sodio y bispiribac sódico. Los datos se expresaron como porcentaje de actividad residual en relación a la actividad en ausencia de herbicida. La inhibición enzimática se evaluó mediante el parámetro I_{50} . Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y cada ensayo se repitió al menos dos veces, a excepción de las curvas de bispiribac sódico (se necesita un mayor número de repeticiones para completar el análisis estadístico).

Los datos se analizaron mediante la prueba t-Student, comparando los I_{50} de cada versión resistente de enzima ALS versus la salvaje (Wt). Para estos análisis se utilizó el software SigmaPlot (versión 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

El factor de resistencia (FR) se calculó dividiendo el valor I_{50} de las versiones ALS resistentes por el de la versión salvaje.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

3.3.1 Expresión y purificación de distintas versiones recombinantes de la enzima ALS de *A. palmeri*

Se expresaron de forma recombinante y se purificaron siete versiones de la subunidad catalítica de la enzima ALS de *A. palmeri* (Tabla 7) con el fin de determinar de manera inequívoca a qué herbicidas confieren una menor susceptibilidad *in vitro* las distintas sustituciones y en qué medida, adicionalmente a la evaluación comparativa de las eficiencias catalíticas correspondientes.

Alelos	Sustitución ALS	<i>A. palmeri</i>	Número de Acceso (GenBank)
Wt	-	-	KY781916
R1	D376E	D375E	-
R2	A205V	A200V	-
R3	A122S-A282D	A117S-A282D	KY781920
R4	A282D	A282D	KY781917
R5	W574L	W573L	KY781918
R6	S653N	S652N	KY781923

Tabla 7. Alelos del gen ALS expresados de forma recombinante. Los aminoácidos están numerados según la secuencia de ALS de *A. thaliana*, con la excepción de A282D, que es numerada según la secuencia de ALS de *Amaranthus retroflexus* debido a la presencia de un indel en la secuencia de referencia.

Los alelos se subclonaron en el vector de expresión pET32a (+) (3.2 Materiales y métodos, Sección 3.2.1). Este vector está diseñado para el clonado y expresión a altos niveles de proteínas en *E. coli*. Los polipéptidos se obtienen fusionados con la proteína Tiorredoxina (Trx.TagTM) para incrementar la solubilidad de las proteínas blanco en el citoplasma de la bacteria. La fusión también incluye secuencias que permiten la detección (S.TagTM), purificación (oligohistidinas His.Tag[®]), y digestión de la proteína de fusión (sitios de reconocimiento para las proteasas enterokinasa y trombina). Todas las proteínas se expresaron con su péptido señal al cloroplasto predicho de 51 aminoácidos según el programa ChloroP 1.1 (Score= 0,586).

Se transformó con los vectores recombinantes las bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus y la expresión de las proteínas heterólogas se indujo por el agregado de IPTG, en una concentración final de 100 μ M. Mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y posterior tinción con azul de Coomassie, se analizaron los extractos proteicos totales. En la Figura 2 se muestra, a modo de ejemplo, el SDS-PAGE de la proteína Wt. Se confirmó la presencia de una banda mayoritaria del tamaño esperado para la proteína de fusión (~92 kDa) en las fracciones inducidas (Figura 2). Este tamaño

corresponde a la fusión entre el péptido de 17 kDa (Tiorredoxina) codificado por el vector y la proteína ALS, cuya masa predicha a partir de su ADN es 75 kDa.

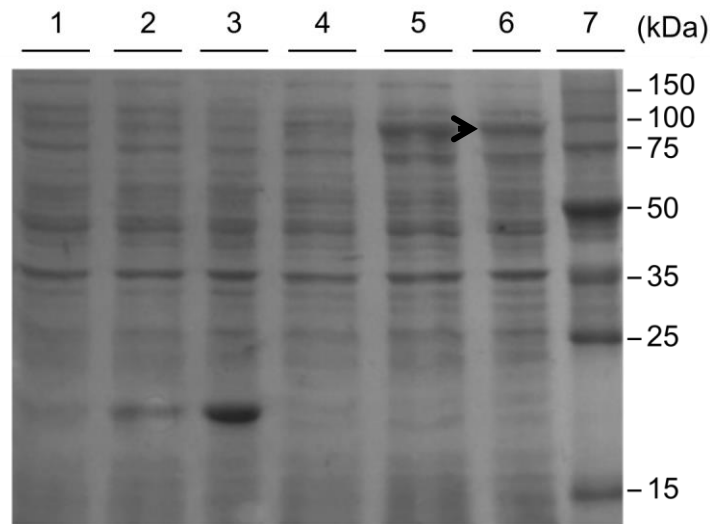


Figura 2. Análisis por SDS-PAGE de extractos proteicos totales de cultivos celulares. SDS-PAGE al 8% P/V de acrilamida teñido con azul de Coomassie. Calles 1-3: Extractos de células de *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus transformadas con el vector pET-32a vacío (A1, D11 y D16, respectivamente). Calles 4-6: Extractos de células *E. coli* BL21 (DE3) Codon plus transformadas con la construcción pET-32a/ Wt (A1; D11, D16, respectivamente). Calle 7: Marcador de peso molecular. Abreviaturas: A1: antes de inducir, D11: 1h después de inducir, D16: 16hs después de inducir. La flecha negra indica la proteína recombinante de interés.

Luego de confirmar la expresión de las proteínas recombinantes, se realizó la ruptura celular en cada cultivo para analizar la expresión proteica en la fase soluble e insoluble de los mismos y posteriormente se procedió a purificar cada proteína a partir de la fracción soluble.

La purificación de las proteínas se llevó a cabo por medio de cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel-agarosa. Las alícuotas obtenidas durante la purificación y las fracciones proteicas de la fase soluble e insoluble del extracto celular fueron analizadas mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie. En la Figura 3 se muestra, a modo de ejemplo, el SDS-PAGE de la proteína Wt donde se observó la presencia de una banda del tamaño esperado para la proteína de fusión en ambas fracciones (soluble e insoluble) aunque en mayor proporción en la fracción soluble. Las proteínas recombinantes eluyeron en un solo paso a una concentración de imidazol de 155 mM y luego de su purificación fueron confirmadas mediante Western blot revelado con anticuerpos anti-6xHis (Figura 4).

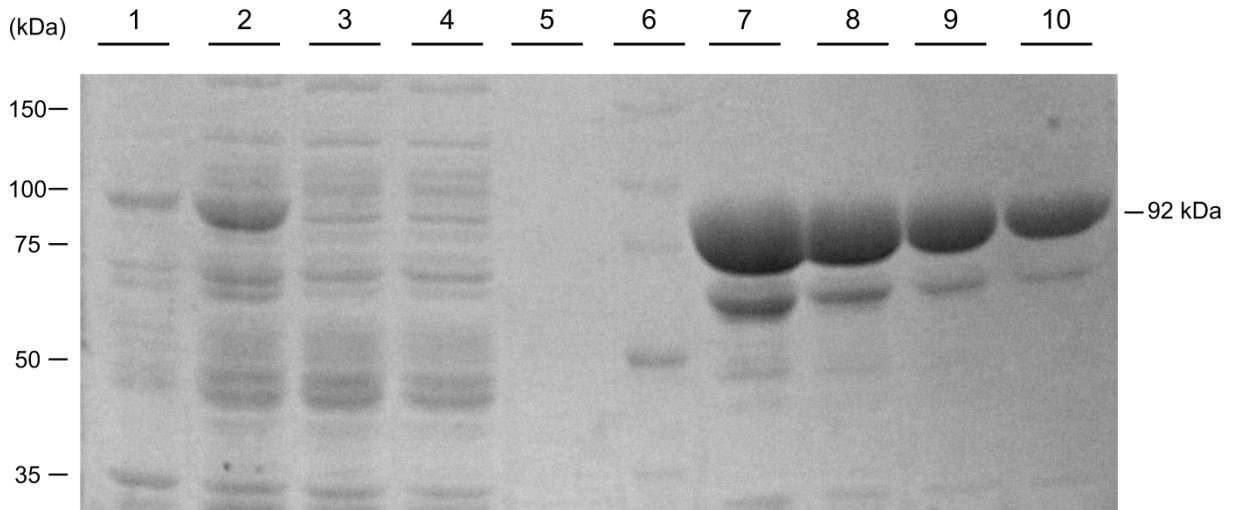


Figura 3. Análisis de fracciones solubles e insolubles y fracciones obtenidas en la purificación de la proteína Wt. SDS-PAGE al 8% P/V de acrilamida teñido con azul de Coomassie. Calle 1: fracción insoluble. Calle 2: fracción soluble. Calle 3: fracción no retenida por la columna. Calle 4 y 5: fracción que eluye con el lavado (primer y último lavado). Calle 6: marcador de peso molecular (Promega). Calle 7-10: fracciones consecutivas (de 1 ml) eluidas con imidazol 155 mM.

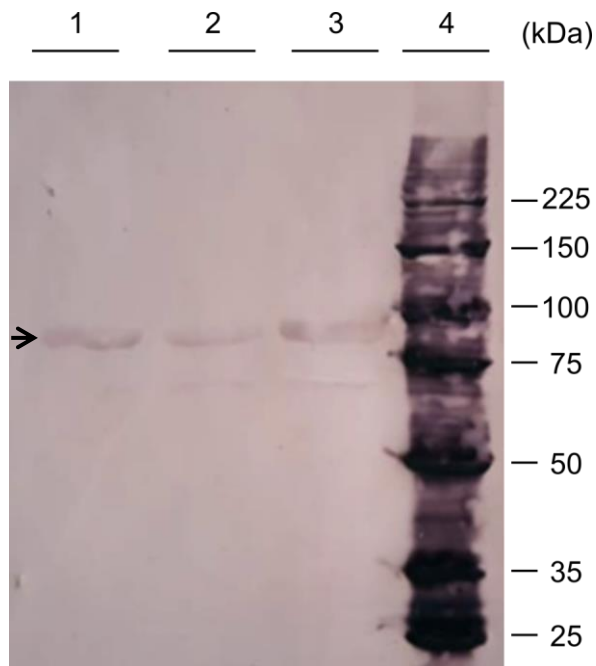


Figura 4. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas de fusión empleando anticuerpos primarios anti-6xHis y secundarios anti-IgG de conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Calle 1: ALS salvaje (Wt). Calle 2: ALS R3 (A122S-A282D). Calle 3: ALS R4 (A282D). Calle 4: marcador de masa molecular. La flecha negra indica las proteínas recombinantes de interés.

Las fracciones que contenían la proteína recombinante con mayor pureza se agruparon y se les cambió el buffer en tubos concentradores Amicon Vivaspin 20 (50 kDa),

con el objetivo de disminuir la concentración salina de las muestras y evitar una posible interferencia en los ensayos posteriores.

3.3.2 Parámetros cinéticos de las enzimas ALS recombinantes

Se determinaron los parámetros cinéticos, K_m y $V_{m\acute{a}x}$, de las enzimas ALS recombinantes para evaluar si las distintas sustituciones en la enzima tienen efecto sobre éstos.

A priori, se compararon los parámetros cinéticos de las proteínas de fusión Wt y R1 con las proteínas Wt y R1 digeridas con la proteasa trombina (escinde la Tiorredoxina) y se comprobó que no existen diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de las respectivas versiones de estas proteínas, por lo tanto se decidió realizar los ensayos subsecuentes directamente con las proteínas de fusión (versión completa).

Todas las versiones de la enzima ALS siguen una cinética de Michaelis-Menten (Figura 5), lo cual coincide con lo observado en otras especies de malezas (Bernasconi et al., 1995; Yu et al., 2010; Liu et al., 2017; Yang et al., 2018). No obstante, también se ha informado cooperatividad negativa en la curva de saturación de piruvato para la enzima ALS de *A. thaliana* (Chang y Duggleby, 1997; Lee et al., 1999).

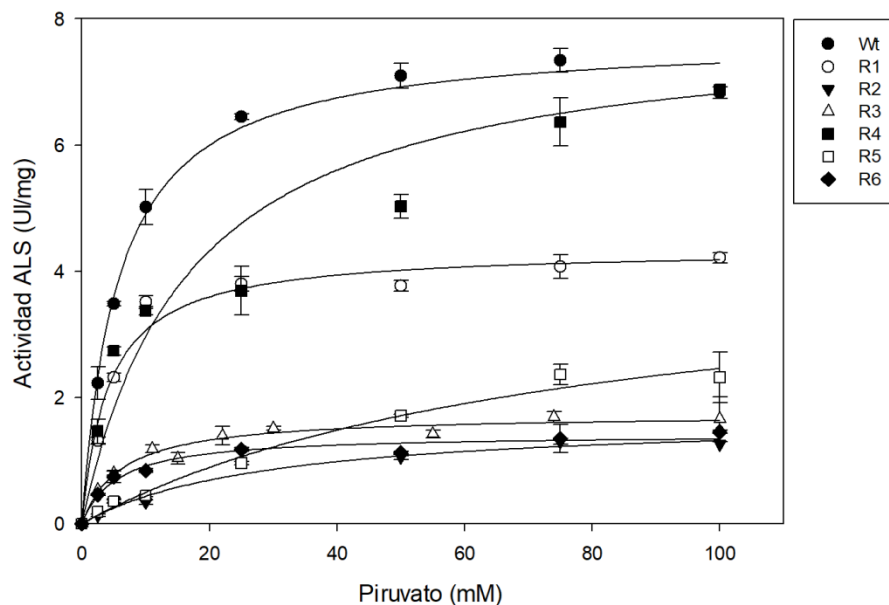


Figura 5. Efecto de la concentración de piruvato sobre la actividad enzimática de las ALS recombinantes. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ ($6,2 \pm 0,2$ UI/ mg) y K_m ($5,3 \pm 0,8$ mM) de la proteína de fusión Wt

son similares a los reportados para las enzimas ALS de origen vegetal (expresadas de forma heteróloga en *E. coli* o purificadas a partir de extractos vegetales) (Bernasconi et al., 1995; Chang y Duggleby, 1997; Lee et al., 1999; Yu et al., 2010).

Las enzimas R2 y R5 fueron las únicas que poseen una K_m significativamente diferente a la enzima Wt (Tabla 8). En ambos casos, este parámetro fue mayor al de la ALS Wt, lo cual significa que las sustituciones A205V y W574L afectan negativamente la afinidad de la enzima por el sustrato. La menor afinidad generada por la mutación W574L podría deberse a que el triptófano es importante para definir la forma del canal de acceso al sitio activo (McCourt et al., 2006).

Por otra parte, la mayoría de las enzimas mutantes (R1, R2, R3 y R6) presentan valores de $V_{máx}$ significativamente menores al de la enzima Wt, lo que indica que todas las sustituciones evaluadas, a excepción de W574L y A282D, disminuyen la velocidad de reacción de la enzima ALS de *A. palmeri*. Cabe destacar que la sustitución A282D no afectó significativamente ninguno de los parámetros cinéticos de la ALS.

Es importante señalar que, de las 31 sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a los herbicidas del grupo B, sólo unas pocas han sido evaluadas por su impacto en la funcionalidad de la ALS. Los efectos observados en este trabajo sobre los parámetros cinéticos de la sustitución W574L (mayor K_m y $V_{máx}$ no afectada) coinciden con los observados para la ALS recombinante de *A. thaliana* (Chang y Duggleby, 1998). Sin embargo, esta sustitución en *Descurainia sophia* L. disminuye la K_m y la $V_{máx}$ (Yang et al., 2018), mientras que en *Lolium rigidum* (Gaudin) Weiss ex Nyman y *Poa annua* L. sólo aumenta la $V_{máx}$ de la enzima (Yu et al., 2010; Cross et al., 2015).

En relación a la sustitución D376E, se ha informado que la misma no sólo disminuye la $V_{máx}$, como se detectó en este estudio sino que también disminuye la K_m de la ALS de *D. sophia* (Yang et al., 2018). Por el contrario, esta mutación en la ALS recombinante de *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla y la ALS de tabaco produce un aumento de la K_m de las enzimas y, en el caso de *S. juncooides*, también aumenta su $V_{máx}$ (Le et al., 2005; Sada et al., 2013).

La mutación S653N, a diferencia de lo observado en la enzima R6, no afecta a los parámetros cinéticos de la ALS recombinante de *A. thaliana* (Chang y Duggeby, 1998).

Por último, las sustituciones A122S, A205V y A282D fueron estudiadas por primera vez en este trabajo de tesis en cuanto a cómo afectan la funcionalidad de la ALS. Sin embargo, en poblaciones de *S. ptychanthum* resistentes con la mutación A205V, ya se

había observado una menor actividad específica de la enzima ALS con esta sustitución (Ashigh y Tardif, 2007).

Enzima recombinante	Sustitución ALS	$V_{m\acute{a}x}$	Km	R^2
Wt	-	6,2±0,2	5,3±0,8	0,95
R1	D376E	4,54±0,06*	4,3±0,3	0,98
R2	A205V	1,9±0,1*	36±9*	0,97
R3	A122S-A282D	1,81±0,08*	5,2±0,9	0,93
R4	A282D	7,5±0,4	11±3	0,96
R5	W574L	4,3±0,8	78±28*	0,95
R6	S653N	1,38±0,06*	6,4±0,9	0,96

Tabla 8. Parámetros cinéticos de las enzimas ALS recombinantes. Las estimaciones de los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante ajuste no lineal al modelo de Michaelis-Menten. $V_{m\acute{a}x}$ y Km se expresan como UI/mg y mM, respectivamente. Los valores son el promedio de al menos dos determinaciones diferentes con su correspondiente error estándar. R^2 representa el coeficiente de determinación del ajuste utilizado. Abreviaturas: $V_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima de reacción; Km: constante de Michaelis-Menten. Los * indican diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros cinéticos de cada versión ALS resistente respecto a los de la ALS Wt (prueba t-Student, $p < 0,05$).

Las sustituciones que mayor efecto tienen sobre la eficiencia catalítica de la ALS son A205V, W574L, S653N y A122S (Tabla 9). La disminución en la eficiencia catalítica de la enzima producida por estas mutaciones podría tener un impacto en la supervivencia y/o reproducción de las plantas resistentes, es decir un costo biológico. Así, por ejemplo, la sustitución A205V mostró estar asociada a un costo biológico en *S. ptychanthum*, ya que las plantas con esta mutación producen una menor cantidad de semillas debido a una maduración tardía de las bayas en condiciones óptimas (Ashigh y Tardif, 2009).

En relación con la mutación W574L, se ha asociado un fuerte efecto pleiotrópico sobre el crecimiento de las plantas con esta mutación en poblaciones de *Amaranthus powellii* S. Watson resistentes (Tardif et al., 2006); sin embargo, el efecto de esta mutación sobre la funcionalidad de la enzima ALS no se ha informado en esta especie. Además, otros efectos se han relacionado con esta sustitución, como la reducción de la biomasa de las raíces de las plantas resistentes en poblaciones de *Lolium perenne* L. (Menegat et al., 2016) y la disminución en el número de semillas y el rendimiento por planta en una población resistente *Raphanus sativus* L. (Vercellino et al., 2018). En estos dos casos se observó que la actividad específica de la enzima mutada fue menor que la de la salvaje. Por el contrario, el cambio de aminoácido W574L no afectó el crecimiento de las plantas en poblaciones resistentes de *Ambrosia trifida* L. (Marion et al., 2017), *P. annua* (Cross et al., 2015) y *L. rigidum* (Yu et al., 2010), aun cuando en estas dos últimas poblaciones se observó que la

mutación aumentó la $V_{m\acute{a}x}$. Resulta evidente entonces que los efectos en los parámetros cinéticos de la ALS y los costos biológicos asociados a las mutaciones que le confieren resistencia parecen ser altamente dependientes de la especie y no pueden ser generalizados.

Con respecto a la mutación A122S, es la primera vez que se observa en plantas, por lo que el único antecedente al respecto deriva de otra sustitución en la misma posición: se ha reportado que la sustitución de la alanina por asparagina tiene un costo biológico para las plantas resistentes de *E. crus-galli* (Panozzo et al., 2017).

Enzima recombinante	Sustitución ALS	k_{cat}	Eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m)
Wt	-	9,6±0,3	1,8
R1	D376E	7,0±0,2*	1,6
R2	A205V	2,9±0,3*	0,08
R3	A122S-A282D	2,7±0,1*	0,5
R4	A282D	7,9±0,3	0,7
R5	W574L	7±1	0,09
R6	S653N	2,1±0,06*	0,3

Tabla 9. k_{cat} y eficiencia catalítica de las enzimas ALS recombinantes. Los valores k_{cat} y la eficiencia catalítica de cada enzima fueron calculados de acuerdo a la $V_{m\acute{a}x}$ y K_m de la Tabla 8. k_{cat} ($V_{m\acute{a}x}/[E]$) y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) se expresan como s^{-1} y $s^{-1}mM^{-1}$, respectivamente. Abreviaturas: k_{cat} : constante catalítica; K_m : constante de Michaelis-Menten. Los * indican diferencias estadísticamente significativas entre las k_{cat} de cada versión ALS resistente respecto a la de la ALS Wt (prueba t-Student, $p < 0,05$).

Los estudios cinéticos de esta investigación determinaron, por primera vez, el efecto en los parámetros cinéticos de la ALS de *A. palmeri* de seis sustituciones halladas en la subpoblación Tot resistente. Si bien la mayoría de las mutaciones afectaron negativamente la $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima, solo cuatro (A122S, A205V, W574L y S653N) disminuyeron considerablemente la eficiencia catalítica de la ALS, siendo este efecto más pronunciado para las sustituciones A205V y W574L, dada la menor afinidad de la enzima por el sustrato.

En conclusión, la menor eficiencia catalítica de la enzima ALS causada por las cuatro mutaciones nombradas anteriormente podría tener un costo biológico en las plantas de *A. palmeri* resistentes. Sin embargo, se requieren estudios pertinentes para confirmarlo.

3.3.3 Evaluación *in vitro* de la actividad ALS en presencia de herbicidas del grupo B

Se midió la actividad enzimática ALS de las enzimas recombinantes de *A. palmeri* en presencia de diferentes concentraciones de herbicidas del grupo B (imazetapir, clorimurón-

etil, diclosulam, flucarbazona de sodio y bispiribac sódico) para determinar si dichas enzimas son inhibidas y en qué medida frente a estos cinco principios activos (un representante de cada familia química). Cabe aclarar que todos los herbicidas evaluados se encuentran indicados para el control de yuyo colorado, a excepción del herbicida flucarbazona de sodio, que se utiliza en cultivos de trigo para el control de malezas de ciclo invernal. No obstante, se decidió incluirlo en los ensayos con el objetivo de determinar si alguna de las enzimas R caracterizadas eran susceptibles a este herbicida, dado que podría constituir una nueva opción para el control de *A. palmeri*. Los ensayos se realizaron a concentración saturante de sustrato mediante el método discontinuo.

En base a los valores de I_{50} obtenidos a partir de las curvas de inhibición enzimática (Tabla 10) las enzimas R1, R2, R3 y R5 presentan una menor respuesta inhibitoria a imazetapir, clorimurón-etil, diclosulam y flucarbazona de sodio; mientras que la enzima R6 muestra un comportamiento similar frente a los herbicidas nombrados, a excepción de diclosulam, y la ALS R4 fue inhibida en igual grado que la enzima Wt por todos los herbicidas estudiados. Con respecto, al herbicida bispiribac sódico, resultados preliminares mostraron que todas las enzimas R presentan I_{50} mayores a la Wt. Sin embargo, esta tendencia requiere confirmación estadística (ver sección 3.2.8).

Herbicida	Enzima recombinante	Parámetros				
		a	b	I_{50}	FR	R^2
Imazetapir (IMI, μM)	Wt	102±3	2,1±0,4	0,35±0,05	-	0,99
	R1 (D376E)	87±4	1,1±0,2	8±2*	22,8	0,98
	R2 (A205V)	92±4	0,9±0,2	32±9*	91,4	0,97
	R3 (A122S-A282D)	107±6	1,4±0,5	11±4*	31,4	0,93
	R4 (A282D)	101±6	1,2±0,3	0,5±0,2	1,4	0,98
	R5 (W574L)	-	-	>500	>1428	-
	R6 (S653N)	-	-	>500	>1428	-
Clorimurón-etil (SU, nM)	Wt	98±4	1,1±0,1	1,6±0,3	-	0,97
	R1 (D376E)	96±2	0,8±0,1	572±82*	357,5	0,95
	R2 (A205V)	103±4	0,7±0,1	33±5*	20,6	0,99
	R3 (A122S-A282D)	102±3	1,0±0,2	13±3*	8,1	0,98
	R4 (A282D)	94±5	0,7±0,2	1,6±0,7	1	0,97
	R5 (W574L)	-	-	>1000	>625	-
	R6 (S653N)	90±5	1,4±0,4	11±2*	6,8	0,97
Diclosulam (TP, nM)	Wt	99±8	1,4±0,3	3,6±0,7	-	0,97
	R1 (D376E)	93±6	1,0±0,2	149±43*	41,4	0,95
	R2 (A205V)	95±4	1,0±0,2	104±20*	28,8	0,98
	R3 (A122S-A282D)	106±4	2,2±0,3	75±8*	20,8	0,96

	R4 (A282D)	102±8	1,0±0,2	5±1	1,4	0,96
	R5 (W574L)	-	-	>640	>178	-
	R6 (S653N)	99±6	1,5±0,3	3,3±0,5	0,9	0,97
Flucarbozona de sodio (SCT, µM)	Wt	100±5	0,7±0,1	0,006±0,002	-	0,97
	R1 (D376E)	93±3	1,1±0,2	1,5±0,3*	250	0,99
	R2 (A205V)	104±5	1,1±0,3	0,06±0,01*	10	0,99
	R3 (A122S- A282D)	100±2	0,66±0,05	0,06±0,01*	10	0,99
	R4 (A282D)	102±3	1,1±0,2	0,006±0,001	1	0,99
	R5 (W574L)	108±6	1,0±0,3	239±85*	39833	0,92
	R6 (S653N)	100±8	0,7±0,2	0,03±0,01*	5	0,96
Bispiribac sódico (PTB, µM)	Wt	99±4	0,40±0,07	0,0013±0,0003	-	0,98
	R1 (D376E)	86±4	1,0±0,3	36±11	27692	0,96
	R2 (A205V)	100±3	0,8±0,1	0,50±0,08	384	0,99
	R3 (A122S-A282D)	100±2	0,25±0,02	0,029±0,008	22	0,99
	R5 (W574L)	113±7	0,9±0,1	179±59	130769	0,89
	R6 (S653N)	101±9	0,5±0,1	15±5	11538	0,97

Tabla 10. Parámetros de las curvas de inhibición de la actividad ALS. Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los valores de I_{50} de las enzimas recombinantes R y la Wt. Los valores son el promedio de al menos dos determinaciones diferentes con su correspondiente error estándar. Abreviaturas: a: asíntota superior (% Actividad residual); b: pendiente de la recta en el punto I_{50} (% Actividad residual [Herbicida]¹) y I_{50} : inhibición de la actividad media ([Herbicida]). Los * indican diferencias estadísticamente significativas para cada herbicida entre las versiones R y la Wt de la enzima ALS (prueba t-Student, $p < 0,05$).

La resistencia cruzada observada en las versiones R de ALS de *A. palmeri* se puede explicar teniendo en cuenta la estructura cristalina de la ALS de *A. thaliana*. Los aminoácidos en las posiciones A122, A205, D376, W574 y S653 están implicados (en mayor o menor medida) en la unión de los herbicidas a la enzima, por consiguiente, la sustitución de un aminoácido puede afectar la unión de más de un herbicida y conferir resistencia a distintas familias químicas (McCourt et al., 2006; Garcia et al., 2017; Lonhienne et al., 2018).

La resistencia a las cuatro familias de herbicidas (IMI, SU, TP, SCT) proporcionada por la sustitución D376E en la enzima R1 (Tabla 10) es consistente con lo ya reportado para otras especies de malezas tales como, *L. perenne* (Menegat et al., 2016), *S. juncooides* (Sada et al., 2013), *A. powellii* (Ashigh et al., 2009) y *Raphanus raphanistrum* L. (Yu et al., 2012). En la ALS de *A. palmeri* (R1) esta mutación confiere alto nivel de resistencia a las sulfonilureas (FR= 357,5, clorimurón-etil) y moderado a las imidazolinonas (FR= 22,8, imazetapir) y triazolopirimidinas (FR= 41,4, diclosulam) (Figura 6, A). El mismo patrón se observó en los ensayos *in vitro* a partir de extractos de las poblaciones mencionadas arriba. La menor afinidad por el clorimurón-etil que confiere la sustitución D376E se debe a que el

aspartato es esencial para la unión las SU a la enzima. Este aminoácido interacciona fuertemente con la arginina de la posición 377 formado un puente salino que une a esta clase de herbicidas (Duggleby et al., 2008). Además, esta mutación en la ALS de *A. palmeri* también proporciona una resistencia considerable a las SCT, lo cual se informó para la ALS de *L. perenne* (Menegat et al., 2016).

Con respecto a la sustitución A205V, los resultados de los ensayos inhibitorios con la enzima R2 determinaron que esta mutación confiere una alta resistencia a las IMI (FR= 91,4) y moderada para el resto de las familias de herbicidas (Figura 6, B). Son escasos los ensayos *in vitro* con esa versión de ALS. Sin embargo, el alto nivel de resistencia a las IMI y la resistencia moderada a las SU también se observó en la ALS con la sustitución A205V de *S. ptychanthum* (Ashigh y Tardif, 2007). No obstante, en dicha especie la mutación parece no conferir resistencia a las TP (flumetsulam). Curiosamente, no hay reportes de que la sustitución A205V sea la responsable de la resistencia a esta familia de herbicidas para otras especies, por lo tanto ésta sería la primera vez que se informa que A205V confiere resistencia a las TP. Lo mismo ocurre para las SCT, es la primera vez que se evalúa esta familia para la mutación A205V y se reporta que otorga resistencia (FR= 10). Por otro lado, los estudios *in vivo* con poblaciones de *C. canadensis* y *A. retroflexus* con esta mutación comprobaron que esta sustitución en *C. canadensis* da resistencia a las SU pero no en *A. retroflexus* (McNaughton et al., 2005; Matzrafi et al., 2015). Algo interesante a señalar es que la alanina en la posición 205 no está implicada directamente en la unión de las IMI (McCourt et al., 2006), por lo tanto el modelo estructural de la ALS no podría explicar la alta resistencia a esta familia, lo cual indica que existe una interacción más compleja (o indirecta, por cambios conformacionales) de la A205 con los herbicidas IMI.

Hasta el momento, se han reportado sustituciones en A122 de la ALS que confieren resistencia en nueve especies de malezas (Tranel et al., 2019). Las sustituciones A122T y A122V proporcionan resistencia solo a unas pocas familias de herbicidas. El cambio de aminoácidos A122T da resistencia a las IMI en *S. ptychanthum* (Milliman et al., 2003), *A. hybridus* (Trucco et al., 2006) y en *E. crus-galli* también a las TP (Riar et al., 2013). Por otro lado, la mutación A122V da resistencia a las IMI en *E. crus-galli* y *A. thaliana* (Riar et al., 2013; Chang y Duggleby, 1998). A diferencia de las sustituciones nombradas, las mutaciones A122Y y A122N otorgan resistencia a un amplio espectro de herbicidas en *R. raphanistrum* y *E. crus-galli*, respectivamente (Han et al., 2012; Panozzo et al., 2017). De manera similar, en este trabajo se comprobó que el cambio A122S en la enzima ALS de *A. palmeri*, reportada por primera vez en plantas, confiere resistencia a las cuatro familias de herbicidas ensayadas (Tabla 10).

La alanina en la posición 122 está implicada principalmente en la unión de los herbicidas de las familias IMI, SU y TP (McCourt et al., 2006; Lonhienne et al., 2018). Este aminoácido establece contactos hidrofóbicos importantes con los herbicidas IMI, pero no tanto con los herbicidas SU (solo interacciona con el etil-eter del clorimurón-etil). Teóricamente, el reemplazo de la alanina por serina, un aminoácido polar, afectaría en mayor medida la unión de imazetapir. En concordancia, la sustitución A122S provee mayores niveles de resistencia a las IMI y TP en relación a las SU y las SCT (Figura 6, C). Cabe aclarar que esta resistencia que se está describiendo y se observó en la enzima R3 se debe a la sustitución A122S, ya que la sustitución A282D (R4), también presente en la enzima R3, no proporciona resistencia a ningún herbicida ni altera significativamente los parámetros cinéticos de ALS.

Los ensayos de inhibición con la enzima R5 demuestran que la sustitución W574L es de amplio espectro, es decir, proporciona resistencia a las cuatro familias de herbicidas evaluadas (Tabla 10). Esto coincide con lo reportado en múltiples casos en distintas especies de malezas (Tranel et al., 2019). Para el caso de la ALS de *A. palmeri*, esta mutación confirió una muy alta resistencia al herbicida flucarbazona de sodio (Figura 6, D). Son escasos los estudios que utilizan esta familia de herbicidas, pero a pesar de esto, en los ensayos *in vivo* con poblaciones resistentes de *Lithospermum arvense* L. y *Sinapis arvensis* L. se observó que esta mutación proporciona mayor resistencia a las SU y TP, respectivamente, en lugar de a las SCT (Christoffers et al., 2006; Wang et al., 2019). Sin embargo, los resultados de estos ensayos *in vivo* podrían estar afectados por mecanismos de RNT no considerados.

El cambio de aminoácidos W574L otorga altos niveles de resistencia a las IMI y SU (FR >1428 y FR > 625, respectivamente) y una resistencia considerable a las TP (FR >178). Estos resultados concuerdan con los obtenidos de los ensayos *in vitro* de otras especies, tales como *X. strumarium*, *R. sativus*, *Amaranthus tuberculatus* (Moq.) J. D. Sauer. y la ALS recombinante de *A. thaliana* (Bernasconi et al., 1995, Chang y Duggleby, 1998; Patzold y Tranel, 2007; Vercellino et al., 2018).

Por otra parte, los ensayos de la actividad ALS en presencia de distintos herbicidas indican que la enzima R6 tiene una muy alta resistencia a imazetapir (FR >1428) y baja para clorimurón-etil (FR= 6,8) y flucarbazona de sodio (FR= 5) (Tabla 10). El patrón de resistencia cruzada en R6 conferido por la sustitución S653N (Figura 6, E) coincide con el informado para *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. y *A. tuberculatus* (Patzoldt y Tranel, 2007; Laplante et al., 2009). Contrariamente, la sustitución S653N no disminuyó significativamente la

susceptibilidad a las SU en la ALS recombinante de *A. thaliana* (Chang y Duggleby, 1998). El alto nivel de resistencia a las IMI proporcionado por el cambio de aminoácidos S653N se debe a que la serina está involucrada principalmente en la unión de las IMI a la enzima ALS. La sustitución de ésta por asparagina no desplazaría a las SU, siempre que la cadena lateral esté orientada correctamente. En contraste, el reemplazo de S653 con casi cualquier otro residuo más grande perjudica la unión de las SU, ya que obstruye el espacio donde se encuentra el anillo aromático de estos herbicidas (McCourt et al., 2006).

Con respecto al herbicida diclosulam, según nuestros resultados, la mutación S653N no otorga resistencia, sin embargo, en algunas especies como *A. hybridus* y *Bromus tectorum* L. (Whaley et al., 2006; Kumar y Jha, 2017) se determinó por medio de curvas dosis-respuesta que esta mutación si da resistencia a las TP. Esta discordancia entre los resultados expuestos puede deberse a que mecanismos de RNT no considerados podrían estar participando de la resistencia de esas poblaciones que contienen la mutación, ya que en los ensayos *in vivo* no se discriminan las contribuciones de los mecanismos (RT y RNT).

En síntesis, los ensayos de inhibición de la actividad ALS con las distintas versiones resistentes determinaron que la mayoría de las enzimas R son resistentes a las cuatro familias de herbicidas evaluadas, a excepción de R6, que es susceptible a las TP, y R4, que se comportó de la misma forma que la Wt frente a todos los herbicidas evaluados. La enzima R5 con la mutación W574L fue la que presentó menores niveles de inhibición frente a todos los herbicidas ensayados (Figura 6, D). Por otro lado, las sustituciones A122S y A205V confieren un patrón de resistencia similar (alta resistencia a IMI, moderada a TP y baja a SU y SCT) a diferencia de la mutación D376E, que proporciona un patrón distinto al de todas las demás mutaciones. Cabe destacar que es la primera vez, que se informa que el cambio de aminoácidos A205V da resistencia a las TP y SCT y que la sustitución A122S es de amplio espectro, es decir, proporciona resistencia a las cuatro familias de herbicidas evaluadas.

Finalmente, los niveles de resistencia que provee cada sustitución establecidos por ensayos *in vitro* no siempre son suficientes para conferir un nivel notable de resistencia en las plantas (*in vivo*). Por esto, es necesario determinar los niveles de resistencia también mediante ensayos *in vivo* (curvas dosis-respuesta), tal como se describe en el siguiente capítulo. No obstante, resulta interesante la correspondencia hallada entre el perfil inhibitorio obtenido en extractos de la subpoblación Tot (Tabla 4, capítulo 1) y el patrón total de inhibición que otorgaría una mezcla hipotética de los alelos bajo estudio en igual proporción (Figura 6, F).

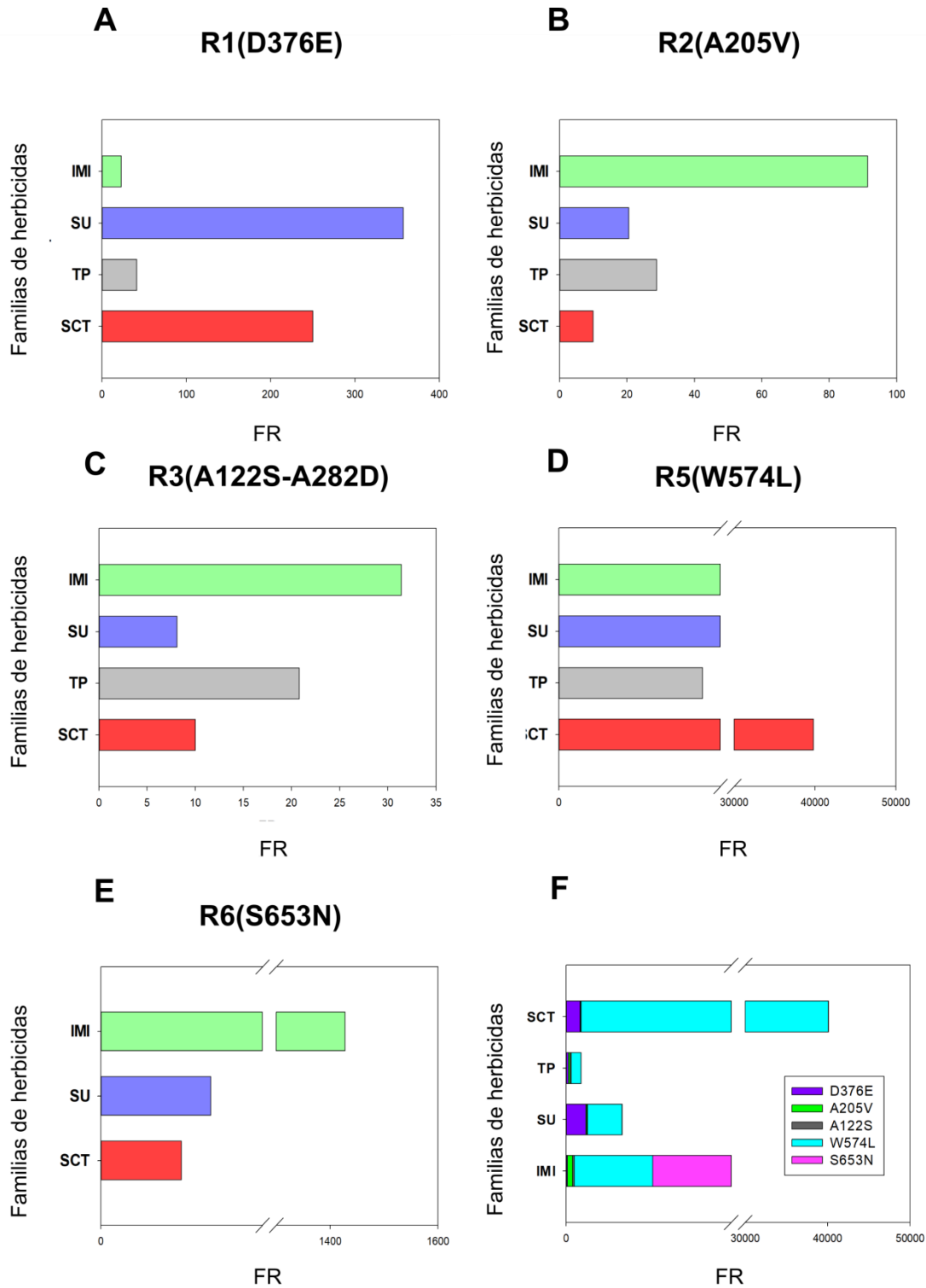


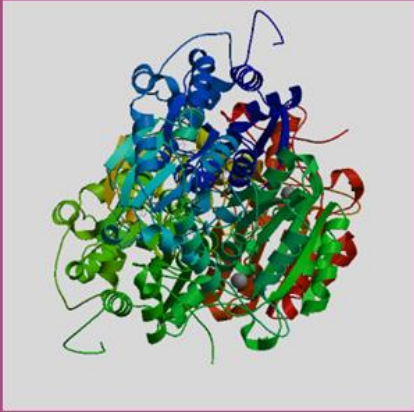
Figura 6. Patrón de resistencia proporcionado por las distintas sustituciones en las enzimas recombinantes. A: R1 (D376E). B: R2 (A205V). C: R3 (A122S-A282D). D: R5 (W574L). E: R6 (S653N). F: Comparación de los FR proporcionados por cada sustitución en la ALS para cada herbicida. Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los valores de I_{50} de las enzimas recombinantes R y la Wt. Abreviaturas: IMI: imidazolinonas; SU:

sulfonilureas; TP: triazolopirimidinas; SCT: sulfonilaminocarbonil triazolinonas.

3.4 CONCLUSIONES:

Por medio de técnicas de biología molecular se logró la expresión heteróloga en *E. coli* de las distintas versiones de la enzima ALS presentes en la subpoblación Tot. Esto permitió estimar los parámetros cinéticos de cada una y evaluar su respuesta a los herbicidas del grupo B mediante ensayos de inhibición de la actividad ALS. Los estudios cinéticos de esta investigación determinaron, por primera vez, el efecto en los parámetros cinéticos de la ALS de *A. palmeri* de seis sustituciones halladas en la subpoblación Tot resistente. Todas las enzimas recombinantes expusieron una cinética de Michaelis-Menten. Si bien la mayoría de las mutaciones afectaron la $V_{m\acute{a}x}$ de la ALS, las sustituciones que mayor efecto tuvieron sobre la eficiencia catalítica de la ALS fueron: A205V ($0,08\text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$), W574L ($0,09\text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$), A122S ($0,5\text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) y S653N ($0,3\text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$). El efecto más pronunciado en las mutaciones A205V y W574L podría deberse a que éstas disminuyeron significativamente la afinidad de la enzima por el sustrato. La disminución de la eficiencia catalítica de la ALS producida por las sustituciones mencionadas podría tener un costo biológico en las plantas resistentes; sin embargo, se requiere realizar los estudios pertinentes para confirmarlo.

Con respecto a los ensayos de inhibición de la actividad ALS, los mismos determinaron que las mutaciones D376E, A205V, A122S y W574L son de amplio espectro, que S653N no confiere resistencia a las TP y que la A282D no otorga resistencia a ningún herbicida. El cambio de aminoácidos W574L fue el que mayores niveles de resistencia otorgó en la ALS de *A. palmeri* para todos los herbicidas. Las sustituciones A122S y A205V presentan un patrón de inhibición similar (alta a IMI, moderada a TP y baja a SU y SCT), al tiempo que la mutación D376E otorga alta resistencia a las SU y SCT y moderada a las IMI y TP. Cabe destacar, que es la primera vez que se informa que la sustitución A205V da resistencia a las TP y SCT y que la A122S es de amplio espectro. Estudios *in vivo* son necesarios para determinar los niveles de resistencia que confieren las tres sustituciones halladas por primera vez en *A. palmeri*.



Capítulo 3

Determinación del nivel de resistencia *in vivo* a herbicidas del grupo B proporcionado por mutaciones específicas en el gen *ALS*

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE RESISTENCIA *IN VIVO* A HERBICIDAS DEL GRUPO B PROPORCIONADO POR MUTACIONES ESPECIFICAS EN EL GEN ALS**4.1 INTRODUCCIÓN:**

El género *Amaranthus* incluye varias malezas agronómicas importantes. Entre éstas se encuentran especies diclino dioicas (plantas unisexuales) como *A. palmeri* y *Amaranthus tuberculatus* y otras monoicas (flores unisexuales, plantas bisexuales) como *A. hybridus*, *A. retroflexus* y *A. powellii* que con frecuencia son sexualmente compatibles entre ellas mismas (Trucco et al., 2007).

Al ser una especie diclino dioica *A. palmeri* tiene polinización cruzada obligada, lo cual favorece el enriquecimiento y recombinación de los alelos asociados a la resistencia. Se ha demostrado la transferencia de rasgos de resistencia a glifosato por polen desde plantas de *A. palmeri* resistentes a plantas femeninas susceptibles hasta una distancia de 300 m (Culpepper et al., 2006). Además, *A. palmeri* puede hibridar con otras especies del género (Franssen et al., 2001; Trucco et al., 2007; Gaines et al., 2012). De este modo, el tipo de reproducción de esta maleza contribuye con la rápida propagación de la resistencia, dentro y entre especies de *Amaranthus*, y aumenta la probabilidad de generar poblaciones con resistencia múltiple.

La mayoría de los casos de resistencia a inhibidores de la ALS en *A. palmeri* son debido a cambios en la secuencia de bases del gen de la ALS (Molin et al., 2016; Nakka et al., 2017; Singh et al., 2019). Determinar el nivel de resistencia *in vivo* proporcionado por estos cambios resulta importante, ya que no todas las mutaciones proveen una protección sólida contra el daño causado por los herbicidas, aun cuando estas sustituciones proporcionan a la enzima una sensibilidad reducida *in vitro* (Yu y Powles, 2014). Por ejemplo, en *A. tuberculatus* se observó mediante ensayos *in vitro* que la sustitución S653N otorga a la ALS una resistencia a tifensulfuron cuatro veces mayor respecto a la enzima salvaje. Sin embargo, esta susceptibilidad reducida no fue suficiente para conferir una resistencia notable *in vivo* y las plantas resultaron sensibles a este herbicida (Patzoldt y Tranel, 2007).

La diversidad en las mutaciones en el gen *ALS* se puede ver a nivel poblacional, planta individual y del *locus*. A nivel de la población, es común que en diferentes poblaciones de la especie se encuentren distintas mutaciones ALS. A nivel planta individual, diferentes individuos dentro de una misma población pueden tener distintas mutaciones ALS

y, sobretodo en especies de malezas de polinización cruzada, una misma planta puede tener diferentes alelos mutantes. A nivel del *locus*, un solo alelo del gen *ALS* también puede tener dos o más mutaciones (mutaciones dobles o múltiples) (Warwick et al., 2008; Yu et al., 2008; Délye et al., 2011). Esta diversidad en las mutaciones *ALS* causa que el estudio de los patrones de resistencia cruzada y el nivel de resistencia *in vivo* otorgado por mutaciones específicas en el gen *ALS* resulte complejo en algunas poblaciones de malezas.

Para el estudio correcto de la resistencia conferida por una mutación específica en el gen *ALS* se deben seleccionar o generar individuos que posean solo la sustitución específica en igual proporción (homocigota o heterocigota); puesto que una población de malezas es infrecuentemente compuesta completamente por individuos resistentes o susceptibles a un herbicida específico (Cousens y Mortimer, 1995) y habitualmente se encuentra una gran diversidad de mutaciones en la *ALS* asociada a la resistencia en malezas alógamas.

La forma de obtener los individuos descriptos depende de la biología de la especie con la que se trabaje. La generación de subpoblaciones purificadas (a partir de individuos homocigotas) es una de las metodologías más utilizadas en malezas para estudiar el fenotipo proporcionado por las distintas mutaciones (Yu et al., 2012; Deng et al., 2017). Sin embargo, esta manera de obtener material homogéneo resulta dificultosa cuando se trabaja con una población diclino dioica que tiene una gran cantidad de alelos *ALS* asociados a la resistencia, como en este caso *A. palmeri*; ya que, se debería encontrar un pie femenino y otro masculino con la mutación de interés en homocigosis y cruzarlos. Por ello, Teaster y Hoagland (2014) desarrollaron un método de propagación macro-vegetativa que facilita el estudio a largo plazo en líneas clonadas seleccionadas de *A. palmeri*.

Determinar el grado de resistencia a un determinado principio activo de una maleza con isoformas conocidas de *ALS* es necesario para establecer la relación entre las dosis y la respuesta de la especie al herbicida. Además, permite comprobar que el nivel de resistencia conferido por la mutación a la enzima es suficiente para conferir una resistencia notable en las plantas. Así, el objetivo de este capítulo es determinar el nivel de resistencia *in vivo* a inhibidores de la *ALS* proporcionado por sustituciones específicas (A122S, D376E o A205V) en la enzima *ALS*, no reportadas hasta el momento en *A. palmeri*.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS:

4.2.1 Material vegetal

A partir de la subpoblación de *A. palmeri* de Totoras (Tot), descrita en sección la 2.2.1, se seleccionaron plantas con las sustituciones A122S, D376E o A205V en la enzima ALS. La subpoblación de Tucumán (Tuc) se utilizó como control susceptible para los ensayos con herbicidas inhibidores de la ALS.

4.2.2 Identificación de plantas con sustitución A122S, D376E o A205V en la enzima ALS

4.2.2.1 Selección de individuos

Se seleccionaron individuos mediante la aplicación de Derby® (i.a.: imazetapir 10% P/V; Gleba) a la dosis de campo recomendada (100 g i.a./ha). Se obtuvieron aproximadamente 40 plantas de la subpoblación Tot en macetas de diez litros que contenían una mezcla de suelo, arena y perlita (70-20-10%, respectivamente), en la cámara de cultivo (fotoperíodo 16:8 horas día/noche, 25°C). Las plantas fueron tratadas con el herbicida cuando alcanzaron el estadio de 4-6 hojas. La aplicación del herbicida se llevó a cabo utilizando un equipo de presión constante con boquillas de ventilador planas a 206,84 kPa, calibrado para suministrar 116 L/ha. Tres semanas después del tratamiento, se tomaron muestras de hojas jóvenes de las plantas sobrevivientes para determinar el genotipo en el locus ALS de cada una.

4.2.2.2 Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADNg a partir de hojas jóvenes de 30 plantas que sobrevivieron a la aplicación con el herbicida. La extracción se realizó de acuerdo a una versión modificada y acortada del protocolo de extracción con buffer CTAB. Se molieron 100 mg de tejido foliar, previa incubación a 60°C durante toda la noche, y se agregaron 600 µl de buffer CTAB (Tris-Cl 100 mM pH 8; cloruro de sodio 1,4 M; EDTA 20 mM pH 8; CTAB 2%). Luego de incubar 15 minutos a 55°C, se añadieron 600 µl de cloroformo y se centrifugó 7 minutos a 15000 x g a temperatura ambiente. Se extrajo 400 µl de la fase superior y se colocó con 400 µl de isopropanol. Se incubó durante 10 minutos a -20°C y posteriormente se centrifugó a máxima velocidad a 4°C. Después de lavar el pellet con etanol 70% V/V, éste se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua. La concentración de las soluciones de ADNg se estimó como se describe en la sección 2.2.5.1.

4.2.2.3 Búsqueda de individuos portadores de la sustitución A122S mediante dCAPS

Se utilizaron muestras de ADN_g de 25 plantas para el ensayo de digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas (dCAPS, por sus siglas en inglés: derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence). Este ensayo permite detectar el cambio de un nucleótido en una posición particular, mediante la amplificación con cebadores que introducen un sitio de corte para una enzima de restricción, en este caso, basados en la secuencia salvaje (o wild-type, Wt). Si existe un polimorfismo nucleotídico, el sitio de restricción no se genera y el patrón de digestión es diferente. En este caso, se diseñaron cebadores para detectar mutaciones puntuales en el gen *ALS* que producen la sustitución en la alanina 122. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 12 µl, conteniendo: 0,2 mM mezcla de dNTPs, 0,5 µM cebadores, buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 0,48 U de la enzima GoTaq® ADN Polimerasa (Promega, Cat. M3001). Los cebadores que se utilizaron fueron los siguientes:

ALSdcaps122f sentido: 5' - CTAAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACC - 3'

ALSdcaps122r antisentido: 5' - CGAGTAAGAGCTTGATGGATTTCCATGCATG - 3'

Las digestiones se realizaron a 37°C durante 2 horas, utilizando la enzima de restricción SphI (Biolabs New England, Cat. R0182S) que reconoce y corta específicamente la secuencia GCATG^AC presente en la secuencia de tipo salvaje. Muestras de ADN previamente secuenciadas se incluyeron como controles para validar la fidelidad del test. La secuencia salvaje produce una única banda digerida de 171 pb, mientras que una mutación puntual en el segundo nucleótido codificante de la A122 produce la pérdida del sitio de restricción y la visualización de una única banda no digerida de 202 pb. Las bandas de ADN se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6% P/V teñidos con SYBR safe (Invitrogen®, Cat. S33102).

4.2.2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron utilizando un equipo Bio-Rad Mini-PROTEAN III. Se prepararon geles al 6% P/V con acrilamida: bisacrilamida (29:1) 30% P/V, TBE 5X (Tris 0,044 M; ácido bórico 0,036 M; EDTA 0,05 M; pH8), APS 10% P/V y TEMED. Las muestras a sembrar se diluyeron con buffer de siembra (azul de bromofenol 0,25% P/V, xilencianol 0,25% P/V y glicerol 30% V/V). Se empleó como buffer de corrida al

TBE 0,5X y las corridas electroforéticas se realizaron a 100 V. Los geles fueron teñidos con SYBR safe (Invitrogen®, Cat. S33102).

4.2.2.5 Amplificación, clonado en vector pGEM-T Easy y secuenciación del gen ALS

Mediante amplificación, clonado y secuenciación del gen *ALS* completo (subunidad catalítica) se determinó el genotipo del locus *ALS* para cada planta seleccionada. Los protocolos que se llevaron a cabo son descritos en las secciones 2.2.5.2, 2.2.5.3 y 2.2.5.4.

4.2.3 Obtención de clones vegetativos a partir de individuos con las sustituciones A122S, D376E o A205V en la enzima ALS

Cada planta seleccionada se multiplicó mediante un método de clonado artificial. Los clones vegetativos de cada una se obtuvieron de acuerdo al protocolo descrito por Teaster y Hoagland (2014), que consiste en la utilización de esquejes, solución de enraizamiento e incubación bajo luz continua ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) por 7 días, para luego continuar el cultivo de los clones en condiciones normales de crecimiento (25°C , fotoperíodo 16:8 horas día/noche, intensidad lumínica de $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$).

4.2.4 Obtención de semillas a partir de individuos con la sustitución A122S en la enzima ALS

Dos plantas portadoras de la sustitución A122S en la enzima ALS, una con flores masculinas y la otra con flores femeninas, fueron clonadas como se describe en la sección anterior. Cuatro clones de cada planta fueron trasplantados a macetas de diez litros que contenían una mezcla de suelo, arena y perlita (70-20-10%, respectivamente). Seguidamente, los ocho clones fueron aislados en la cámara de cultivo (fotoperíodo 16:8 horas día/noche, 25°C) para evitar la contaminación con el polen de otras plantas y propiciar el entrecruzamiento. Cuando los clones alcanzaron su etapa reproductiva se realizó el cruzamiento, agitando suavemente las inflorescencias del pie masculino sobre las inflorescencias del pie femenino, promoviendo así la liberación de polen sobre los estigmas. Luego, se continuó con el cultivo de las plantas hasta madurez de cosecha, cuando se cortaron las inflorescencias y se obtuvieron las semillas, las cuales se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

4.2.5 Ensayos de dosis-respuesta

Se obtuvieron aproximadamente 120 clones de cada planta, con las sustituciones

A122S, D376E o A205V en la enzima ALS, en macetas de 500 cm³ que contenían una mezcla de suelo, arena y perlita (70-20-10%, respectivamente), en la cámara de cultivo (fotoperíodo 16:8 horas día/noche, 25°C). Los clones fueron tratados con los herbicidas cuando alcanzaron una altura de 8-10 cm. Las dosis de herbicida que se utilizaron fueron: 0,5X, 1X, 2X, 4X, 8X, 16X y 32X siendo X= 100 g ia/ha para imazetapir, X= 50 g ia/ha para clorimurón-etil y X= 30 g ia/ha para diclosulam. Las curvas dosis-respuesta se obtuvieron aplicando la metodología descrita en la sección 2.2.3. El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado con seis repeticiones por dosis.

Los datos se analizaron mediante la prueba t-Student, comparando los LD₅₀ o GR₅₀ de cada clon con sustitución exclusiva en la ALS versus la subpoblación Tuc susceptible. Para estos análisis se utilizó el software SigmaPlot (versión 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

El factor de resistencia (FR) se calculó dividiendo el valor LD₅₀ o GR₅₀, determinado para los tres clones con las distintas sustituciones en la enzima ALS por el de la subpoblación susceptible.

Las curvas dosis-respuesta para las plantas con la sustitución A122S en la enzima ALS obtenidas a partir de semillas se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.3. Las dosis de herbicida que se utilizaron fueron: 0,5X, 1X, 2X, 4X, 8X siendo X= 100 g i.a./ha para imazetapir y X= 30 g i.a./ha para diclosulam. El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado con diez repeticiones por dosis.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.3.1 Niveles de resistencia *in vivo* a herbicidas inhibidores de la ALS en plantas multiplicadas vegetativamente con las sustituciones A122S, D376E o A205V

Debido a la gran variabilidad genética observada dentro de la subpoblación Tot, para el estudio en profundidad de la resistencia *in vivo* que proporcionan las sustituciones A122S, D376E y A205V en la enzima ALS no reportadas hasta el momento en *A. palmeri*, se seleccionaron y multiplicaron vegetativamente individuos con cada sustitución exclusiva en la enzima.

A partir de la subpoblación Tot se seleccionaron individuos resistentes mediante la aplicación de imazetapir a la dosis de campo recomendada. Se identificaron los alelos del gen *ALS* de cinco plantas que sobrevivieron (Tabla 11). Esto fue suficiente para encontrar las plantas con las sustituciones D376E y A205V en heterocigosis (individuos 1 y 3), pero no lo fue para encontrar aquellas con la sustitución A122S; por lo tanto, se aumentó el número de plantas estudiadas y se utilizó la técnica dCAPS para facilitar la selección.

De las 25 plantas analizadas por la técnica de dCAPS, sólo dos presentaron la sustitución A122S (Figura 7). Se clonó y secuenció el gen *ALS* completo (subunidad catalítica) de estas plantas con la sustitución A122S para analizar la presencia de otras mutaciones y confirmar la heterocigosis observada por dCAPS.

Sin embargo, el análisis de estas secuencias arrojó siempre el alelo con la mutación (seis clones de diferentes PCR), no aportando evidencia de la co-existencia del alelo salvaje. De cualquier manera, las dos plantas presentan el alelo R3 (A122S-A282D) descrito en la sección 2.3.3 y si bien este alelo tiene dos mutaciones, ya se demostró mediante ensayos *in vitro* en el capítulo anterior que la sustitución A282D en la ALS no confiere resistencia a ninguna de las cuatro familias de herbicidas ensayadas.

Individuo	Genotipo identificado
1	R1 (D376E) Wt
2	R1 (D376E) R5 (W574L)
3	R2 (A205V) Wt
4	R2 (A205V) R7 (A282D-S653N)
5	R5 (W574L) Wt

Tabla 11. Genotipo del locus *ALS* de individuos seleccionados con imazetapir. Los alelos del gen *ALS* se nombran de acuerdo a la sección 2.3.3.

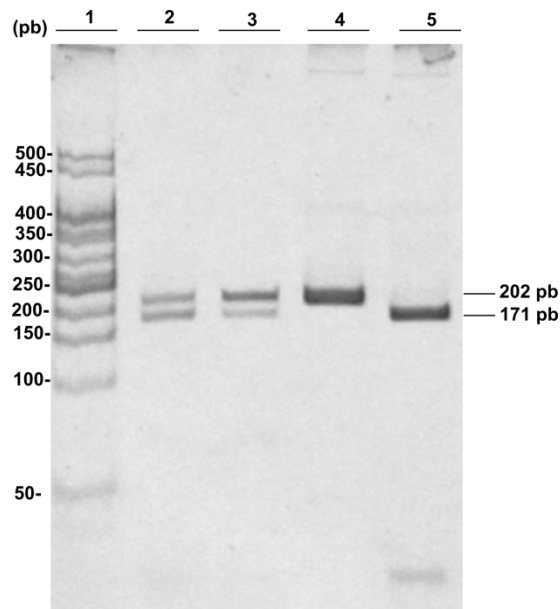


Figura 7. Ensayo de dCAPS desarrollado para la sustitución A122 en la *ALS* de *A. palmeri*. Gel de poliacrilamida 6% P/V teñido con SYBR safe. Calle 1: marcador de peso molecular 50 pb (Inbio). Calle 2: planta con sustitución A122S (pie femenino). Calle 3: planta con sustitución A122S (pie masculino). Calle 4: construcción pGEM-T/R3 (Control +). Calle 5: construcción pGEM-T/Wt (Control -). La secuencia salvaje (Wt) produce una banda única digerida de 171 pb, mientras que la mutante es insensible a la digestión y produce una banda de 202 pb.

En la subpoblación Tot se identificaron individuos que tienen en cada alelo *ALS* una mutación distinta (individuos 2 y 4, Tabla 11), lo cual dificultó aún más la selección de plantas con una única sustitución en la *ALS*.

Para las sustituciones D376E y A205V sólo se hallaron plantas con flores masculinas con la mutación en cuestión en heterocigosis; en cambio, para la sustitución A122S, se halló un pie masculino y uno femenino. Dadas estas condiciones, se procedió a multiplicar las

plantas con cada sustitución mediante un método de clonado artificial (Sección 4.2.3) y así se obtuvo material homogéneo para realizar las curvas dosis-respuesta y determinar el nivel de resistencia *in vivo* conferido por cada sustitución.

Cabe destacar que también se cruzaron las plantas con la sustitución A122S en la ALS para realizar el mismo estudio, pero en este caso el material vegetal se obtuvo a partir de semillas. En la Figura 8 se muestran los clones vegetativos de la planta con la sustitución D376E, a modo de ejemplo, en distintas etapas de regeneración.



Figura 8. Clones vegetativos obtenidos a partir de una planta con la sustitución D376E en la enzima ALS en distintas etapas de regeneración. (A) Brote que se corta de la planta para clonarlo. (B) Brotes luego de dos semanas de haber regenerado raíces. (C) Clon utilizado para curvas dosis-respuesta.

Se realizaron las curvas dosis-respuesta de los clones vegetativos con una sustitución en la enzima ALS (A122S, A205V o D376E) para los herbicidas imazetapir, clorimurón-etil y diclosulam. Los clones se nombraron de acuerdo al alelo del gen *ALS* que poseen, es decir que los clones R1 poseen la sustitución D376E en la enzima ALS, los R2 la A205V y los clones R3 las sustituciones A122S-A282D.

El porcentaje de supervivencia de los clones R1, R2 y R3 fue del 100% a todas las dosis ensayadas de todos los herbicidas, lo cual impidió el ajuste de los datos a partir de

esta variable. Todos los clones con sustituciones únicas en la enzima ALS sobrevivieron a una dosis 32 veces mayor que la utilizada a campo para imazetapir (100 g i.a./ha), diclosulam (30 g i.a./ha) y clorimurón-etil (50 g i.a./ha) (Figura 9). Esto indica que las tres mutaciones en el gen *ALS* confieren resistencia cruzada *in vivo* a los herbicidas evaluados. Para imazetapir, la LD_{50} (Tabla 12) de los clones fue mayor a la determinada para la subpoblación original Tot (sección 2.3.1, capítulo 1), lo cual se explica fácilmente si se tiene en cuenta la presencia de individuos susceptibles en las subpoblaciones no purificadas (Cousens y Mortimer 1995).

Si bien los clones con mutaciones únicas en el gen *ALS* sobrevivieron a todos los herbicidas, su crecimiento se inhibió severamente, afectando la biomasa (Figura 9, Tabla 12), particularmente en los tratamientos con imazetapir y clorimurón-etil. Para imazetapir en todos los casos los GR_{50} resultaron < 100 g i.a./ha (dosis a campo recomendada), en tanto que para clorimurón-etil los GR_{50} superaron la dosis de campo (50 g i.a./ha). Este mismo comportamiento se observó en poblaciones de *R. raphanistrum* con la sustitución D376E (Yu et al., 2012).

Los FR determinados a partir de los GR_{50} muestran un menor nivel de afectación de la biomasa de las plantas sobrevivientes a las TP, mientras que las SU parecen ser las causantes de los efectos más severos.

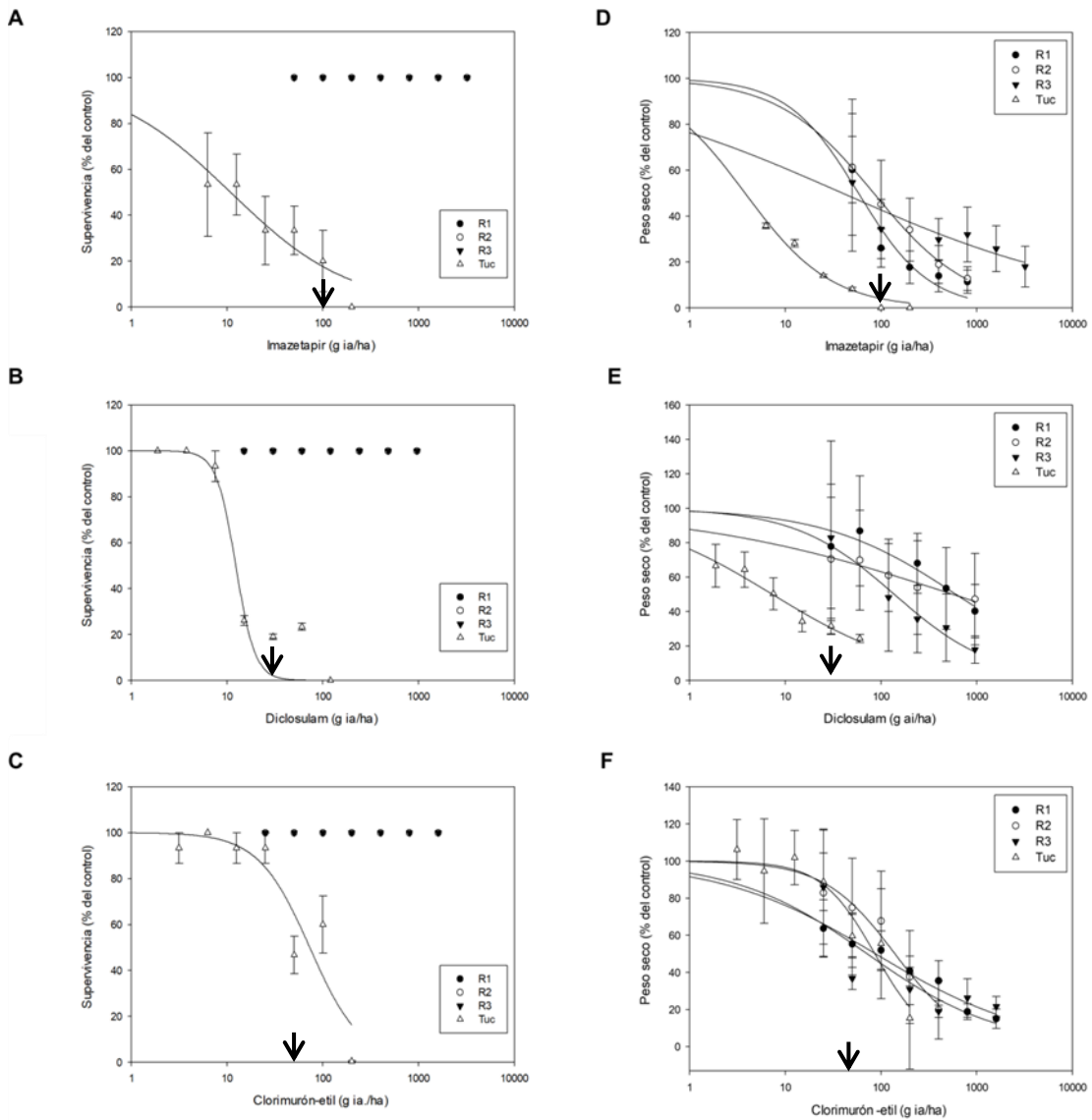


Figura 9. Curvas dosis-respuesta con inhibidores de la ALS en clones vegetativos con una sustitución exclusiva en la enzima ALS. Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia (A-C) y peso seco (D-F) relativo a los controles no tratados. En algunos casos (A-C) las dosis del herbicida aplicado no provocaron una reducción sustancial de la variable supervivencia, lo cual imposibilitó el ajuste de los datos a la curva paramétrica. Las flechas sobre el eje x indican la dosis aplicada a campo (1X) de cada principio activo. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

Herbicida	Material vegetal	Parámetros				
		LD ₅₀	FR	GR ₅₀	FR	R ²
Imazetapir (IMI)	R1	>3200	>290	58±10*	15,3	0,97
	R2	>3200	>290	83±3*	21,8	0,99
	R3	>3200	>290	39±22	10,3	0,96
	Tuc	11±3	-	3,8±0,6	-	0,99
Diclosulam (TP)	R1	>960	>80	607±142*	83,1	0,94
	R2	>960	>80	564±114*	77,3	0,98
	R3	>960	>80	137±17*	18,8	0,98
	Tuc	12±2	-	7,3±0,8	-	0,98
Clorimurón-etil (SU)	R1	>1600	>22	89±19	1	0,98
	R2	>1600	>22	140±14*	1,6	0,97
	R3	>1600	>22	71±36	0,8	0,85
	Tuc	73±17	-	86±11	-	0,98

Tabla 12. Parámetros de las curvas dosis-respuesta. Los valores de GR₅₀ (inhibición del crecimiento media) y LD₅₀ (dosis letal media) están expresados en g i.a./ha. Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los parámetros de LD₅₀ o GR₅₀ de los clones R y la subpoblación Tuc. R² representa el coeficiente de determinación del ajuste utilizado. Los * indican diferencias estadísticamente significativas para cada herbicida entre los clones R y la subpoblación Tuc (prueba t-Student, p< 0,05).

La resistencia cruzada a los herbicidas del grupo B conferida por la sustitución D376E concuerda con lo ya reportado para otras especies de malezas (Whaley et al., 2007; Ashigh et al., 2009; Yu et al., 2012). Con respecto a la sustitución A205V, se confirma que en *A. palmeri* proporciona resistencia *in vivo* a las familias de las IMI y SU al igual que en *S. ptychanthum* y *Conyza* spp. (Ashigh y Tardif, 2007; Matzrafi et al., 2015). Además, se detecta por primera vez que el cambio de aminoácidos A205V confiere resistencia *in vivo* a TP (diclosulam), familia química de herbicidas no muy estudiada para esta mutación. La sustitución A122S resultó ser de amplio espectro, como otras dos mutaciones en la posición 122 (A122Y y A122N) reportadas sólo en *R. raphanistrum* y *E. cruz-galli*, respectivamente (Han et al., 2012; Panozzo et al., 2017).

De las tres mutaciones estudiadas en el gen ALS, se encontró mayor nivel de resistencia a imazetapir en las plantas clonadas con la sustitución A205V (FR= 21,8), a diclosulam en las plantas con las sustituciones D376E (FR= 83,1) o A205V (FR= 77,3) y a clorimurón-etil, en las que contienen la sustitución A205V en la enzima ALS (FR= 1,6). Estos perfiles inhibitorios son consistentes con los estudios *in vitro* realizados con cada isoforma (capítulo 2) para imazetapir, pero difieren del comportamiento observado frente a diclosulam

y clorimurón-etil, donde la sustitución D376E fue la que otorgó mayores niveles de resistencia a estos herbicidas. Esta misma tendencia (mayores niveles de resistencia *in vitro* que *in vivo*) fue también observada en poblaciones de *R. raphanistrum* con la mutación D376E (Yu et al., 2012).

Los FR a nivel planta (*in vivo*) y enzima (*in vitro*) no siempre están perfectamente correlacionados. Tales inconsistencias cuantitativas se han observado también en otras investigaciones (Foes et al., 1999; Ashigh y Tardif, 2007; Han et al., 2012; Panozzo et al., 2017) y las razones de éstas pueden ser múltiples como por ejemplo, otros mecanismos de resistencia pueden estar presentes o puede haber diferencias genéticas y fisiológicas entre las poblaciones comparadas.

Curiosamente, para los tres clones, los FR para diclosulam determinados por ensayos *in vivo* son mayores o iguales (para la A122S) a los establecidos *in vitro*. Tal comportamiento podría sugerir la presencia de otro mecanismo contribuyendo a la resistencia para este herbicida, como por ejemplo una degradación metabólica aumentada del herbicida. Este mecanismo de resistencia ya se ha observado en *A. palmeri* (Nakka et al., 2017). Sin embargo, futuros experimentos son necesarios para confirmar esta hipótesis.

4.3.2 Niveles de resistencia *in vivo* a herbicidas inhibidores de la ALS en plantas con la sustitución A122S obtenidas a partir de semillas

Se realizaron curvas dosis-respuesta con plantas obtenidas a partir de semillas que presentan el alelo ALS R3 para comprobar que no haya un efecto debido a la propagación macro-vegetativa sobre el fenotipo resistente observado en los clones. El estudio sólo se llevó a cabo con individuos con esta mutación, ya que es la primera vez que la sustitución A122S se observa en plantas y no hay otros trabajos para contrastar la resistencia que proporciona; por consiguiente, es importante determinar que la resistencia se debe sólo a la mutación y no a otro efecto.

El porcentaje de supervivencia de las plantas con sustitución exclusiva en la ALS fue del 100% a todas las dosis ensayadas de imazetapir ($LD_{50} > 800$ g i.a./ha, Tabla 13) y diclosulam ($LD_{50} > 240$ g i.a./ha, Tabla 13). Los individuos sobrevivieron a dosis ocho veces mayor a la recomendada a campo (dosis máxima ensayada) (Figura 10). Estos resultados concuerdan con los obtenidos a partir de clones vegetativos, los cuales sobrevivieron a dosis 32X. Vale la pena destacar que por medio de estos ensayos *in vivo* se confirma que el pie masculino era homocigota (como lo indicaban los resultados de secuenciación), ya que ninguna planta murió a las dosis ensayadas, demostrando la ausencia de plantas

susceptibles. Al respecto se podría pensar que durante el desarrollo del dCAPS se produjo una contaminación de la muestra con molde sensible, dado que la banda de 171 pb (proveniente de la digestión del molde sensible) es más tenue que la de 202 pb para esa planta (Figura 7, calle 3).

Con respecto a la biomasa remanente, los datos no ajustaron a una curva. Las plantas sobrevivientes presentaron a la dosis 8X un 75% de peso seco respecto al control no tratado para imazetapir, mientras que para diclosulam fue del 55% (Figura 10). Para los dos herbicidas, el GR₅₀ fue mayor en las plantas obtenidas a partir de semillas (GR₅₀> 800 y 240 g i.a./ha para imazetapir y diclosulam, respectivamente) que en los clones (GR₅₀= 39±22 y 137±17 g i.a./ha para imazetapir y diclosulam, respectivamente). Esto puede explicarse considerando que, como se discutió anteriormente, las semillas son homocigotas y heterocigotas mientras que los clones son todos heterocigotas. No obstante, no puede descartarse un efecto del clonado sobre la biomasa remanente.

Herbicidas	Material vegetal	Parámetros				
		LD ₅₀	FR	GR ₅₀	FR	R ²
Imazetapir (IMI)	R3	>800	>72	>800	>210	-
	Tuc	11±3	-	3,8±0,6	-	0,99
Diclosulam (TP)	R3	>240	>20	>240	>33	-
	Tuc	12±2	-	7,3±0,8	-	0,98

Tabla 13. Parámetros de las curvas dosis-respuesta. Los valores de GR₅₀ (inhibición del crecimiento media) y LD₅₀ (dosis letal media) están expresados en g i.a./ha. Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los parámetros de LD₅₀ o GR₅₀ de las plantas con la sustitución A122S y la subpoblación Tuc. R² representa el coeficiente de determinación del ajuste utilizado.

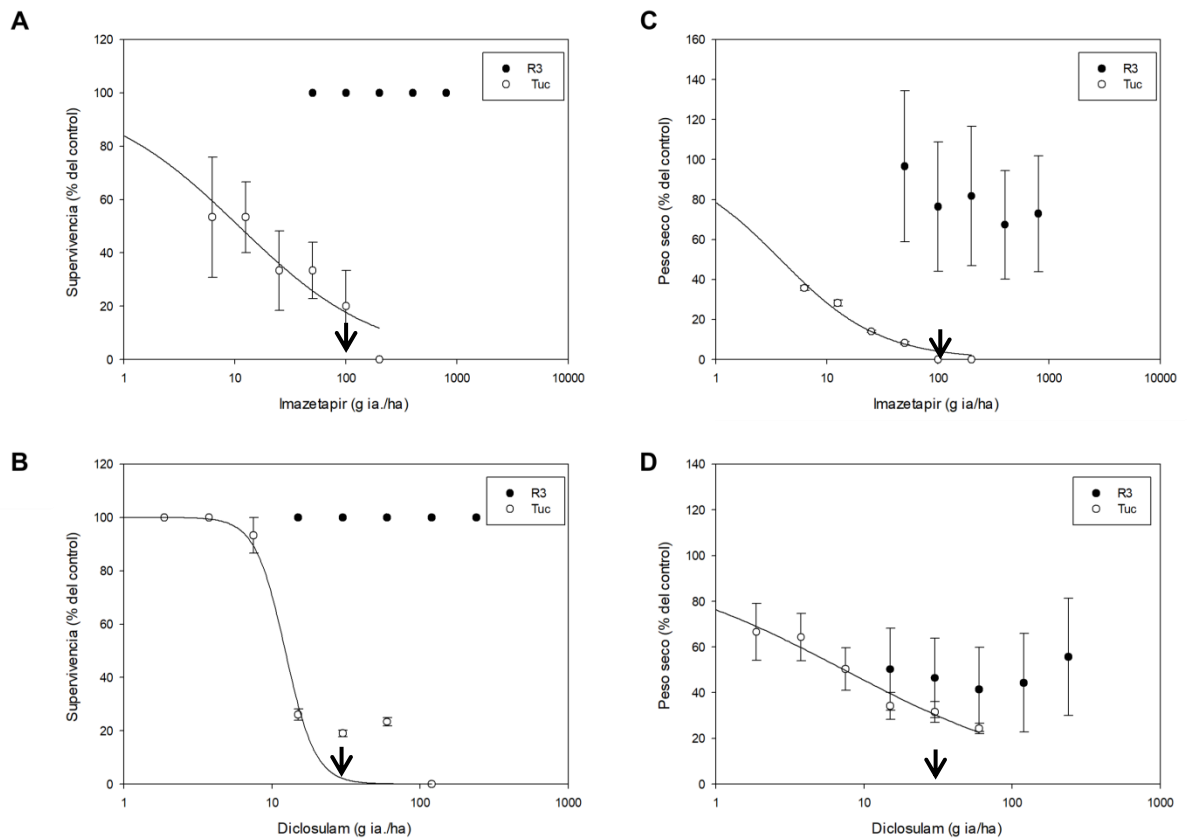


Figura 10. Curvas dosis-respuesta con inhibidores de la ALS en plantas con la sustitución A122S en la enzima ALS. Los resultados se expresan como porcentaje supervivencia (A y B) y peso seco (C y D) relativo a los controles no tratados. En algunos casos (A-D) las dosis del herbicida aplicado no provocaron una reducción sustancial de las variables en estudio, lo cual imposibilitó el ajuste de los datos a la curva paramétrica para R3. Las flechas sobre el eje x indican la dosis aplicada a campo (1X) de cada principio activo. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

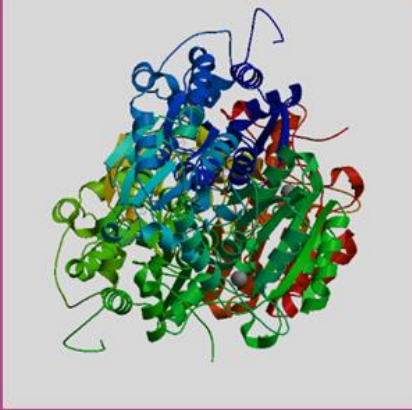
La clonación por propagación macro-vegetativa se puede utilizar para evaluar plantas durante estudios a largo plazo (Teaster y Hoagland, 2014). Esta técnica permite obtener múltiples clones que se usan como réplicas en ensayos letales y se ha empleado para el estudio de resistencia a múltiples herbicidas en distintas especies del género, así como también para caracterizar la respuesta de *A. palmeri* al stress abiótico (Ma et al., 2013; Teaster y Hoagland, 2014; Korres et al., 2017; Shergill et al., 2018). Los resultados de los ensayos *in vivo* con las plantas obtenidas a partir de semillas validaron los observados a partir de los clones; esto es, los clones portadores de la sustitución 122 mostraron resistencia a imazetapir y diclosulam, al igual que las plantas obtenidas a partir de semillas.

Esta es la primera vez que se utiliza el clonado por propagación macro-vegetativa para

el estudio del nivel de resistencia *in vivo* otorgado por distintas sustituciones en la ALS, comprobándose que es una técnica confiable.

4.4 CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en este capítulo señalan que las sustituciones A122S, D376E y A205V confieren resistencia cruzada a las familias de herbicidas de las IMI, SU y TP en *A. palmeri*. Esto coincide con lo observado en los ensayos *in vitro* de inhibición de la actividad ALS para las enzimas recombinantes con dichas sustituciones (capítulo 2). Es importante el estudio del nivel de resistencia *in vivo* que confiere cada sustitución en la enzima ALS, porque los índices *in vivo* no necesariamente se condicen con las relaciones halladas *in vitro*. Finalmente, es la primera vez que se reporta que la sustitución A205V confiere resistencia *in vivo* a diclosulam, que pertenece a la familia química de las TP y que la sustitución A122S, por primera vez descrita en plantas, proporciona resistencia cruzada a los herbicidas ensayados.



Capítulo 4

Caracterización de la resistencia a glifosato de una subpoblación de *A. palmeri* identificada en Totoras

CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A GLIFOSATO DE UNA SUBPOBLACIÓN DE *A. palmeri* IDENTIFICADA EN TOTORAS**5.1 INTRODUCCIÓN:**

El glifosato es un herbicida no selectivo, sistémico y post-emergente que controla más especies de malezas que cualquier otro herbicida conocido. Al momento de su introducción en 1974, el glifosato era relativamente costoso, lo que limitaba su uso a cultivos hortícolas de alto valor. Luego su uso comenzó a aumentar cuando apareció el principio de la “selectividad de posición”, que consistía en la aplicación de glifosato sobre los tallos y hojas de las malezas (por ejemplo: Sorgo de Alepo) al superar éstas la altura de la soja. Conforme su precio fue disminuyendo, comenzó a adoptarse en muchas otras situaciones, incluyendo el control de malezas en situaciones previas a la siembra y en barbecho.

En 1996, la introducción de la soja resistente a glifosato permitió su uso como herbicida selectivo post-emergente. En el mismo año, *L. rigidum* fue identificado como el primer caso de resistencia a glifosato reportado en una maleza. Este primer caso no tuvo relación con la introducción de cultivos resistentes a glifosato, ya que *L. rigidum* había desarrollado resistencia después de 15 años de múltiples tratamientos con glifosato en un huerto de manzanas (Pratley et al., 1999).

La efectividad del glifosato en cultivos resistentes al mismo, combinada con su amplio espectro de control a un costo relativamente bajo, condujeron a una tasa de adopción rápida en soja, maíz, algodón y canola. Desde entonces ha habido un aumento constante en el número de las especies de malezas resistentes a glifosato en todo el mundo, en gran parte debido al aumento en el uso de este químico en cultivos resistentes (Heap y Duke, 2017). Actualmente, 47 especies de malezas han desarrollado resistencia a glifosato en los cinco continentes (Heap, 2019) y en Argentina, 14 de estas especies ya han sido detectadas.

De los 163 géneros de la familia Amaranthaceae, el único género que ha desarrollado resistencia a glifosato es *Amaranthus*. Cuatro especies de este género poseen resistencia a glifosato: *A. palmeri*, *A. tuberculatus*, *A. hybridus* y *Amaranthus spinosus* L. De estas especies, la que mayor impacto económico tiene en los cultivos es *A. palmeri* (Heap y Duke, 2017).

La resistencia a glifosato en *A. palmeri* está asociada principalmente a mecanismos

de RT. La amplificación del gen *EPSPS* ha sido el mecanismo de RT más común descrito en esta especie (Gaines et al., 2010; Küpper et al., 2017). Este no posee un costo biológico para *A. palmeri* lo cual lo hace un mecanismo de resistencia a glifosato importante y generalizado (Vila-Aiub et al., 2014). También se ha encontrado la sustitución P106S en algunas poblaciones de yuyo colorado de México y Argentina (Domínguez-Valenzuela et al., 2017; Kaundun et al., 2019). Recientemente, se ha propuesto la participación de una amplificación basada en ADN circular extracromosómico como el mecanismo presente en una población de *A. palmeri* del estado de Georgia, en Estados Unidos (Koo et al., 2018).

Los mecanismos de RNT a glifosato parecen no ser relevantes en *A. palmeri*. Sin embargo, algunas poblaciones de esta especie resistentes a glifosato, recolectadas en campos de algodón, mostraron mecanismos de RNT y RT (Domínguez-Valenzuela et al., 2017). La caracterización de los escasos mecanismos de RNT detectados en el género demostró una absorción reducida y una translocación alterada del glifosato (Domínguez-Valenzuela et al., 2017; Palma-Bautista et al., 2019).

Cabe destacar, que los mecanismos de RT y RNT a glifosato pueden coexistir en una planta individual y dentro de las poblaciones de estas (Bostamam et al., 2012; Morran et al., 2018). Así, las plantas individuales y/o las poblaciones pueden ser portadoras de distintos mecanismos de RT (por ejemplo: mutación y amplificación del gen *EPSPS*) (Chen et al., 2015) y/o diferentes mecanismos de RNT (por ejemplo: absorción y translocación reducida) en simultáneo (Vila-Aiub et al., 2012).

Considerando el modelo productivo predominante en nuestro país, caracterizado por la elevada dependencia del control químico utilizando pocos herbicidas, la escasez de rotaciones y una alta proporción de la superficie agrícola bajo arrendamiento; y las características que posee *A. palmeri*, las consecuencias que puede ocasionar su presencia en los sistemas agrícolas son potencialmente peligrosas (Tuesca et al., 2016). Por consiguiente, conocer las bases moleculares de la resistencia a glifosato en las subpoblaciones de *A. palmeri* halladas en el país es relevante ya que ofrece herramientas para abordar el problema de la resistencia a través del diseño de prácticas de control más eficientes, fundamentalmente para hacer frente a subpoblaciones con resistencia múltiple.

Así, este capítulo tiene como objetivo establecer los niveles de resistencia *in vivo* a glifosato, determinar el número relativo de copias del gen *EPSPS* e identificar los alelos del gen que codifica para la enzima blanco presentes en una subpoblación de *A. palmeri* hallada en Totoras con resistencia múltiple a herbicidas del grupo B y G.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS:

5.2.1 Material vegetal

Se utilizó la subpoblación de *A. palmeri* de Totoras descrita en la sección 2.2.1 como objeto de estudio para la resistencia a glifosato. Otra subpoblación de esta maleza, colectada de un campo que nunca había sido aplicado con glifosato, se usó como control susceptible para los ensayos con dicho herbicida. Las geolocalizaciones y nomenclaturas de cada subpoblación se resumen en la Tabla 1.

Subpob.	Nombre	Coordenadas	R glifosato?	R ALS?
Totoras	Tot	32°34'59.88"S, 61°10'59.88"W	Sí	Sí
Vicuña Mackenna	VM	33°55'17.0" S 64°35'17.9" O	No	¿?

Tabla 14. Subpoblaciones de *A. palmeri* estudiadas.

5.2.2 Ensayos de dosis-respuesta

Se realizaron curvas de dosis-respuesta de las subpoblaciones de *A. palmeri* (Tot y VM). La metodología aplicada para los ensayos y el análisis de los datos fueron descritos en la sección 2.2.3. El herbicida que se utilizó fue RoundUp Full® II (sal potásica 66,2 g, equivalente ácido de glifosato 54% P/V, Monsanto). Las dosis de herbicida ensayadas fueron: 0; 0,0625X; 0,125X; 0,250X; 0,5X; 1X, 2X, 4X, 8X, 16X y 32X, siendo X= 1080 g i.a./ha.

5.2.3 Análisis de las bases moleculares de la resistencia

5.2.3.1 Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN_g a partir de tejido foliar fresco de seis plantas sobrevivientes a la dosis 1X de glifosato de la subpoblación Tot y de seis plantas no aplicadas de la subpoblación VM. Las extracciones se llevaron a cabo como se detalla en la sección 2.2.5.1.

5.2.3.2 Digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas (dCAPS)

Se utilizó una alícuota de cada muestra de ADN_g en un ensayo de dCAPS. La PCR y la digestión se llevaron a cabo como se describe en Chatham et al. (2015). Los cebadores se diseñaron para detectar mutaciones puntuales en el gen *EPSPS* que generan una sustitución en la prolina 106.

El cebador directo fue EPSdcapsF1 (5'-ATGTTGGACGCTCTCAGAACTCTTGGT-3'), mientras que el reverso fue modificado para generar especificidad para las subpoblaciones locales del género *Amaranthus* (EPSdcapsR1: 5'-TCCAGCAACGGCAACCGCAGCTGTCCATG-3'). Las digestiones se realizaron a 37°C durante toda la noche, utilizando la enzima de restricción NcoI (Promega, Cat. R6513), que reconoce y corta específicamente la secuencia C[^]CATGG presente en la secuencia de tipo salvaje. Las bandas de ADN se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6% P/V teñidos con SYBR safe (Invitrogen®, Cat. S33102), según lo descrito en la sección 4.2.2.4. Muestras de ADN previamente secuenciadas se incluyeron como controles para validar la fidelidad del test. La secuencia salvaje produce una única banda digerida de 156 pb, mientras que una mutación puntual en el tercer nucleótido codificante de la P106 produce la pérdida del sitio de restricción y la visualización de una única banda no digerida de 181 pb. Así, aquellas plantas que mostraron sólo la banda no digerida de 181 pb o ambas bandas fueron clasificadas como homocigotas y heterocigotas para sustituciones en la P106, respectivamente.

5.2.3.3 Secuenciación y análisis

Se utilizaron muestras de ADN_g como molde para la amplificación de un segmento conservado de 195 pb correspondientes al tercer exón del gen *EPSPS*, el cual contiene al codón codificante de la P106, y la secuencia lindante. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µl conteniendo: 0,2 mM mezcla de dNTPs, 0,5 µM cebadores, buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima), buffer enhancer 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 1 U de Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs New England, Cat. M0491). Se utilizaron los siguientes cebadores, previamente diseñados por Gaines et al. (2010):

EPSfwGa sentido: 5' - ATGTTGGACGCTCTCAGAACTCTTGGT - 3'

EPSrvGa antisentido: 5' - TGAATTCCTCCAGCAACGGCAA - 3'

Se realizó la amplificación del gen mediante el protocolo descrito previamente por Gaines et al. (2010): 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos compuestos por tres etapas: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 40 segundos a 72°C; y una etapa de 5 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se secuenciaron a través del servicio proporcionado por Macrogen Inc. (Corea del Sur). Las lecturas de secuenciación se alinearon con una

secuencia *EPSPS* de referencia de *A. palmeri* obtenida del NCBI (FJ861243.1). El alineamiento se realizó utilizando el algoritmo Cluster W del software Unipro Ugene v1.11.2. Todas las secuencias fueron traducidas y alineadas, para buscar sustituciones de aminoácidos.

5.2.3.4 PCR cuantitativa en tiempo real (real-time qPCR)

La amplificación en el número de copias del gen *EPSPS* se estudió mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó como gen de referencia el gen de actina de *A. palmeri*. Los cebadores que se usaron fueron los siguientes:

EPSfwGa sentido: 5´ - ATGTTGGACGCTCTCAGAACTCTTGGT - 3´

EPSrvGa antisentido: 5´ - TGAATTCCTCCAGCAACGGCAA - 3´

Actinafw sentido: 5´ - CGTGACCTGACTGATTACCTTA - 3´

Actinarv antisentido: 5´ - GCTCGTAGTTCTTCTCAATGGC - 3´

Los cebadores EPSfwGa y EPSrvGa, previamente diseñados por Gaines et al. (2010), amplifican un fragmento génico de 195 pb, como se mencionó anteriormente; y los cebadores Actinafw y Actinarv uno de 118 pb. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 13 µL, conteniendo cebadores en una concentración de 200 nM, 1X de Mezcla real (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) y 50 ng de cada ADNg. Cada muestra biológica se procesó por triplicado. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) programado de la siguiente manera: 2 minutos a 95°C; 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C. Al final del ciclado, la especificidad en la amplificación de los productos se chequeó mediante la construcción de curvas de fusión (86 ciclos de 10 segundos variando la temperatura entre 72 y 95°C, con un incremento de 0,5°C a partir del 2º ciclo). La eficiencia de la amplificación se calculó independientemente en cada reacción y se consideró para el procesamiento de los datos. Las cuantificaciones comparativas de los valores Ct (definido como el ciclo umbral a partir del cual la señal de fluorescencia se incrementa por encima del ruido durante la fase exponencial de la reacción de PCR) se hicieron con el software REST (Relative Expression Software Tool V 2.0.7 for Rotor Gene, Corbett Life Sciences) (Pfaffl et al., 2002). Los resultados se expresaron como el número de veces en el que las copias del gen *EPSPS* están incrementadas en las plantas resistentes respecto de las susceptibles. Las diferencias estadísticamente significativas fueron estimadas a través del test de aleatorización provisto por el software REST.

5.2.4 Acumulación de ácido shikímico en tejido foliar de plantas tratadas con glifosato

Se obtuvieron clones vegetativos de los individuos de interés de la subpoblación problemática, de acuerdo a la metodología detallada en la sección 4.2.3.

Se trataron clones vegetativos de la subpoblación resistente y plantas de la subpoblación susceptible, en estadio de 4-6 hojas, con 1080 g i.a./ha de glifosato (RoundUp Full® II) y se emplearon para cuantificar la acumulación de ácido shikímico en post-aplicación siguiendo la metodología de Shaner et al. (2005).

Se tomaron muestras de 0,05 g de peso fresco de la lámina foliar, de tres clones vegetativos de cada individuo de interés resistente y de tres plantas de la subpoblación susceptible a 0, 24, 48, 72 y 96 horas post-aplicación. Las muestras se colocaron en viales de 20 ml con 1 ml de fosfato monobásico de amonio 10 mM (pH 4,4) y Tween 80 0,1% V/V y se conservaron a -80°C. Posteriormente, se agregaron 250 µl de ácido sulfúrico 1,25 N a cada vial y se los incubó durante 15 min a 60°C. Los niveles de shikimato se midieron de acuerdo a Cromartie y Polge et al. (2000).

Se transfirieron 167 µl de cada vial a un tubo, se agregaron 667 µl de una solución de ácido periódico 0,25% P/V y m- periodato 0,25% P/V y se incubó a 25°C durante 90 minutos. Finalmente, se detuvo la reacción agregando 667 µl de hidróxido de sodio 0,6 N en sulfito de sodio 0,22 M y se midió la absorbancia a 380 nm en un espectrofotómetro (PerkinElmer Lambda Bio+, Waltham, Massachusetts, U.S.). La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración, utilizando concentraciones conocidas de ácido shikímico (Sigma- Aldrich, Cat. S5375). Los datos se expresaron como µg de ácido shikímico por gramo de peso fresco. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y se repitieron dos veces los experimentos.

Los datos se sometieron a un análisis de la variancia (ANOVA) bifactorial en el software SigmaPlot (versión 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) y las diferencias estadísticamente significativas se estimaron mediante el test de Holm-Sidak con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$).

5.2.5 Acumulación de ácido shikímico en discos de hojas incubados con glifosato *in vitro*

Se tomaron muestras de 0,05 g de peso fresco de la lámina foliar de tres clones vegetativos de las mismas plantas utilizadas en el ensayo anterior y de tres plantas de la

subpoblación susceptible. Las muestras se colocaron en viales de 20 ml con 1 ml de fosfato monobásico de amonio 10 mM (pH 4,4) y Tween 80 0,1% V/V. A los viales tratados se les agregó glifosato 100 μM (RoundUp Full ® II), utilizando a modo de control viales sin el agregado del herbicida. La concentración seleccionada permite distinguir, por este ensayo, plantas con diferentes grados de sensibilidad al herbicida.

Se cerraron los viales con láminas de termoplástico flexible (Parafilm®) y se incubaron a 24°C y 150 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa continua por 16 horas en una cámara de crecimiento. Posteriormente, se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección anterior para determinar los niveles de ácido shikímico acumulados en cada vial.

Los resultados se expresaron como μg de ácido shikímico por gramo de peso fresco. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento total fue llevado a cabo dos veces.

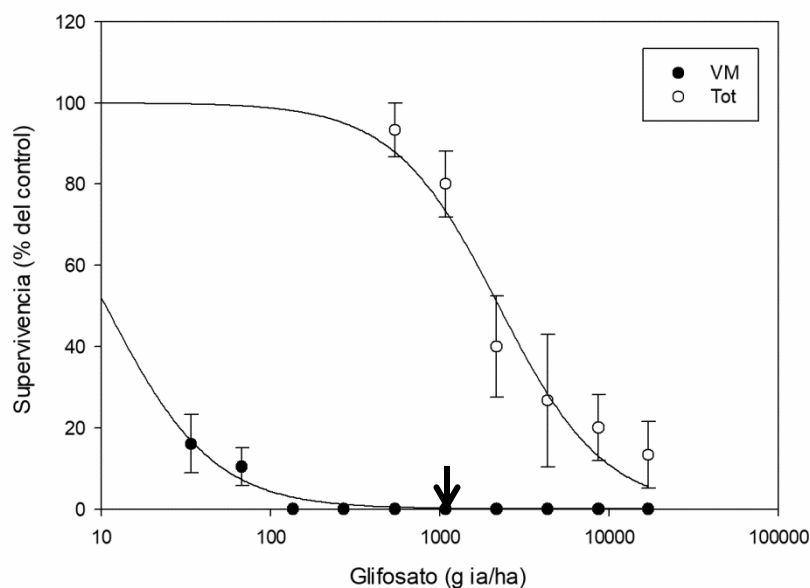
Los datos se sometieron a un ANOVA unifactorial en el software SigmaPlot (versión 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) y las diferencias estadísticamente significativas se estimaron mediante el test de Holm-Sidak con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.3.1 Niveles de resistencia a glifosato *in vivo* en la subpoblación de *A. palmeri* de Totoras

Mediante ensayos dosis-respuesta se realizó la confirmación y caracterización *in vivo* de la resistencia a glifosato para la subpoblación Tot. Las curvas dosis-respuesta indican que tanto la biomasa seca como la tasa de supervivencia en la subpoblación Tot son significativamente mayores que para la subpoblación VM cuando las plantas son expuestas a dosis crecientes de glifosato (Figura 11).

Los factores de resistencia, calculados como los cocientes entre los GR_{50} y LD_{50} de la subpoblación resistente versus la susceptible, fueron 45 y 222,3, respectivamente (Tabla 15), indicando altos niveles de resistencia a glifosato en esta subpoblación. Es importante resaltar que la subpoblación VM fue marcadamente susceptible a glifosato ($LD_{50} = 10 \pm 3$ g i.a./ha y $GR_{50} = 28 \pm 5$ g i.a./ha, Tabla 15) en comparación a otras poblaciones susceptibles de la especie (Palma-Bautista et al., 2019; Küpper et al., 2017), produciendo así altos FR que podrían estar sobrestimando el nivel de resistencia de la subpoblación Tot. Sin embargo, no hay dudas de que la subpoblación Tot resulta realmente resistente teniendo en cuenta que ni siquiera una dosis 2X es suficiente para controlar el 50% de la subpoblación. Así, estos altos niveles de resistencia podrían contribuir al enriquecimiento de este biotipo en el banco de semillas en condiciones de sobreuso de glifosato.



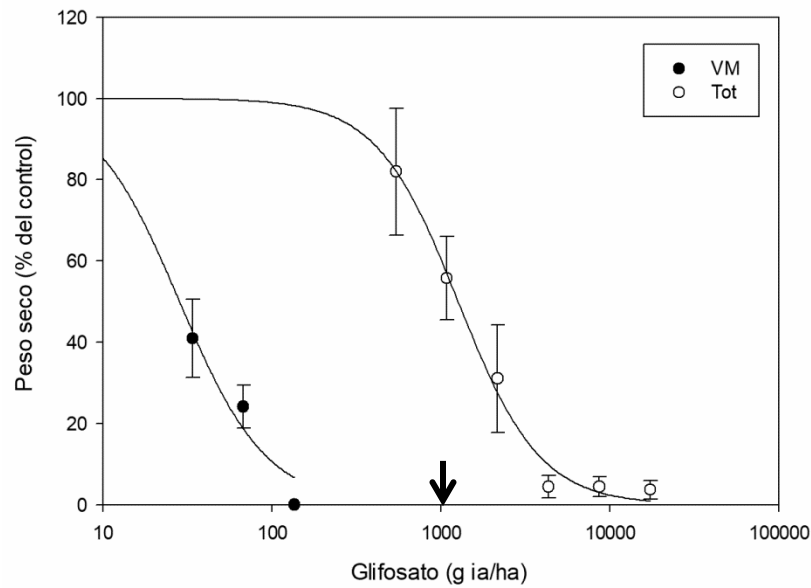


Figura 11. Efecto del glifosato sobre la supervivencia y biomasa de la subpoblación Tot. Las plantas de las subpoblaciones Tot y VM fueron sometidas a la aplicación de dosis crecientes de glifosato. Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia (gráfico superior) y peso seco (gráfico inferior) respecto de los grupos controles no tratados. Las flechas sobre el eje x indican la dosis aplicada a campo (1X) de glifosato. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media.

Subpoblación	Peso seco			Supervivencia		
	GR ₅₀	FR	R ²	LD ₅₀	FR	R ²
Tot	1260±63*	45	0,99	2223±303*	222,3	0,96
VM	28±5	-	0,98	10±3	-	0,99

Tabla 15. Respuesta a glifosato de las subpoblaciones Tot y VM. Parámetros de las curvas de dosis-respuesta. Los valores de GR₅₀ (inhibición del crecimiento media) y LD₅₀ (dosis letal media) están expresados en g i.a./ha. Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los parámetros de GR₅₀ y LD₅₀ de la subpoblación Tot respecto de la subpoblación VM. R² representa el coeficiente de determinación del ajuste utilizado. Los * indican diferencias estadísticamente significativas entre las subpoblaciones ensayadas (prueba t-Student, p<0,05).

Con respecto al LD₅₀ de la subpoblación Tot, éste se asemeja al de poblaciones de *A. palmeri* colectadas en México (LD₅₀ entre 948±62 - 1722±167 g i.a./ha) (Domínguez-Valenzuela et al., 2017) y en la provincia de Córdoba de nuestro país (LD₅₀: 1934 g i.a./ha) (Palma-Bautista et al., 2019). No obstante, la dosis letal media (LD₅₀) de la subpoblación en estudio resultó menor que la de una población de *A. palmeri* (LD₅₀:3982±310 g i.a./ha) reportada en Brasil (Küpper et al., 2017) pero mayor a la de otra población encontrada en Vicuña Mackenna, Argentina (LD₅₀: 1102 g i.a./ha) (Kaundun et al., 2019).

Los mecanismos de resistencia asociados a estas poblaciones son: una sustitución de la prolina en la posición 106 por serina, absorción y translocación reducida, para la población de México (Domínguez-Valenzuela et al., 2017); absorción y translocación reducida, para la población de Córdoba (Palma-Bautista et al., 2019); aumento del número de copias del gen *EPSPS* (elevado, entre 50 - 179 copias del gen), en la de Brasil (Küpper et al., 2017); y sustitución P106S en la *EPSPS* y aumento del número de copias del gen (1,8 copias), en la de Vicuña Mackenna (Kaundun et al., 2019).

5.3.2 Bases moleculares de la resistencia a glifosato

Para abordar los dos mecanismos de resistencia asociados al sitio de acción mayoritariamente reportados para especies del género, se evaluó la presencia de sustituciones en la P106 y se determinó el número de copias del gen *EPSPS* mediante las técnicas dCAPS y qPCR, respectivamente.

En la subpoblación Tot, se encontraron plantas homocigotas para la sustitución P106S y plantas homocigotas para la secuencia salvaje, es decir, sin ninguna sustitución en la posición 106. En el gel de la Figura 12 se pueden observar, a modo de ejemplo, los diferentes patrones de digestión obtenidos en la subpoblación Tot. Estos resultados fueron confirmados por secuenciación parcial del gen *EPSPS*. La no detección de plantas heterocigotas en la subpoblación Tot se atribuye al bajo número de individuos evaluados.

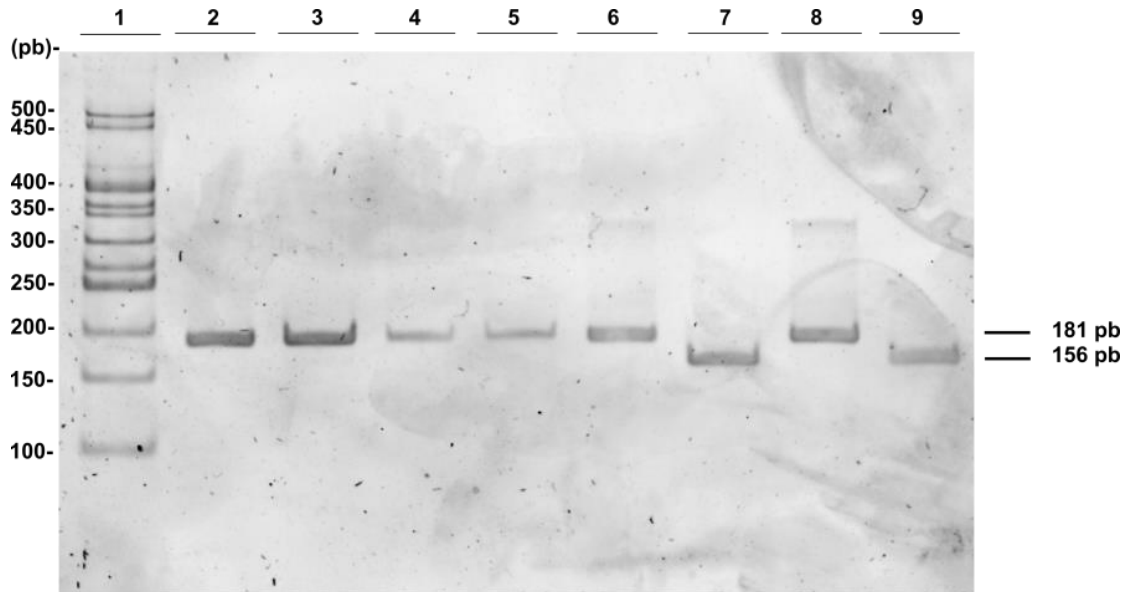


Figura 12. Presencia de la sustitución P106S en la EPSPS de la subpoblación Tot. Ensayo de dCAPS desarrollado para la sustitución P106 en la EPSPS de *A. palmeri*. Gel de poliacrilamida 6% P/V teñido con SYBR safe. Calle 1: Marcador de peso molecular 50 pb (Inbio). Calle 2-6: plantas de la subpoblación Tot homocigotas para la sustitución P106S. Calle 7: planta de la subpoblación Tot homocigota para la secuencia salvaje. Calle 8 y 9: ADNs control de muestras secuenciadas de *A. palmeri* homocigotas para P106S y homocigotas salvaje, respectivamente. La secuencia salvaje (Wt) produce una banda única digerida de 156 pb, mientras que la mutante es insensible a la digestión y produce una banda no digerida de 181 pb.

En relación al número de copias del gen *EPSPS*, los resultados se expresaron como el número de copias del gen *EPSPS* en las plantas resistentes relativo al de las susceptibles, no observándose diferencias significativas (Figura 13).

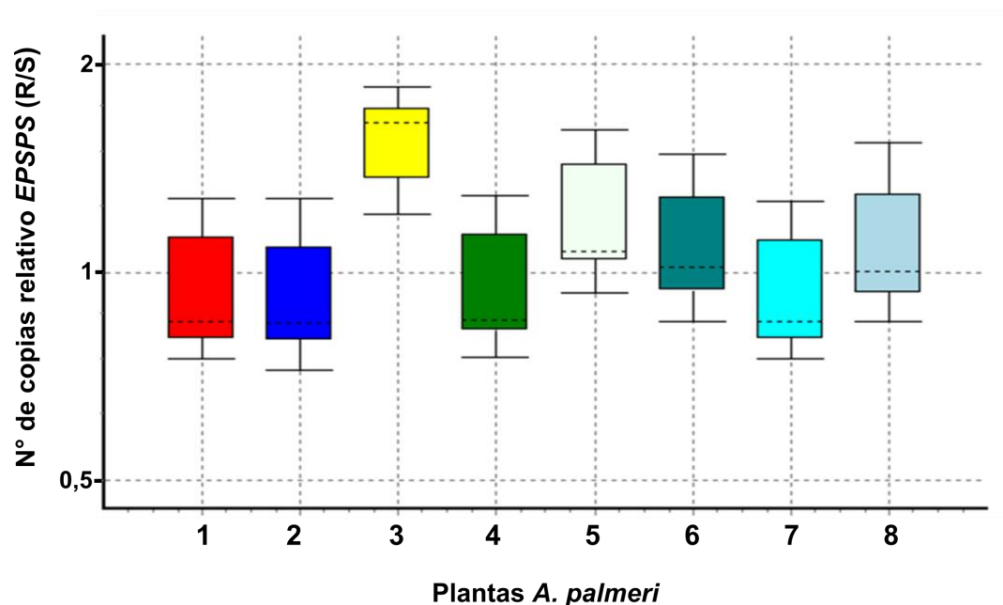


Figura 13. Número de copias del gen *EPSPS* de la subpoblación Tot respecto a la subpoblación VM. El número relativo de copias del gen *EPSPS* fue determinado por PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados fueron normalizados utilizando las determinaciones de las muestras VM como referencia. Las barras verticales representan el error estándar de la media.

De acuerdo a estos resultados, el mecanismo de resistencia a glifosato de la subpoblación Tot estaría asociado al sitio de acción y se debería a la sustitución en la posición 106 de una prolina por una serina en la *EPSPS*. Como se mencionó anteriormente, esta mutación puntual es conocida por conferir resistencia a glifosato en *A. palmeri* (Domínguez-Valenzuela et al. 2017; Kaundun et al., 2019) y en otras especies de malezas (Baerson et al., 2002; Gonzalez-Torralva et al. 2012; Nandula et al. 2013; Yu et al., 2015; Takano et al., 2019). No obstante, las diversas sustituciones de P106 en *EPSPS* confieren solo resistencia a glifosato en bajo nivel tanto a nivel enzimático como a nivel planta (Sammons y Gaines, 2014).

La sustitución P106S causa un pequeño cambio estructural en el sitio activo de la *EPSPS* pero no afecta sus parámetros cinéticos (K_m y $V_{máx}$) (Baerson et al., 2002; Yu et al., 2015), explicando la ausencia de un costo biológico asociado (Vila-Aiub et al., 2019).

Debido a que la sustitución de P106S proporciona bajos niveles de resistencia en malezas (Alarcón-Reverte et al., 2013; Yu et al., 2015; Takano et al., 2019), el significativamente mayor LD_{50} de la subpoblación en estudio (2223 ± 303 g i.a./ha) sugiere que algún mecanismo no asociado al sitio de acción estaría contribuyendo a la resistencia. Consistentemente con esta hipótesis, en la subpoblación en estudio se encontraron también individuos resistentes a glifosato sin la sustitución P106S en la *EPSPS*.

5.3.3 Análisis comparativo de la acumulación de ácido shikímico por aplicación de glifosato *in planta* versus aplicación en disco de hojas

El efecto del glifosato en el metabolismo de la planta se traduce en la inhibición de la acción de la enzima blanco por competir con el PEP por el sitio activo a la EPSPS. La inhibición de la EPSPS, enzima clave en la vía del shikimato, reduce la regulación por retroalimentación negativa de la vía, lo cual resulta en un aumento en el flujo de carbono a shikimato-3-fosfato, que luego se convierte en altos niveles de ácido shikímico (Duke y Powles, 2008).

Se estudió la acumulación de ácido shikímico en tejido foliar de plantas tratadas con glifosato y en hojas incubadas con este herbicida *in vitro*. Cuando la aplicación del glifosato se realiza *in vitro* las plantas son abstraídas del proceso de absorción y penetración normal del herbicida que realizan, forzando la entrada masiva del mismo a través de los bordes del disco de hoja. En contraste, cuando son aplicadas con glifosato *in planta*, la penetración del herbicida ocurre a nivel de la cutícula foliar únicamente. Así, el análisis comparativo de los perfiles de acumulación de ácido shikímico en cada condición experimental permitiría detectar un mecanismo de resistencia causado por una absorción foliar reducida del herbicida, ya que el mismo resulta salteado en la condición de aplicación *in vitro*, eliminando su contribución. Asimismo, una resistencia debida a la translocación reducida del herbicida hacia los tejidos meristemáticos no estaría contribuyendo en los ensayos *in vitro*. En cambio, por ejemplo, una RNT producida por un metabolismo aumentado sería contemplada en ambos tipos de ensayos.

Se obtuvieron clones vegetativos de los individuos con y sin la sustitución P106S en la enzima de la subpoblación problemática para utilizar el mismo material en los dos ensayos y comparar la acumulación de ácido shikímico en hoja por aplicación del glifosato *in planta* versus la aplicación *in vitro*.

Los niveles de ácido shikímico detectados en hoja luego del tratamiento *in planta* con glifosato fueron distintos entre las plantas de las subpoblaciones resistente y susceptible (Figura 14). A las 24 horas post-aplicación, se detectó una mayor acumulación de ácido shikímico en las plantas de la subpoblación VM con respecto a las plantas de la subpoblación Tot, coherentemente con el grado de susceptibilidad de cada subpoblación. Esta diferencia se incrementó a 96 horas post-aplicación. Paralelamente, todas las plantas de la subpoblación Tot tuvieron el mismo comportamiento luego de la aplicación de glifosato *in planta*, independientemente de la presencia/ausencia de la mutación P106S.

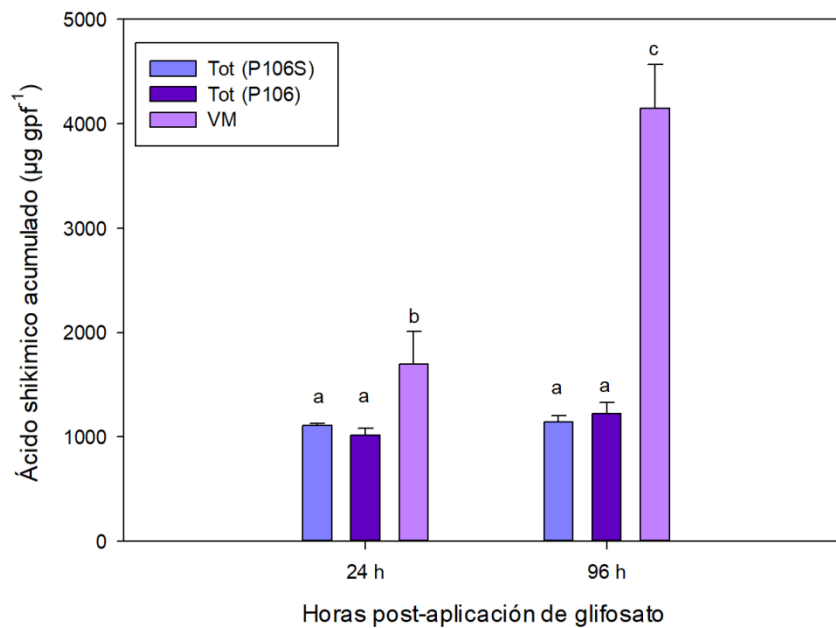


Figura 14. Acumulación de ácido shikímico en hojas de plantas de las subpoblaciones susceptible (VM) y resistente (Tot) a 24 y 96 horas post-aplicación de 1080 g i.a./ha de glifosato. Los valores se expresan en μg de ácido shikímico por gramo de peso fresco de tejido. Se representan los valores medios \pm el error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las plantas con distintos genotipos y las horas post-aplicación ($p < 0,05$).

Cuando los discos hojas de los individuos analizados fueron incubados con glifosato $100 \mu\text{M}$ *in vitro* durante 16 horas se detectaron diferencias en los niveles de ácido shikímico acumulados entre las plantas de las distintas subpoblaciones (resistente y susceptible), así como también entre las plantas de la subpoblación Tot con diferentes genotipos (Figura 15).

Las plantas con la sustitución P106S en la EPSPS acumularon una menor cantidad de ácido shikímico que las plantas susceptibles y los clones vegetativos de la subpoblación Tot sin la sustitución P106 en la enzima. Mientras que estos últimos acumularon igual cantidad de ácido shikímico que las plantas susceptibles. Resultados similares, con respecto a la diferencia en acumulación de ácido shikímico entre las poblaciones resistentes y susceptibles, se han observado en otras especies de malezas tales como *A. tuberculatus* (Nandula et al., 2013) y *E. indica* (Takano et al., 2019).

Debido a que la acumulación de ácido shikímico es normalmente proporcional a la inhibición de la EPSPS, una acumulación menor de este en las plantas con la sustitución P106S, demuestra una vez más que esta sustitución le confiere resistencia a la enzima a glifosato. Por el contrario, las plantas resistentes sin la mutación parecen comportarse de manera similar a las plantas sensibles en este ensayo, dado que ambas contienen una

isoforma de EPSPS salvaje. Esto indica que el mecanismo de RNT presente en estas plantas no está operando en las condiciones del ensayo en discos.

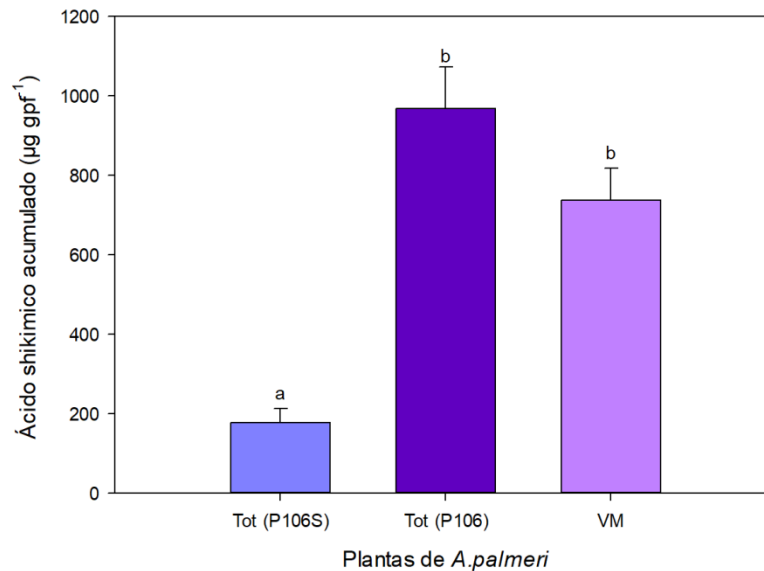


Figura 15. Acumulación de shikimato en hojas de plantas de las subpoblaciones susceptible (VM) y resistente Tot por aplicación de glifosato *in vitro*. Los valores se expresan en µg de ácido shikímico por gramo de peso fresco de tejido. Las barras verticales representan el error estándar de la media. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los individuos analizados ($p < 0,05$).

En otras palabras, las plantas sin la sustitución P106S acumulan 3,4 veces menos ácido shikímico que la subpoblación VM cuando la aplicación de glifosato es *in planta* y no muestran diferencias en la acumulación del metabolito cuando la aplicación es *in vitro* (Tabla 16).

Individuos	Aplicación de glifosato <i>in planta</i>		Aplicación de glifosato <i>in vitro</i>	
	µg de ácido shikímico/ gpf	Ratio SG/RG	µg de ácido shikímico/ gpf	Ratio SG/RG
Tot (P106S)	1139±66	3,6	177±35	4,2
Tot (P106)	1225±105	3,4	968±104	0,8
VM	4150±418	-	737±6	-

Tabla 16. Acumulación de ácido shikímico en individuos de las subpoblaciones Tot y VM. Ensayo de acumulación de ácido shikímico mediante aplicación de glifosato *in planta* 96 post-aplicación vs *in vitro*. Promedio de ácido shikímico acumulado de tres clones de cada individuo ± error estándar. Las medidas se realizaron por duplicado y el experimento se realizó dos veces. SG: plantas susceptibles a glifosato (VM). RG: plantas resistentes a glifosato (Tot P106S y P106).

El comportamiento de las plantas con la sustitución P106S es el mismo que se observó en una población de *E. indica* con un mecanismo de RT asociado a la sustitución P106S en la EPSPS. En esa población la relación de ácido shikímico acumulado respecto a la población sensible fue la misma para los ensayos de acumulación de ácido shikímico con aplicación de glifosato *in planta* e *in vitro* (Takano et al., 2019).

De manera similar a nuestros resultados, una acumulación de ácido shikímico diferencial en función del genotipo fue observada en discos de hoja de poblaciones de *A. palmeri* con la sustitución P106S en EPSPS o una absorción y translocación reducida de glifosato. Esto es, las poblaciones con una absorción y translocación reducida acumularon una mayor cantidad de shikimato que las que tienen la sustitución P106S (Domínguez-Valenzuela et al., 2017), pero menos que la población sensible.

La evidencia hasta aquí descrita señala que el mecanismo de resistencia de las plantas sin la sustitución P106S en la enzima podría deberse a una absorción y/o translocación reducida, en línea con lo reportado recientemente para otras poblaciones de *A. palmeri* de nuestro país (Palma-Bautista et al., 2019).

Estos resultados demuestran que la resistencia a glifosato de la subpoblación Tot está asociada a mecanismos de RT y RNT. La resistencia a glifosato debido a la coexistencia de estos mecanismos, ya se ha reportado en *A. palmeri* (Domínguez-Valenzuela et al., 2017). Futuros experimentos son necesarios para confirmar el mecanismo de RNT propuesto y conocer sus bases bioquímicas y fisiológicas.

5.4 CONCLUSIONES:

Los resultados presentados en este capítulo confirman la resistencia a glifosato de la subpoblación de *A. palmeri* de Totoras. Esto disminuye aún más las opciones químicas para el control del yuyo colorado en las zonas rurales de dicha localidad, ya que esta subpoblación posee también resistencia cruzada a los inhibidores de la ALS, como se describió en el capítulo 1.

La caracterización molecular de la resistencia indica que la subpoblación posee mecanismos de RT y RNT. El mecanismo de RT está asociado a una mutación puntual en el gen *EPSPS* (P106S) que reduce la sensibilidad de la enzima por el glifosato y el mecanismo de RNT podría deberse a una absorción y/o translocación reducida del herbicida, puesto que en individuos sin la sustitución P106S se observaron diferencias en la acumulación de ácido shikímico cuando la aplicación de glifosato fue *in planta* versus *in vitro*.

Futuros experimentos permitirán conocer en profundidad las bases bioquímicas y fisiológicas del mecanismo de RNT presente en esta subpoblación. Estos resultados representan el primer reporte de una población de *A. palmeri* en Argentina con presencia simultánea de mecanismos de RT y RNT a glifosato.

6. CONCLUSIONES GENERALES:

CAPÍTULO 1

- Se confirmó y cuantificó la resistencia cruzada en una subpoblación (Tot) de *Amaranthus palmeri* a tres familias químicas de herbicidas inhibidores de la ALS.
- Se determinó que la resistencia a inhibidores de la ALS de la subpoblación Tot se debe a un mecanismo asociado al sitio de acción, de mutación de punto en la secuencia codificante del gen ALS.
- Se identificaron dos sustituciones de aminoácidos (W574L y S653N) en la enzima ALS previamente reportadas en la especie y cuatro sustituciones (A122S, A282D, D376E y A205V) detectadas por primera vez en *A. palmeri* en este trabajo de tesis.

CAPÍTULO 2

- Se logró la expresión heteróloga en *E. coli* de las 7 versiones de ALS presentes en la subpoblación Tot y la caracterización de sus parámetros cinéticos, así como también la cuantificación de la inhibición producida por cada herbicida. Es la primera vez que se estudia la cinética de enzima ALS de *A. palmeri*
- Se observó una disminución de la $V_{m\acute{a}x}$ de las enzimas R1 (D376E), R2 (A205V), R3 (A122S-A282D) y R6 (S653N). En las enzimas R2 y R5 (W574L) se determinó una K_m mayor a la de la enzima salvaje, indicando una menor afinidad de las enzimas mutantes por el sustrato.
- La sustitución A282D en la enzima R4 no afectó sus parámetros cinéticos ni la respuesta inhibitoria, descartándose su contribución al fenotipo de resistencia.
- Las sustituciones A205V, A122S, W574L y S653N afectaron considerablemente la eficiencia catalítica de las enzimas R2, R3, R5 y R6, respectivamente. La menor eficiencia catalítica de estas enzimas podría tener un costo biológico en las plantas resistentes.
- Todas las isoformas “resistentes” presentaron menor susceptibilidad frente a imazetapir (IMI), clorimurón-etil (SU), diclosulam (TP) y flucarbazona de sodio (SCT), a excepción de la enzima R6 que fue susceptible a diclosulam.
- Las enzimas R presentaron diferentes perfiles de inhibición relativos a la isoforma salvaje, siendo la mutación W574L presente en R5 la menos susceptible a todos los herbicidas ensayados.

- Es la primera vez que se informa que la sustitución A205V proporciona menor susceptibilidad *in vitro* a las familias de herbicidas TP y SCT y que la sustitución A122S es de amplio espectro.

CAPÍTULO 3

- Se logró seleccionar individuos con sustituciones exclusivas en la enzima ALS y determinar el nivel de resistencia *in vivo* conferido por las mutaciones D376E, A205V y A122S en *A. palmeri*.
- Las tres mutaciones en el gen ALS confieren resistencia cruzada a herbicidas de tres familias químicas: IMI, SU y TP. Esto demostró que la menor capacidad inhibitoria conferida por las sustituciones en la enzima ALS halladas por primera vez en esta especie es suficiente para conferir un nivel notable de resistencia en las plantas.

CAPÍTULO 4

- Se confirmó la resistencia a glifosato de la subpoblación Tot. La caracterización molecular de la resistencia indica que la subpoblación posee mecanismos de RT y RNT.
- El mecanismo de RT está asociado a una mutación puntual en el gen *EPSPS* (P106S) que reduce la sensibilidad de la enzima por el glifosato y el mecanismo de RNT podría deberse a una absorción y/o translocación reducida del herbicida. No obstante, futuros experimentos son necesarios para confirmarlo.

Por lo antes mencionado, en relación a las hipótesis planteadas inicialmente se puede concluir que:

- La hipótesis “*la resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS (herbicidas del grupo B) de las plantas de *Amaranthus palmeri* halladas en la localidad de Totoras se debe a un mecanismo target de mutación de punto sobre el gen ALS*” **es aceptada**.

En la subpoblación Tot se encontraron múltiples alelos del gen *ALS* que confieren resistencia a diferentes herbicidas en distintos niveles, *in vitro* e *in vivo*.

- La hipótesis “*la resistencia a glifosato (herbicida del grupo G) de las plantas de *Amaranthus palmeri* halladas en la localidad de Totoras se debe a un mecanismo target de amplificación del número de copias del gen *EPSPS**” **es rechazada**.

Los individuos de la subpoblación analizados no poseen un mayor número de copias del gen *EPSPS* respecto a la subpoblación susceptible. El principal mecanismo de

resistencia de la subpoblación Tot está asociado al sitio de acción, pero se debe a una mutación puntual en el gen *EPSPS* (P106S), a diferencia de lo reportado para la mayoría de las poblaciones de la especie, antecedentes sobre los que se apoyó la hipótesis. Hay indicios de que una absorción y/o translocación reducida del herbicida podría ser el mecanismo de RNT involucrado; sin embargo, futuros experimentos son necesarios para comprobar esto.

Finalmente, en este trabajo de tesis se confirmó que la subpoblación de *A. palmeri* hallada en Totoras tiene resistencia múltiple a los inhibidores de la ALS y glifosato y se dilucidaron las bases moleculares que explican el fenotipo de resistencia a estos herbicidas. Para los dos herbicidas la resistencia está principalmente asociada a un mecanismo de RT (sustitución de punto en enzima blanco) y para glifosato también un mecanismo de RNT está implicado. En esta investigación se encontró por primera vez en plantas la sustitución A122S en la enzima ALS. Se caracterizó la cinética y determinó el patrón de resistencia (*in vitro* e *in vivo*) de esta nueva mutación, así como también se realizó con las demás versiones de la ALS de *A. palmeri*. El cambio de aminoácidos A122S confiere resistencia de amplio espectro a los inhibidores de la ALS. Sin embargo, afecta la eficiencia catalítica de la enzima, lo cual podría tener un costo biológico. Futuros experimentos son necesarios para determinar si el mecanismo de RNT involucrado en la resistencia a glifosato es una absorción y/o translocación reducida del herbicida y establecer si la mutación A122S en el gen *ALS* tiene asociado un costo biológico.

La caracterización de los mecanismos de resistencia resulta clave para la toma de decisiones acerca de las estrategias que se incluyen en un programa de manejo. En este sentido, la presencia de diferentes sustituciones que confieren resistencia de amplio espectro a inhibidores de la ALS y de la sustitución P106S en la enzima *EPSPS* junto a otro mecanismo de RNT que proporcionan alta resistencia a glifosato podría alertar sobre la ineficacia del control de esta especie de *Amaranthus* sólo con herbicidas de los grupos B y G en Argentina. Además, la presencia de mecanismos de RNT plantea una seria amenaza para el manejo de esta maleza con otros modos de acción. Consecuentemente, estrategias que impliquen la rotación de mezclas de herbicidas con diferentes modos de acción en complementación con prácticas de control no químicas (como la labranza, el uso de cultivos de cobertura y desmalezado manual o mecánico), podrían ser específicamente diseñadas para cada región bajo el soporte de estudios basados en evidencia científica.

7. BIBLIOGRAFÍA:

- Alarcón-Reverte R, García A, Urzúa J, Fischer AJ (2013) Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. *Weed Sci.* 61: 48-54.
- Alcántara-de la Cruz R, Fernández-Moreno PT, Ozuna CV, Rojano-Delgado AM, Cruz-Hipolito HE, Domínguez-Valenzuela JA, Barro F, De Prado R (2016) Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. *Front. Plant Sci.* 7: 1492.
- Anderson WP (1996) *Weed science: principles and applications*. Third edition. West Pub. Co. (Ed.). St. Paul., pp. 388.
- Ashigh J, Corbett CAL, Smith PJ, Laplante J, Tardif FJ (2009) Characterization and diagnostic tests of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors due to an Asp376Glu substitution in *Amaranthus powellii*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 95: 38-46.
- Ashigh J, Tardif FJ (2007) An Ala 205 Val substitution in acetohydroxyacid synthase of Eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) reduces sensitivity to herbicides and feedback inhibition. *Weed Sci.* 55: 558-565.
- Ashigh J, Tardif FJ (2009) An amino acid substitution at position 205 of acetohydroxyacid synthase reduces fitness under optimal light in resistant populations of *Solanum ptychanthum*. *Weed Res.* 49: 479-489.
- Baerson SR, Rodriguez DJ, Tran M, Feng Y, Biest NA, Dill GM (2002) Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol.* 129: 1265-1275.
- Bascomb NF, Gutteridge S, Smith JK, Leto KJ (1987) Import of *in vitro* synthesized acetolactate synthase into isolated pea-chloroplasts. *J Cell Biochem.*, pp. 88-88.
- Bastida F, Menéndez J (2001) Producción integrada y manejo integrado de malas hierbas. *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*, pp. 307–316.
- Baylis A (2000) Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag. Sci.* 56: 299-308.
- Beckie HJ, Tardif FJ (2012) Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Prot.* 35:15-28.
- Berger S, Madeira PT, Ferrell J, Gettys L, Morichetti S, Cantero JJ, Nuñez C (2016) Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) identification and documentation of ALS-resistance in Argentina. *Weed Sci.* 64: 312-320.
- Bernasconi P, Woodworth AR, Rosen BA, Subramanian MV, Siehl LD (1995) A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *J. Biol. Chem.* 270: 17381-17385.

- Black CC, Chen TM, Brown RH (1969) Biochemical basis for plant competition. *Weed Sci.* 17: 338-344.
- Bollag DM, Edelman SJ (1991) *Protein Methods*. Wiley-Liss Inc., Nueva York, pp. 229.
- Bostamam Y, Malone J, Dolman FC, Boutsalis P, Preston C (2012) Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations containing a target site mutation in EPSPS and reduced glyphosate translocation are more resistant to glyphosate. *Weed Technol.* 60: 474-479.
- Brosnan JT, Vargas JJ, Breeden GK, Grier L, Aponte RA, Tresch S, Laforest M (2016) A new amino acid substitution (Ala-205-Phe) in acetolactate synthase (ALS) confers broad spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Planta* 243: 149-159.
- Burgos NR, Kuk YI, Talbert RE (2001) *Amaranthus palmeri* resistance and differential tolerance of *Amaranthus palmeri* and *Amaranthus hybridus* to ALS-inhibitor herbicides. *Pest Manag. Sci.* 57: 449-457.
- Busi R, Yu Q, Barrett-Lennard R, Powles SB (2008) Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. *Theor. Appl. Genet.* 117: 1281-1290.
- Chang AK, Duggleby RG (1997) Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochem. J* 327: 161-169.
- Chang AK, Duggleby RG (1998) Herbicide-resistant forms of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase: characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. *Biochem. J.* 333: 765-777.
- Chatham LA, Wu C, Riggins WC, Hager AG, Young BG, Roskamp GK, Tranel PJ (2015) EPSPS gene amplification is present in the majority of glyphosate-resistant Illinois waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. *Weed Technol.* 29: 48-55.
- Chen J, Huang H, Zhang C, Wei S, Huang Z, Chen J, Wang X (2015) Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta* 242: 859-869.
- Christoffers MJ, Nandula VK, Howatt KA, Wehking TR (2006) Target-site resistance to acetolactate synthase inhibitors in wild mustard (*Sinapis arvensis*). *Weed Sci.* 54: 191-197.
- Christopher JT, Preston C, Powles SB (1994) Malathion antagonizes metabolism based chlorsulfuron resistance in *Lolium rigidum*. *Pest. Biochem. Physiol.* 49: 172-182.
- Cole D (1985) Mode of action of glyphosate—a literature analysis. En: “The herbicide glyphosate”. Grossbard, E.; Atkinson, D. (Eds.). Londres. Butterworth, pp. 490.
- Cousens R, Mortimer AM (1995) *Dynamics of Weed Populations*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cromartie TH, Polge ND (2000) An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. *Proc. Weed Sci. Soc Am* 40: 291.

- Cross RB, McCarty LB, McElroy JS, Tharayil N, Bridges WC (2015) Comparison of enzyme and growth characteristics in ALS-inhibitor susceptible and resistant annual bluegrass (*Poa annua*) biotypes. *Weed Sci.* 63: 220-228.
- Culpepper AS, Grey TL, Vencill WK, Kichler JM, Webster TM, Brown SM, York AC, Davis JW, Hanna WW (2006) Glyphosate resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Sci.* 54: 620-626.
- Dayan FE, Owens DK, Corniani N, Silva FML, Watson SB, Howell J, Shaner DL (2015) Biochemical Markers and Enzyme Assays for Herbicide Mode of Action and Resistance Studies. *Weed Sci.* 63: 23-63.
- Della-Cioppa G, Bauer SC, Klein BK, Shah DM, Fraley RT, Kishore GM (1986) Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 6873-6877.
- Délye C, Duhoux A, Pernin F, Riggins CW, Tranel PJ (2015) Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Sci.* 63: 91-115.
- Délye C, Jasieniuk M, Le Corre V (2013) Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends Genet.* 29: 649-658.
- Délye C, Pernin F, Scarabel L (2011) Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Sci.* 180: 333-342.
- Deng W, Yang Q, Zhang Y, Jiao H, Mei Y, Li X, Zheng M (2017). Cross-resistance patterns to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides of flixweed (*Descurainia sophia* L.) conferred by different combinations of ALS isozymes with a Pro-197-Thr mutation or a novel Trp-574-Leu mutation. *Pestic Biochem Phys.* 136: 41-45.
- Díez de Ulzurrun P (2013) Manejo de malezas problema. Modos de acción de herbicida. Red de conocimiento en malezas resistentes, ISSN N° 2250-5350.
- Domínguez-Valenzuela JA, Gherekhloo J, Fernández-Moreno PT, Cruz-Hipolito HE, Alcántara-de la Cruz R, Sánchez-González E, De Padro R (2017) First confirmation and characterization of target and non-target site resistance to glyphosate in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) from Mexico. *Plant Physiol. Biochem.* 115: 212-218.
- Duggleby RG, McCourt JA, Guddat LW (2008) Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 309-324.
- Duggleby RG, Pang SS (2000) Acetohydroxyacid synthase. *BMB Rep.* 33: 1-36.
- Duhoux A, Carrère S, Gouzy J, Bonin L, Délye C (2015) RNA-Seq analysis of rye-grass transcriptomic response to an herbicide inhibiting acetolactate-synthase identifies transcripts linked to non-target-site-based resistance. *Plant Mol. Biol.* 87: 473-487.

- Duke SO, Powles SB (2008) Glyphosate: A once in a century herbicide. *Pest Manag Sci.* 64: 319-325.
- Durner J, Gailus V, Böger P (1991) New aspects on inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. *Plant Physiol.* 95: 1144-1149.
- Falco SC, McDevitt RE, Chui CF, Hartnett ME, Knowlton S, Mauvais CJ, Smith JK, Mazur BJ (1989) Engineering herbicide-resistant acetolactate synthase. *Dev. Ind. Microbiol.* 30: 187-194.
- Ferguson GM, Hamill AS, Tardif FJ (2001) ALS inhibitor resistance in populations of Powell amaranth and redroot pigweed. *Weed Sci.* 49: 448-453.
- Foes MJ, Liu L, Tranel PJ, Wax LM, Stoller EW (1998) A biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistant to triazine and ALS herbicides. *Weed Sci.* 46: 514-520.
- Forlani G, Mantelli M, Nielsen E (1999) Biochemical evidence for multiple acetoin forming enzymes in cultured plant cells Part 1 in the series "Acetoin Synthesis in Higher Plants". *Phytochemistry* 50: 255-262.
- Forlani G, Nielsen E, Landi P, Tuberosa R (1991) Chlorsulfuron tolerance and acetolactate synthase activity in corn (*Zea mays* L.) inbred lines. *Weed Sci.* 39: 553-557.
- Franssen AS, Skinner DZ, Al-Khatib K, Horak MJ, Kulakow PA (2001) Interspecific hybridization and gene flow of ALS resistance in *Amaranthus* species. *Weed Sci.* 49: 598-606.
- Gaines TA, Ward SM, Bukun B, Preston C, Leach JE, Westra P (2012) Interspecific hybridization transfers a previously unknown glyphosate resistance mechanism in *Amaranthus* species. *Evol. Appl.* 5: 29-38.
- Gaines TA, Zhang W, Wang D, Bukun B, Chisholm ST, Shaner DL, Nissen SJ, Patzoldt WL, Tranel PJ, Culpepper AS, Grey TL, Webster TM, Vencill WK, Sammons RD, Jiang J, Preston C, Leach JE, Westra P (2010) Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *PNAS.* 107:1029-1034.
- Garcia MD, Nouwens A, Lonhienne TG, Guddat LW (2017) Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. *PNAS* 114: E1091-E1100.
- Gonzalez-Torralva F, Gil-Humanes J, Barro F, Brants I, De Prado R (2012) Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. *Plant Physiol. Biochem.* 58: 16-22.
- Han H, Yu Q, Purba E, Li M, Walsh M, Friesen S, Powles SB (2012) A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. *Pest Manag. Sci.* 68: 1164-1170.

- Hartzler B (2013). Palmer amaranth: ID, biology and management. Disponible en <http://extension.agron.iastate.edu/weeds/mgmt/2014/ICMPalmer.pdf>
- Heap I (2014) Herbicide resistant weeds. En Integrated Pest Management. Pimentel D, Peshin R (Ed.).Vol 3, Springer, Netherlands, pp. 21-301.
- Heap I (2019) The international survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org>. Último acceso Diciembre 2019.
- Heap I, Duke SO (2017) Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. Pest Manag. Sci. 74: 1040-1049.
- Horak MJ, Loughin TM (2000) Growth analysis of four *Amaranthus* species. Weed Sci. 48:347-355.
- Jasieniuk M, Brûlé-Babel AL, Morrison IN (1996) The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. Weed Sci. 44: 176-193.
- Jha P, Norsworthy JK, Malik MS (2007) Effect of tillage and soybean canopy formation on temporal emergence of Palmer amaranth from a natural seed bank. Proc. South Weed Sci. Soc. 60: 11.
- Jones AV, Young RM, Leto KJ (1985) Subcellular localization and properties of acetolactate synthase, target site of the sulfonylurea herbicides. Plant Physiol. 77: pp. S293.
- Kaundun SS, Jackson LV, Hutchings SJ, Galloway J, Marchegiani E, Howell A, Mcindoe E, Tiesca D Moreno, R (2019) Evolution of Target-Site Resistance to Glyphosate in an *Amaranthus palmeri* Population from Argentina and Its Expression at Different Plant Growth Temperatures. Plants 8: 512.
- Koo DH, Molin WT, Saski CA, Jiang J, Putta K, Jugulam M, Friebe B, Gill BS (2018) Extrachromosomal circular DNA-based amplification and transmission of herbicide resistance in crop weed *Amaranthus palmeri*. Proc. Natl. Acad. Sci. 115: 3332-3337.
- Korres NE, Norsworthy JK, FitzSimons T, Roberts TL, Oosterhuis DM (2017) Differential response of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) gender to abiotic stress. Weed Sci 65: 213-227.
- Kumar V, Jha P (2017) First report of Ser653Asn mutation endowing high-level resistance to imazamox in downy brome (*Bromus tectorum* L.). Pest Manag. Sci. 73: 2585-2591.
- Küpper A, Borgato EA, Patterson EL, Netto AG, Nicolai M, de Carvalho SJ, Scott JN, Gaines TA, Christoffoleti PJ (2017) Multiple resistance to glyphosate and acetolactate synthase inhibitors in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) identified in Brazil. Weed Sci. 65: 317-326.
- Labrada R, Caseley JC, Parker C (1994) Weed management for developing countries. Vol 120. Food & Agriculture Org.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lanfranconi LE, Bragachini MA, Peiretti J, Sánchez FR (2012) El avance de las malezas resistentes a herbicidas en los sistemas agrícolas ¿Podremos controlarlas? Documento de trabajo INTA. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_lan-bra_-_malezas_resistentes__limpieza_de_sem.pdf
- Laplante J, Rajcan I, Tardif FJ (2009) Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in *Setaria viridis*. *Theor. Appl. Genet.* 119: 577-585.
- Larran AS, Lorenzetti F, Tuesca D, Perotti VE, Permingeat HR (2018) Molecular mechanisms endowing cross resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus hybridus* from Argentina. *Plant Mol. Biol. Report.* 36: 907-912.
- Le DT, Yoon MY, Kim YT, Choi JD (2005) Two consecutive aspartic acid residues conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxy acid synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1749: 103-112.
- Lee YT, Chang AK, Duggleby RG (1999) Effect of mutagenesis at serine 653 of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase on the sensitivity to imidazolinone and sulfonyleurea herbicides. *FEBS Lett.* 452: 341-345.
- Lee YT, Duggleby RG (2001) Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. *Biochemistry* 40: 6836-6844.
- Leguizamón E (2008) Historia de la agricultura y el control de malezas en la Argentina (material didáctico FCA-UNR).
- Liu W, Bai S, Jia S, Guo W, Zhang L, Li W, Wang J (2017) Comparison of ALS functionality and plant growth in ALS-inhibitor susceptible and resistant *Myosoton aquaticum* L. *Pestic. Biochem. Phys.* 142: 111-116.
- Lonhienne T, Garcia MD, Pierens G, Mobli M, Nouwens A, Guddat LW (2018) Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides. *PNAS* 115: E1945-E1954.
- Lonhienne T, Nouwens A, Williams CM, Fraser JA, Lee YT, West NP, Guddat LW (2016) Commercial herbicides can trigger the oxidative inactivation of acetohydroxyacid synthase. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55: 4247-4251.
- Ma R, Kaundun SS, Tranel PJ, Riggins CW, McGinness, DL, Hager AG, Hawkes T, McIndoe E, Riechers DE (2013) Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. *Plant Physiol.* 163: 363-377.
- Marion SM, Davis VM, Stoltenberg DE (2017) Characterization of Wisconsin giant ragweed (*Ambrosia trifida*) resistant to cloransulam. *Weed Sci.* 65: 41-51.

- Matzrafi M, Lazar TW, Sibony M, Rubin B (2015) *Conyza* species: distribution and evolution of multiple target-site herbicide Resistances. *Planta* 242: 259-267.
- McCourt JA, Pang SS, King-Scott J, Guddat L, Duggleby RG (2006) Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *PNAS* 103: 569-573.
- McNaughton KE, Letarte J, Lee EA, Tardif FJ (2005) Mutations in ALS confers herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). *Weed Sci.* 53: 17-22.
- Menegat A, Bailly GC, Aponte R, Heinrich GM, Sievernich B, Gerhards R (2016) Acetohydroxyacid synthase (AHAS) amino acid substitution Asp376Glu in *Lolium perenne*: effect on herbicide efficacy and plant growth. *JPDP* 123: 145-153.
- Mesgaran MB, Matzrafi M, Ohadi S (2019). Sex Lability and Dimorphism in Diecious Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). *bioRxiv* 769935.
- Metzler MJ, Papa JC (2015). ALERTA: *Amaranthus palmeri* S. Watson en el sur de Entre Ríos. INTA.
- Mifflin BJ (1971) Cooperative feedback control of barley acetohydroxyacid synthetase by leucine, isoleucine, and valine. *Arch. Biochem. Biophys.* 146: 542-550.
- Milliman LD, Riechers DE, Wax LM, Simmons FW (2003) Characterization of two biotypes of imidazolinone-resistant eastern black nightshade (*Solanum ptycanthum*). *Weed Sci.* 51: 139-144.
- Molin WT, Nandula VK, Wright AA, Bond JA (2016) Transfer and expression of ALS inhibitor resistance from Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to an *A. spinosus* x *A. palmeri* hybrid. *Weed Sci.* 64: 240-247.
- Montoya JC, Garay JA, Cervellini JM (2015) Amarantáceas en la Región Semiárida Central Argentina: La Pampa y San Luis. EEA INTA Anguil "Ing. Agr. Guillermo Covas", Ediciones INTA, ISBN: 0325-2167.
- Moretti ML, Van Horn CR, Robertson R, Segobye K, Weller SC, Young BG, Johnson WG, Douglas Sammons R, Wang D, Ge X, d-Avignon A, Gaines TA, Westra P, Green AC, Jeffery T, Lespérance MA, Tardif FJ, Sikkema PH, Christopher Hall J, McLean MD, Lawton MB, Schulz B (2018) Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 2. Rapid response physiology and non-target-site resistance. *Pest Manag. Sci.* 74: 1079-1088.
- Morichetti S, Cantero JJ, Núñez C, Barboza GE, Amuchastegui A, Ferrell J (2013) On the presence of *Amaranthus palmeri* (Amaranthaceae) in Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 48: 347-353.

- Morran S, Moretti ML, Brunharo CA, Fischer AJ, Hanson BD (2018) Multiple target site resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) lines from California orchards. *Pest Manag. Sci.* 74: 2747-2753.
- Mousdale DM, Coggins JR (1993) Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L. *Planta* 163: 241-249.
- Nakka S, Thompson CR, Peterson DE, Jugulam M (2017) Target site-based and non-target site based resistance to ALS inhibitors in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Sci.* 65: 681-689.
- Nandula VK, Ray JD, Ribeiro DN, Pan Z, Reddy KN (2013) Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target-site and nontarget-site mechanisms. *Weed Sci.* 61: 374-383.
- Netto AG, Nicolai M, Carvalho SJP, Borgato EA, Christoffoleti PJ (2016) Multiple resistance of *Amaranthus palmeri* to ALS and EPSPS inhibiting herbicides in the State of Mato Grosso, Brazil. *Planta daninha* 34: 581-587.
- Neve P, Diggle A, Smith F, Powles SB (2003) Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* L: population biology of a rare resistance trait. *Weed Res.* 43: 404-417.
- Ngo TD, Krishnan M, Boutsalis P, Gill G, Preston C (2018) Target-site mutations conferring resistance to glyphosate in feathertop Rhodes grass (*Chloris virgata*) populations in Australia. *Pest Manag. Sci.* 74: 1094-1100.
- Nol N, Tsikou D, Eid M, Livieratos IC, Giannopolitis CN (2012) Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Coryza canadensis* and relative transcript levels of EPSPS and ABC transporter genes. *Weed Res.* 52: 233-241.
- Norsworthy JK, Ward SM, Shaw DR, Llewellyn R, Nichols RL, Webster TM, Bradley KW, Stephen GF, Powles SB, Burgos NR, Witt WW, Barret M (2012) Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. *Weed Sci.* 60: 31-62.
- Owen MD (2016) Diverse approaches to herbicide-resistant weed management. *Weed Sci.* 64: 570-584.
- Palma-Bautista C, Torra J, Garcia MJ, Bracamonte E, Rojano-Delgado AM, Alcántara-de la Cruz R, De Prado R (2019). Reduced absorption and impaired translocation endows glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri* harvested in glyphosate-resistant soybean from Argentina. *J. Agric. Food Chem.* 67: 1052-1060.
- Pang SS, Duggleby RG, Guddat LW (2002). Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J. Mol. Biol.* 317: 249-262.

- Panozzo S, Scarabel L, Rosan V, Sattin M (2017) A new Ala-122-Asn amino acid change confers decreased fitness to ALS-resistant *Echinochloa crus-galli*. *Front. Plant Sci.* 8: 2042.
- Papa JC (2002) Malezas tolerantes y resistentes a herbicidas. Actas del Seminario de Sustentabilidad de la Producción Agrícola. INTA, JICA, Buenos Aires.
- Patzoldt WL, Tranel PJ (2007) Multiple ALS mutations confer herbicide resistance in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Sci.* 55: 421-428.
- Peng Y, Abercrombie LLG, Yuan JS, Riggins CW, Sammons RD, Tranel PJ, Stewart Jr CN (2010) Characterization of the horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expression analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. *Pest Manag. Sci.* 66: 1053-1062.
- Perotti VE, Larran AS, Palmieri VE, Martinatto AK, Alvarez CE, Tuesca D, Permingeat HR (2019) A novel triple amino acid substitution in the EPSPS found in a high-level glyphosate-resistant *Amaranthus hybridus* population from Argentina. *Pest Manag. Sci.* 75: 1242-1251.
- Perotti VE, Larran AS, Palmieri VE, Martinatto AK, Permingeat HR (2020) Herbicide resistant weeds: a call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. *Plant Sci.* 290: 110255.
- Peterson DE, Thompson CR, Shoup D, Olson B (2001) Herbicide mode of action. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl Acid Res* 30:e36.
- Pline W, Wilcut J, Duke S, Edmisten K, Wells R (2002) Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J Agric. Food Chem.* 50: 506- 512.
- Poston DH, Hirata CM, Wilson HP (2002) Response of acetolactate synthase from imidazolinone-susceptible and-resistant smooth pigweed to ALS inhibitors. *Weed Sci.* 50: 306-311.
- Powles S; Lorraine-Colwill D; Dellow J; Preston C (1998) Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Sci.* 46: 604-607.
- Powles SB, Yu Q (2010) Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 317-347.
- Pratley J, Urwin N, Stanton R, Baines P, Broster J, Cullis K, Schafer D, Bohn J, Krueger R (1999) Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. I. Bioevaluation. *Weed Sci.* 47: 405-411.

- Preston C, Stone LM, Rieger MA, Baker J (2006) Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. Pestic. Biochem. Phys 84: 227-235.
- Radosevich S, Holt J, Ghersa M (1997) Weed ecology. Implications for management. Nueva York. Wiley & Sons, pp 589.
- REM (2017) Red de conocimiento de malezas resistentes. Disponible en <https://www.aapresid.org.ar/rem/wp-content/uploads/sites/3/2015/10/Herbicidas-Amaranthus-actualizacion-10-15.pdf>.
- REM (2017) Red de conocimiento de malezas resistentes. Disponible en <https://www.aapresid.org.ar/rem/donde-son-mas-problema-las-malezas-problema/>
- REM (2019) Red de conocimiento de malezas resistentes. Disponible en: <http://www.aapresid.org.ar/rem/las-malezas-siguen-ganando-terreno/>
- Riar DS, Norsworthy JK, Srivastava V, Nandula V, Bond JA, Scott RC (2013) Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). J. Agric. Food Chem 61: 278-289.
- Rosales-Robles ER, Sánchez de la Cruz R (2006) Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción. INIFAP-Campo Experimental Río Bravo, Folleto técnico.
- Rutledge RG, Quillet T, Hattori J, Miki BL (1991) Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family. Mol. Gen. Genet. MGG 229:31-40.
- Sada Y, Ikeda H, Yamato S, Kizawa S (2013) Characterization of sulfonylurea-resistant *Schoenoplectus juncooides* having a target-site Asp376Glu mutation in the acetolactate synthase. Pestic. Biochem. Phys. 107: 106-111.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Third ed., Gold Spring Harbor, New York, pp:116-118.
- Sammons RD, Gaines TA (2014) Glyphosate resistance: state of knowledge. Pest Manag. Sc.i 70: 1367-1377.
- Schönbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss JV, Amrhein N, Evans JN, Kabsch W (2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 1376-1380.
- Sellers BA, Smeda RJ; Johnson WG, Kendig JA, Ellersieck MR (2003) Comparative growth of six *Amaranthus* species in Missouri. Weed Sci. 51: 329-333.
- Senseman S (2007) Herbicide Handbook. Ed 9. Lawrence. Weed Science Society of America, pp 458.

- Shaner DL (2014) Lessons learned from the history of herbicide resistance. *Weed Sci.* 62: 427-431.
- Shaner DL, Nadler-Hassar T, Henry WB, Koger CH (2005) A rapid *in vivo* shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Sci.* 53: 769-774.
- Shergill LS, Barlow BR, Bish MD, Bradley KW (2018) Investigations of 2, 4-D and multiple herbicide resistance in a Missouri waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population. *Weed Sci.* 66: 386-394.
- Singh S, Singh V, Salas-Perez RA, Bagavathiannan MV, Lawton-Rauh A, Roma-Burgos N (2019) Target-site mutation accumulation among ALS inhibitor-resistant Palmer amaranth. *Pest Manag. Sci.* 75: 1131-1139.
- Stallings WC, Abdel-Meguid SS, Lim LW (1991) Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 5046-5050.
- Steinrücken HC, Amrhein N (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 94: 1207-1212.
- Steyermark JA (1963) *Flora of Missouri*. Ames, IA: Iowa State University Press, pp 622.
- Subramanian MV, Hung HY, Dias JM, Miner VW, Butler JH, Jachetta JJ (1990) Properties of mutant acetolactate synthases resistant to triazolopyrimidine sulfonanilide. *Plant Physiol.* 94: 239-244.
- Takano HK, Mendes RR, Scoz LB, Ovejero RFL, Constantin J, Gaines TA, Westra P, Dayan FP, Oliveira RS (2019) Proline-106 EPSPS Mutation Imparting Glyphosate Resistance in Goosegrass (*Eleusine indica*) Emerges in South America. *Weed Sci.* 67: 48-56.
- Tardif FJ, Rajcan I, Costea M (2006) A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. *New Phytol.* 169: 251-264.
- Teaster ND, Hoagland RE (2014) Characterization of glyphosate resistance in cloned *Amaranthus palmeri* plants. *Weed Biol. Manag.* 14: 1-10.
- Tranel PJ, Wright TR (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci.* 50: 700-712.
- Tranel PJ, Wright TR, Heap IM (2019) Mutations in herbicide resistant weeds to ALS inhibitors. Online <http://www.weedscience.com>. Último acceso Diciembre 2019.
- Trucco F, Hager AG, Tranel PJ (2006) Acetolactate synthase mutation conferring imidazolinone-specific herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *J. Plant Phys.* 163: 475-479.

- Trucco F, Zheng D, Woodyard AJ, Walter JR, Tatum TC, Rayburn AL, Tranel P J (2007) Nonhybrid progeny from crosses of dioecious amaranths: implications for gene-flow research. *Weed Sci.* 55: 119-122.
- Tuesca D, Papa JC, Morichetti S (2013) *Amaranthus palmeri*, una maleza arribada a nuestro país desde el hemisferio norte. INTA, Centro Regional Santa Fe, Estación Experimental Agropecuaria Oliveros.
- Tuesca D, Papa JC, Morichetti S (2016) Manejo de malezas problema. *Amaranthus palmeri* (S.) Watson: Bases para su manejo y control en sistemas de producción. Red de conocimiento en malezas resistentes, ISSN N° 2250-5350, Volumen VI.
- Van Horn CR, Moretti ML, Robertson RR, Segobye K, Weller SC, Young BG, Johnson WG, Schulz B, Green AC, Jeffery T, Lespérance MA, Tardif FJ, Sikkema PH, Hall JC, McLean MD, Lawton MB, Sammons RD, Wang D, Westra P, Gaines TA (2018) Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 1. Novel rapid cell death response to glyphosate. *Pest Manag. Sci.* 74: 1071-1078.
- Vercellino RB, Pandolfo CE, Breccia G, Cantamutto M, Presotto A (2018) AHAS Trp574Leu substitution in *Raphanus sativus* L.: screening, enzyme activity and fitness cost. *Pest Manag. Sci.* 74: 1600-1607.
- Vila-Aiub MM, Balbi MC, Distéfano AJ, Fernández L, Hopp E, Yu Q, Powles SB (2012) Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. *Pest Manag. Sci.* 68: 430-436.
- Vila-Aiub MM, Goh SS, Gaines TA, Han H, Busi R, Yu Q, Powles SB (2014) No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri*. *Planta* 239: 793-801.
- Vila-Aiub MM, Gundel P, Yu Q, Powles SB (2013) Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. *Pest Manag. Sci.* 69: 228-232.
- Vila-Aiub MM, Yu Q, Powles SB (2019) Do plants pay a fitness cost to be resistant to glyphosate? *New Phytologist* 223: 532-547.
- Wang T, Picard JC, Tian X, Darmency H (2010) A herbicide-resistant ACCase 1781 *Setaria* mutant shows higher fitness than wild type. *Heredity* 105: 394-400.
- Wang Q, Zhao N, Zhang L, You L, Wang D, Liu W, Wang J (2019) A Trp-574-Leu mutation in the acetolactate synthase (ALS) gene of *Lithospermum arvense* L. confers broad-spectrum resistance to ALS inhibitors. *Pestic. Biochem and Phys* 158: 12-17.
- Ward SM, Webster TM, Steckel LE (2013) Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*): a review. *Weed Technol.* 27: 12-27.

- Warwick SI, Xu R, Sauder C, Beckie HJ (2008) Acetolactate synthase target-site mutations and single nucleotide polymorphism genotyping in ALS-resistant kochia (*Kochia scoparia*). *Weed Sci.* 56: 797-806.
- Weed Science Society of America Terminology Committee (1998) Resistance and tolerance definitions. *Weed Technol* 12:789. Disponible en <http://wssa.net/wssa/weed/resistance/herbicide-resistance-and-herbicide-tolerance-definitions/>
- Weed Science Society of America Terminology Committee (2019) WSSA- Herbicide Site of Action (SOA) Classification List. Disponible en <http://wssa.net/wssa/weed/herbicide>
- Westerfeld WW (1945) A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.* 161: 495-502.
- Whaley CM, Wilson HP, Westwood JH (2006) ALS resistance in several smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) biotypes. *Weed Sci* 54: 828-832.
- Whaley CM, Wilson HP, Westwood JH (2007) A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 55: 83-90.
- White AD, Graham MA, Owen MDK (2003) Isolation of acetolactate synthase homologs in common sunflower. *Weed Sci.* 51: 845-853.
- White AD, Owen MD, Hartzler RG, Cardina J (2002) Common sunflower resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 50: 432-437.
- Wiersma PA, Schmiemann MG, Condie JA, Crosby WL, Moloney MM (1989) Isolation, expression and phylogenetic inheritance of an acetolactate synthase gene from *Brassica napus*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 219: 413-420.
- Wise AM, Grey TL, Prostko EP, Vencill WK, Webster TM (2009) Establishing the geographical distribution and level of acetolactate synthase resistance of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) accessions in Georgia. *Weed Technol.* 23: 214-220.
- Woodworth AP, Bernasconi M, Subramanian M, Rosen B (1996) A second naturally occurring point mutation confers broad-based tolerance to acetolactate synthase inhibitors. *Plant Physiol.* 111: S105.
- Yang Q, Deng W, Li X, Yu Q, Bai L, Zheng M (2016) Target-site and non-target-site based resistance to the herbicide tribenuron-methyl in flixweed (*Descurainia sophia* L.). *BMC Genomics* 17: 551.
- Yang Q, Deng W, Wang S, Liu H, Li X, Zheng M (2018) Effects of resistance mutations of Pro197, Asp376 and Trp574 on the characteristics of acetohydroxyacid synthase (AHAS) isozymes. *Pest Manag. Sci.* 74: 1870-1879.

- Yu Q, Collavo A, Zheng MQ, Owen M, Sattin M, Powles SB (2007a) Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. *Plant Physiol.* 145: 547-558.
- Yu Q, Han H, Li M, Purba E, Walsh MJ, Powles SB (2012) Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. *Weed Res.* 52: 178-186.
- Yu Q, Han H, Powles SB (2008) Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. *Pest Manag. Sci.* 64: 1229-1236.
- Yu Q, Han H, Vila-Aiub MM, Powles SB (2010) AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *J Exp. Bot.* 61: 3925-3934.
- Yu Q, Jalaludin A, Han H, Chen M, Sammons RD, Powles SB (2015) Evolution of a double amino acid substitution in the EPSP synthase in *Eleusine indica* conferring high level glyphosate resistance. *Plant Physiol.* 167: 1440-1447.
- Yu Q, Nelson JK, Zheng MQ, Jackson M, Powles SB (2007b) Molecular characterization of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes. *Pest Manag. Sci.* 63: 918-927.
- Yu Q, Powles SB (2014) Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Manag. Sci.* 70: 1340-1350.
- Yu Q, Zhang XQ, Hashem A, Walsh MJ, Powles SB (2003) ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Sci.* 51: 831-838.
- Yuan JS, Abercrombie LLG, Cao Y, Halfhill MD, Zhou X, Peng Y, Hu J, Rao MR, Heck GR, Larosa TJ, Sammons RD, Wang X, Ranjan P, Johnson DH, Wadl PA, Scheffler BE, Rinehart TA, Trigiano RN, Stewart CN(2010) Functional genomics analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. *Weed Sci* 58:109-117.
- Yun MS, Yogo Y, Miura R, Yamasue Y, Fischer AJ (2005) Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and-susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). *Pest. Biochem. Physiol.* 83: 107-114.
- Zhao B, Fu D, Yu Y, Huang C, Yan K, Li P, Shafi J, Zhu H, Wei S, Ji M (2017) Non-target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in a *Sagittaria trifolia* L. population. *Pestic. Biochem. Phys.* 140: 79-84.
- Zhao N, Yan Y, Ge LA, Zhu B, Liu W, Wang J (2019a) Target site mutations and cytochrome P450s confer resistance to fenoxaprop-P-ethyl and mesosulfuron-methyl in *Alopecurus aequalis*. *Pest Manag. Sci.* 75: 204-214.

- Zhao N, Yan Y, Luo Y, Zou N, Liu W, Wang J (2019b) Unravelling mesosulfuron-methyl phytotoxicity and metabolism-based herbicide resistance in *Alopecurus aequalis*: Insight into regulatory mechanisms using proteomics. *Sci. Total Environ.* 670: 486-497.