



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**“CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO RESPONSABLE DE LA RESISTENCIA
A HALOXIFOP-P-METIL Y GLIFOSATO EN *Sorghum halepense*.”**

ANDREA K. MARTINATTO

Licenciada en Biotecnología

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Dr. HUGO R. PERMINGEAT

CO-DIRECTOR: Dra. VALERIA E. PEROTTI

2020

**“CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO RESPONSABLE DE LA RESISTENCIA
A HALOXIFOP-P-METIL Y GLIFOSATO EN *Sorghum halepense*.”**

Andrea K. Martinatto

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 del Dr. Hugo R. Permingeat y la co-dirección de la Dra. Valeria E. Perotti.

Andrea K. Martinatto

-Tesisista-

Hugo R. Permingeat

-Director-

Valeria E. Perotti

-Co-Directora-

Defendida:..... de 2020

-A mi hija Olivia-

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme otorgado el soporte económico, a través de sus becas, para la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, por permitirme realizar mi formación de posgrado.

A mi Director Hugo Permingeat por invitarme a formar parte de su grupo de investigación. Además, por su confianza y respaldo que me permitieron realizar el doctorado libremente.

A mi Directora Valeria Perotti por su gran dedicación con el grupo de trabajo que me permitió formarme a través de su conocimiento y crecer profesionalmente.

A Juan Carlos Papa (EEA INTA Oliveros) y Daniel Tuesca (Cátedra de malezas de FCA-UNR) por proporcionarnos el material vegetal de trabajo. También a Daniel por la buena predisposición para realizarnos las aplicaciones de herbicidas.

A la Dra. Clarisa Alvarez del CEFODI por el asesoramiento en la parte experimental de estructuración de las proteínas y difracción circular.

A David (CPA IICAR), Dario y Ayelen (alumnos ayudantes del laboratorio) por asistirme con el arduo trabajo de invernadero, cámaras y curvas dosis respuesta.

A todos los compañeros de mesada que fueron pasando por el laboratorio (Agostina, Albertina, Alvaro, Lucas, Luisina, Daniel, Valeria Palmieri, Valeria Perotti) por hacer ameno el ámbito de trabajo. A Vale Palmieri por su gran acompañamiento en todas las instancias de presentaciones a becas, seminarios y recesos de verano. A Luisina por transportarnos gentilmente durante tanto tiempo y hacernos más liviano los viajes a la facultad.

A todo el grupo de Pipeteadores (sin dejar de nombrar a Carolina, Celeste, Nicolas, Maricel y Mariano) por las medias mañanas con mates, almuerzos, recesos y momentos importantes compartidos a lo largo de estos años. A nuestro amigo Nicolás por enseñarnos que se puede salir adelante después del momento tan difícil que nos tocó atravesar como grupo humano. A Debora por ayudarme en esta última etapa.

A mi querida madre que cuidó con tanto amor del tesoro más importante de mi vida durante todo este tiempo, permitiéndome poder continuar en este camino.

Finalmente, y muy especialmente a mi compañero “incondicional” de la vida, Wali, que una vez más me apoyó con tanto amor para que pudiera seguir creciendo profesionalmente.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

ARTÍCULOS EN REVISTAS CON REFERATO

“A novel EPSPS triple mutation and gene amplification are simultaneously present in a highly-glyphosate resistant *A. hybridus* population from Argentina”. *Pest Management Science*, 75, 242–1251 (2019).

Perotti, V.; Larran, A.; Palmieri, V.; Martinatto, A.; Tuesca, D.; Permingeat, H.

“Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies”. *Plant Science*, 290: 110255 (2020).

Perotti, V.; Larran, A.; Palmieri, V.; Martinatto, A.; Permingeat, H.

CAPÍTULO 1 y 3: “Molecular mechanisms endowing multiple resistances to ACCase-inhibiting herbicides and glyphosate in *S. halepense* from Argentina”. (En proceso de redacción).

Martinatto, A., Perotti, V., Tuesca, D., Permingeat, H. (2020).

CAPÍTULO 2: “Cloning, expression, purification and functional characterization of a plant carboxyl transferase domain from ACCase.” (En proceso de redacción).

Martinatto, A., Permingeat, H., Perotti, V. (2020).

PRESENTACIONES A CONGRESOS

XVII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. IV Jornada Latinoamericana. II Jornadas de Ciencia y Tecnología. I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. Casilda. 2016.

Póster: “Análisis bioinformático y diseño experimental para la identificación del mecanismo de resistencia a ariloxifenoxipropionatos en *Sorghum halepense*”.

Martinatto, A.; Palmieri V.; Tuesca, D.; Perotti, V.; Permingeat, H.

Póster: “Evaluación *in vivo* e *in vitro* de la respuesta a inhibidores ALS y glifosato de un biotipo de *Amaranthus palmeri* resistente hallado a campo”.

Palmieri, V.; Martinatto, A.; Monasterolo, L.; Tuesca, D.; Perotti, V.; Permingeat, H.

XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Corrientes. 2016.

Póster: “*Biochemical and molecular characterization of a resistance mechanism of a biotype Amaranthus palmeri with resistance to ALS inhibitors found in production parcels*”.

Palmieri, V.; Martinatto, A.; Monasterolo, L.; Tuesca, D.; Permingeat, H.; Perotti, V.

XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. 2016.

Póster: “*Análisis funcional y bioquímico de un posible biotipo resistente a ariloxifonoxipropionatos en Sorghum halepense*”.

Martinatto, A.; Palmieri V.; Tuesca, D.; Perotti, V.; Permingeat, H.

XI Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2017: Biotecnología: valor en origen, productividad y sustentabilidad. Bahía Blanca. 2017.

Póster: “*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.*”

Perotti, V.; Palmieri, V.; Martinatto, A.; Monasterolo, L. y Permingeat, H.

LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). CABA. 2017.

Comunicación oral: “*PCR-based detection of resistance to Acetyl- CoA carboxylase- inhibiting herbicides in Johnsongrass (Sorghum halepense L. Pers).*”

Martinatto, A., Palmieri V., Monasterolo L., Permingeat, H. y Perotti V.

II Congreso Argentino de Malezas (ASACIM). Rosario. 2018.

Póster: “*Estudio del mecanismo responsable de la resistencia a graminicidas (inhibidores ACCasa) en Sorghum halepense*”.

Martinatto, A.; Papa, J.C.; Tuesca, D.; Perotti, V.; Permingeat, H.

XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. 2018.

Póster: “*Extracción de ADN de semilla única y estudio de la frecuencia de una triple mutación en el gen de la EPSPS de A. hybridus mediante HRMA (High Resolution Melting Analysis).*

Larran, A; Palmieri, V; Martinatto, A.; Permingeat, H; Perotti, V.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Las Malezas y su relación con los sistemas de producción agrícola.....	1
1.2. Herbicidas y sus modos de acción	2
1.3. Resistencia a herbicidas.....	5
1.4. Mecanismos de resistencia	6
1.5. Evolución de la resistencia en malezas.....	10
1.6. Situación actual en Argentina y su región	13
1.7. <i>Sorghum halepense</i>	13
1.8. Importancia del conocimiento de los mecanismos de resistencia para el manejo de malezas.	15
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	19
2.1. Objetivo general	19
2.2. Hipótesis de trabajo	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Material vegetal.....	20
3.2. Experimentos de dosis-respuesta.....	21
3.3. Tratamiento con inhibidores del citocromo P450.....	22
3.4. Extracción de ADN genómico.....	23
3.5. Extracción de ARN total y tratamiento con desoxirribonucleasas	23
3.6. Estimación de la cantidad y calidad de ADN y/o ARN obtenido	23
3.7. Transcripción reversa	24
3.8. Reacción en cadena de la ADN Polimerasa (PCR) para amplificar el dominio carboxiltransferasa del gen de la ACCasa	24
3.9. PCR para amplificar secuencia parcial del dominio CT del gen de la accasa	25
3.10. PCR para amplificar secuencia parcial del gen <i>EPSPS</i>	26
3.11. Análisis de secuencias de ADN y proteínas	27
3.12. PCR alelo específica (ASPCR) para la detección de las sustituciones I2041N y IXXXXT	27
3.13. CAPS para detección de la mutación I2041N	29
3.14. PCR en tiempo real (qPCR) para estimación del número de copias.....	30

3.15. Obtención de progenie del individuo seleccionado GC-C4 resistente a haloxifop-p- metil	32
3.16. PCR alelo específica cuantitativa (ASqPCR)	32
3.17. Cepas bacterianas y plásmidos	34
3.18. Transformación de <i>Escherichia coli</i> con ADN plasmídico	35
3.19. Extracción de ADN plasmídico	35
3.20. Clonado en el vector pGEMT Easy	36
3.21. Búsqueda de colonias conteniendo el ADN plasmídico de interés.....	36
3.22. Secuenciación	37
3.23. Clonado y subclonado del dominio CT de la ACCasa para la expresión recombinante.....	37
3.24. Expresión de proteínas recombinantes	39
3.25. Purificación de las proteínas recombinantes.....	40
3.26. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	41
3.27. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.....	42
3.28. Medidas de actividad del dominio carboxil transferasa de ACCasa.....	42
3.29. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	43
CAPÍTULO 1.....	44
CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A HALOXIFOP-P-METIL EN LA SUBPOBLACIÓN DE <i>Sorghum halepense</i> HALLADA EN CAMPOS DE GOBERNADOR CRESPO	45
4.1. INTRODUCCIÓN.....	45
4.1.1. Acetil CoA carboxilasa.....	45
4.1.2. Isoformas de la ACCasa	46
4.1.3. ACCasa homomérica.....	48
4.1.4. Herbicidas inhibidores de ACCasa (Grupo A)	49
4.1.5. Mecanismos de resistencia a inhibidores de ACCasa.....	51
4.1.6. ACCasas homoméricas inherentemente tolerantes.....	61
4.1.7. Selectividad en base al metabolismo de herbicidas	61
4.1.8. Resistencia a herbicidas y su relación con los niveles de ploidía	62
4.1.9. Evolución de la resistencia a inhibidores de ACCasa.....	63
Objetivos específicos.....	64
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
4.2.1. Experimentos de dosis-respuesta con inhibidores de ACCasa en las subpoblaciones GC-R y Zav-S. 65	
4.2.2. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de ACCasa de <i>Sorghum halepense</i>	66
4.2.3. Identificación de las mutaciones presentes en las subpoblaciones GC-R y Zav-S	68
4.2.4. Búsqueda de individuos portadores de las sustituciones I2041N y IXXXXT	72
4.2.4.1. Optimización de las condiciones de ASPCR	72
4.2.4.2. Genotipado de las mutaciones en los individuos seleccionados de la subpoblación GC-R.....	75
4.2.5. Experimentos de dosis respuesta con los clones vegetativos de los individuos seleccionados	77

4.2.6. Efectos de inhibidores del citocromo P450 sobre el tratamiento con haloxifop-p-metil a dosis única	81
4.2.7. Estimación del número de copias del gen <i>ACC</i> en individuos seleccionados	82
4.2.8. Evaluación de la posible correlación entre los niveles de resistencia y la proporción alélica del alelo R1: ¿existe efecto de dilución?	83
4.3. CONCLUSIONES	86
CAPÍTULO 2	88
CLONADO Y EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LAS DIFERENTES VERSIONES DEL DOMINIO CT DE ACCASA	89
5.1. INTRODUCCIÓN	89
Objetivo específico	91
5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
5.2.1. Clonado y expresión recombinante del dominio CT de la ACCasa de <i>Sorghum halepense</i>	92
5.2.2. Medidas de actividad del dominio CT	99
5.2.3. Evaluación preliminar del grado de oligomerización del dominio CT	99
5.2.4. Evaluación de la estructuración secundaria del dominio CT por Dicroísmo Circular	100
5.3. CONCLUSIONES	102
CAPÍTULO 3	103
CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A GLIFOSATO EN LA SUBPOBLACIÓN DE <i>Sorghum halepense</i> HALLADA EN CAMPOS DE GOBERNADOR CRESPO	104
6.1. INTRODUCCIÓN	104
6.1.1. EPSPS (5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa)	104
6.1.2. Herbicidas inhibidores de EPSPS (grupo G)	106
6.1.3. Mecanismos de resistencia a glifosato	107
6.1.4. Casos de resistencia	113
Objetivos específicos	114
6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	115
6.2.1. Confirmación de la resistencia a glifosato en la subpoblación GC-R	115
6.2.2. Análisis de la secuencia conservada del gen <i>EPSPS</i>	117
6.2.3. Estudio del número de copias del gen <i>EPSPS</i>	118
6.3. CONCLUSIONES	121
7. CONCLUSIÓN FINAL	122
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La acción de los herbicidas seguida de su aplicación y los mecanismos de resistencia identificados en malezas	8
Figura 2. Esquema del diseño de oligocebadores de ASPCR..	29
Figura 3. Esquema del diseño de CAPS.	30
Figura 4. Curva estándar para la cuantificación del alelo I2041N resistente en la progenie del clon GC-C4.....	33
Figura 5. Esquema del diseño de oligocebadores para el clonado del dominio CT de ACCasa	38
Figura 6. Reacción catalizada por la Acetil CoA carboxilasa (ACCasa).	46
Figura 7. Isoformas de las ACCasa en plantas superiores.....	48
Figura 8. Distribución de malezas resistentes RACC en Argentina.....	64
Figura 9. Curvas dosis respuesta de las subpoblaciones GC-R y Zav-S de <i>Sorghum halepense</i> con haloxifop-p-metil	66
Figura 10. Análisis de las secuencias de la ACCasa de <i>S. halepense</i>	68
Figura 11. Determinación de la temperatura de hibridación selectiva para ASPCR (I2041N).	73
Figura 12. Determinación de condiciones óptimas para ASPCR multiplex (I2041N).....	74
Figura 13. Determinación de las condiciones de amplificación selectiva para ASPCR (IXXXXT)	75
Figura 14. Análisis de los individuos seleccionados resistentes (GC-C3, C4, C6, C7, C10 y C11) para I2041N.....	76
Figura 15. Análisis de los individuos seleccionados resistentes (C2, C4, C5, C7, C10 y C14) para IXXXXT.....	76
Figura 16. Curvas dosis respuesta <i>in vivo</i> de individuos seleccionados de <i>Sorghum halepense</i> con haloxifop-p-metil.	79
Figura 17. Efecto sobre la biomasa del tratamiento con inhibidores del P450 en plantas de la subpoblacion Zav-S y GC-R.	82
Figura 18. Número de copias relativas del gen ACC en individuos seleccionados.....	83
Figura 19. Análisis por marcadores CAPS de las plantas de la progenie derivadas del parental GC-C4 para la mutación 2041.....	84

Figura 20. Cuantificación de alelos R1 en la progenie del clon GC-C4 mediante ASqPCR...	85
Figura 21. Esquema de los plásmidos de expresión del sistema pET..	91
Figura 22. Chequeo de la inducción de la proteína recombinante CT1663S2.	94
Figura 23. Chequeo de la purificación en columnas de níquel agarosa de la proteína recombinante CT1663S2 obtenida en pET28a.	95
Figura 24. Chequeo de la inducción de la proteína recombinante CT1663S2 con 1 μ M de IPTG..	96
Figura 25. Chequeo de distintas condiciones de inducción de la proteína recombinante CT1663S2 obtenida en pET32a.	97
Figura 26. Chequeo de la expresión de la proteína recombinante CT2358R1.	98
Figura 27. Chequeo de la purificación en columnas de níquel agarosa de la proteína recombinante CT2358R1.	98
Figura 28. Análisis de la movilidad electroforética del dominio CT (CT2358R1) de la ACCasa recombinante purificado en condiciones no desnaturalizantes.	100
Figura 29. Espectro de Dicroísmo Circular en UV lejano del dominio CT (CT2358R1) de la ACCasa recombinante	101
Figura 30. Reacción catalizada por la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) y su participación en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos.	105
Figura 31. Distribución de malezas resistentes a glifosato en Argentina.	114
Figura 32. Curvas dosis-respuesta de las subpoblaciones de <i>Sorghum halepense</i> con glifosato.	116
Figura 33. Alineamiento de las secuencias parciales del gen <i>EPSPS</i> .	118
Figura 34. Número relativo de copias del gen EPSPS en los individuos seleccionados de GC-R respecto a los individuos sensibles (Zav- S1 y S2).	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modo de acción de los herbicidas según HRAC.	4
Tabla 2. Oligocebadores utilizados para amplificar el dominio CT del gen <i>ACC</i>	25
Tabla 3. Oligocebadores usados para secuenciar productos de PCR.	26
Tabla 4. Oligocebadores usados para amplificar la secuencia parcial del gen <i>EPSPS</i>	26
Tabla 5. Oligocebadores usados en ASPCR.....	28
Tabla 6. Oligocebadores usados para el gen de referencia en la determinación del número de copias.	31
Tabla 7. Cepas bacterianas.	34
Tabla 8. Plásmidos.....	35
Tabla 9. Vectores de expresión de la serie pET portadores del dominio CT de la ACCasa de <i>Sorghum halepense</i>	39
Tabla 10. Composición del medio rico ZYP para autoinducción.....	40
Tabla 11 Sustituciones de aminoácidos sobre el dominio CT del gen <i>ACC</i> que confieren resistencia a herbicidas inhibidores del grupo A.	53
Tabla 12. Resistencia basada en metabolismo a herbicidas inhibidores de ACCasa en malezas gramíneas.....	55
Tabla 13. Resumen de los mecanismos de resistencia en malezas reportados al momento para herbicidas inhibidores de ACCasa.....	60
Tabla 14. Parámetros obtenidos de las curvas dosis-respuesta de las subpoblaciones GC-R y Zav-S de <i>Sorghum halepense</i>	66
Tabla 15. Haplotipos encontrados a partir del alineamiento de secuencias del dominio CT del gen de <i>ACC</i> cloroplástica de plantas sensible y resistentes.	71
Tabla 16. Diferencias de aminoácidos encontradas en el marco de lectura abierto del dominio CT de ACCasa de los individuos seleccionados de la subpoblación GC-R resistente en comparación con la secuencia sensible.	77
TABLA 17. Parámetros obtenidos de las curvas dosis-respuesta de los clones vegetativos de los individuos seleccionados	80
Tabla 18. Resumen de los mecanismos de resistencia en malezas reportados al momento para glifosato	112
Tabla 19. Parámetros obtenidos de las curvas dosis respuesta de las subpoblaciones con glifosato.	116

Tabla 20. Valores de LD ₅₀ y GR ₅₀ previamente reportados en la literatura para <i>Sorghum halepense</i> tratado con glifosato.	117
Tabla 21. Estimación del número de copias relativo del gen <i>EPSPS</i> mediante qPCR.....	119

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABT	1-aminobenzotriazol
ACC	Gen de acetil CoA carboxilasa
ACCasa	Acetil CoA carboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN copia
ADNcec	ADN circular extracromosomal
AI	Antes de inducir
ARN	Ácido ribonucleico
ASPCR	PCR alelo específica
ASqPCR	PCR alelo específica cuantitativa
C2088F	Sustitución de cisteína 2088 de la ACCasa por fenilalanina
C2088R	Sustitución de cisteína 2088 de la ACCasa por arginina
CAPS	del inglés <i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i> , digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas
Ct	del inglés <i>threshold cycle</i> , ciclo umbral
CT	Dominio carboxiltransferasa
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
D2078G	Sustitución de aspartato 2078 de la ACCasa por glicina
DC	Dicroísmo circular
DEN	fenilpirazolinás
DI ¹	Después de inducir 1 hora
DI ¹⁶	Después de inducir 16 horas
DIM	ciclohexanodionas
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPSP	5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato
EPSPS	5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa
EPSPS	Gen de 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa
FOP	ariloxifenoxipropionatos
FR	Factor de resistencia
<i>g</i>	Gravedad, unidad de aceleración
G101A	Sustitución de la glicina 101 de la EPSPS por alanina
G2096A	Sustitución de glicina 2096 de la ACCasa por alanina
G2096S	Sustitución de glicina 2096 de la ACCasa por serina
GR ₅₀	del inglés <i>Growth rate 50</i> , reducción del crecimiento media
HRAC	del inglés <i>Herbicide Resistance Action Committee</i> , Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas
I1781L	Sustitución de isoleucina 1781 de la ACCasa por leucina
I1781T	Sustitución de isoleucina 1781 de la ACCasa por treonina
I1781V	Sustitución de isoleucina 1781 de la ACCasa por valina
I2041D	Sustitución de isoleucina 2041 de la ACCasa por aspartato
I2041N	Sustitución de isoleucina 2041 de la ACCasa por asparagina
I2041T	Sustitución de isoleucina 2041 de la ACCasa por treonina
I2041V	Sustitución de isoleucina 2041 de la ACCasa por valina
ia	Ingrediente activo

IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IXXXXT	Sustitución de isoleucina por treonina en una posición no reportada
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LD ₅₀	del inglés <i>Lethal dose 50</i> , dosis letal media
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MS	Murashige-Skoog
NTSR	del inglés <i>non-target-site resistance</i> , resistencia no asociada al sitio de acción
P/V	Peso en volumen
P106	Prolina en la posición 106 de la EPSPS
P106A	Sustitución de la prolina 106 de la EPSPS por alanina
P106L	Sustitución de la prolina 106 de la EPSPS por leucina
P106S	Sustitución de la prolina 106 de la EPSPS por serina
P106T	Sustitución de la prolina 106 de la EPSPS por treonina
P450	Citocromo P450
pb	pares de bases
PBO	Butóxido de piperonilo
PCR	del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PEP	fosfoenolpiruvato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
qPCR	PCR en tiempo real
SDS	Dodecilsulfato sódico
S3P	shikimato-3-fosfato
T102L	Sustitución de la treonina 102 de la EPSPS por leucina
T102S	Sustitución de la treonina 102 de la EPSPS por serina
TAP-IVS	Triple sustitución en la secuencia de la EPSPS (T102I+A103V+P106S)
TIPS	Doble sustitución en la secuencia de la EPSPS (T102I+P106S)
TIPT	Doble sustitución en la secuencia de la EPSPS (T102I+P106T)
TSR	del inglés <i>target-site resistance</i> , resistencia asociada al sitio de acción
U	Unidades de enzima
W1999C	Sustitución de triptófano 1999 de la ACCasa por cisteína
W1999L	Sustitución de triptófano 1999 de la ACCasa por leucina
W1999S	Sustitución de triptófano 1999 de la ACCasa por serina
W2027C	Sustitución de triptófano 2027 de la ACCasa por cisteína
WSSA	del inglés <i>Weed Science Society of America</i> , Sociedad Americana de Ciencias de las Malezas.
Wt	del inglés <i>Wild type</i> , tipo salvaje
X	Dosis de herbicida recomendada a campo
X-Gal	5-bromo-4cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Los herbicidas son una importante herramienta en la producción agrícola para controlar malezas, evitar la erosión del suelo y mantener altos rendimientos. En Argentina, el modelo agro-productivo consolidado en las últimas décadas se basa en el cultivo de soja transgénica tolerante a glifosato (ya sea en monocultivo, o bien, en una rotación con maíz transgénico tolerante al mismo herbicida). Sin embargo, la elevada eficacia combinada con la simplicidad de operación de estos sistemas resultó en el uso excesivo de un pequeño número de herbicidas. Esto trajo como consecuencia inmediata una disminución en la diversidad productiva, una reducción sustancial en la abundancia de numerosas especies de malezas y la evolución de biotipos resistentes. El primer caso de resistencia a herbicidas en Argentina fue detectado en 1996, y al día de la fecha existen 18 especies diferentes que han desarrollado resistencia al menos a un herbicida, ascendiendo este número a 262 especies a nivel mundial. Así, la resistencia a herbicidas en malezas representa hoy uno de los problemas más importantes que enfrentan los sistemas agropecuarios en todo el mundo.

El sorgo de Alepo (*Sorghum halepense* (L.) Persoon) ha sido introducido al país con propósitos forrajeros, pero actualmente es considerada una de las malezas más problemáticas del mundo, causando grandes pérdidas económicas. Es una gramínea C4, perenne y alotetraploide. Sus características la vuelven una especie sumamente competitiva, interfiriendo con los barbechos previos a cultivos primavera-estivales como soja, maíz o girasol. El principal inconveniente que presenta para su control químico eficaz y económico es su carácter de perennidad a través de la formación de rizomas de gran extensión y biomasa, especialmente en condiciones de ausencia de labranza. Este atributo es el que dificulta marcadamente el control mediante tratamientos con herbicidas sistémicos post-emergentes.

En este trabajo de tesis se caracterizó la resistencia múltiple a herbicidas inhibidores de la ACCasa y a glifosato de una subpoblación de *Sorghum halepense* hallada en campos de Gobernador Crespo (GC-R).

Los ensayos *in vivo* con haloxifop-p-metil mostraron que la subpoblación GC-R es altamente resistente con valores de LD₅₀ y GR₅₀ mayores a ocho veces la dosis recomendada a campo. Experimentos de dosis respuesta sobre ciertos individuos seleccionados de esta subpoblación (GC-C4, GC-C6 y GC-C7) permitieron explicar la resistencia observada y justificar los valores de GR₅₀ y LD₅₀ de la subpoblación original. A su vez, los estudios

moleculares de secuencias nucleotídicas permitieron identificar dos mutaciones en el gen de la ACCasa. Las sustituciones provocadas por estos cambios (I2041N y A2096G) fueron reportadas previamente como responsables de conferir altos niveles de resistencia a varios principios activos de herbicidas del grupo A. Además, se encontró una sustitución no reportada (IXXXXT) sobre el dominio CT de la ACCasa, exclusiva de la subpoblación en estudio, que podría estar implicada en el fenotipo de resistencia. La identificación de nuevos alelos que confieren resistencia resulta de gran interés por su potencial aplicación en el desarrollo de cultivos tolerantes a herbicidas. Por otra parte, los estudios de qPCR realizados indicaron la ausencia de un mecanismo de amplificación génica. Además, no se encontraron evidencias para postular a un mecanismo de resistencia metabólica contribuyendo de manera significativa a la resistencia. Por consiguiente, los resultados obtenidos confirman que la resistencia a haloxifop-p-metil de la subpoblación GC-R se debe principalmente a un mecanismo asociado al sitio de acción.

Con respecto al glifosato, los estudios de dosis respuesta confirmaron la resistencia de la subpoblación GC-R con un valor de LD₅₀ poco mayor a la dosis recomendada a campo. Sin embargo, la biomasa remanente se vio severamente afectada a dicha dosis. Los estudios moleculares permitieron descartar un mecanismo asociado al sitio de acción (mutaciones en la secuencia y amplificación del gen *EPSPS*), de acuerdo con lo reportado previamente para esta maleza.

La profunda caracterización de los mecanismos de resistencia en la subpoblación GC-R, derivó en el desarrollo y optimización de una PCR cuantitativa alelo específica (ASqPCR) que posibilita la identificación rápida y confiable de la relación de alelos mutados respecto a los alelos salvajes en individuos de una especie poliploide con múltiples copias del gen bajo estudio.

Finalmente, se logró expresar de manera recombinante y obtener en fase soluble el dominio CT de la ACCasa de *Sorghum halepense*. La obtención de las distintas versiones alélicas del dominio CT recombinante abre las puertas para su caracterización funcional en presencia de inhibidores y para la exploración de nuevas sustituciones implicadas en la resistencia. Así, la optimización de esta herramienta de análisis representa una estrategia prometedora a fin de evaluar alelos novedosos que puedan encontrarse en poblaciones naturalmente resistentes.

Palabras claves: herbicidas, malezas, glifosato, resistencia, *Sorghum*, ACCasa

ABSTRACT

Herbicides represent the major weeds control tool for agricultural production. In Argentina, the consolidated agricultural model is mostly based on the use of glyphosate-tolerant soybean (either in monoculture, or in rotation with glyphosate-tolerant corn). The high efficiency combined with the simplicity of these systems resulted in the excessive use of a small number of herbicides, favoring the evolution of resistant weeds. The first case of herbicide resistance in Argentina was detected in 1996, and nowadays there are 18 different species that have evolved resistance to at least one herbicide. Considering that this number rises to 262 species worldwide, herbicide resistance in weeds is today one of the most important problems that agricultural systems are facing.

Johnsongrass (*Sorghum halepense* (L.) Persoon) was introduced as a forage grass into the country, but now is considered one of the most common and troublesome weeds in the world, causing major economic losses. *Sorghum halepense* is a perennial, tetra-allopolyploid C4 grass. It is highly competitive, interfering with fallows prior to spring-summer crops such as soybean, corn or sunflower. The main drawback that it presents for its effective chemical control is its perennial nature through the formation of large rhizomes, especially in non-tillage systems. This attribute makes johnsongrass very difficult to control through post-emergent applications with systemic herbicides.

In this thesis, multiple resistance to glyphosate and herbicides inhibiting ACCase from a subpopulation of *Sorghum halepense* found in Gobernador Crespo (GC-R) fields was characterized.

In vivo tests with haloxyfop-p-methyl showed that GC-R subpopulation was highly resistant, with LD₅₀ and GR₅₀ values greater than eight times the recommended field dose. Molecular studies of nucleotide sequences allowed two mutations in the ACCase gene to be identified. The substitutions caused by these changes (I2041N and A2096G) were previously reported as responsible for conferring high levels of resistance to several active ingredients of group A herbicides. In addition, an unreported substitution (IXXXXT) on the CT domain of the ACCase was exclusively found in the subpopulation under study, which could be involved in the resistance phenotype. The identification of new alleles that confer resistance is of great interest because of their potential application in the development of herbicide-tolerant crops. On the other hand, the qPCR studies carried out indicated the absence of a gene amplification

mechanism. In addition, no evidence was found to suspect of an enhanced metabolism significantly contributing to the resistance. Consequently, the results obtained confirm that the haloxyfop-p-methyl resistance of the GC-R subpopulation is mainly associated to a target-site mechanism of action.

Regarding glyphosate, dose response studies confirmed the resistance of the GC-R subpopulation with a LD₅₀ value slightly higher than the recommended field dose. However, the remaining biomass was severely affected at that dose. Molecular studies allowed to rule out a target-site resistance mechanism (either mutations in the sequence or amplification of the EPSPS gene), in line with previous reports for this weed.

The deep characterization of the resistance mechanisms in the GC-R subpopulation resulted in the development and optimization of an Allele-Specific quantitative PCR (ASqPCR). It enables a rapid and reliable identification of the ratio of mutated to wild-type alleles in individuals of a polyploid species with multiple copies of the gene under study.

Finally, it was possible to recombinantly express the CT domain of the *Sorghum halepense* ACCase. Obtaining the different allelic versions of the recombinant CT domain may allow for its functional characterization in the presence of inhibitors and for the exploration of new substitutions involved in resistance. Thus, the optimization of this analysis tool represents a promising strategy for the study of novel alleles that can be naturally found in resistant populations.

Keywords: herbicides, weeds, glyphosate, resistance, *Sorghum*, ACCase.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. LAS MALEZAS Y SU RELACIÓN CON LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

Se conoce como “malezas” a aquellas plantas que, a modo general, interfieren con la actividad humana tanto en áreas cultivadas como no cultivadas. En los agroecosistemas, son plantas que crecen en un cultivo y que no corresponden a la especie o al genotipo cultivado. Las malezas interactúan con los cultivos de distintas maneras. Pueden competir por los nutrientes, el agua, la luz y el espacio, y además hospedar insectos y microorganismos que pueden transmitirles enfermedades al cultivo al ofrecer condiciones óptimas para su desarrollo. A su vez, pueden liberar sustancias alelotóxicas o alelopáticas afectando el crecimiento de las plantas cultivadas. También interfieren con la cosecha del cultivo, incrementando los costos de tales operaciones y contaminando la producción. Consecuentemente, la presencia de estas plantas en las áreas cultivadas reduce la eficiencia de los insumos tales como el fertilizante y el agua de riego, fortalecen la densidad de otros organismos y plagas y, finalmente, reducen severamente el rendimiento y la calidad del cultivo (Labrada et al., 1994).

Las prácticas agrícolas necesarias para eliminar las malezas que crecen en las áreas sembradas con cultivos han ido evolucionando conjuntamente con los sistemas de producción de granos. Las formas de labranza históricamente representaron una parte importante de la producción agrícola, siendo la principal función de la preparación del suelo facilitar la siembra y acelerar el crecimiento de las plantas. Además, la preparación de la tierra era considerada necesaria para obtener un cultivo uniforme, sin interferencias de las malezas (Pérez, 2005).

Sin embargo, las prácticas de labranza contribuían en gran medida a la erosión y al desgaste de los suelos haciendo que los mismos pierdan sus nutrientes, volviéndolos infértiles. A finales de la década de 1980 se fue generando un nuevo concepto cuya base era la incorporación de prácticas agronómicas conservacionistas en los sistemas de producción. En esa década comenzó a adoptarse el método de siembra directa (una forma de agricultura de conservación, labranza mínima o labranza cero), el cual consiste en un sistema integral de producción de granos que evolucionó hacia la implantación del cultivo sin remoción del suelo y con una cobertura permanente del mismo con residuos de cosecha (Pognolote et al., 2011).

La adopción de la siembra directa derivó en un sistema productivo más sustentable, ya que entre sus beneficios se encuentran el de mejorar el aprovechamiento del agua, proteger

contra la erosión, mejorar el balance de materia orgánica, permitir sembrar donde arar no era posible por falta de agua, prolongar el ciclo agrícola, ahorrar en el uso de combustibles y emisiones contaminantes debido a una menor cantidad de maquinaria utilizada y aumentar el rendimiento de los cultivos (Pognolote et al., 2011; Trigo, 2011). Sin embargo, la expansión de la siembra directa en la agricultura se debe, en parte, a la adopción de herbicidas de amplio espectro y al desarrollo de cultivos transgénicos resistentes a esos herbicidas en la década del 90 (Vencill et al., 2012).

Las malezas pueden ser controladas en forma mecánica, cultural, biológica o química. La necesidad de impedir la pérdida de rendimiento y controlar las malezas con prácticas sustentables requiere que el agricultor adapte y combine herramientas de control dependiendo el cultivo, el sistema de cultivo y la población de malezas presentes en el campo. Las opciones de control pueden así solo proporcionar una reducción en las malezas y un cambio en la composición de especies en un dado sitio, dependiendo el nivel de presión de selección y sistema de cultivo usado.

El control químico de las malezas se realiza por medio de la aplicación de herbicidas y ha llegado a convertirse en la principal herramienta en todos los programas de manejo de malezas de la agricultura avanzada (Anderson, 1996; Owen, 2016). El uso extensivo de herbicidas en la agricultura se debe a que son productos altamente fiables y eficaces, de fácil manejo y económicamente rentables.

1.2. HERBICIDAS Y SUS MODOS DE ACCIÓN

Los herbicidas son productos orgánicos, generalmente sintéticos, que inhiben o interrumpen el crecimiento y desarrollo de una planta. En su mayoría, poseen una afinidad muy específica por ciertas proteínas con función enzimática localizadas en distintas regiones subcelulares. Generalmente, la afinidad está dada por la similitud estructural y química que existe entre el sustrato natural de la enzima y el herbicida. Mediante la unión al sitio activo de la enzima o a regiones cercanas al mismo, los herbicidas imposibilitan que el sustrato natural de la enzima haga lo mismo y la consecuencia inmediata es la inhibición del proceso metabólico mediado por dicha enzima.

Los herbicidas pueden clasificarse con diversos criterios:

- Por su selectividad: Selectivos (eliminan algunas plantas sin dañar significativamente a otras) o no selectivos (son fitotóxicos para todas las especies vegetales).
- Por su tiempo de aplicación: pre-emergentes (antes de que emerja el cultivo, pudiendo inclusive utilizarse en pre-siembra) o post-emergentes (luego de la emergencia del cultivo).
- Movilidad dentro de la planta: Sistémicos (son absorbidos y transportados a toda la planta vía xilema y/o floema) o de contacto (tienen un transporte limitado y solo dañan las partes de la planta con las que entraron en contacto).
- Persistencia: Residuales o no residuales.
- Familias químicas: triazinas, dinitroanilinas, fenoxiacéticos, cloroacetamidas, ciclohexanodionas, sulfonilureas y bipyridilos, entre otros.
- Modo de acción (MoA), haciendo referencia al proceso bioquímico que se ve afectado por el herbicida.

La Sociedad Americana de Malezas (WSSA- por su sigla en inglés) y el Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas (HRAC- por su sigla en inglés) han desarrollado esquemas de clasificación basados en el MoA 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 resulta una de las más relevantes debido a que es la que mejor describe cómo los herbicidas imponen la presión de selección sobre las malezas y su conocimiento tiene una utilidad directa en las estrategias de control (Vencill, 2012) (Tabla 1).

Actualmente existen 26 modos de acción diferentes para los más de 200 principios activos disponibles (algunos cuyo sitio de acción es desconocido). Los herbicidas más utilizados corresponden a los grupos A, B y G, los cuales encabezan el listado de números de especies que han desarrollado resistencia a los mismos (Heap, 2019).

TABLA 1. Modo de acción de los herbicidas según HRAC. (Adaptada de Délye et al., 2013a).

Grupo	Modo(s) de acción	Gen codificante de la enzima blanco	Vía afectada
A	Inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase)	Nuclear	Biosíntesis de ácidos grasos
B	Inhibición de la acetolactato sintasa (ALS)	Nuclear	Biosíntesis de aminoácidos (Leu, Ile, Val)
C	Inhibición de la proteína D1 del fotosistema II	Cloroplástico	Fotosíntesis (transferencia de electrones)
D	Desvío de los electrones transferidos por la ferredoxina del fotosistema I	Cloroplástico	Fotosíntesis (transferencia de electrones)
E	Inhibición de la Protoporfirinógeno Oxidasa (PPO)	Nuclear	Fotosíntesis (biosíntesis del grupo hemo)
F	Inhibición de la fitoeno desaturasa (PDS), la hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) o de una proteína desconocida	Nuclear	Fotosíntesis (biosíntesis de carotenoides)
G	Inhibición de la EnolPyruvylShikimato-3-fosfato Sintasa (EPSPS)	Nuclear	Biosíntesis de aminoácidos (Phe, Trp, Tyr)
H	Inhibición de la glutamina sintasa	Nuclear	Biosíntesis de aminoácidos (Gln)
I	Inhibición de la Dihidropterato sintasa	Nuclear	Biosíntesis de tetrahidrofolato
K1, K2	Aumento de la depolimerización de tubulina	Nuclear	Polimerización de microtúbulos
K3	Inhibición de la ácido graso sintasa (FAS)	Nuclear	Biosíntesis de ácidos grasos
L	Inhibición de la celulosa sintasa	Nuclear	Biosíntesis de pared celular
M	Desacople de la fosforilación oxidativa	-	Biosíntesis de ATP
N	Inhibición de la ácido graso elongasa	Nuclear	Biosíntesis de ácidos grasos
O	Estimulación de la proteína I de respuesta al inhibidor de transporte (TIR1)	Nuclear	Regulación de los genes de respuesta a auxina
P	Inhibición del transporte de auxinas	Desconocido	Señalización hormonal de largo alcance
Z	Desconocido	-	

1.3. RESISTENCIA A HERBICIDAS

Darwin, Lamarck, Mendel introdujeron la idea de selección natural y desarrollo de adaptaciones basados en la diversidad genética y mutaciones dentro de las especies. La selección natural permite que poblaciones sobrevivan exitosamente a condiciones cambiantes del entorno. Algunas condiciones del entorno cambian muy lentamente, tardando siglos, mientras que otros cambios ocurren solo en minutos. Los herbicidas, al igual que otros pesticidas y antibióticos, pueden verse como un evento de este tipo, que causan un estrés extremo y una alta presión de selección en las malezas específicas, permitiendo seleccionar los individuos mejor adaptados.

La resistencia es usualmente causada por mutaciones dentro del genoma de la planta. Se reportó que la tasa de mutaciones espontáneas en organismos biológicos está en el rango de 1×10^{-5} a 10^{-6} en gametos por generación y locus (Jasieniuk et al., 1996). Además, la variación natural de la tasa de mutaciones bajo condiciones de estrés puede ser mayor que bajo condiciones normales (Bridghes, 1997; Gressel, 2011; Mikula, 1995; Naito et al., 2009; Slack et al., 2006). No obstante, una mutación que confiere resistencia nunca es causada por la aplicación del herbicida, dado que cada compuesto antes de ser aprobado es ensayado previamente por su potencial mutagénico. Así, considerando el número de semillas por unidad de superficie y la tasa de mutación natural, un carácter de resistencia a herbicida podría ya estar presente en la población, ya sea por evolución espontánea o traída por transferencia de semilla (Délye et al., 2013a). La ventaja o desventaja de cada carácter de resistencia podría impactar en el costo biológico de la planta y así influir ampliamente en su diseminación y establecimiento en la población natural (Christoffers, 1999).

La definición científica fue presentada en 1998 por WSSA. La **tolerancia** es definida como *“la capacidad inherente de una especie a sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con herbicida. Esto implica que no hubo selección o manipulación genética para hacer la planta”*. Por su lado, la **resistencia** es definida como *“la capacidad adquirida heredable de una planta a sobrevivir y reproducirse después de la exposición a una dosis normalmente letal para el biotipo salvaje. En una planta, la resistencia puede ser que ocurra naturalmente o inducida por técnicas como la ingeniería genética, entre otras”* (Anonymous, 1998; Vila-Aiub y Fisher, 2014).

Por otra parte, para evitar reportar casos de resistencia sin que representen verdaderamente una amenaza significativa para el campo, es necesario cumplir con la definición dada por Heap, en la cual expresa que una maleza es considerada resistente si su respuesta a una aplicación de herbicida cumple con los dos siguientes requisitos: “*diferencias estadísticas genéticamente heredadas en respuesta al herbicida entre dos poblaciones de la misma especie de maleza*” y “*que la población resistente sobreviva a la dosis comercial recomendada bajo condiciones normales*” (Lorentz, 2012).

Algunas malezas no sólo evolucionan resistencia a un herbicida en particular, sino también a varios herbicidas de la misma o diferente clase química. La **resistencia cruzada** ocurre cuando un mecanismo de resistencia individual confiere resistencia a varios herbicidas, mientras que la **resistencia múltiple** se presenta cuando una planta o población acumula dos o más mecanismos de resistencia.

1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Las malezas resistentes pueden sobrevivir a la aplicación de herbicidas a través de una variedad de mecanismos que se pueden dividir en dos categorías amplias: los mecanismos asociados al sitio de acción o *TSR* (del inglés *target-site resistance*) y los mecanismos no asociados al sitio de acción o *NTSR* (del inglés *non-target-site resistance*). La *TSR* 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 *NTSR* 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. Ambos mecanismos de resistencia pueden ser causados por mutaciones estructurales o regulatorias. En el primer tipo, los cambios en la secuencia de nucleótidos que codifican la proteína modifican la estructura tridimensional de la misma disminuyendo la eficacia del herbicida. Por ejemplo, en el caso de *TSR* las mutaciones que producen sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión del herbicida en la proteína blanco, disminuyen la afinidad del mismo. Alternativamente, en el caso de *NTSR*, las mutaciones en el sitio activo de enzimas metabólicas o de transportadores pueden alterar la actividad de estas proteínas en la degradación del herbicida o compartimentación lejos del sitio de acción, respectivamente. Por otro lado, el segundo tipo de mutaciones resulta en una expresión diferencial de uno o varios genes en plantas resistentes comparadas con la sensible. Estas mutaciones son cambios en la secuencia del ADN que causan un incremento en la expresión de

la proteína blanco compensando la acción inhibitoria del herbicida (*TSR*); o la variación en la expresión de enzimas que intervienen en algún mecanismo *NTSR*. Este tipo de mutaciones son más bien alteraciones del ADN que no son fáciles de detectar debido a que son de diversa naturaleza, como por ejemplo amplificación del gen entero, cambios en la secuencia promotora ó procesos epigenéticos (ej, metilación del ADN), entre otros (Délye et al., 2013a, 2015; Powles y Yu, 2010).

La figura 1 muestra un esquema de cómo actúan los herbicidas después de su aplicación y los mecanismos de resistencia identificados en malezas que corresponden a cada paso de acción.

Luego de su aplicación, las moléculas del herbicida penetran en la planta (1), son translocadas al lugar donde se encuentra la proteína blanco (2), se acumulan en dicho lugar (3), se unen a la proteína blanco (4) y, finalmente, interrumpen estructuras o procesos celulares vitales (5). Por lo general, la inhibición de vías metabólicas esenciales deriva en la producción de especies reactivas del oxígeno que dañan las células y, en última instancia, causan la muerte de la planta.

Los múltiples mecanismos de resistencia que han evolucionado en las malezas interfieren con la acción del herbicida. En el caso de la *NTSR*, los mecanismos incluyen: una reducción en la penetración del herbicida por alteraciones en las propiedades de la cutícula o en la fisiología de la planta (A), una translocación reducida del herbicida hacia el sitio blanco (B), una degradación metabólica aumentada del herbicida (C), o una neutralización aumentada de moléculas citotóxicas generadas por la acción del herbicida (D). En el caso de la *TSR*, los mecanismos incluyen: una sobreproducción de la proteína blanco por mutaciones en las regiones regulatorias o por amplificación génica (E), y/o mutaciones estructurales que modifican la organización tridimensional y las propiedades electroquímicas de la proteína blanco (F). Estas modificaciones estructurales podrían no afectar la afinidad de unión del herbicida (F-1), reducirla (F-2), bloquearla (F-3) o pueden aumentar la estabilidad de la proteína blanco, resultando en hipersensibilidad al herbicida a nivel proteína (no mostrado) (Délye et al., 2013a).

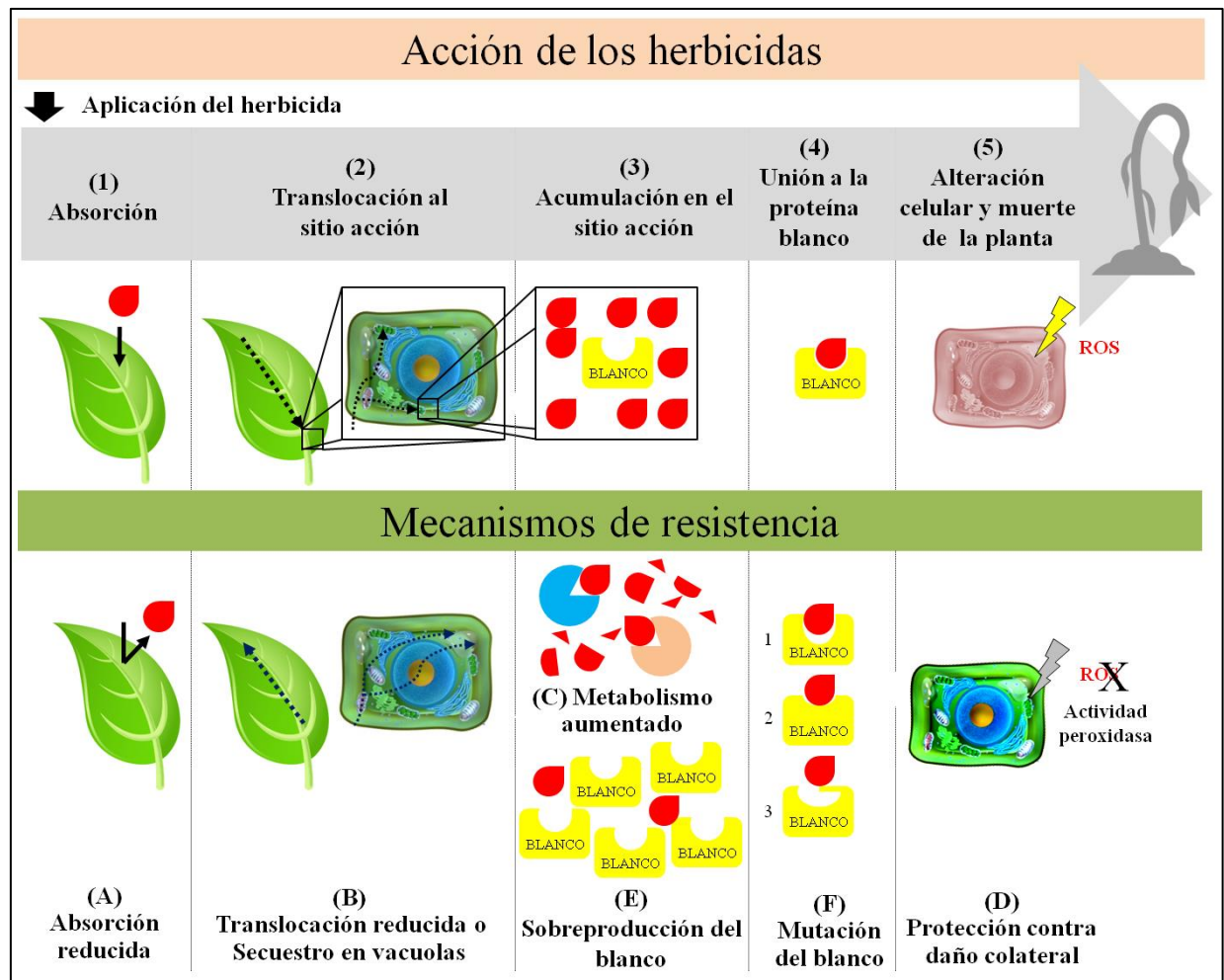


FIGURA 1. La acción de los herbicidas seguida de su aplicación (superior) y los mecanismos de resistencia identificados en malezas (inferior). (Figura adaptada de Délye et al., 2013).

Los mecanismos *NTSR* han sido descritos como “el lado oscuro de la resistencia”, debido a que muy poco se sabe si se compara con los mecanismos *TSR* (Délye, 2013b). 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 (Ghanizadeh y Harrington, 2017). Además, los *TSR* sólo confieren resistencia a herbicidas cuyo blanco de acción es la proteína en cuestión, mientras que los *NTSR* pueden conferir resistencia impredecible a herbicidas con varios modos de acción, incluido herbicidas aún no comercializados (Petit et al., 2010). Esta naturaleza múltiple de los mecanismos de *NTSR* tiene una incidencia directa sobre su evolución, ya que cada gen proporciona algún nivel de resistencia. En otras palabras, cuando un herbicida no logra el control total de las malezas en generaciones sucesivas, los diferentes genes *NTSR* podrían

contribuir a un aumento de la tolerancia a los herbicidas (Manalil, 2014). En las especies alógamas, donde los individuos intercambian y recombinan alelos, el desarrollo de *NTSR* debe ser más rápido que en las especies autógamias. Además, la rapidez con la que se acumulan los alelos *NTSR* en una población depende de la diversidad genética inicial y del tamaño de la población, la presión de selección y los costos de resistencia (Délye, 2013b).

La resistencia metabólica (esquemática en la Figura 1.C) es uno de los mecanismos de *NTSR* mejor conocidos y generalmente se describe como un proceso de desintoxicación vegetal que consta de cuatro fases. La fase 1 comprende un paso de activación donde las moléculas de herbicidas son modificadas de manera que ciertos grupos funcionales sean expuestos a enzimas de la fase 2. Usualmente, las reacciones de esta fase son las oxidaciones llevadas a cabo por citocromo P450 monooxigenasas (Cit P450) u oxidasas de función mixta. La fase 2 generalmente involucra conjugación que implica la unión de moléculas hidrofílicas voluminosas al herbicida activado, tales como grupos tioles o azúcares. En estos procesos están principalmente involucradas la glutatión S-transferasa (GST) o las glicosiltransferasas (GT), permitiendo el reconocimiento del herbicida por las proteínas de la siguiente fase. La fase 3 implica el transporte activo de las moléculas de herbicidas conjugadas hacia las vacuolas o espacio extracelular, proceso que comúnmente es llevado a cabo por transportadores tipo ABC. Finalmente, en la fase 4 las moléculas de herbicidas conjugadas son degradadas (Van Eerd et al., 2003; Yuan et al., 2007). Las enzimas de la fase 1 y 2 son ubicuas en plantas y participan en diversos procesos metabólicos como aquellos relacionados con el metabolismo secundario clave en la defensa de las plantas contra estreses bióticos y abióticos (Vila-Aiub y Fisher, 2014).

Esta resistencia asociada a la actividad del Cit P450 y GST ha sido estudiada en especies de gramíneas como *Alopecurus myosuroides* y *japonicus*, *Lolium rigidum*, *Echinochloa phyllopogon* y *Beckmannia syzigachne*, que mostraron resistencia a una amplia gama de herbicidas (Busi et al., 2017; Chen et al., 2018; Hall et al., 1997; Iwakami et al., 2014; Pan et al., 2016). De manera similar, algunos estudios han confirmado que la resistencia metabólica también puede estar presente en las malezas latifoliadas, aunque han sido sustancialmente menos numerosos (Figueiredo et al., 2018; Ma et al., 2013; Nakka et al., 2017; Oliveira et al., 2018; Torra et al., 2017).

Recientemente, se reportó una población de *Echinochloa colona* que metaboliza glifosato mediante la acción de la enzima aldo cetoglutarato reductasa, proponiendo esta vía enzimática como la responsable de conferir la resistencia (Pan et al., 2019).

Delye et al. (2013b) propusieron que parte de la *NTSR* puede ser constitutiva y otra parte podría ser inducida, porque el proceso de desintoxicación de la planta se encuentra bajo control genético polialélico. Hasta la fecha no se ha descrito ningún factor de transcripción involucrado en la *NTSR* en las malezas.

Otro mecanismo de *NTSR* es la reducción en la translocación del herbicida (Figura 1.B), descrita como una restricción en el movimiento del herbicida dentro de la planta (a través del xilema y/o el floema) y/o la compartimentación del herbicida (secuestro en la pared celular o en la vacuola; exclusión activa de los cloroplastos) (Délye, 2013b). Tempranamente, se ha documentado una reducción de la translocación del herbicida a los tejidos meristemáticos en poblaciones resistentes a glifosato de *Conyza canadensis* y *Lolium rigidum*, respectivamente (Feng et al., 2004; Koger y Reddy, 2005a; Lorraine-Colwill et al., 2002; Wakelin et al., 2004). Actualmente, existen numerosos reportes de especies resistentes a glifosato por translocación reducida del herbicida (Ghanizadeh y Harrington, 2017; Sammons y Gaines, 2014).

Aunque todavía no se han identificado los alelos involucrados, dos estudios a nivel molecular apuntan a la participación de los transportadores ABC en este tipo de resistencia; específicamente, en la reducción de la translocación de glifosato por secuestro en vacuola en *Conyza canadiensis* (Tani et al., 2015) y en el eflujo de 2,4-D en *Raphanus raphanistrum* (Goggin et al., 2016).

Hoy en día, el número de casos de *NTSR* para los grupos de herbicidas más importantes del mundo ha crecido notablemente (Délye et al., 2013b, Perotti et al., 2020), lo que representa una verdadera preocupación entre los productores dado que dichos mecanismos pueden conferir resistencia a herbicidas con varios modos de acción, como se detalla más adelante.

1.5. EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA EN MALEZAS

La introducción de herbicidas selectivos desde finales de la década de 1940 ha aumentado la rentabilidad y facilitado el trabajo de los agricultores. Sin embargo, esta época dorada de los herbicidas se terminó con la aparición del primer caso de resistencia a 2,4-D en 1957 en poblaciones de *Daucus carota* L. (Switzer, 1957). A partir de ese momento, los casos de malezas resistentes aumentaron y actualmente existen reportadas 262 especies de malezas resistentes en todo el mundo a 23 de los 26 sitios de acción conocidos (Heap, 2019).

El uso continuo del mismo herbicida o la aplicación de herbicidas con el mismo modo de acción (MoA), inevitablemente condujo a la selección de poblaciones de malezas resistentes

(Shaner y Beckie, 2014). Durante las últimas dos décadas, la adopción extensiva de cultivos transgénicos tolerantes a herbicidas como el glifosato llevó a la industria agroquímica a frenar el desarrollo de nuevas moléculas de herbicidas, particularmente aquellas con nuevos modos de acción. La rápida eficacia combinada con la simplicidad de operación de estos sistemas resultó en el uso excesivo de un pequeño número de herbicidas, favoreciendo la evolución de las malezas resistentes.

Son muchos los factores que influyen en el proceso de evolución de la resistencia y, a grandes rasgos, pueden clasificarse en dos grupos: los factores antropológicos y los factores biológicos (Perotti et al., 2020; Powles y Yu, 2010).

Los factores antropológicos son aquellos relacionados con las intervenciones humanas y las prácticas agronómicas seleccionadas para el manejo de malezas. Estos incluyen la elección de diferentes herbicidas, su frecuencia de utilización y las dosis de aplicación en el campo. La rotación de herbicidas de igual modo de acción y la utilización de herbicidas con elevada actividad residual favorecen la selección de plantas resistentes. Otros factores de manejo agronómico como el uso de prácticas alternativas de control de malezas, rotación de cultivos y principios activos y alternancia en las prácticas de labranza son aspectos de considerable importancia.

Los factores biológicos, por su parte, incluyen la biología y la genética de cada especie de maleza y el mecanismo de resistencia involucrado. Así, la frecuencia, el número y la dominancia de los caracteres de resistencia pre-existentes a la aplicación de un herbicida son factores condicionantes del tiempo en el que resulta un nuevo caso de resistencia en una determinada población (Jasieniuk et al., 1996). Además, los costos biológicos o efectos de estos caracteres sobre la capacidad reproductiva de la especie tienen inherentemente un impacto en la tasa de evolución de la resistencia, dada la menor habilidad competitiva de las plantas resistentes en ausencia de la presión de selección (Vila-Aiub et al., 2009). Por último, ciertos factores biológicos como el porcentaje de autogamia y alogamia, la producción de semillas y su longevidad en el suelo, el éxito del flujo génico por dispersión de semillas y polen, tienen una incidencia directa en la dispersión de los alelos causantes de la resistencia (Busi et al., 2009; Jasieniuk et al., 1996).

Recientemente se propuso al cambio climático global como un factor inadvertido que estaría actuando como presión de selección sobre malezas resistentes a herbicidas, sobre todo aquellas que evolucionaron mecanismos *NTSR* (Perotti et al., 2020). Debido a que la *NTSR* es

parte de una respuesta al estrés abiótico (Délye, 2013b), es válido pensar como hipótesis que las plantas con este tipo de mecanismo tengan más probabilidades de sobrevivir bajo condiciones de estrés, tales como altas temperaturas o patrones de precipitaciones alterados, producto del mismo cambio climático.

Los potenciales efectos adversos de los pesticidas sobre la salud humana y el ambiente, combinado con el incremento en los casos de resistencia y la falta de desarrollo de nuevos MoA, han resultado en demandas políticas y regulatorias para una menor dependencia de los pesticidas. Por esto, se recomienda el uso de programas de manejo de malezas que combinan múltiples métodos. Aunque el concepto de “Manejo Integrado de Malezas” (IWM, por sus siglas en inglés) fue originado hace más de medio siglo atrás, su adopción ha sido bastante pobre (Moss et al., 2019a).

Se podrían usar dos estrategias fundamentales para mitigar (proactivas) o controlar (reactivas) la resistencia a herbicidas. Las primeras intentan reducir la presión de selección de herbicidas al diversificar los métodos de control y así minimizar la supervivencia y reproducción de individuos resistentes. Las últimas intentan disminuir la propagación de la resistencia debido a la producción de semillas, dispersión de polen y la diseminación de propágulos (Norsworthy et al., 2012).

Las estrategias actuales suelen consistir meramente en medidas reactivas, fenómeno que ha sido asociado a múltiples factores (Hurley y Frisvold, 2016; Norsworthy et al., 2012). Brevemente, las dos razones principales para la menor adopción de estrategias proactivas por parte de los productores son el aumento de los costos de control de malezas, junto con la percepción de que los beneficios de retrasar la resistencia son inciertos, además de la expectativa de que nuevos herbicidas estarán disponibles en el futuro. Sin embargo, se requiere una mejor comprensión del componente humano relacionado al manejo de malezas para abordar este tema tan complejo y multifactorial.

En síntesis, existe un conjunto de prácticas que debieran integrarse dentro de los programas de manejo de malezas para abordar una intensificación agrícola sostenible, como será necesario en las próximas décadas para satisfacer las demandas de alimentos a nivel mundial.

1.6. SITUACIÓN ACTUAL EN ARGENTINA Y SU REGIÓN

Actualmente, el 90% de los productores en Sudamérica utilizan la agricultura sin labranza y el glifosato tiene un rol clave en este sistema. Los cultivos tolerantes a glifosato representan casi el 96 % del área total cultivada de soja (ya sea en monocultivo, o bien en una rotación con maíz transgénico tolerante). El glifosato es aplicado de tres a cinco veces por año en campos con soja resistente a glifosato (RG). Esta tecnología ha sido exitosamente utilizada los últimos 20 años en Argentina, Brasil, Paraguay, Bolivia y Uruguay. Sin embargo, el uso de glifosato sin rotación de herbicidas o en algunos casos mezclado con otra clase de herbicidas llevó a la selección de poblaciones de malezas RG a lo largo de las principales regiones agrícolas (Peterson et al., 2018).

En los '90, en esta región sudamericana, fueron predominantes las resistencias a herbicidas del grupo A y B (inhibidores de ACCasa y ALS), debido al uso intensivo de estos herbicidas en campos de soja convencional. Es importante destacar que ambos grupos de herbicidas, junto al grupo C1 (inhibidores del fotosistema II) son clasificados de “alto riesgo” en base a la cantidad de casos de resistencia a nivel mundial (Moss et al., 2019b)

En nuestro país, el primer caso de resistencia a herbicidas se reportó en el 1996 para la especie *Amaranthus quitensis*, conocida como “yuyo colorado” (Tuesca y Nisensohn, 2001). Los biotipos, encontrados en el sur de las provincias de Santa Fe y Córdoba, presentaban resistencia cruzada a los inhibidores de la ALS imazetapir (IMI) y clorimurón-etil (SU), a cuya aplicación repetida habían sido expuestos (Heap, 2019). En 2005, se registró un biotipo de *Sorghum halepense* resistente a glifosato en campos cultivados con soja en la provincia de Salta (Heap, 2019), aunque el primer reporte científico fue realizado dos años después (Vila-Aiub et al., 2007). A partir de ese momento, innumerables casos de resistencia a herbicidas de distintos grupos en diversas malezas son denunciados periódicamente por agricultores, extensionistas y técnicos profesionales. Al día de la fecha, son 18 las especies de malezas que han desarrollado resistencia a herbicidas pertenecientes al menos a un modo de acción en Argentina (Heap, 2019).

1.7. *Sorghum halepense*

Sorghum halepense (L.) Persoon, o sorgo de Alepo, es una de maleza perenne que pertenece a la familia de las poáceas. La etimología de la palabra *halepense* viene del latín “de

la ciudad Haleb” (Aleppo), de Siria. Es una especie cosmopolita, originaria de la región mediterránea, existiendo cierta controversia en este aspecto (Leguizamón, 2006).

Fue introducido en los EE.UU. con fines de utilización forrajera por el Sr. Johnson, un productor de Alabama y Carolina del Sur en 1840 y a fines del siglo, la especie se había extendido en todo el país (Mc Whorter, 1989; Warwick y Black, 1983). La introducción en la Argentina a principios de siglo pasado fue con el mismo objetivo que en EE.UU. Dado su carácter de planta invasora fue declarado plaga de la agricultura en 1930. Posteriormente, en 1951 se prohibió su siembra y multiplicación en todo el territorio nacional. Hacia mediados de la década del '70 el sorgo de Alepo constituía un problema de envergadura, que limitaba la productividad de los sistemas de producción, ocasionando pérdidas de rendimiento muy importantes (Leguizamón, 2006).

Es una especie C4 de ciclo estival muy invasiva que afecta principalmente cultivos de soja, maíz y girasol en nuestro país. Presenta un ciclo anual de desarrollo que se inicia para la parte aérea en primavera, fructificando en verano y multiplicándose a través semillas y rizomas. Se considera que es autógama pero no completa, exhibiendo un 6 a 8% de alogamia (Leguizamón, 2006). Es tetra - aloploide ($2n = 4x=40$), originada de la hibridación entre *Sorghum propinquum* y *Sorghum bicolor ssp arundinaceum* y posterior duplicación de cromosomas (Fernández et al., 2013).

La amplia distribución y prevalencia del sorgo de Alepo es debida a su capacidad reproductiva y su alta adaptabilidad (Kaloumenos et al., 2009) Es decir, dentro de las características que lo hacen una maleza altamente competitiva, se encuentran la alta producción y longevidad de sus semillas (Warwick y Black, 1983) y la producción de rizomas que constituyen un sistema de propagación muy eficaz. Estos últimos proporcionan a la planta la capacidad de brotar temprano y empezar a crecer, llegando a ser más grande que otras plantas en el lugar, y, como resultado, tener mayor potencial fotosintético debido a una mayor superficie, lo que permite además desplazar a las plantas vecinas más jóvenes. También pueden inhibir la germinación y el desarrollo de plántulas de muchas especies cultivadas (trébol, soja y trigo) a través de la producción de químicos alelopáticos (Friedman y Horowitz, 1970; Newman, 1989). Otra característica es su plasticidad para adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales, incluso tolerando la sequía (Warwick y Black, 1983).

El sorgo de Alepo es una de las malezas que tiene un récord de estrategias y metodologías usadas en la productividad agropecuaria para limitar su crecimiento y difusión.

Además de los métodos preventivos y el diseño de herramientas específicas para el control mecánico, su presencia ha sido motivo del uso de una gama creciente de herbicidas, al principio no selectivos (como el glifosato) y luego selectivos, tanto de aplicación en presembrado como en post-emergencia.

Si bien presenta una abundancia regional significativamente menor que en décadas anteriores, también es cierto que aún permanece ampliamente difundido en los ecosistemas agropecuarios. Se presume que la tendencia hacia la disminución y/o eliminación de las labranzas tendría como secuela cambios en la longevidad de las estructuras de persistencia (semillas, coronas y rizomas) y en la dinámica del crecimiento y desarrollo de las estructuras aéreas y subterráneas que favorecerían su persistencia bajo las nuevas condiciones de cultivo. Estas hipótesis se amplían a una escala significativamente mayor si se agrega el hecho de la aparición de biotipos resistentes a glifosato y a herbicidas inhibidores de ACCasa y de ALS.

1.8. IMPORTANCIA DEL CONOCIMIENTO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA PARA EL MANEJO DE MALEZAS.

Como se mencionó anteriormente, el manejo de malezas integrado implica diversificar las prácticas de control para reducir la presión evolutiva de selección que favorece a los biotipos de malezas resistentes a herbicidas. Para ello se requiere de un amplio conocimiento de las poblaciones de malezas. Esto incluye el conocimiento de la biología de las flores y los sistemas reproductivos, la fecundidad, las variaciones en la latencia de las semillas, las distancias de migración de las semillas y el polen, el balance costo/beneficio del mantenimiento del polimorfismo genético, entre los aspectos de mayor relevancia. Además, identificar y dilucidar las bases moleculares de los mecanismos de resistencia es también de crucial importancia (Perotti et al., 2020).

Un factor genético importante a considerar es la ploidía de cada población de malezas. Muchas de las principales malezas son poliploides, siendo genéticamente más diversas que las diploides por contener más copias de cada gen debido a que contienen más de un genoma. Así, sería esperable que esta redundancia de genes posibilite una mayor diversidad de mutaciones en los genes de resistencia (RH) y promueva una evolución más rápida. Sin embargo, en las especies poliploides, la magnitud de la resistencia conferida por una mutación en un gen puede diluirse por múltiples alelos, lo que desencadena una correlación negativa entre el número de

copias del gen target y el nivel de resistencia (Panozzo et al., 2013). Sólo unos pocos estudios intentaron determinar el vínculo entre la ploidía y la tasa de evolución de las plantas con RH, encontrándose una asociación negativa entre ellos (Yu et al., 2013a).

Por su parte, comprender los mecanismos de resistencia de una maleza a un herbicida es importante en varios sentidos. Por ejemplo, en el caso del glifosato, revelar los mecanismos de resistencia permitió a los científicos comprender mejor el modo de acción del glifosato y tomar conciencia sobre la rápida propagación de la resistencia entre las distintas especies de malezas (Shaner et al., 2012).

Además, conocer si una población de malezas presenta mecanismos de *TSR* y/o *NTSR* es crucial para el desarrollo de estrategias de manejo de las poblaciones resistentes a herbicidas. Si el mecanismo está asociado al sitio de acción causando resistencia solo a algunos herbicidas con el mismo MoA, se puede utilizar otro herbicida de distinta familia química. Sin embargo, la existencia de mutaciones que confieren distintos esquemas de resistencia cruzada entre herbicidas de un mismo modo de acción sugiere que lo más prudente es siempre cambiar por un herbicida de diferente MoA. El empleo de mezclas o las aplicaciones secuenciadas de herbicidas distintos es una forma efectiva de retardar la evolución de resistencia (Beckie y Reboud, 2009; Busi et al. 2020). No obstante, el uso recurrente de una misma mezcla podría seleccionar biotipos que hayan acumulado mecanismos de resistencia a ambos herbicidas (resistencia cruzada o múltiple).

Por el contrario, la presencia de mecanismos *NTSR* es más compleja de interpretar en términos de decisiones de manejo. Diferentes mecanismos de *NTSR* fueron reportados como responsables en varios casos de resistencia múltiple. No obstante, si varios herbicidas comparten una misma ruta de degradación, entonces todos ellos serán seleccionados por el mismo mecanismo de resistencia y cambiar el uno por el otro no tendrá efecto alguno. La detección de mecanismos de *NTSR* será definitivamente más útil en los programas de manejo de malezas cuando se logre una mejor comprensión de los mismos.

Por otra parte, conocer el tipo de mecanismo que proporciona la resistencia permite tomar decisiones acertadas en cuanto a las dosis utilizadas y así retrasar aun más la evolución de las resistencias. La *TSR* generalmente es gobernada por genes de herencia monogénica que suelen conferir altos niveles de resistencia, con excepciones como el caso del glifosato, donde sustituciones simples en la enzima blanco otorgan bajos niveles de resistencia (Vila-Aiub et al., 2019). La evolución de la resistencia será más rápida al ser monogénica, y además se ve

acelerada cuando el herbicida es altamente fitotóxico o se usan altas dosis, debido a que prácticamente todos los individuos sobrevivientes que pasen su descendencia a la próxima generación serán portadores del gen de resistencia (Jasieniuk et al., 1996). Por el contrario, dosis bajas o herbicidas poco letales permitirán que un mayor número de individuos susceptibles sobrevivan y produzcan semilla, lo que podría retrasar el incremento de la frecuencia de individuos TSR (Fisher, 2013).

En el caso de la *NTSR* la situación puede ser muy diferente, ya que la resistencia está controlada por varios genes. A menudo se trata de genes de efecto menor que confieren bajos niveles de resistencia, cuya acumulación en un mismo genotipo resulta en niveles de resistencia suficientes como para permitir la supervivencia a un tratamiento de herbicida con la dosis comercial. En este caso, las bajas dosis capaces de matar al biotipo susceptible permitirían la supervivencia de individuos con algunos genes de resistencia parcial. Éstos podrían intercambiar y acumular genes de resistencia, o tendrían más tiempo para que algunos de estos genes se dupliquen o amplifiquen. El resultado sería el aumento del nivel de resistencia individual con el tiempo, tras el apilamiento/incremento de los alelos *NTSR* (Busi et al., 2012; Busi y Powles, 2009; Manalil, 2011, 2014; Neve y Powles 2005a, 2005b;). Si bien se asume que los mecanismos *TSR* otorgan mayores niveles de resistencia que los *NTSR*, se encontraron excepciones a esta regla. Por citar ejemplos, en una población de *A. myosuroides* la contribución de la *NTSR* fue significativamente mayor a la resistencia otorgada por la mutación *TSR* en la posición 1781 (Kaundun et al., 2013a). Asimismo, la comparación de los niveles de resistencia a glifosato entre cuatro poblaciones de *Amaranthus palmeri* con mecanismo *NTSR* exclusivo versus tres poblaciones con *NTSR* en co-existencia con *TSR* arrojó las mismas conclusiones (Domínguez- Valenzuela et. al, 2017)

Por último, es importante tener en cuenta que identificar un cambio genético (ya sea una mutación estructural del gen o diferencias en la expresión) entre plantas resistentes y sensibles, no es suficiente para dilucidar el mecanismo responsable de la resistencia. Es necesario dar evidencias concretas de que ese cambio genético sea el responsable del fenotipo observado. Tales evidencias pueden ser obtenidas mediante estudios bioquímicos o genéticos. Por ejemplo, mediante estudios genéticos de co-segregación del fenotipo resistente con el alelo en estudio; o la expresión de las versiones de las proteínas sensibles y resistentes de modo recombinante y posterior comparación de sus respuestas frente al herbicida. Otra forma es comparar

sensibilidades de organismos enteros (*E. coli*, levaduras o plantas) conteniendo transgenes que sólo difieren en la mutación encontrada (pruebas de concepto).

De otro modo, si una mutación identificada es idéntica a otra que ha sido previamente confirmada que confiere resistencia en una especie distinta, sería un buen argumento – pero incompleto- de que la mutación está implicada en la resistencia. Comparar dos especies o dos poblaciones distintas con la misma sustitución no dice nada acerca de la existencia de otro mecanismo de resistencia en cada población particular. Con igual importancia, los análisis genéticos también pueden ser usados para determinar si múltiples mecanismos de resistencia están presentes en una población.

El diagnóstico oportuno es crucial para el manejo de las resistencias y su mitigación, por esto la confirmación de la resistencia en poblaciones de malezas requiere métodos rápidos y precisos para identificar biotipos resistentes. Para esto, están disponibles una variedad de enfoques distintos para confirmar y evaluar la resistencia en malezas (revisado por Burgos et al., 2013; Délye et al., 2015). En la actualidad son cada vez más los grupos de investigación abocados al estudio de los mecanismos moleculares que otorgan resistencia a herbicidas en malezas. Esto posibilita un accionar más rápido y el movimiento de la balanza hacia el lado de las estrategias proactivas.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Dilucidar el mecanismo de resistencia a haloxifop-p-metil y glifosato presente en la población de *Sorghum halepense* hallada en Gobernador Crespo, provincia de Santa Fe. Se pretende focalizar los estudios en la identificación de nuevos alelos para su posible aplicación en el desarrollo de cultivos resistentes a estos herbicidas.

2.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1) La resistencia a haloxifop-p-metil de una subpoblación de *Sorghum halepense* hallada en campos de la localidad de Gobernador Crespo es producida por un mecanismo *TSR* (por su sigla del inglés *target-site resistance*).
- 2) La obtención del dominio carboxiltransferasa (CT) de la enzima ACCasa recombinante de *Sorghum halepense* constituye una importante herramienta para la profundización del estudio del mecanismo de acción de los herbicidas del grupo A.
- 3) La resistencia a glifosato en la población en estudio se encuentra asociada a un mecanismo *NTSR* (por su sigla del inglés *non-target-site resistance*).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal fue proporcionado por el grupo de trabajo del Profesor Daniel Tuesca, de la cátedra de Malezas de la Facultad de Ciencias Agrarias, Zavalla (UNR) y el Ingeniero Agrónomo Juan Carlos Papa de la EEA INTA Oliveros. Se recolectaron muestras de rizomas y semillas de plantas de *Sorghum halepense* en campos de las siguientes localidades:

- Biotipo resistente a arilfenoxipropionatos y glifosato hallado en Gobernador Crespo (30° 22' 59.88" S, 60° 25' 0.12" O), provincia de Santa Fe, llamado GC-R. Este campo presentaba una historia de sucesivas aplicaciones con los herbicidas mencionados durante al menos cinco campañas previas a la toma de muestra.

- Biotipo sensible a arilfenoxipropionatos y glifosato hallado en Zavalla (33° 1' 34.92" S, 60° 53' 17.47" O), provincia de Santa Fe, llamado Zav-S. Es importante destacar que el área del campo donde fueron recolectados nunca fue tratada con herbicidas.

Se seleccionaron individuos sobrevivientes a una aplicación de dosis de campo del herbicida haloxifop-p-metil (64,8 g ingrediente activo -ia- ha⁻¹) de la subpoblación resistente (GC-R) y se efectuó el clonado vegetativo a partir de la propagación de rizomas. El haloxifop-p-metil utilizado está registrado comercialmente como Galant® HL, C.E. 54 % (P/V), de Dow Agrosience Argentina. Al mismo tiempo se clonaron, mediante este método, individuos de la subpoblación susceptible (Zav-S) sin previa selección. Los rizomas fueron colocados en macetas plásticas de 5 L conteniendo mezcla de tierra, arena y perlita en partes iguales. Las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo con un régimen de 16 horas de luz y una temperatura día/noche de 24 ± 3 °C.

Simultáneamente, cada individuo seleccionado fue evaluado por ensayos moleculares de ASPCR (PCR alelo específica) y marcadores CAPS (del inglés *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) y/o secuenciación. Posteriormente, los clones vegetativos de los tres individuos seleccionados (GC-C4, GC-C6 y GC-C7) portadores de alelos de interés, fueron

sometidos a experimentos de curvas dosis-respuesta para evaluar su contribución al fenotipo de resistencia *in vivo* en la subpoblación original.

3.2. EXPERIMENTOS DE DOSIS-RESPUESTA

Se realizaron experimentos de dosis respuesta con las subpoblaciones halladas a campo (GC-R y Zav-S) y los clones vegetativos seleccionados portadores de alelos de interés (GC-C4, GC-C6, GC-C7 y Zav-S1).

Para producir plántulas homogéneas, los rizomas fueron cortados en fragmentos de 3 a 4 cm de longitud y estratificados en bandejas de 20 cm x 30 cm x 10 cm. Para esto, los fragmentos de rizomas se cubrieron con una mezcla de tierra, perlita y arena en partes iguales y se crecieron en invernadero a 25-30°C. Diez días después de la emergencia, las plántulas se trasplantaron en vasos de 500 cm³ conteniendo mezcla de tierra, perlita y arena.

Los herbicidas (haloxifop-p-metil y glifosato) fueron aplicados cuando las plántulas estaban en el estadio de 4-5 hojas (40 cm de alto), con un equipo aspersor de presión constante con boquillas de ventilador planas a 206,84 kPa, calibrada para suministrar 116 L ha⁻¹.

Las plántulas de las subpoblaciones GC-R y Zav-S fueron tratadas con las siguientes dosis de haloxifop- p- metil: 32,4; 64,8; 129,6; 259,2 y 518,4 g ia ha⁻¹. Estas dosis corresponden a 1/2X, 1X, 2X, 4X y 8X, siendo 1X la dosis recomendada a campo. De modo similar, los clones vegetativos de los individuos seleccionados resistentes (GC-C4, GC-C6 y GC- C7) y sensible (Zav-S1) fueron tratados con haloxifop- p- metil con un rango de dosis de 1X a 32X y 1/8 X a 2X, respectivamente. En cada experimento se incluyó un control no tratado para cada subpoblación.

Por otro lado, la subpoblación GC-R fue tratada con glifosato (Roundup®, full II, ia: glifosato 66.2% P/V, Monsanto Argentina) con las dosis: 270, 540, 1080, 2160 y 4320 g ia ha⁻¹, correspondientes a dosis 1/4X a 4X, y la susceptible Zav-S con 33,5; 67,5; 135; 270; 540 y 1080 g ia ha⁻¹ correspondiente a dosis 1/32 a 1X, respectivamente.

Los experimentos se realizaron al menos dos veces y con un diseño completamente aleatorizado con 3 o 5 réplicas por dosis (1 planta por maceta).

Se determinó la supervivencia y el peso seco 20 y 30 días después de la aplicación de los herbicidas glifosato y haloxifop-p-metil, respectivamente. La supervivencia de las plantas se evaluó mediante el registro del número de plantas no controladas en cada réplica. Para el registro de la biomasa, se colocó la parte aérea de las plantas sobrevivientes de cada maceta en

estufa 48 horas a 60°C. Los datos se expresaron como porcentaje de supervivencia y biomasa seca en relación al control no tratado.

Las curvas fueron ajustadas por medio de un modelo de regresión no lineal descrito por Seefeld et al. (1995) cuya expresión es:

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

donde Y representa la biomasa o supervivencia (como porcentaje del control no tratado) de plantas expuestas a las diferentes dosis de herbicidas utilizadas, C es la respuesta media a una dosis de herbicida muy alta (límite inferior), D es la respuesta media cuando la dosis de herbicida tiende a cero (límite superior), x es la dosis del herbicida, 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, del inglés “50% growth reduction”) o una reducción del 50% de la supervivencia (LD₅₀, del inglés “50% lethal dose”). Mediante el cociente de los GR₅₀ o LD₅₀ (dosis de herbicida que causa un 50% de reducción en la biomasa o supervivencia, respectivamente) se estimó el factor de resistencia (FR). El error asociado se calculó mediante propagación de las variancias obtenidas en cada curva. Las diferencias significativas mínimas se calcularon mediante *t-test* o el ensayo de Tukey ($\alpha = 0,05$) usando el software Sigma Plot (versión 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

3.3. TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DEL CITOCROMO P450

Las plántulas de *S. halepense* Zav-S y GC-R generadas a partir de rizomas, fueron crecidas en macetas de 500 cm³ hasta un estadio de 3-4 hojas a campo o en invernadero.

Las plántulas crecidas a campo en macetas con tierra y regadas con agua fueron divididas en tres grupos que recibieron los diferentes tratamientos: i) butóxido de piperonilo (PBO), ii) haloxifop-p-metil y iii) ambos tratamientos (PBO seguido de haloxifop-p-metil). El PBO (2100 g ia ha⁻¹) se aplicó una hora antes que el haloxifop-p-metil (64,8 g ia ha⁻¹), ambos con el equipo aspersor de presión constante descrito en la sección anterior (absorción foliar). Se utilizaron 5 plantas por tratamiento.

Por otra parte, plántulas crecidas en invernadero en macetas con perlitas y regadas con medio MS (1g/L) se trataron con 1-aminobenzotriazol (ABT) (70 µM), haloxifop-p-metil (64,8 g ia ha⁻¹) ó ABT con haloxifop-p metil. El tratamiento con ABT fue realizado 1 día antes del

herbicida mediante regado (absorción radicular), mientras que el haloxifop se aplicó con el equipo aspersor. En este caso, se utilizaron 6 plantas por tratamiento.

En ambos experimentos se incluyó un control no tratado y se determinó el peso seco 30 días después de la aplicación del tratamiento. Las diferencias significativas mínimas se calcularon mediante el ensayo Tukey ($\alpha = 0,05$) usando el software Sigma Plot.

3.4. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

La preparación de ADN genómico de hojas de *Sorghum halepense* de los biotipos resistentes y susceptibles se llevó a cabo mediante el uso de buffer CTAB de acuerdo al método informado por Lipp et al. (1999). Para ello, se homogeneizaron 100 mg de hojas jóvenes en mortero en presencia de nitrógeno líquido. Finalmente, el ADN genómico obtenido se eluyó en 50 μ l de agua estéril y fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso.

3.5. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y TRATAMIENTO CON DESOXIRRIBONUCLEASAS

La preparación de ARN total de hojas de plantas individuales de *Sorghum halepense* de los biotipos resistentes y susceptibles se llevó a cabo utilizando el kit “Spectrum Plant total RNA kit” según instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich Cat. STRN250). Se homogeneizaron 50 mg de hojas jóvenes en mortero en presencia de nitrógeno líquido. El ADN contaminante fue eliminado mediante un tratamiento con desoxirribonucleasas (DNasa). Para ello, se incubó en cada caso con 1 U de enzima RQ1 (Promega, Cat. M6101) a 25°C durante 20 minutos. Finalmente, los ARN obtenidos se eluyeron dos veces de la columna en 50 μ l de agua destilada libre de ribonucleasas tratada con 0,1 % (V/V) DEPC (dietil pirocarbonato). Los ARN totales obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su posterior uso.

3.6. ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DE ADN Y/O ARN OBTENIDO

La integridad del ADN y/o ARN obtenido se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% (P/V) en buffer Tris- Acetato- EDTA (TAE) (40 mM Tris acetato; 1 mM EDTA) en presencia de bromuro de etidio (Promega) o de Syber Safe (Invitrogen). La corrida electroforética se realizó a una intensidad constante de 60 mA. Las muestras se diluyeron en una relación 6:1 con buffer de siembra (2,5% (P/V) Ficoll 400, 11 mM EDTA; 3,3 mM Tris

HCl pH= 8; 0,017% (P/V) SDS (dodecilsulfato sódico); 0,015 % (P/V) azul de bromofenol). Como marcador de tamaño molecular se utilizó ADN de fago λ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* / *HindIII* (Promega), 1 kb Molecular Ruler (Biorad) o cincuenta marker (Biodynamics) Los geles fueron visualizados en un transiluminador UVP (PhotoDoc-It™ Imaging System) y Gel Doc™ XR+ System. La concentración del ARN y ADN extraído se estimó por comparación visual de las bandas obtenidas con el marcador de tamaño molecular.

3.7. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Para la reacción de transcripción reversa se incubó en cada caso un volumen equivalente a 2 μg de ARN total con 0,4 μg de oligo(dT) (Biodynamics) durante 5 minutos a 70°C para favorecer la desnaturalización. Transcurrido este tiempo, se transfirió rápidamente a hielo y se le agregó: 1 mM de mezcla de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs), buffer 1X (suministrado por el fabricante de la enzima, Promega) y 20 U de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega) en un volumen final de 20 μl . Luego, se procedió a la síntesis de la primera hebra añadiendo 200 U de transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega) y se incubó la mezcla 2 horas a 42°C. Posteriormente, se inactivó la enzima calentando 10 minutos a 70°C. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C para ser posteriormente utilizado en las reacciones de PCR.

3.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA (PCR) PARA AMPLIFICAR EL DOMINIO CARBOXILTRANSFERASA DEL GEN DE LA ACCasa

Las reacciones de amplificación se desarrollaron en un volumen final de 50 μl conteniendo 1 μl de ADN o ADNc, 2 mM MgCl_2 , 0,2 mM mezcla de dNTPs, 0,5 μM oligonucleótidos oligocebadores, buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 1,25 U de GoTaq®ADN Polimerasa (Promega) o 1 U de Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs New England). Los oligocebadores utilizados para la amplificación del dominio carboxiltransferasa (CT) del gen de la ACCasa (ACC) fueron los siguientes:

TABLA 2. Oligocebadores utilizados para amplificar el dominio CT del gen ACC

Posición	Nombre	Secuencia de nucleótidos 5´-3´	SR	Pdto (pb)
CT1663				
4972-6634	<i>ACC1663f</i> ^a	GATAG <u>GGATCC</u> CCTGGATTTCCTCAATGG	BamHI	1663
	<i>ACC1663r</i> ^b	CTAT <u>GAGCTC</u> TTAGATCCTTCTCCGTAGC	SacI	
CT2358				
4624-6979	<i>ACC2358f</i> ^a	TCAG <u>GCTAGC</u> TCGGCAGCTGGTC	NheI	2358
	<i>ACC2358r</i> ^b	TAC <u>CTCGAG</u> TCAACCAAGGACCTTC	XhoI	

^a sentido ^b antisentido. La posición está referida a la secuencia del ARN mensajero de *S. bicolor* (XM002446133.1). Los sitios de restricción (SR) están subrayados en la secuencia de los oligocebadores.

La amplificación se realizó en un termociclador T100 Thermal Cycler (Biorad), comenzando con una etapa de 5 minutos a 95 °C seguida de 4 ciclos compuestos por tres etapas: 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 54 °C (*CT1663*) ó 58°C (*CT2358*) y 60-90 segundos a 72 °C; y posteriormente 25 ciclos compuestos por tres etapas: 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 62°C y 60-90 segundos a 72°C. Por último, se realizó una etapa de 7 minutos a 72 °C. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1% (P/V). En los experimentos preliminares de análisis de secuencias se utilizó ADN de un grupo de 10 plantas y luego ADN o ADNc de plantas individuales. En ambos casos los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEMT- Easy (Promega) como se describe más adelante en la sección 3.20.

3.9. PCR PARA AMPLIFICAR SECUENCIA PARCIAL DEL DOMINIO CT DEL GEN DE LA ACCasa

Para la obtención de los productos de PCR a secuenciar, se diseñaron 2 pares de oligocebadores para amplificar específicamente dos fragmentos cortos del gen que codifica la ACCasa homomérica plástica de *Sorghum halepense* (Délye, 2005c) (Tabla 3). Estos fragmentos comprenden dos zonas sobre el dominio CT de la enzima, donde se agrupan los codones variables que confieren resistencia a inhibidores de ACCasa.

TABLA 3. Oligocebadores usados para secuenciar productos de PCR.

Nombre	Secuencia de nucleótidos 5'-3'
<i>ACCcp1f^a</i>	GATAGGATCCCCTGAATTTCCCAATGG
<i>ACCcp1r^b</i>	GCAAGATAAGCTCCTATTCCTACAGTC
<i>ACCcp2f^a</i>	GACACAGACCATGATGCAGCTTG
<i>ACCcp2r^b</i>	CCATACAGTCTTGGAGTTCCCTCTGA

^a sentido ^b antisentido

Las reacciones de amplificación se desarrollaron como se describe en la sección anterior, utilizando una temperatura de anillado de 56°C y 52°C para los pares de oligocebadores *ACC1f/r* y *ACC2 f/r*, respectivamente.

3.10. PCR PARA AMPLIFICAR SECUENCIA PARCIAL DEL GEN *EPSPS*

Se llevó a cabo la amplificación de un segmento conservado del gen *EPSPS* que comprende los sitios conocidos que confieren resistencia (posiciones 101, 102; 103 y 106). Para el diseño de oligocebadores, se utilizaron como referencia las secuencias del gen *EPSPS* de *Sorghum halepense* (HQ436351-4) (Vila-Aiub et al., 2012) (Tabla 4).

TABLA 4. Oligocebadores usados para amplificar la secuencia parcial del gen *EPSPS*.

Nombre	Secuencia de nucleótidos 5'-3'
<i>epspsShf^a</i>	CTGTTGTTGTTGGCTGTGG
<i>epspsShr^b</i>	CGTAAGTTGCATTTCCACCAG

^a sentido ^b antisentido

La amplificación se realizó en un termociclador T100 Thermal Cycler (Biorad), comenzando con una etapa de 5 minutos a 95 °C seguida de 30 ciclos compuestos por tres etapas: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C. Por último, se realizó una etapa de 5 minutos a 72 °C. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 2% (P/V). Se utilizó como molde ADN genómico de los tres individuos seleccionados de la supboblación GC-R (GC-C4, C6 y C7) y dos de la supboblación de Zav-S (Zav-S1 y S2).

3.11. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN Y PROTEÍNAS

Las búsquedas en las bases de datos se realizaron utilizando la red del Centro de Información Nacional para Biotecnología (NCBI) versión de BLAST 2.2.30. El análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se llevó a cabo utilizando las herramientas de los programas DNA Star (Lasergene) o μ GENE; y el alineamiento múltiple de secuencias mediante el programa CLUSTALW (Thompson et al., 1994). La predicción de presencia de señales de localización subcelular se realizó utilizando los servidores ChloroP V1.1 y TargetP Server v1.01 (Emanuelsson et al., 1999) y MitoProt II 1.0a4 y SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004; Claros et al., 1996). El estudio de dominios proteicos se llevó a cabo utilizando la plataforma de datos InterPro.

3.12. PCR ALELO ESPECÍFICA (ASPCR) PARA LA DETECCIÓN DE LAS SUSTITUCIONES I2041N Y IXXXXT

Este diseño (dos ASPCR diferentes) fue realizado para distinguir la presencia de cada una de las dos mutaciones encontradas en los análisis preliminares de secuencias realizados sobre las 10 plantas de la subpoblación resistente; esto es, isoleucina por asparagina (I2041N), sustitución previamente reportada (Scarabel et al. 2014) e isoleucina por treonina (IXXXXT), de aquí en adelante llamadas R1 y R2, respectivamente.

Se diseñaron oligocebadores alelo específicos (*ACCR1-1* y *ACCR1-4*) y (*ACCR2-5* y *ACCR2-8*) y oligocebadores comunes que flanquean el sitio de cada mutación (*ACCR1-2* y *ACCR1-3*) y (*ACCR2-6* y *ACCR2-7*) para detectar las sustituciones R1 y R2, respectivamente. (Tabla 5).

TABLA 5. Oligocebadores usados en ASPCR.

Nombre	Secuencia de nucleótidos 5'-3'
I2041N (R1)	
<i>ACCR1-1</i> ^a	CTCTGGTGGACAGAGAGATCTCTTTGAAGGAGT
<i>ACCR1-2</i> ^b	CGGTCTGGATTTATTTTGCTATCGACCACA
<i>ACCR1-3</i> ^a	GATTGCCTCTGTTTATCCTGGCTAACTGG
<i>ACCR1-4</i> ^b	TTCTCGACAATTGTTGAGCCAGCCTGAAGGT
IXXXXT (R2)	
<i>ACCR2-5</i> ^a	CAACCTGGCTTGTGAAAGGAAACTTCCCCTTCT
<i>ACCR2-6</i> ^b	CACCGCTATCTAGCTGCAGCTTAT GTG CTA
<i>ACCR2-7</i> ^a	TACTTTCAGAGCTGGATCATTGGCCCAAG
<i>ACCR2-8</i> ^b	ATCCTAGCACCAGAGTTTGCTGCCAAGTAAG

^a sentido ^b antisentido

Estos oligocebadores fueron utilizados para la reacción de ASPCR obteniéndose tres amplicones de distinto tamaño: uno específico para el alelo sensible (167 pb y 217 pb), otro específico para el alelo resistente (99 pb y 119 pb) y el tercero es amplificado en todas las muestras (control interno positivo de 204 pb y 274 pb), para las sustituciones R1 y R2, respectivamente. Para aumentar la especificidad, se agregó un *mismatch* (base no complementaria) en la penúltima base del cebador específico de alelo en el extremo 3'. Así, las plantas que resulten homocigotas para el alelo resistente mostrarán bandas de amplificación con la combinación de oligocebadores *ACCR1-3* x *ACCR1-4* o *ACCR2-7* x *ACCR2-8*; mientras que las homocigotas para el alelo susceptible arrojarán resultados de amplificación positiva sólo con la combinación de oligocebadores *ACCR1-1* x *ACCR1-2* ó *ACCR2-5* x *ACCR2-6* (Figura 2).

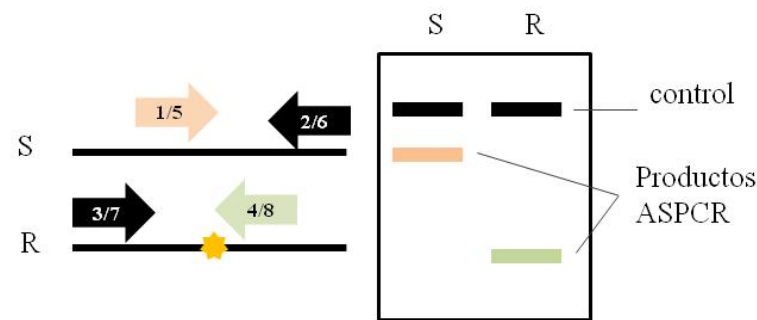


FIGURA 2. Esquema del diseño de oligocebadores de ASPCR. Patrón de bandas que puede ser obtenido para plantas sensibles (S) y resistentes (R) utilizando los oligocebadores 1, 2 y 3 ó 5, 6 y 7 y los oligocebadores 2, 3 y 4 ó 6, 7 y 8, respectivamente. 1 (*ACCR1-1*), 2 (*ACCR1-2*), 3 (*ACCR1-3*), 4 (*ACCR1-4*), 5 (*ACCR2-5*), 6 (*ACCR2-6*), 7 (*ACCR2-7*), 8 (*ACCR2-8*).

Los protocolos para cada reacción de ASPCR se optimizaron utilizando un termociclador T100 Thermal Cycler (Biorad) con un gradiente de temperatura de hibridación de 62°C – 68°C. A su vez, se probaron distintas condiciones de reacción que permitieran la amplificación selectiva de cada uno de los alelos, incluyendo distintas concentraciones de MgCl₂ y de oligocebadores. En todos los casos se utilizó como molde ADN genómico extraído de plantas individuales de las subpoblaciones resistentes y sensibles, como se describió en la Sección 3.4. Finalmente, las reacciones de amplificación se desarrollaron en un volumen final de 12 µl conteniendo 2,5 mM (I2041N) ó 3 mM (IXXXXT) de MgCl₂, 0,2 mM mezcla de dNTPs, 0,2 µM oligocebadores alelo específico, 0,04 µM (I2041N) ó 0,02 µM (IXXXXT) de oligocebador control, buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 0,48 U de GoTaq® ADN Polimerasa (Promega). La amplificación se realizó mediante una PCR en dos pasos, comenzando con una etapa de 2 minutos a 95 °C seguida de 30 ciclos compuestos por dos etapas: 30 segundos a 95°C y 50 segundos a 72°C. Por último, se realizó una etapa de 5 minutos a 72 °C. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 2% (P/V), utilizando como marcador de tamaño molecular Cincuenta Marker (Biodynamics).

3.13. CAPS PARA DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN I2041N

Paralelamente, para confirmar la presencia/ausencia de la mutación I2041N, se utilizó la técnica CAPS (del inglés *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), la cual utiliza sitios de restricción que están naturalmente presentes en un tipo de amplicón y ausentes en el otro, debido

a la presencia de la mutación que aporta la resistencia (Scarabel et al., 2014). En este caso la mutación 2041, que produce una sustitución de Ile por Asn, elimina un sitio de restricción *EcoRI*. Así, a partir de ADN genómico y utilizando los oligocebadores *ACCRI-2* x *ACCRI-3* (Tabla 5) se amplificó por PCR un fragmento de 204 pb, y posteriormente se trató con 5 U de *EcoRI*. Finalmente, la digestión fue chequeada en gel de agarosa 2% (P/V). De este modo, las plantas que resulten homocigotas resistentes mostrarán una banda sin cortar de 204 pb y las homocigotas susceptibles sólo dos bandas de 138 pb y 66 pb (Figura 3).

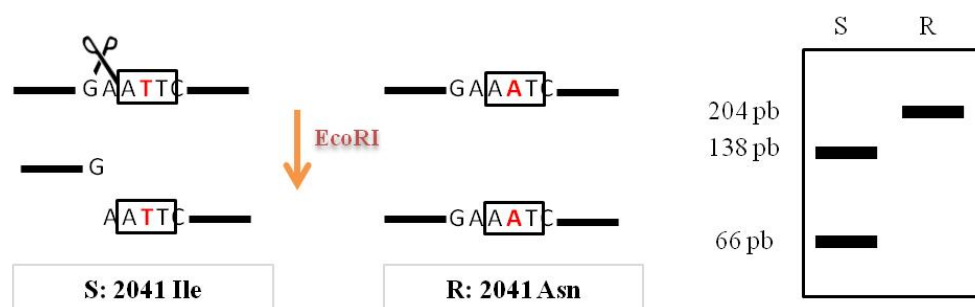


FIGURA 3. Esquema del diseño de CAPS. Patrón de bandas que puede ser obtenido para plantas sensibles (S) y resistentes (R).

3.14. PCR EN TIEMPO REAL (qPCR) PARA ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS

Se determinó el número de copias genómicas del gen *ACC* y *EPSPS* en los individuos seleccionados de las subpoblaciones Zav-S y GC-R realizando una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). El ADN genómico de los clones vegetativos seleccionados (GC-C4, C6, C7 y Zav-S1 y S2) fue extraído como se describió en la sección 3.4. Los oligocebadores utilizados para amplificar los genes *ACC* y *EPSPS* son; *ACCRI-2/ ACCRI-3* (Tabla 5) y *epspsShf/epspsShr* (Tabla 4), respectivamente. Los genes de Ubiquitina (*UBQ*) y Actina (*actina*) se utilizaron como normalizadores, obteniendo mejores resultados para el primero (datos no mostrados) (Tabla 6).

TABLA 6. Oligocebadores usados para el gen de referencia en la determinación del número de copias.

Nombre	Secuencia de nucleótidos 5'-3'
<i>UBQSbf^a</i>	CAAGAGCGCAAGAAGAAGACGTACACCAAG
<i>UBQSbr^b</i>	CGATTACGCCTTCTGGTTGTAGACATAGGTG
<i>ActSbf^a</i>	GTGACCTTACCGACAACCTGATG
<i>ActSbr^b</i>	CACCGATTGTGATAACCTGTCCATC

^a sentido ^b antisentido

Las reacciones de amplificación se desarrollaron en un volumen final de 13 μ l conteniendo: Realmix qPCR 1X (Biodynamics), 200 nM de oligocebadores específicos de cada gen, y 50 ng de ADN genómico. Las amplificaciones se realizaron en un equipo Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen) programado de la siguiente manera: *Desnaturalización inicial*: 95 °C durante 2 minutos; *Amplificación*: 40 ciclos compuestos por 3 etapas: 95 °C durante 30 segundos, 67 °C (*ACC*) ó 58°C (*EPSPS*) durante 20 segundos, y 72°C durante 30 segundos, en la cual se produce la lectura de la fluorescencia; *Elongación final*: 72°C durante 5 minutos.

Se realizaron las curvas de fusión para cada reacción de PCR midiendo la disminución de la fluorescencia con el incremento de la temperatura (86 ciclos de 72°C a 95°C) cada 0,5°C a partir del segundo ciclo. De este modo, la especificidad de las reacciones fue confirmada mediante el análisis de dichas curvas. La eficiencia de amplificación se calculó independientemente en cada reacción y fue considerada en el procesamiento de los datos.

El número de copias de cada gen (*ACC* y *EPSPS*) fue evaluado mediante el método comparativo $(E+1)^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). En la ecuación anterior E representa la eficiencia de la amplificación y Ct es el ciclo de la amplificación para el cual la fluorescencia medida es mayor a un valor crítico. Por encima de este valor crítico toda fluorescencia medida es considerada debida a amplificación y no al ruido. Las cuantificaciones comparativas de los valores Ct fueron calculados con el software REST (Relative Expression Software Tool V 2.0.7 for Rotor Gene, Corbett Life Sciences). Los resultados fueron expresados como el incremento en el número copias del gen en cuestión en los clones vegetativos resistentes (GC-C4, GC-C6 y GC-C7) relativo al número de copias de dicho gen en los clones sensibles (Zav-S1 y Zav S2).

3.15. OBTENCIÓN DE PROGENIE DEL INDIVIDUO SELECCIONADO GC-C4 RESISTENTE A HALOXIFOP-P- METIL

La progenie del clon GC-C4 se obtuvo mediante autopolinización en condiciones controladas de invernadero. Cuando la mayoría de las semillas alcanzaron la madurez, las panojas fueron cuidadosamente cortadas y guardadas en bolsas de papel. Luego fueron llevadas al laboratorio, secadas por 1 semana a temperatura ambiente y almacenadas a 4°C.

Las semillas se esterilizaron con hipoclorito de sodio 50 % (V/V) durante 15 segundos, luego con etanol 70 % (V/V) y finalmente se enjuagaron con abundante agua. Posteriormente, se les extrajo el tegumento con bisturí estéril y se colocaron en un medio conteniendo sales MS (2,3 g/L) y agar 0,6 % (P/V). Para la sincronización de la germinación, las semillas fueron sometidas a un tratamiento con calor en las siguientes condiciones: 4 horas a 45°C y 20 horas a 25°C por 3 días, fotoperiodo de 12 horas y un flujo de luz de 15-30 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, dado que es conocido que las grandes fluctuaciones diurnas de temperatura favorecen la germinación (Scarabel et al., 2014). A continuación, las plántulas fueron trasplantadas en macetas de 500 cm^3 con mezcla de tierra estéril, arena y perlita (1:1:1) y crecidas en cámara de cultivo como se describió en la anteriormente. Posteriormente, cada plántula fue evaluada primero por marcadores CAPS y luego por ASqPCR (PCR alelo específica cuantitativa).

3.16. PCR ALELO ESPECÍFICA CUANTITATIVA (ASqPCR)

Los resultados se cuantificaron usando el método de la curva estándar. Para esto, primero se construyeron los estándares de ADN plasmídico purificados y específicos del gen *ACC* resistente obtenido como se describe en las siguientes secciones. La concentración ($\text{ng}/\mu\text{l}$) del ADN plasmídico fue medida por absorbancia a 260 nm y el correspondiente número de copias absoluto fue calculado. Luego se realizaron diluciones seriadas del mismo, cubriendo un rango de 10 - 10^6 número de copias.

La ASqPCR, se realizó utilizando los oligocebadores específicos de la sustitución I2041N (*ACCRI-3* y *ACCRI-4*) y oligocebadores comunes que flanquean el sitio de la mutación (control) (*ACCRI-2* y *ACCRI-3*) (Tabla 5). Las amplificaciones se realizaron en un equipo Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen) programado como se describió en la sección 3.12.

Para generar la curva estándar, se realizó una ASqPCR con las diluciones del ADN plasmídico amplificando por un lado con los oligocebadores específicos del alelo resistente y

por otro, con los oligocebadores control, que amplifican tanto secuencias correspondientes a los alelos sensibles como resistentes. A continuación, se graficaron los valores de Ct versus log número de copias conocido. El ajuste lineal permitió obtener la ecuación para calcular la concentración de las muestras analizadas.

Además, para evaluar la especificidad de los oligocebadores de la banda resistente y así evitar falsos positivos, se realizó, en las mismas condiciones que las curvas estándar, una ASqPCR utilizando como molde mezcla de diluciones seriadas de ADN plasmídico resistente con 10^6 copias del ADN plasmídico sensible para cada punto (Figura 4).

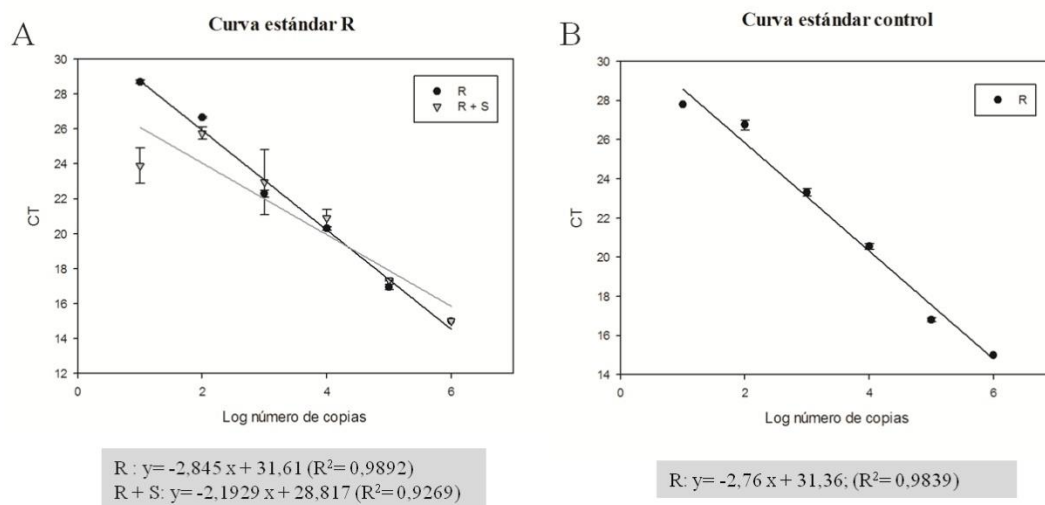


FIGURA 4. Curva estándar para la cuantificación del alelo I2041N resistente en la progenie del clon GC-C4. A) ASqPCR utilizando oligocebadores específicos para el alelo resistente (ACCR1-3 y ACCR1-4) **B)** ASqPCR utilizando oligocebadores comunes (control) (ACCR1-2 y ACCR1-3). Líneas negras: diluciones seriadas del ADN plasmídico resistente (10 a 10^6 número de copias). Línea gris: mezcla de diluciones seriadas del ADN plasmídico resistente (10 a 10^6 número de copias) más 10^6 copias de ADN plasmídico sensible.

En el caso de las curvas estándar con oligocebadores específicos del alelo resistente (Figura 4A), ambas mostraron un buen ajuste, con una diferencia en la pendiente debido al primer punto donde hay 10 copias del molde resistente contra 10^6 copias del molde sensible (curva R+S), forzando a la amplificación inespecífica con un exceso de molde sensible. Es importante destacar que estas diferencias extremas de seis órdenes de magnitud no representan una condición fisiológica posible.

Finalmente, la progenie del clon GC-C4 fue analizada por ASqPCR. Así, se determinó la relación de la cantidad de copias de la secuencia de ACC conteniendo la mutación 2041

respecto a la cantidad total de copias de la secuencia ACC amplificada como control. Es importante aclarar, que la “cantidad total de copias” utilizada como referencia incluye a todas las secuencias de ACC amplificadas con los oligocebadores usados como control, sin distinguir alelos pertenecientes a distintos genes (con el único requisito de portar la secuencia conservada donde hibridan los oligocebadores). Los resultados fueron expresados como la relación entre el número de alelos R1 (I2041N) relativo al número total de haplotipos amplificados con los oligocebadores control.

3.17. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados se describen en las siguientes tablas:

TABLA 7. Cepas bacterianas.

Cepas bacterianas	Fenotipo relevante
E. coli K-12 DH5 α ^a	<i>recA endA thi hsdR supE relA deoR lac</i> [Φ 80, <i>lacZ</i> Δ M15]
E. coli BL21 (DE3) codon plus ^b	<i>ompT hsdSB (rB-, mB-) gal1 dcm,</i> [λ DE3] [argU ileY LeuW Cam+]

^a Invitrogen ^b cedidas gentilmente por el Lic. Juan Pablo Zubimendi (Cefobi)

TABLA 8. Plásmidos.

Plásmidos	Características relevantes
pGEM-T Easy^a	<i>bla</i> ⁺ , 3.015pb, <i>ori</i> f1, <i>lacZ</i> (SMC), plásmido linealizado con <i>EcoR</i> V y con timidinas no apareadas agregadas en los extremos 3'
pET-28a(+)^b	<i>kan</i> ⁺ , 5.369 pb, <i>ori</i> f1, <i>lacI</i> , SMC, <i>ori</i> pBR322, expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor y de las señales de iniciación de la traducción del bacteriófago T7, fusión a secuencia de hexahistidinas para permitir su purificación.
pET-32a (+)^b	<i>bla</i> ⁺ , 5.900 pb, <i>ori</i> f1, <i>lacI</i> , SMC, <i>ori</i> pBR322, expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor y de las señales de iniciación de la traducción del bacteriófago T7, fusión amino terminal a Tiorredoxina y a secuencia de hexahistidinas para aumentar la solubilidad de la proteína de interés y permitir su purificación.

^aPromega. ^bNovagen. SMC: sitio de múltiple clonado. *bla*⁺ y *kan*⁺: resistencia a ampicilina y kanamicina, respectivamente.

3.18. TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli* CON ADN PLASMÍDICO

El estado de competencia de bacterias de *E. coli* DH5 α y BL21 (DE3) Codon plus se llevó a cabo mediante el uso de cationes divalentes. Para la transformación, se colocaron 50 μ l de la suspensión celular obtenida y 1-2 μ l de plásmido o 5 μ l de mezcla de ligación en un tubo Eppendorf. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, luego a 42°C durante 45 segundos y nuevamente en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se agregó 1 ml de medio LB y se agitó a 37 °C durante 1 hora. Luego de este periodo, las células se sembraron en placas de Petri con medio LB agar (LB y 1,5% (P/V) agar) conteniendo los antibióticos y reactivos adecuados según el caso.

3.19. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Se crecieron 3 ml de medio LB en presencia del agente de selección, células de *E. coli* transformadas con el plásmido a purificar durante toda la noche a 37 °C y con agitación. Este cultivo se centrifugó a 12.000 g por 1 minuto. La preparación de ADN plasmídico se llevó a

cabo utilizando el kit GenElute™ Plasmid Miniprep según instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich).

3.20. CLONADO EN EL VECTOR pGEMT Easy

El fragmento de interés obtenido por PCR fue ligado al vector pGEMT Easy (Promega), diseñado especialmente para el clonado de productos de amplificación generados por enzimas con actividad transferasa terminal, como la Taq ADN polimerasa. En el caso de utilizar la enzima con actividad correctora de prueba que genera productos de PCR con extremos romos, se incubó 15 minutos a 72 °C con la enzima GoTaq ®ADN Polimerasa (Promega) para el agregado de desoxiadenosina trifosfato terminal. Posteriormente, en ambos casos, los productos de PCR se purificaron con el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)” para remover el exceso de oligocebadores y nucleótidos. La mezcla de ligación se desarrolló 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), 50 ng de vector y el producto de amplificación purificado. La reacción se incubó 16 horas a 4°C. Luego, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α y se sembraron en placas de Petri con medio LB agar conteniendo 100 µg/ml ampicilina y 20 µg/ml X-Gal (5-bromo-4cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido). Las bacterias transformantes que poseían el vector ligado con el inserto se evidenciaron como colonias blancas.

3.21. BÚSQUEDA DE COLONIAS CONTENIENDO EL ADN PLASMÍDICO DE INTERÉS

El análisis de las colonias se realizó utilizando una de las siguientes metodologías:

- Por digestión de los plásmidos purificados: 1 µg de ADN del plásmido se cortó con 10 U de las enzimas de restricción *BamHI* y *SacI* (para el caso del dominio *CT1663*), y *NheI* y *XhoI* (para el caso del dominio *CT2354*) siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega).
- Por PCR: se realizó el mismo protocolo de PCR utilizado para la obtención de los insertos correspondientes, excepto que el ADN molde consistió en una colonia tomada con un palillo estéril, previamente replicada en una placa de Petri conteniendo medio LB-agar con el antibiótico adecuado.

Luego de la digestión de los plásmidos o de la PCR correspondiente, los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1 % (P/V).

3.22. SECUENCIACIÓN

Las construcciones obtenidas y los productos de PCR fueron secuenciados a través del servicio proporcionado por Macrogen Inc. (Corea del Sur) mediante el método que utiliza el terminador Big Dye TM utilizando un secuenciador automático 3730 xl DNA analyzer (Applied Biosystem). Se utilizaron los oligocebadores T7 promoter, T7 terminator, SP6 o un cebador específico según el caso. Los análisis de las secuencias fueron conducidos tal cual se describe en la sección 3.11.

3.23. CLONADO Y SUBCLONADO DEL DOMINIO CT DE LA ACCASA PARA LA EXPRESION RECOMBINANTE

La expresión recombinante del dominio CT de la ACCasa se realizó mediante dos estrategias. Para esto, la amplificación del dominio CT del gen de la ACCasa se llevó a cabo mediante PCR utilizando como molde ADN genómico (*CT1663*) para la estrategia 1 y ADNc (*CT2358*) para la estrategia 2 del individuo GC-C4 (Sección 3.8). Los oligocebadores utilizados en las PCR fueron diseñados de manera específica para amplificar el dominio CT de la ACCasa plasmídica e introducir los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *BamHI/ SacI* y *NheI/ XhoI*, para el dominio *CT1663* y *CT2358*, respectivamente (Figura 5).

Los productos de amplificación se clonaron en el vector pGEMT Easy, diseñado especialmente para este propósito, obteniéndose los plásmidos pGEMT-CT (Sección 3.20). Las secuencias completas clonadas fueron confirmadas por secuenciación (Sección 3.22).

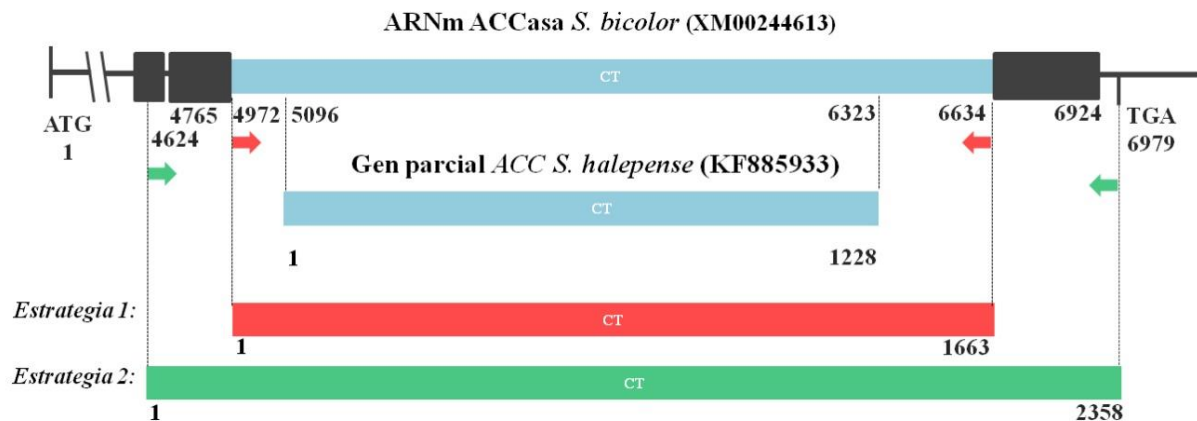


FIGURA 5. Esquema del diseño de oligocebadores para el clonado del dominio CT de ACCasa.

Las flechas rojas (CT1663) y verdes (CT2358) indican los sitios de hibridación de los oligocebadores para el clonado del dominio CT (específicos de la isoforma cloroplástica) diseñados para ambas estrategias.

Las versiones alélicas susceptibles (S1 y S2) y resistentes (R1 y R2) clonadas en los plásmidos pGEMT se subclonaron en los vectores de expresión de la serie pET (28a y 32a) (Tabla 8). Los plásmidos fueron digeridos siguiendo las instrucciones del proveedor de las enzimas de restricción utilizadas (Promega). Luego, las mezclas de digestión se corrieron en geles de agarosa 1% (P/V) (Sección 3.6). Los fragmentos se recuperaron del gel cortando la banda correspondiente con un bisturí estéril utilizando el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)”. Las mezclas de ligación se desarrollaron 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) y los fragmentos de ADN purificados en una relación molar vector: inserto de 1:3. Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 4°C. Luego, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α y se sembraron en placas de Petri con medio LB agar conteniendo 100 μ g/ml ampicilina o 50 μ g/ml kanamicina como agentes de selección, dependiendo de la serie pET utilizada. Para identificar las colonias transformantes que poseían el vector conteniendo el inserto, se procedió como se describe en las secciones 3.19 y 3.21. En la siguiente tabla se detallan los vectores de expresión construidos para cada una de las versiones alélicas y se detalla a que isoforma aminoacídica corresponde.

TABLA 9. Vectores de expresión de la serie pET portadores del dominio CT de la ACCasa de *Sorghum halepense*.

Plásmidos	Características relevantes	Isoforma de la que deriva
pET-28a/CT1663S1	<i>kan</i> ⁺ , pET-28a (+)::S1	I
pET-28a/CT1663S2	<i>kan</i> ⁺ , pET-28a (+)::S2	II
pET-28a/CT1663R1	<i>kan</i> ⁺ , pET-28a(+)::R1 (I2041N)	IV
pET-28a/CT1663R2	<i>kan</i> ⁺ , pET-28a (+):: R2 (IXXXXT)	V
pET-28a/CT2358S2	<i>kan</i> ⁺ , pET-28a (+)::S2	I
pET-28a/CT2358R1	<i>kan</i> ⁺ , pET-28a(+)::R2 (I2041N)	IV
pET-28a/CT2358R2	<i>kan</i> ⁺ , pET-28a (+):: R2 (IXXXXT)	V
pET-32a/CT1663S1	<i>bla</i> ⁺ , pET-32a (+)::S1	I
pET-32a/CT1663S2	<i>bla</i> ⁺ , pET-32a (+)::S2	II
pET-32a/CT1663R1	<i>bla</i> ⁺ , pET-32a(+)::R1 (I2041N)	IV
pET-32a/CT1663R2	<i>bla</i> ⁺ , pET-32a (+):: R2 (IXXXT)	V

bla⁺ y *kan*⁺: resistencia a ampicilina y kanamicina, respectivamente.

3.24. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las versiones alélicas susceptibles (S1 y S2) y resistentes (R1 y R2) subclonadas en los vectores de expresión de la serie pET (28a y 32a) se utilizaron para la transformación de las cepas competentes *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus. Las colonias transformantes conteniendo los plásmidos correspondientes se crecieron a 37°C en 8 ml de medio LB con los antibióticos requeridos en cada caso, con agitación durante 16 hs. Cada cultivo se empleó para inocular 400 ml de medio LB contenidos en un Erlenmeyer de 2 L de capacidad en presencia del antibiótico correspondiente. Este cultivo se creció a 30°C con agitación hasta que la DO a 600 nm alcanzó un valor aproximado de 0,6 UA. Las medidas de DO a 600 nm se llevaron a cabo en un equipo LAMBDA Bio (Perkin Elmer).

Luego de tomar alícuotas para los controles no inducidos (AI), se indujo la expresión agregando el inductor IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) en una concentración final de 100 μM y se continuó la incubación a 30°C en agitación durante toda la noche. Además, se tomaron alícuotas para los controles inducidos después de 1 hora (DI¹) y después de 16 horas (DI¹⁶). El resto del cultivo se utilizó para la purificación de la proteína, previo análisis de fracciones proteicas (fracción soluble e insoluble del extracto celular).

En los casos en que se encontró a las proteínas recombinantes formando cuerpos de inclusión se probaron variantes de este protocolo: La inducción se realizó con menores concentraciones de IPTG (50 μ M y 1 μ M), con un inductor más débil como la lactosa 1% (P/V) y una temperatura de inducción más baja (16°C). Además, se llevó a cabo un protocolo de autoinducción utilizando medio rico ZYP-5052 descrito a continuación, creciendo las células con agitación a 230 rpm a 16°C y 30°C durante 24 horas. Estos cambios propician que la proteína se pliegue más lentamente, haciéndola más estable al expresarse y que pueda permanecer en la fracción soluble.

TABLA 10. Composición del medio rico ZYP para autoinducción. Se indican los nombres de las soluciones stock, su composición y la concentración final de cada componente en el medio. Todas las soluciones se encuentran estériles al momento de su uso; el medio 5052 y el buffer NPS fueron esterilizados por microfiltración con una membrana de 0,22 μ m para jeringa MILLEX GV (MILLIPORE), mientras que los demás fueron esterilizados en autoclave, a excepción del componente FeCl₃•6H₂O (metales traza), el cual fue disuelto en HCl 0,1 M.

Solución stock	Componente	Concentración final
ZY	Tiptona de caseína	1 % (P/V)
	Extracto de levadura	0,5 % (P/V)
MgSO₄	MgSO ₄	1 mM
5052	Glicerol	0,50 % (P/V)
	Glucosa	0,05 % (P/V)
	α -D-Lactosa	0,20 % (P/V)
NPS	(NH ₄) ₂ SO ₄	25 mM
	KH ₂ PO ₄	50 mM
	Na ₂ HPO ₄	50 mM
Metales trazas	FeCl ₃ •6H ₂ O	50 μ M Fe
	CaCl ₂	20 μ M Ca
	MnCl ₂ •4H ₂ O	10 μ M Mn
	Zn SO ₄ • 7H ₂ O	10 μ M Zn
	CoCl ₂ •6H ₂ O	2 μ M Co
	CuCl ₂ •2H ₂ O	2 μ M Cu
	NiSO ₄	2 μ M Ni
	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	2 μ M Mo
	H ₃ BO ₃	2 μ M H ₃ BO ₃

3.25. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Después de 16 horas de crecimiento tras el agregado del inductor, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Se eliminaron los sobrenadantes y los sedimentos celulares se resuspendieron en buffer de lisis: buffer de unión (Tris HCl 50 mM;

NaCl 300 mM; imidazol 20 mM; pH 8) con el agregado del inhibidor de proteasas PMSF 1 mM.

Posteriormente, la ruptura celular se llevó a cabo en un sonicador Vibra- Cell TM (Sonics), para lo cual la muestra fue sometida a 4-8 pulsos de 25 segundos cada uno y 1 minuto de descanso en baño de agua-hielo entre cada pulso. Los extractos celulares se centrifugaron durante 20 minutos a 4500 x g a 4°C y se separó el sobrenadante (fracción soluble) del precipitado (fracción insoluble).

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 (Biorad) y se equilibró con buffer de unión (se lavó con al menos 5 volúmenes). La elución de la proteína de interés se realizó con concentraciones crecientes de imidazol: 50, 200 y 450 mM, tras realizar 5 lavados con el buffer de unión luego de la siembra. Las fracciones se recogieron cada 1,5 ml; para su posterior chequeo.

Luego, se agruparon las fracciones que potencialmente contenían la proteína ACCasa (seguimiento de la cromatografía por dosaje de proteínas totales en cada fracción eluida) y se almacenaron a -80 °C. Los extractos celulares (AI, DP¹ y DP¹⁶), las distintas fracciones (soluble e insoluble) y las diferentes alícuotas de la purificación de cada versión ACCasa se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y posterior tinción con azul de Coomassie 0,1% (P/V) (Biorad).

Las muestras obtenidas se concentraron una vez en tubos Amicon ultra-15 (Millipore) con un tamaño de poro de 10 kDa centrifugando a 4°C a 5000 x g. Luego, se realizaron dos cambios de buffer agregando 5 volúmenes de buffer Tris HCl 20 mM; MgCl₂ 2 mM; pH 8 en cada cambio. Por último, se agregó glicerol 20% (v/v) y se almacenó el concentrado proteico a -20°C hasta su utilización.

3.26. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se llevaron a cabo utilizando la celda Mini-PROTEAN III de Bio-Rad de acuerdo al sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). Las concentraciones finales de acrilamida fueron 10% (P/V) para el gel de separación y 5% (P/V) para el gel de concentración. Las

muestras diluidas 4:5 en buffer de siembra 5X (1X= 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% (V/V) glicerol, 2% (P/V) SDS, 5% (V/V) 2-mercaptoetanol y 0,1% (P/V) azul de bromofenol) se calentaron a 100 °C durante 5 minutos, para optimizar la desnaturalización de las proteínas. Los geles fueron analizados por tinción con azul de Coomassie (Smith, 1984). La estimación de la masa molecular de los polipéptidos desnaturalizados se realizó mediante la comparación de la distancia recorrida en el gel SDS- PAGE con la de las siguientes proteínas marcadores: 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15, 10 kDa (Promega).

3.27. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes se llevaron a cabo utilizando la celda Mini-PROTEAN III de Bio-Rad de acuerdo al sistema discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las concentraciones de acrilamida de los geles de separación y de concentración utilizadas fueron 6% y 3%, respectivamente. Las muestras fueron diluidas 4:5 en buffer de siembra 5X (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% (V/V) glicerol y 0,1% (P/V) azul de bromofenol). Los geles fueron analizados por tinción con azul de Coomassie (Smith, 1984).

3.28. MEDIDAS DE ACTIVIDAD DEL DOMINIO CARBOXIL TRANSFERASA DE ACCasa

Las medidas de actividad enzimática carboxil transferasa (CT) se realizaron en un lector de microplacas siguiendo la reducción de NAD⁺ a 340 nm, involucrando el acoplamiento del acetil CoA generado en la reacción a las reacciones combinadas de la citrato sintasa (CS) y malato deshidrogenasa (MDH) (Guchhait et al, 1974).

CT: *éster de biotina + malonil CoA → Acetil CoA + CO₂ unido al éster de biotina*

MDH: *Malato + NAD⁺ → OAA (Oxalacetato) + NADH*

CS: *OAA + Acetil CoA → Citrato + CoA*

Reacción Neta:

éster de biotina + malonil- CoA + malato + NAD⁺ → citrato + CoA + CO₂ unido al éster de biotina + NADH

La mezcla de reacción contenía 100 mM de Tris-Cl pH=8, 0,1 mM de malonil CoA, 5 mM de éster de biotina (se probaron dos alternativos: biotin metil éster y biotin succinil éster),

10 mM de L-malato, 0,5 mM de NAD⁺, 18 unidades de MDH, 3,5 unidades de CS y cantidades variables de enzima CT recombinante purificada. La reacción se inició con el agregado del sustrato malonil CoA.

3.29. ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (DC)

Los espectros de dicroísmo circular fueron realizados en un espectrofotómetro J 810 (JASCO) utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico tanto para el UV-cercano (250-350 nm) como para el UV-lejano (200-260 nm). Se utilizaron concentraciones de proteínas del orden de 20-30 μ M. Como blanco se utilizó el buffer de diálisis 50 mM de K₃PO₄ y 5 mM de MgSO₄ ó 20 mM Tris-HCl, 5 mM de MgSO₄. Se realizaron 6 acumulaciones por espectro. En el caso del UV-cercano se registraron valores cada 2 nm desde 250 hasta 350 nm en un modo de escaneo continuo con una velocidad de barrido de 100 nm/minuto, una respuesta de 2 s y un ancho de banda de 1 nm. En el caso del UV-lejano se registraron valores cada 1 nm desde 190 hasta 260 nm en un modo de escaneo continuo con una velocidad de barrido de 100 nm/minuto, una respuesta de 1 s y un ancho de banda de 1 nm.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A HALOXIFOP-P-METIL EN LA
SUBPOBLACIÓN DE *Sorghum halepense* HALLADA EN CAMPOS DE GOBERNADOR
CRESPO

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. ACETIL COA CARBOXILASA

La enzima acetil CoA carboxilasa (ACCase EC 6.4.1.2) es una enzima ubicua biotinilada que cataliza la carboxilación dependiente de ATP de acetil CoA en malonil CoA en una reacción reversible de 2 pasos. Esta reacción es el primer paso en síntesis de ácidos grasos (Délye, 2005a).

Todas las isoformas ACCase contienen tres dominios funcionales, de los cuales dos son catalíticos y el tercero es un dominio estructural. El dominio estructural, denominado transportador de biotin-carboxilo (BCC, del inglés *Biotin Carboxyl Carrier*), lleva unido covalentemente el grupo prostético biotina a través de un enlace amida a un residuo de lisina. Por otra parte, el dominio catalítico biotin-carboxilasa (BC), cataliza la carboxilación de biotina dependiente de ATP. El otro dominio catalítico, denominado carboxil transferasa (CT), cataliza la transferencia del grupo carboxilo desde carboxi-biotina al sustrato acetil CoA (Nikolau et al., 2003; Tong, 2013) (Figura 6).

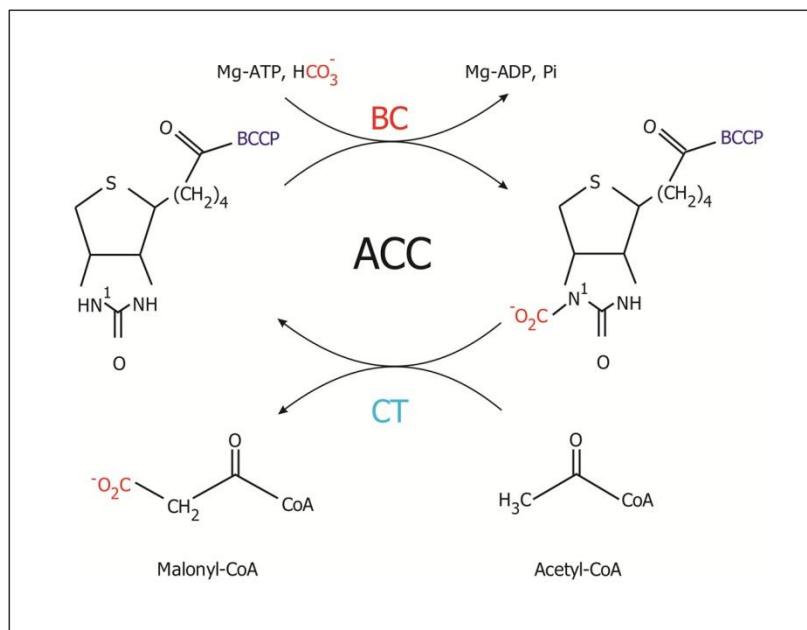


FIGURA 6. Reacción catalizada por la Acetil CoA carboxilasa (ACCasa).

Las plantas son capaces de transportar los azúcares y aminoácidos por largas distancias, pero no los ácidos grasos sintetizados por las células del mesófilo. Usualmente, cada célula debe sintetizar los ácidos grasos requeridos para sí misma. El precursor de la síntesis de ácidos grasos, el malonil CoA, no puede atravesar la envoltura plasmática y debe ser sintetizado por la ACCasa correspondiente, tanto en plastidios como en citosol, de acuerdo a los requerimientos celulares. En plastidios, el malonil CoA es usado principalmente en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos; mientras que en el citosol, es utilizado en varias reacciones, incluyendo la elongación de ácidos grasos de cadena larga; la síntesis de metabolitos secundarios, tales como flavonoides y antocianinas; y la malonilación del precursor del etileno (ácido-1-aminociclopropano carboxílico) (Délye 2005a; Sasaki y Nagano, 2004).

4.1.2. ISOFORMAS DE LA ACCasa

Se han encontrado dos formas distintas de la enzima en la naturaleza (Figura 7). Una forma heteromérica de la ACCasa, usualmente presente en procariontes (*E. coli*), está compuesta de cuatro subunidades distintas: dos dominios CT (α y β) y una subunidad para cada dominio BC y BCC. Estos dominios son codificados por diferentes genes, los cuales son expresados coordinadamente para formar una enzima heteromérica funcional. Por otra parte, la forma homomérica es una gran proteína compuesta por los cuatro dominios sobre el mismo

polipéptido multifuncional, y está presente en mamíferos, levaduras y otros eucariotas (Konishi et al., 1996; Sasaki y Nagano, 2004; Zhang et al., 2003).

La mayoría de las plantas tienen ambas formas: la forma heteromérica en plastidios y la forma homomérica en el citosol, con excepción de la familia de las *Poáceas*, las cuales tienen una forma homomérica en plastidios, citosol y mitocondrias. (Délye, 2005a; Sasaki y Nagano, 2004). La isoforma plastídica es responsable de aproximadamente el 80% de la actividad total de ACCasa en hojas (Délye, 2005a). Sin embargo, la distinción entre gramíneas y otras plantas no es tan clara. Los plastidios de algunas especies de dicotiledóneas, como las de la familia Geraniáceas, no contienen una ACCasa heteromérica y probablemente contengan una isoforma homomérica de esta enzima (Christopher y Holtum 2000). Además, los plastidios de las dicotiledóneas tales como *Brassica napus L.* y *Arabidopsis thaliana L.* contienen una isoforma tanto homomérica como heteromérica. Esto podría representar una redundancia en el mecanismo de generación de malonil CoA en los plastidios, lo cual habría permitido la pérdida evolutiva de la ACCasa heteromérica del genoma de gramíneas (vestigio evolutivo). Así, en los plastidios de gramíneas, las isoformas homoméricas eucariotas parecen haber reemplazado la ACCasa heteromérica de origen procariota (Huang et al., 2002; Konishi et al., 1996; Nikolau et al., 2003; Tong, 2013).

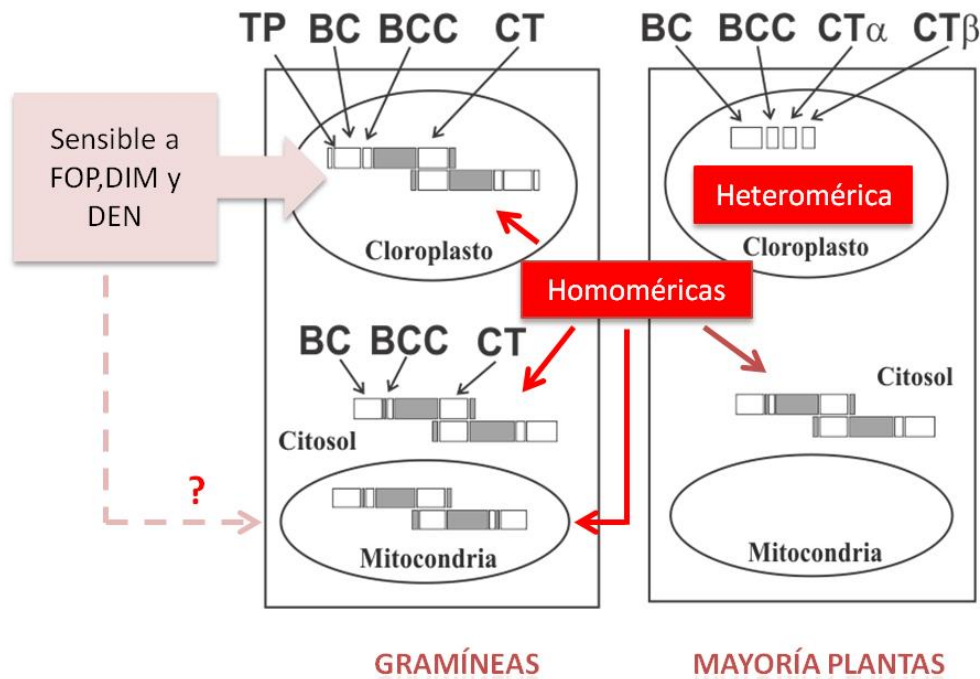


FIGURA 7. Isoformas de las ACCasa en plantas superiores. TP: Péptido tránsito; BC: Biotin carboxilasa; BCC: Transportador de biotin-carboxilo y CT: Carboxil transferasa. (Adaptado de Délye, 2005a).

4.1.3. ACCasa HOMOMÉRICA

La ACCasa homomérica es un dímero de un gran polipéptido multifuncional de 210-250 kDa, cuyo tamaño observado por cromatografía de filtración en gel es de 500 kDa (Nikolau et al., 2003; Sasaki y Nagano, 2004). La estructura dimérica de la ACCasa ha sido establecida por cristalografía de la ACCasa de levaduras (homomérica) en complejo con su sustrato, acetyl CoA. La porción del dímero que comprende al dominio CT de la ACCasa consiste en un arreglo cabeza-cola de los dos monómeros, creando dos cavidades de sitio activo por dímero. El acetyl CoA penetra en estas cavidades para carboxilarse produciendo malonil CoA (Zhang et al., 2003).

Las subunidades de todas las ACCasas homoméricas de animales, hongos y plantas comparten una organización estructural común correspondiente al arreglo lineal de los dominios funcionales: NH₂-BC-BCC-CT-COOH. Así, todas las ACCasas homoméricas comparten un alto grado de conservación de secuencias (Nikolau et al., 2003). La diferencia principal es la presencia de aproximadamente 100 aminoácidos extras en el extremo N-terminal

de la isoformas plastídica y mitocondrial, que probablemente formen una secuencia péptido tránsito dual (Peeters y Small, 2001).

A nivel de secuencias, estas enzimas consisten en aproximadamente 2.300 aminoácidos (ARNm de aproximadamente 7.000 pb de longitud). Además, los genes de las ACCasas homéricas de plantas tienen una estructura compleja de intrones- exones, alcanzando los 15.000 pb de longitud. Por ejemplo, en trigo (*Triticum aestivum* L.) la ACCasa citosólica tiene al menos 28 intrones; mientras que los genes de la ACCasa plastídica en *Alopecurus myosuroides* Huds. y *Setaria viridis* (L.) Beauv contienen 32 intrones.

En gramíneas diploides, un solo gen nuclear (*ACCI*) (generalmente codifica la isoforma homomérica mitocondrial y plastídica (Délye, 2005a), aunque genes duplicados podrían existir en *Lolium rigidum* y *Zea mays* (Huang et al., 2002; Iwakami et al., 2012). En el caso de las poliploides, tanto en *Alopecurus japonicus* tetraploide (Xu et al., 2014) como en *Triticum aestivum* (Huang et al., 2002) y *Avena fatua* (Yu et al., 2013a) hexaploides, se encontró un solo gen *ACCI*, para cada par de cromosomas homeólogos. En cambio, en *Echinochloa phyllopogon* (alotetraploide), se encontraron 2 copias por cada par de cromosomas homeólogos. Por otra parte, las isoformas citosólicas pueden ser codificadas por varios genes distintos (*ACC2*), tal como se observó en *T. aestivum* donde se identificaron al menos 5 genes (*ACC2*, *1-ACC2*, *5*) (Faris et al., 2001).

Es importante mencionar además que las secuencias de las ACCasas homoméricas son altamente conservadas entre y dentro de las especies. Las secuencias de aminoácidos de las ACCasa plastídicas de gramíneas comparten un 80 % de identidad, un 65 % de identidad con las ACCasa citosólicas de plantas y un 52% con la isoforma citosólica de un organismo filogenéticamente distante como la levadura (Délye, 2005a).

4.1.4. HERBICIDAS INHIBIDORES DE ACCasa (GRUPO A)

Los inhibidores de ACCasa son un grupo de graminicidas comercialmente importantes, muy efectivos y selectivos, los cuales son aplicados en post-emergencia. Desde su introducción hacia finales de los '70 han sido ampliamente usados en el mundo entero para controlar numerosas especies de malezas, convirtiéndose en el tercer grupo más importante de herbicidas a nivel mundial (Délye, 2005a; Kaundun, 2014).

Se clasifican en el grupo A (según HRAC) y pertenecen a tres familias químicas según su estructura química: ariloxifenoxipropionatos (también llamados FOPs); ciclohexanodionas

(también llamados DIMs) y fenilpirazolininas (DEN). Los dos primeros han sido ampliamente usados por más de 40 años con numerosos casos de resistencia reportados. Por otra parte, si bien el pinoxaden fue introducido más recientemente (2006), ya existen malezas resistentes, probablemente debido a la selección por resistencia cruzada con FOP y/o DIM (Petit et al., 2010; Tong, 2013).

El blanco de inhibición de estos herbicidas es la isoforma plastídica homomérica presente en las gramíneas, siendo el resto de las isoformas insensibles a tales inhibidores. Todos los herbicidas de este grupo se unen específicamente al dominio CT, produciendo la inhibición de la enzima. Se postula que la inhibición de ACCasa bloquea la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos y, consecuentemente, altera la integridad de las membranas celulares causando la pérdida de metabolitos y la rápida muerte de la planta. No obstante, se cree que la causa primaria de la toxicidad de estos herbicidas es la generación de hidroperóxidos citotóxicos, como efecto secundario (Délye, 2005a).

Estudios cinéticos indicaron que los inhibidores FOP y DIM mostraron inhibición competitiva respecto al sustrato acetil- CoA. Debido a que ambos herbicidas son inhibidores mutuamente excluyentes, se propuso que sus sitios de unión sobre el dominio CT son solapantes, pero no los mismos (Burton et al., 1991; Rendina et al., 1990). Posteriormente, se determinaron los modos de unión precisos de haloxifop, tepraloxidim y pinoxaden mediante la cristalografía del dominio CT de la isoforma citosólica de levadura (Xiang et al., 2009; Yu et al., 2010; Zhang et al., 2003, 2004). De acuerdo con los datos bioquímicos, los tres compuestos inhiben la ACCasa al competir con la unión de su sustrato (acetil CoA). A pesar de la diversidad química, los tres inhibidores comparten dos puntos de anclaje comunes de interacción con el dominio CT. A su vez, cada uno establece interacciones únicas con este dominio.

La unión del haloxifop requiere un gran cambio conformacional en el sitio activo, en la interfase del dímero del dominio CT, mientras que el tepraloxidim y el pinoxaden requieren cambios menores. Este gran cambio observado por resolución cristalográfica del complejo enzima-inhibidor crea un “bolsillo de unión” que no existe en la enzima libre, y mucho menos, en el complejo enzima-sustrato, siendo esto consistente con los datos cinéticos que demuestran que el haloxifop es inhibidor competitivo con respecto al malonil CoA (Zhang et. al, 2004). La mayoría de las mutaciones que dan resistencia a estos inhibidores se localizan en la cercanía o en los sitios de unión de los inhibidores (Délye, 2005a; Guo et al. 2017; Powles y Yu, 2010).

4.1.5. MECANISMOS DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE ACCasa

Al igual que con otros modos de acción de herbicidas, la resistencia a los inhibidores de ACCasa pueden dividirse en mecanismos asociados al sitio de acción (*TSR*) o ajenos al sitio de acción (*NTSR*).

RESISTENCIA ASOCIADA AL SITIO DE ACCIÓN (O RELACIONADA A LA ACCasa)

Es causada por sustituciones de aminoácidos sobre el dominio carboxiltransferasa, impidiendo la unión efectiva del herbicida. Estudios previos demuestran que la TSR se hereda como una característica monogénica (Christoffers et al., 2002; Moss et al., 2003). Son excepciones a esta regla dos poblaciones resistentes de *Sorghum halepense* y *Leptochloa chinensis* con actividad específica incrementada (Bradley et al., 2001; Pornprom et al. 2006). Sin embargo, algunos autores postulan que ésta puede ser una mala interpretación debido a las diferencias intrínsecas de las poblaciones sensibles y resistentes que están siendo comparadas. Más recientemente se encontró una población de *Digitaria sanguinalis* con aumento del número de copias del gen *ACC*, siendo el primer reporte de este tipo de mecanismo para un modo acción distinto al glifosato (Laforest et al, 2017).

El cambio de isoleucina por leucina en la posición 1781 fue la primera mutación sobre el dominio CT identificada casi simultáneamente por tres laboratorios independientes (Délye et al., 2002c; Zagnitko et al., 2001; Zhang y Devine, 2000). Progresivamente desde aquel momento, se identificaron siete mutaciones y 16 sustituciones sobre el dominio CT del gen *ACC* que confieren resistencia en distintas malezas. Asimismo, se han encontrado casos de coexistencia de varios alelos de resistencia dentro de una misma subpoblación y/o planta individual (Délye et al., 2004; 2005b). Un caso extremo, es la presencia de dos mutaciones distintas en el mismo codón (W1999C ó L), en genes homeólogos de la misma planta de *Alopecurus japonicus* (Xu et al., 2014).

A diferencia de las primeras clasificaciones (Délye, 2005a; Hochberg et al., 2009), estudios más recientes mostraron que, con excepción de las sustituciones D2078G y C2088R que confieren amplia resistencia a todos los herbicidas ensayados, los niveles y espectros de resistencia del resto de las sustituciones dependen de la mutación de resistencia particular, del número de alelos resistentes (homocigota/heterocigota), de la especie de maleza, del estadio de crecimiento de la planta, y de la naturaleza química herbicida (Kaundun, 2014; Yu et al., 2007).

A continuación, se detallan las mutaciones de punto descritas hasta el momento para el dominio CT de la ACCasa (Tabla 11).

TABLA 11 Sustituciones de aminoácidos sobre el dominio CT del gen ACC que confieren resistencia a herbicidas inhibidores del grupo A.

Sustitución	Especie de maleza	Referencias
I1781L	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Délye (2002a, b , 2008); Petit,(2010)
	<i>Avena fatua</i>	Christoffers (2002); Beckie (2012)
	<i>Avena sterilis</i>	Liu (2007)
	<i>Beckmania syzigachne</i>	Li (2014)
	<i>Hordeum glaucum/leporinum</i>	Lovreet (2015)
	<i>Lolium multiflorum</i>	White (2005), Zhang (2017)
	<i>Lolium rigidum</i>	Délye (2002b);Yu (2007)
	<i>Setaria viridis</i>	Délye (2002c)
I1781V	<i>Phalaris paradoxa</i>	Collavo (2011)
I1781T	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Kaundun (2013a)
W1999C	<i>Avena sterilis</i>	Liu (2007)
	<i>Avena fatua</i>	Beckie (2012)
	<i>Alopecurus japonicus</i>	Xu (2014)
W1999L	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Délye (2011a)
	<i>Alopecurus japonicus</i>	Xu (2014)
W1999S	<i>Lolium multiflorum</i>	Kaundun (2013b)
W2027C	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Délye (2005b ;2008); Petit (2010)
	<i>Avena fatua</i>	Beckie (2012)
	<i>Avena sterilis</i>	Liu (2007)
	<i>Beckmania syzigachne</i>	Li (2014)
	<i>Lolium rigidum</i>	Yu (2007)
I2041N	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Délye (2003, 2008); Petit (2010)
	<i>Alopecurus aequalis</i>	Zhao 2019
	<i>Avena fatua</i>	Beckie (2012; Cruz-Hipolito (2011)
	<i>Avena sterilis</i>	Liu (2007)
	<i>Beckmania syzigachne</i>	Pan (2015)
	<i>Lolium rigidum</i>	Délye (2003); Zhang y Powles (2006)
	<i>Phalaris paradoxa</i>	Hochberg (2009)
	<i>Sorghum halepense</i>	Scarabel (2014)
I2041D	<i>Lolium rigidum</i> ^a	Malone (2014)
I2041V	<i>Lolium rigidum</i>	Délye (2003)
I2041T	<i>Alopecurus aequalis</i>	Guo (2017)
D2078G	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Délye (2005b ;2008); Petit (2010)
	<i>Avena fatua</i>	Beckie (2012)
	<i>Avena sterilis</i>	Liu (2007)
	<i>Lolium multiflorum</i>	Kaundun (2010), Zhang (2017)
	<i>Lolium rigidum</i>	Yu (2007)
	<i>Phalaris paradoxa</i>	Hochberg (2009)
C2088R	<i>Avena fatua</i>	Beckie (2012)
	<i>Lolium rigidum</i>	Yu (2007)
C2088F	<i>Lolium rigidum</i> ^a	Malone (2014)
G2096A	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Délye (2005b ;2008); Petit (2010)
	<i>Beckmania syzigachne</i>	Pan (2015)
	<i>Hordeum glaucum/ leporinum</i>	Lovreet (2015)
	<i>Lolium rigidum</i>	Malone (2014; Saini (2015)
G2096S	<i>Avena fatua</i>	Beckie (2012)
	<i>Phalaris paradoxa</i>	Cruz-Hipolito (2012)

Las referencias marcadas en negrita son los primeros reportes de las sustituciones. En rosa se remarca la única sustitución reportada para *Sorghum halepense*. ^aSustituciones sin evidencia suficiente sobre su contribución a la resistencia a inhibidores ACCasa.

RESISTENCIA AJENA AL SITIO DE ACCIÓN

La *NTSR* es considerada como el mecanismo predominante de resistencia a inhibidores de ACCasa (Délye et al., 2011b) y desde el punto de vista agronómico, se considera la más preocupante debido a que puede producir resistencias cruzadas aún impredecibles. Varios estudios a gran escala en *L. multiflorum* (Alarcon Reverte, 2009) y *A. myosuroides* (Délye et al., 2010) demostraron que la mayoría de los individuos resistentes no contenían ninguna mutación conocida. Adicionalmente, se vio que la *NTSR* estaba frecuentemente presente en poblaciones que contenían alguna mutación (Beckie et al., 2012; Kaundun et al., 2013a, b).

Por otra parte, se asume que la *NTSR* confiere niveles más bajos de resistencia que pueden, en algunos casos, ser controlados en un estadio más temprano de la planta (Kaundun, 2014). Sin embargo, también hay estudios que demuestran que los niveles de resistencia conferidos por la *NTSR* pueden superar a los de los mecanismos *TSR* más comunes. Un ejemplo de ello es una población de *A. myosuroides* en donde se encontró que la contribución de la *NTSR* fue significativamente mayor a la resistencia a clodinafop-propargil y pinoxaden otorgada por la mutación *TSR* en la posición 1781 (Kaundun et al., 2013a).

En la mayoría de los casos, la *NTSR* de inhibidores de ACCasa es conferida por la capacidad de algunas poblaciones de metabolizar a los herbicidas a compuestos no tóxicos. La resistencia metabólica es compleja y multigénica, confirmándose en dos estudios genéticos en *L. rigidum* (Busi et al., 2011) y *A. myosuroides* (Petit et al., 2010). En la tabla 12 se resumen los casos de resistencia por metabolismo a distintos herbicidas inhibidores de ACCasa.

Tabla 12. Resistencia basada en metabolismo a herbicidas inhibidores de ACCasa en malezas gramíneas

Herbicida	Especie de maleza	Población ^a	TSR ACCasa	Resistencia cruzada ó múltiple ^b	Molécula involucrada ^c	Datos relevantes de la metodología empleada y/o resultados destacados ^d	Referencias	
Clodinafop-propargil	<i>Alopecurus myosuroides</i>	RC	No	Fx,Hx	Cit P450	Ensayos inhibitorios con ABT y PBO	Letouzé y Gazquez (2003)	
	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Peldon	-	Fx,Fz,Tx, PSII	NI	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]	Hall (1997)	
		Lincs E1	-	-	-	-	-	-
		R (España)	Si	Cd, Fz, Hx, Px, Cx, Tk, PSII	Cit P450	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]; ensayos inhibitorios con ABT	Menéndez y De Prado (1996)	
	<i>Avena sterilis</i>	NAS4	Si	Fz, Sx, Hx	Cit P450	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]; ensayos inhibitorios con tetciclasis	Maneechote (1997)	
	<i>Avena spp</i>	R1	No	-	Cit P450?	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]; similitud con metabolismo trigo	Ahmad-Hamdani (2013)	
	<i>Echinochloa phyllopogon</i>	MHR	-	Tk; Px; ALS	Cit P450	LC-MS /MS; qPCR, expresión heteróloga en <i>S. cerevisiae</i> y arroz de CYP81A12 y CYP81A21; análisis genéticos de la resistencia.	Iwakami (2019)	
	<i>Lolium multiflorum</i>	Essex A1 LincsA1 Wilts B1	No	PSII	Cit P450, GST	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]; actividad GST constitutiva	Cocker (2001)	
	Diclofop-metil		VLR69	Si	ALS, PSII	Cit P450	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]; ensayos inhibitorios con ABT	Preston (1996)
			SLR1A	No	Fz	Cit P450	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C], ensayos inhibitorios con amitrol	Preston y Powles (1998)
		R2	No	PSII	Cit P450	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]; ensayos inhibitorios con ABT	De Prado (2005)	
<i>Lolium rigidum</i>		WALR70	No	ALS, Glifosato	Cit P450	Ensayos inhibitorios con amitrol	Yu (2009)	
		WALR60	No	Glifosato	Cit P450	Ensayos inhibitorios con amitrol	Yu (2009)	
		SLR31	No	-	Cit P450	Análisis genéticos de la resistencia	Busi(2011)	
		R1 R2	No	-	Cit P450	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]	Yu (2013b)	
		R(VLR1)	-	-	Cit P450; NMO; GT; GST	Sobreexpresión génica -RNAseq CYP72A; NMO; GT; GST	Gaines (2014)	
<i>Lolium spp</i>	Tuescania 97' Roma 94'	No	-	Cit P450	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]; ensayos inhibitorios con ABT	Bravin (2001)		

Fenoxaprop- etil	<i>Alopecurus aequalis</i>	AHTCF1	I2041N	Cd, Px	Cit P450	Ensayos inhibitorios con PBO	Zhao (2019)
		R (China)	-	-	Cit P450	Análisis del contenido microsomal Cit P450 y Cit b5; actividad P450 monooxigenasa; ensayos inhibitorios con PBO	Wang (2013)
	<i>Alopecurus japonicus</i>	AHFD-3	D2078G	ALS; PSII	Cit P450	Ensayos inhibitorios con ABT y PBO; análisis del contenido microsomal Cit P450; EST/ qPCR CYP72A; CYP81	Chen (2018)
		R (Francia)	Si	ALS	Cit P450	Análisis genéticos de la resistencia, ensayos inhibitorios con malation	Letouzé y Gazquez (2001)
		Belg, BuckC1, Far, LinckK1, Peldon Lincs E1	No	-	GST	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C], aumento actividad GST	Cocker (1999)
	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Peldon Lincs E1	-	Dc, Fz, Tk, PSII	NI	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C], ensayos inhibitorios con PBO, ABT y tetciclasis	Hall (1997)
		Peldon	No	PSII	GST	Western, Northern, actividad GST/GPOX; HPLC-MS; expresión recombinante;	Cummins (1999); (2009)
		Lincs	No	-	GST	3 genes (AmGSTU1; AmGSTF1; AmGSTL1)	
		RB RC	No	ALS PSII Cd, Hx	GST	Ensayos inhibitorios con Tridiphane	Letouzé y Gazquez, (2003)
	<i>Avena fatua</i>	Dorset	No	Tk	NI	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]	Cocker (2000)
	<i>Avena sterilis</i>	T/11	No				
	<i>Beckmania syzigachne</i>	R (China)	Si	-	Cit P450; esterasa; peroxidasa; GST;GT; transportador ABC	Sobreexpresión génica-RNaseq: CYP87A3; CYP71D7; PIR7B; GDSL estereasa/lipasa 4g01130; Peroxidasa (1, 66); GST (U1, U6, T3); UDP-GT (73C1,85A2); transportador ABCB10	Pan (2016)
	<i>Echinochloa phyllopogon</i>	R (EEUU)	-	ALS	Cit P450	Contenido y actividad específica de Cit P450	Yun (2005)
		R (EEUU)	No	ALS	GST?	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]; TLC: conjugación con GSH y cys	Bakkali (2007)
	<i>Lolium multiflorum</i>	HZYC-6	I1781L/ A2078G	Hx, Qz, Cd, Sx, Ct, Px	Cit P450	Ensayos inhibitorios con PBO, malation y ABT	Zhang (2017)
<i>Poa annua</i>	R (China)	-	-	Cit P450	Análisis del contenido microsomal Cit P450 y Cit b5; actividad P450 monooxigenasa; ensayos inhibitorios con PBO	Wang (2013)	

Fluazifop-butil	<i>Digitaria sanguinalis</i>	R(Australia)	No	Hx, Qz, Sx	NI	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C], ensayos inhibitorios con ABT, PBO, malation, tetciclas y metirapona	Hidayat y Preston (1997)
	<i>Eleusine indica</i>	R (Taiwan)	-	-	Cit P450, GST	LC/MS/MS, actividad Cit P450 y GST	Wang (2017)
	<i>Hordeum leporinum</i>	R (Australia)	No	Hz, Qz, Sx, Ct	NI	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]	Mattews (2000)
Haloxifop	<i>Alopecurus myosuroides</i>	RC	No	Cd, Fx	Cit P450	Ensayos inhibitorios con ABT y PBO	Letouzé y Gazquez (2003)
Pinoxaden	<i>Avena fatua</i>	R (Canadá)	W2027C	Cd, Fx, Qz, Sx, Tk, Ct, Px, ALS	Cit P450	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C], ensayos inhibitorios con malation	Beckie (2012)
	<i>Echinochloa phyllopogon</i>	MHR	-	Tk; Px; ALS	Cit P450	LC-MS /MS; qPCR, expresión heteróloga en <i>S. cerevisiae</i> y arroz de CYP81A12 y CYP81A21; análisis genéticos de la resistencia.	Iwakami (2019)
Tralkoxidim	<i>Echinochloa phyllopogon</i>	MHR	-	Tk; Px; ALS	Cit P450	LC-MS /MS; qPCR, expresión heteróloga en <i>S. cerevisiae</i> y arroz de CYP81A12 y CYP81A21; análisis genéticos de la resistencia.	Iwakami (2019)
	<i>Lolium rigidum</i>	VLR69	No	ALS, PSII	NI	Ensayos siguiendo el herbicida marcado con ¹⁴ [C]	Preston (1996)

^a Población en la cual uno o varios mecanismos de resistencia fueron identificados

^b Cd: clodinafop; Ct: cletodim; Cx: cicloxidim; Dc: diclofop; Fx: fenoxaprop; Fz: fluazifop; Hx: haloxifop; Px: pinoxaden; Qz: quizalofop; Sx: setoxidim; Tk: tralkoxidim

^c Cit P450: citocromo P450; GT: Glicosiltransferasa; GST: Glutation- S- transferasa; NI: no identificada; NMO: Nitronato monooxigenasa.

^d cit b5: citocromo b5; EST: del inglés *expressed sequence tag*; qPCR: PCR en tiempo real; GPOX: glutatión peroxidasas; HPLC-MS: cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masa; TLC: cromatografía en capa delgada; LC/MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa.

Cabe destacar que la precedente tabla fue confeccionada bajo el estricto criterio de informar los mecanismos estudiados para cada principio activo evaluado, a pesar de que algunos autores extrapolan las conclusiones a todos los integrantes de la familia química correspondiente.

Por otra parte, en poblaciones de *L. rigidum* y *A. myosuroides* con resistencias múltiples, se reportaron mecanismos de resistencia mediados por actividad peroxidasas de GST (glutathion-S-transferasas) y concomitante producción de flavonoides para contrarrestar el daño oxidativo debido la acción del herbicida (Cummins et al., 1999, 2013).

Actualmente, se conocen pocos reportes de resistencia causada por penetración reducida (De Prado et al., 2005) y secuestro de herbicidas inhibidores de ACCasa (Dinelli et al., 2005), por lo que se necesitan más estudios para confirmar estos mecanismos.

La ventaja o desventaja de cada carácter de resistencia puede impactar en el costo biológico de la planta y así influir sobre la capacidad reproductiva de la especie. Esto tendrá inherentemente un impacto en la tasa de evolución de la resistencia, dada la mayor/menor habilidad competitiva de las plantas resistentes en ausencia de la presión de selección (Neve et al., 2003).

Distintos estudios que evaluaron características asociadas al costo de la resistencia de la sustitución I1781L en la ACCasa de *L. rigidum* y *A. myosuroides*, mostraron que dicha sustitución no conlleva ningún tipo de costo ecológico, fisiológico ni de reducción de la productividad (Vila-Aiub et al., 2005a, b; Menchari et al., 2008). A su vez, no altera la actividad de la ACCasa, lo que explicaría por qué se selecciona con mayor frecuencia (Vila-Aiub et al., 2015).

Menchari y colaboradores (2008) evaluaron varias poblaciones con las sustituciones I2041N y D2078G en la ACCasa de *A. myosuroides*, mostrando ausencia de efectos pleiotrópicos asociados a características vegetativas o reproductivas para la primera. Por el contrario, la sustitución D2078G resultó en una reducción en la altura y la biomasa vegetativa y reproductiva.

En poblaciones de *L. rigidum* con la mutación D2078G también se vieron efectos pleiotrópicos. En ambas malezas mencionadas resultó ser un costo recesivo (observado en plantas homocigotas). Una posible explicación de este costo es la reducción de la actividad ACCasa asociada con esta mutación particular. Por lo tanto, en ausencia de la presión de selección, esta mutación es menos probable que persista en la población (Vila-Aiub et al. 2015).

En contraste, estudios recientes sobre posibles cambios de frecuencias alélicas generacionales de I1781L, I2041N y D2078G en *L. rigidum* demostraron un aumento de la frecuencia del alelo D2078G, aun en distintos niveles de competencia (Saini et al., 2017). Esta aparente contradicción la explican los diferentes acervos genéticos de las poblaciones resistentes evaluadas. A pesar de que se trata de la misma especie y la misma mutación, pueden existir diferencias fisiológicas y regulatorias entre las poblaciones resistentes derivadas de los correspondientes contextos (*background*) genéticos, que resulten en interacciones diferenciales.

La actividad de la ACCasa con la sustitución C2088R en plantas de *L. rigidum* se vio afectada, disminuyendo a la mitad respecto a las plantas sensibles, explicando el costo asociado a estas mutaciones (Vila-Aiub et al., 2009a; Yu et al., 2007).

Por último, estudios de costo en poblaciones de *L. rigidum* con resistencia metabólica basada en el citocromo P450 resultaron en una reducción en el crecimiento vegetativo (Vila Aiub et al, 2005a) y reproductivo (Vila-Aiub et. al, 2009b)

En la Tabla 13 se resumen los mecanismos de resistencia a inhibidores de ACCasa reportados al momento en distintas especies de malezas.

TABLA 13. Resumen de los mecanismos de resistencia en malezas reportados al momento para herbicidas inhibidores de ACCasa (Adaptado de Perotti et al. 2020).

Bases genéticas/ Mecanismos	Molécula/ Estructura involucrada	Efectos bioquímicos /fisiológicos	Referencias
TSR , Sustitución de aminoácidos en ACCasa: I1781 L/V/T W1999 C/L/S W2027 C I2041 D/N/T/V D2078 G C2088 F/R G2096 A/S	ACCasa	Reducción de la sensibilidad a ACCasa	Kaundun (2014); Guo (2017); Malone (2014)
TSR , Sobreexpresión del gen <i>ACC</i> ?	ACCasa	Mayor actividad de ACCasa	Bradley (2001b); Pornprom (2006).
TSR , Amplificación del gen <i>ACC</i>	ACCasa	Mayor actividad de ACCasa?	Laforest (2017)
NTSR , bases desconocidas	Mayor densidad de cera epicuticular en las cutículas de la hoja	Absorción foliar reducida	De Prado (2005)
NTSR , bases desconocidas	Cit P450	Metabolismo incrementado	Preston et al., (1996); Yun , (2005); Zhang (2017)
NTSR , bases desconocidas	Cit P450, GST	Metabolismo incrementado	Letouzé y Gasquez (2003); Wang (2017)
NTSR , sobreexpresión génica CYP72A; NMO; GT; GST	Cit P450; NMO; GT; GST	Metabolismo incrementado	Gaines (2014)
NTSR , sobreexpresión génica: CYP87A3; CYP71D7; PIR7B; GDSL estereasa/lipasa 4g01130; Peroxidasa (1, 66); GST (U1, U6, T3); UDP-GT (73C1,85A2); transportador ABCB10	Cit P450; esterasa; peroxidasa; GST;GT; transportador ABC	Metabolismo incrementado	Pan (2016)
NTSR , sobreexpresión génica CYP71A4	Cit P450	Metabolismo incrementado	Zhao (2019)
NTSR , sobreexpresión génica AmGSTU1; AmGSTF1; AmGSTL1	GST	Metabolismo incrementado y protección contra daño colateral	Cummins (2009); Cummins (2013)

Abreviaturas: ACCasa: acetyl-CoA carboxylase; Cit P450: citocromo P450; GST: Glutathione S-transferase; NMO: Nitronato monooxygenase; GT: Glicosyltransferase.

Particularmente para *Sorghum halepense*, existen varios reportes de poblaciones con resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa (Bradley y Hagoood, 2001a; Burke et al., 2006; Kaulomenos y Eleftherohorinos, 2009; Heap, 2020). No obstante, hasta el momento los únicos mecanismos de resistencia a graminicidas reportados para esta especie son los asociados

a la ACCasa (*TSR*); una sustitución en la enzima de isoleucina por leucina en la posición 2041 (Scarabel et. al, 2014) y una mayor actividad específica de la misma en poblaciones resistentes (Bradley et. al, 2001b). Cabe destacar, que no se encontraron reportes de mecanismos *NTSR* para este grupo de herbicidas en esta especie.

4.1.6. ACCasas HOMOMÉRICAS INHERENTEMENTE TOLERANTES

Algunas especies de gramíneas del genero *Festuca*, *Poa* y *Vulpia* son tolerantes a herbicidas inhibidores de ACCasa debido a la presencia de ACCasa homomérica plastídica insensible (Kaundun, 2014). Coherentemente, estas ACCasas, al igual que las ACCasa homoméricas citosólicas (Liu et al., 2007), contienen la sustitución I1781L confirmada repetidamente como responsable de la resistencia a este grupo de herbicidas. Así, estas especies de gramíneas podrían representar un eslabón viviente de la cadena evolutiva, conservando en sus plastidios la isoforma homomérica ancestral derivada de una posible duplicación génica de la citosólica, que adquirió el péptido tránsito.

4.1.7. SELECTIVIDAD EN BASE AL METABOLISMO DE HERBICIDAS

Los cultivos de gramíneas como trigo, maíz o arroz contienen una ACCasa homomérica plastídica con sensibilidad similar a la que contienen las malezas gramíneas. Sin embargo, la selectividad está basada en la capacidad de estos cultivos de metabolizar más rápidamente al herbicida en productos inactivos (Délye, 2005a).

Esta capacidad puede ser inherente a los cultivos ó desencadenada por la aplicación de antagonistas en mezcla con el herbicida. Los antagonistas son químicos que exhiben una alta especificidad botánica, suprimiendo el efecto fitotóxico del herbicida en el cultivo sin alterar su actividad contra la maleza. Algunos estudios demostraron la activación de genes o vías metabólicas con un rol general frente a estrés (tanto biótico como abiótico) en respuesta a su aplicación (Hatzios y Burgos, 2004). Debe aclararse que no todos los herbicidas inhibidores de ACCasa pueden ser selectivos hacia el cultivo, tal como ocurre con haloxifop, cletodim o setoxidim (Délye, 2005a).

4.1.8. RESISTENCIA A HERBICIDAS Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE PLOIDÍA

En especies de malezas diploides las mutaciones conocidas en el gen *ACC* confieren de moderados a altos niveles de resistencia (Délye, 2005a; Yu et al., 2007). Estos genotipos pueden ser parcialmente dominantes o dominantes, dependiendo del tipo de mutación, de los herbicidas y las dosis de herbicida (Christoffers et al., 2002; Tal y Rubin, 2004; Yu et al., 2007).

En especies poliploides no es tarea fácil identificar y comprender la resistencia a herbicidas. La mayoría de los estudios están enfocados en estudiar las bases moleculares y bioquímicas de la resistencia, pero no la complejidad de la expresión génica en las malezas poliploides.

Mientras que en diploides ambas copias del gen son usualmente transcriptas y expresadas, en poliploides suele ser más complejo. Yu estudió en profundidad la resistencia en *Avena fatua*, una gramínea hexaploide (alopoliploide) (Yu et al., 2013a). Estudios previos demostraron que todas las especies de *Avena* hexaploides presentan apareamiento de cromosomas bivalentes con herencia disómica, pudiendo predecir que cada gen tiene tres copias homeólogas (una de cada genoma original) (Thomas, 1992). Esto fue confirmado más tarde por Christoffers, quien encontró tres genes de la ACCasa plástica en *Avena fatua* (*ACC1, 1*, *ACC1, 2* y *ACC1, 3*) (Christoffers et al., 2002).

En los estudios de Yu, 2013a se determinó que estos tres genes homeólogos se heredan independientemente y que una planta individual resistente puede expresar una, dos o tres mutaciones que confieren resistencia en el gen *ACC* diferentes (I1781L, D2078G y C2088R). Además, por estudios de inhibición *in vitro* de la ACCasa, se vio que en *Avena spp.*, cada una de las mutaciones confería niveles de resistencia relativamente más bajos a los niveles de resistencia conferidos por las mismas mutaciones en especies de malezas diploides (*A. myosuroides* y *L. rigidum*).

Estos menores niveles de resistencia observados en la especie poliploide son probablemente debidos a un efecto de dilución de la enzima ACCasa resistente con ACCasas sensibles. Paralelamente, dado que la ACCasa requiere de dos monómeros para ser funcionalmente activa, los homodímeros totalmente resistentes podrían estar diluidos aún más en especies poliploides.

Sumando niveles de complejidad, también es posible la expresión diferencial de las tres copias homeólogas, influyendo en la cantidad relativa de copias de *ACC* resistente. Así, si la

expresión de la copia del gen que tiene la mutación es baja comparada con las otras copias, la resistencia conferida por la mutación podría estar aún más diluída (Yu et al., 2013a; Iwakami et al., 2012).

Sorghum halepense, nuestro modelo en estudio, es una alotetraploide que se originó de la hibridación entre *Sorghum propinquum* y *S. bicolor* ssp. *arundinaceum* (Fernandez et al., 2013).

Por lo expuesto anteriormente, es probable que en *S. halepense* existan al menos dos copias homeólogas del gen ACC que codifica para la isoforma plastídica, responsable de la selectividad de los herbicidas del grupo A. Esto supone un efecto de dilución de los alelos resistentes, presumible según los antecedentes previamente descriptos. Sin embargo, no existen antecedentes al respecto de la posible correlación entre el aumento de alelos resistentes y los niveles de resistencia observados.

4.1.9. EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA A INHIBIDORES DE ACCasa

El primer caso de resistencia a herbicidas inhibidores de ACCasa fue reportado en 1982 en una población de *L. rigidum* de Australia. El número de casos de resistencia fue aumentando progresivamente en los últimos 40 años. Actualmente, ya se denunciaron 48 casos de malezas resistentes a inhibidores de ACCasa a nivel mundial, siendo las especies más afectadas *A. myosuroides*, *A. fatua*, *L. multiflorum* y *rigidum* (Heap, 2019).

En Argentina, se reportaron casos en *Lolium spp*, *Avena fatua*, *Sorghum halepense* y *Eleusine indica* en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y Tucumán (Figura 8). En el año 2015, se encontraron simultáneamente poblaciones de *Sorghum halepense* resistentes a inhibidores de ACCasa (RACC) en la provincia de Santa Fe y otra población en Córdoba con resistencia múltiple también a glifosato (REM, 2019).

El material de estudio objeto de esta tesis fue cedido por el Prof. Daniel Tuesca, y corresponde al *Sorghum halepense* encontrado en la provincia de Santa Fe. Cabe señalar que la resistencia a glifosato de este material fue un hallazgo de este trabajo de tesis.

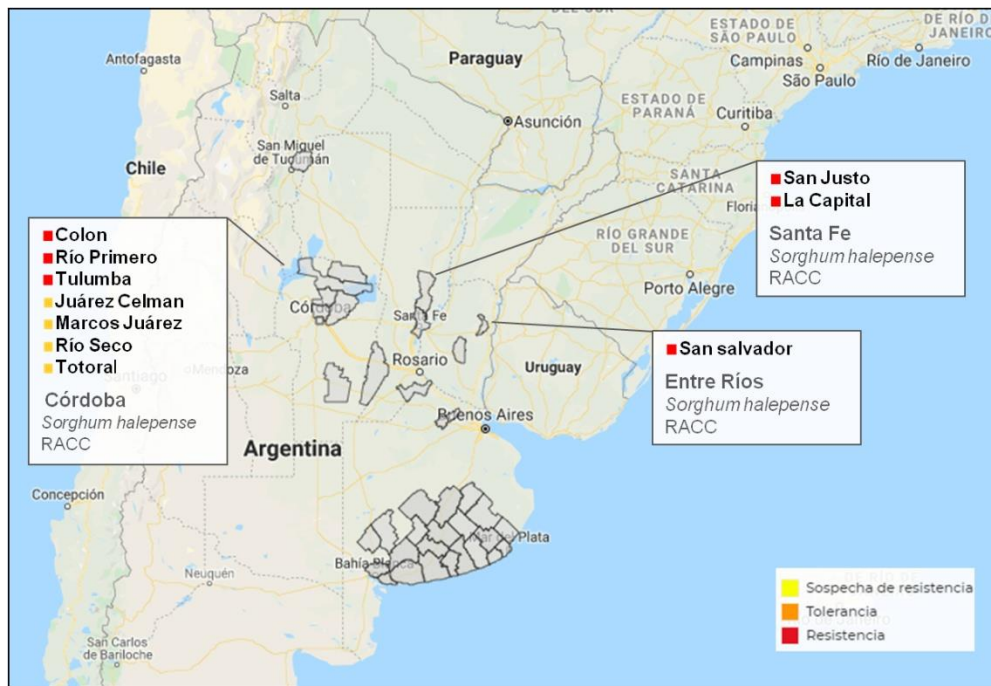


FIGURA 8. Distribución de malezas resistentes RACC en Argentina. En el mapa se señalan los casos reportados de *Sorghum halepense* RACC. Los datos para la construcción de la figura remiten a un censo acumulativo realizado en 2017 (REM, 2019).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Seleccionar individuos sensibles y resistentes a herbicidas del grupo A a partir de una subpoblación de *Sorghum halepense* hallada a campo y determinar los niveles de resistencia *in vivo* a haloxifop-p- metil de los individuos seleccionados.
- 2) Identificar el mecanismo responsable del fenotipo de resistencia a haloxifop-p-metil en los individuos seleccionados.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. EXPERIMENTOS DE DOSIS-RESPUESTA CON INHIBIDORES DE ACCasa EN LAS SUBPOBLACIONES GC-R Y ZAV-S

Con el objetivo de confirmar la resistencia hallada a campo, se realizaron experimentos de dosis-respuesta utilizando uno de los herbicidas inhibidores de ACCasa perteneciente a la familia de los ariloxifenoxipropionatos (haloxifop-p-metil). Estos ensayos se realizaron para determinar los niveles de resistencia de la subpoblación GC-R, en comparación con la subpoblación control (Zav-S).

La subpoblación sensible presentó un GR_{50} de 47 g ia ha⁻¹ y un LD_{50} de 97 g ia ha⁻¹, mientras que los valores del GR_{50} y LD_{50} (> 518 g ia ha⁻¹) de la subpoblación GC-R fueron mayores a 8 veces la dosis de campo (64,8 g ia ha⁻¹), resultando en factores de resistencia mayores a once y cinco, respectivamente. Además, no se registró muerte de ninguna de las plantas de la subpoblación GC-R resistente tratadas con la máxima dosis (8x). A su vez, a esta dosis, tampoco se logró reducir el 50 % de la biomasa, motivo por el cual los datos de biomasa de la subpoblación GC-R no fueron ajustados (Figura 9 y Tabla 14).

A la dosis recomendada a campo de haloxifop-p-metil, las subpoblaciones resistentes (GC-R) y susceptible (Zav-S) presentaron un porcentaje de biomasa remanente del 95 % y 57% (respecto del control no tratado), respectivamente. Al mismo tiempo, el porcentaje de supervivencia de las plantas a la dosis 1X fue del 100% para GC-R y 67% para Zav-S (Figura 9).

En una población de malezas, la aplicación de un tratamiento con herbicida es un evento catastrófico que normalmente debería causar más de un 90% de mortalidad (REM, 2019; Streibig, 2003; Wiley, 2016). Si bien no existe un consenso total acerca del valor de corte a considerar (80-95 %), parece lógico que la subpoblación Zav-S utilizada como referencia en nuestros estudios resultó tener un moderado nivel de resistencia a haloxifop-p-metil, aunque bastante inferior al de la población resistente

Por otra parte, la subpoblación GC-R resultó ser susceptible a cletodim un herbicida perteneciente a la familia química de las ciclohexanodionas (datos no mostrados).

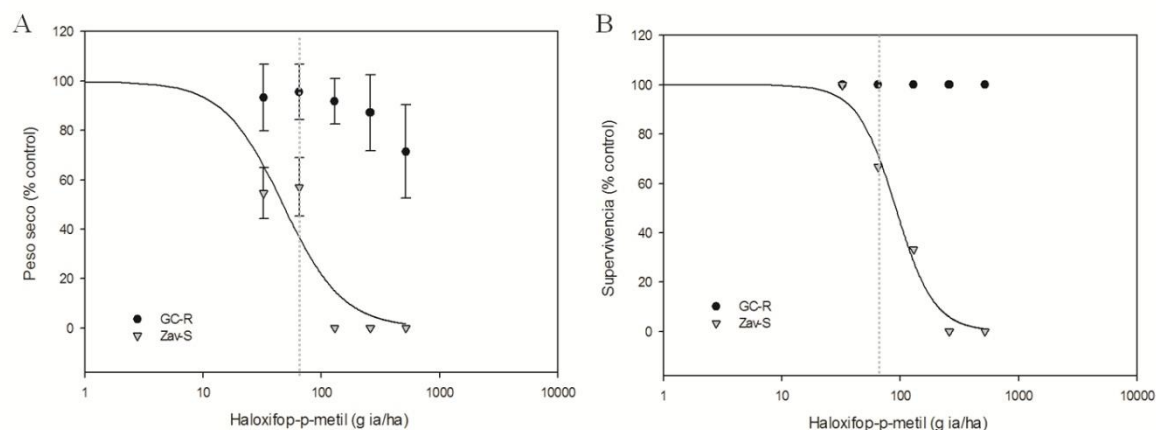


FIGURA 9. Curvas dosis respuesta de las subpoblaciones GC-R y Zav-S de *Sorghum halepense* con haloxifop-p-metil. Los resultados se expresan como % peso seco(A) y supervivencia relativo a los controles no tratados. Los símbolos indican los valores medios y las líneas los valores predictivos para cada población. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media. La línea de puntos indica la dosis de campo recomendada. En el caso de la subpoblación resistente (GC-R) las dosis del haloxifop-p-metil aplicado no provocaron una reducción sustancial de las variables en estudio, lo cual imposibilitó el ajuste de los datos a la curva paramétrica (Ensayo dosis respuesta realizado por el Ing. Papa y el Prof. Tucsca).

TABLA 14. Parámetros obtenidos de las curvas dosis-respuesta de las subpoblaciones GC-R y Zav-S de *Sorghum halepense*. Los valores de GR_{50} y LD_{50} se expresan en $g\ ia\ ha^{-1}$. Los valores entre paréntesis son los errores estándar de la media. Los factores de resistencia (FR) se calcularon utilizando la concentración de herbicidas requerida para reducir la biomasa seca y supervivencia en un 50% respectivamente.

Herbicida	Subpoblación	Peso Seco			Supervivencia		
		GR_{50}	R^2	FR	LD_{50}	R^2	FR
Haloxifop-p-metil	GC-R	>518			>518		
	Zav-S	47(11)	0,9101	>11	97 (32)	0,9476	>5

4.2.2. ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS DE ACCasa DE *Sorghum halepense*

Las secuencias de las ACCasas homoméricas están altamente conservadas entre especies, sin embargo difieren en longitud, conduciendo a variaciones en la posición de residuos de aminoácidos de especies de interés. La ACCasa de *Alopecurus myosuroides* es una de las más estudiadas a nivel bioquímico y molecular, y en la cual se han identificado varias de las mutaciones que confieren resistencia a herbicidas inhibidores de ACCasa. Por esto, se propuso que las sustituciones de aminoácidos de la ACCasa sean referenciadas con la correspondiente

posición de la ACCasa plastídica de *A. myosuroides* (EMBL/Genbank/DDBJ accession AJ310767) (Délye, 2005a).

En las bases de datos están disponibles solo dos secuencias parciales del gen de la ACCasa de *S. halepense* (EMBL, KF885933, sensible- ATT y KF885934 resistente -AAT) que comprenden una región de 1228 bp del dominio CT (Scarabel et al., 2014). Sin embargo, debido a que *S. halepense* es una especie alotetraploide que comparte un subgenoma con *S. bicolor*, es posible usar este último como secuencia completa de referencia para los distintos análisis (Fernández et al., 2013).

A partir de un alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen y ARNm de la isoforma plastídica de *A. myosuroides* (AM408430 y AJ310767, respectivamente) con el ARN mensajero de *S. bicolor* (XM002446133), se identificó el exón que contiene el dominio CT, confirmando la ausencia de intrones (Figura 10). Además, los programas informáticos de predicción del importe de proteínas al cloroplasto (sección 3.11) indicaron que las secuencias de aminoácidos de *S. bicolor* XP002446178.1 (derivada de XM002446133.1) sería de localización plastídica. Finalmente, las secuencias de los ARNm de *S. bicolor* y *A. myosuroides*, presentaron un 82,6% de identidad de secuencia.

En la Figura 10. D se muestra un esquema de los dominios de la ACCasa y se puede ver que todas las mutaciones encontradas al momento que confieren resistencia a estos inhibidores se concentran sobre el dominio CT.

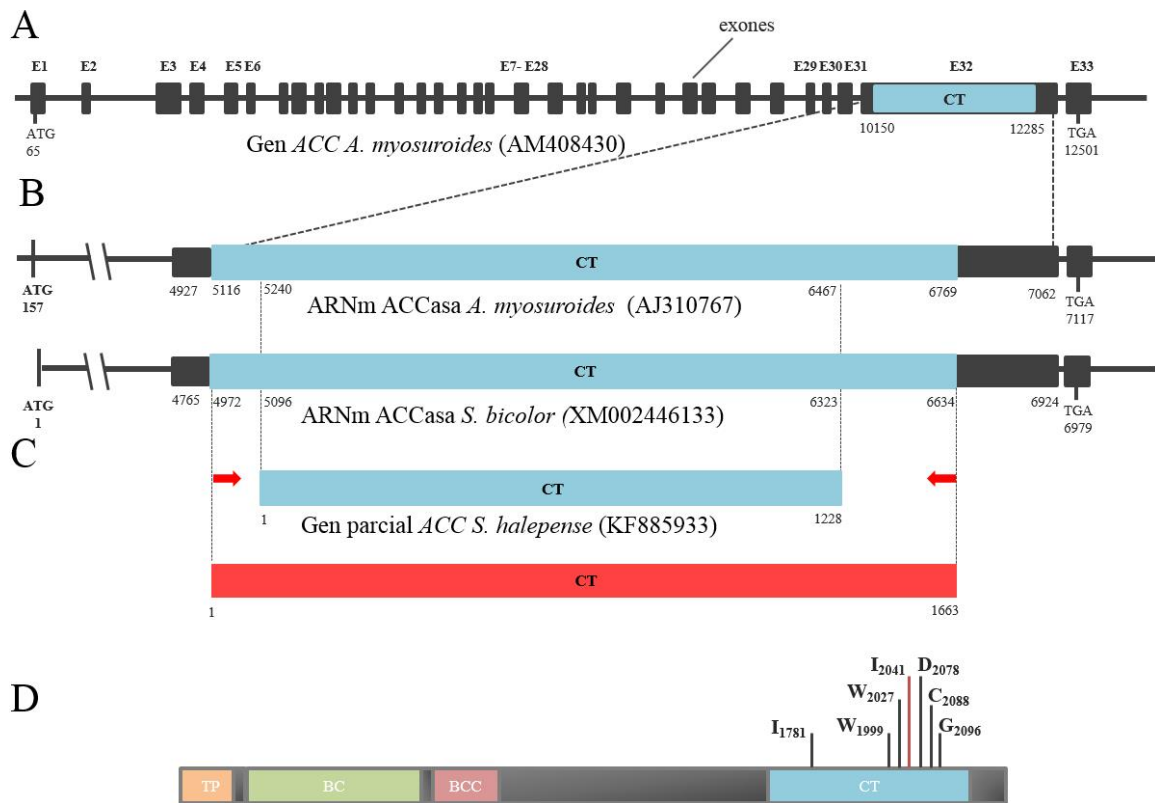


FIGURA 10. Análisis de las secuencias de la ACCasa de *S. halepense* **A)** Estructura esquemática del gen *ACC* de *A. myosuroides*. Los exones (E) se muestran en negro. **B)** Alineamiento de secuencias nucleóticas de los ARNm de *A. myosuroides* y *S. bicolor* que contienen el dominio CT. **C)** Secuencia génica parcial disponible del gen *ACC* de *S. halepense*. Las flechas rojas indican los sitios de hibridación de los oligocebadores para la amplificación del dominio CT completo (CT1663). **D)** Estructura esquemática de los dominios de la ACCasa. Las líneas indican las mutaciones puntuales responsables de la resistencia a inhibidores de ACCasa identificadas en distintas especies de malezas hasta el momento.

4.2.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES PRESENTES EN LAS SUBPOBLACIONES GC-R Y ZAV-S

En primera instancia se realizó una exploración masiva de las secuencias codificantes de la ACCasa en el material de estudio para conocer la variabilidad genética de las subpoblaciones en cuestión. Para ello, se llevó a cabo la amplificación del dominio CT completo (1663 bp) del gen de la ACCasa (*ACC*) mediante PCR, utilizando como molde ADN genómico extraído de hojas jóvenes de grupos de 10 plantas elegidas al azar de cada subpoblación.

Debido a que el modelo en estudio es alotetraploide, conteniendo al menos dos copias homeólogas del gen (una de cada parental) y con posibilidad de contener copias parálogas, se

decidió clonar los fragmentos de PCR en el vector pGEMT Easy para simplificar el análisis de secuencias y conocer los haplotipos.

La comparación de las secuencias de los clones del dominio CT obtenidos de *S. halepense* (6 sensibles y 20 resistentes) con las del gen de la ACCasa cloroplástica de otras gramíneas, mostró un 99-100% de identidad con *S. bicolor* (XM002446133.1), 84-89% con *A. myosuroides* (AJ310767), 78-88% con *Lolium multiflorum* (AY710293), 87-88% con *Lolium rigidum* (AY995232) y 85-89% con *Triticum aestivum* (AF029895), demostrando la alta especificidad de los oligocebadores por la isoforma de interés. Cabe destacar que esta característica se buscó adrede en el diseño de los mismos, para evitar la amplificación de isoformas citosólicas.

El alineamiento de las secuencias de los clones de plantas sensibles y resistentes reveló 13 polimorfismos de nucleótidos simples (SNP), de los cuales siete resultaron sinónimos y seis no sinónimos (Tabla 15). Las 26 secuencias comprendieron un total de 13 haplotipos y 10 de ellos contienen SNP no sinónimos.

Entre los SNP no sinónimos, uno estaba presente únicamente en plantas sensibles (posición 1070), otro tanto en plantas sensibles y resistentes (posición 34) y un tercero (en la posición 388) contenía un codón de paro de la traducción, indicando que no se estaría expresando. Los tres SNP restantes (posiciones XXX, 1163 y 1328) estaban presentes únicamente en plantas resistentes. Los SNP 1163 y 1328 corresponden a las sustituciones I2041N y G2096A, respectivamente, ya reportadas que confieren resistencia a inhibidores de ACCasa (ver Tabla 11). Específicamente, estas dos sustituciones halladas son conocidas por otorgar resistencia a los inhibidores FOP y baja o moderada resistencia a los DIM (Délye et. al, 2003, 2005b, 2008; Hochberg et al., 2009; Scarabel et. al, 2014), de manera que su hallazgo fundamenta perfectamente el patrón de inhibición observado a nivel poblacional. El tercer SNP (XXX) es una mutación que cambia isoleucina por treonina (IXXXXT) no reportada previamente. Este hallazgo resulta interesante dado que podría implicar una nueva mutación contribuyente al fenotipo de resistencia. Si efectivamente lo fuera, guarda un especial interés por su potencial aplicación como herramienta biotecnológica, por lo que en esta instancia se mantiene en confidencia su posición (protección de propiedad intelectual).

En conclusión, el análisis de las secuencias traducidas a partir de los 13 haplotipos hallados entre ambas poblaciones arrojó que existirían hipotéticamente seis variantes aminoacídicas en los plastidios de dichas poblaciones (I-VI) (Tabla 15), tres de las cuáles son

exclusivas de la población resistente (IV, V y VI). Las isoformas IV y VI portan mutaciones previamente caracterizadas por su rol en la resistencia a graminicidas, mientras que la isoforma V es un hallazgo de este trabajo, como se describió anteriormente.

Para confirmar qué secuencias son efectivamente funcionales en hoja se analizaron los ADNc obtenidos a partir de un individuo de la población resistente (llamado GC-C4, ver siguiente sección). Las secuencias obtenidas corresponden a cinco haplotipos distintos, es decir que al menos tres genes *ACC* se están expresando en este tejido. Además, esos cinco ARNm resultan en cuatro isoformas (I, II, IV y V).

Estos resultados estarían indicando la presencia de tres copias funcionales del gen que codifica para la isoforma plastídica de ACCasa en *S. halepense*. De todos modos, se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

TABLA 15. Haplotipos encontrados a partir del alineamiento de secuencias del dominio CT del gen de ACC cloroplástica de plantas sensible y resistentes.

Haplotipo	Posición de nts ^a	34	XXX	255	388	456	615	714	1070	1163	1176	1299	1328	1410	Variante a nivel de AA (Isoforma codificada)
	Posición de AA ^b	1665	XXXX	1738	1783	1805	1858	1891	2010	2041	2045	2086	2096	2122	
	<i>S. bicolor</i> ^c	G(Val)	T(Ile)	G(Leu)	G(Gly)	C(Thr)	C(Ile)	T(Gly)	C(Ala)	T(Ile)	G(Gly)	T(Ile)	G(Gly)	C(Pro)	
	<i>S. hal</i> (S) ^d	-	T	G	G	C	C	T	C	T	G	T/C	G	-	I o III?
	<i>S. hal</i> (R) ^e	-	T	T/G	G	C	C	T	C	A(Asn)	G	T/C	G	A	IV?
1	Sh 1,2,3,4 (S)	-	T	T	G	C	C	T	C	T	G	T	G	-	I o III?
2	Sh 5 (S)	G	T	G	G	C	C	T	G (Gly)	T	G	T	G	G	II
3	Sh 6 (S)	A(Ile)	T	G	G	C	C	T	C	T	G	C	G	G	I
4	Sh 7 (R)	G	T	G	G	A	T	T	C	T	G	T	G	G	III
5	Sh 8 (R)	A(Ile)	T	T	G	C	C	T	C	T	G	T	G	G	I
6	Sh 9 (R)	A(Ile)	T	T	G	C	T	T	C	T	G	T	G	G	I
7	Sh 10 (R)	G	T	G	G	C	T	T	C	T	G	T	G	G	III
8	Sh 11, 12,13 (R)	A(Ile)	T	G	G	C	C	T	C	T	G	T	G	G	I
9	Sh 14,15 (R)	G	T	G	G	A	C	A	C	A(Asn)	C(Gly)	T	G	G	IV
10	Sh 16,17,18 (R)	G	T	G	G	A	C	T	C	A(Asn)	C(Gly)	T	G	G	IV
11	Sh 19 (R)	A(Ile)	C(Thr)	T	T(stop)	C	C	T	C	T	G	T	G	G	-
12	Sh 20, 21, 22, 23, 24(R)	A(Ile)	C(Thr)	T	G	C	T	T	C	T	G	T	G	G	V
13	Sh 25,26 (R) ^f	A(Ile)/ G (Val)	T	G	G	-	-	-	C	T	G	T/C	G(Gly)/C(Ala)	G	VI

a: Posición de nucleótidos, el número se refiere a la secuencia del dominio CT de ACC_{Casea} (1663 bp). **b:** Posición de aminoácidos derivada del gen ACC de *A. myosuroides* (AJ10767). **c, d y e:** Secuencias de referencia (*S. bicolor* XM002446133.1; *S. halepense* KF885933 y *S. halepense* KF885934). **Sh:** clones secuenciados de plantas sensibles y resistentes de *S. halepense*. **Texto en negrita,** SNP no sinónimos. **Rosa:** mutaciones previamente reportadas que confieren resistencia. **Verde:** sustitución encontrada en este trabajo de tesis. **f:** estas secuencias no provienen de clones sino de productos de PCR. (-) no determinado

4.2.4. BÚSQUEDA DE INDIVIDUOS PORTADORES DE LAS SUSTITUCIONES I2041N Y IXXXXT

Con el objetivo de evaluar la contribución a la resistencia que proporcionan las mutaciones 2041 y XXXX encontradas, se requiere de la obtención de clones vegetativos de individuos seleccionados de la subpoblación resistente (GC-R), cada uno portador de una sustitución de interés en particular.

Para confirmar la presencia de dichas sustituciones en cada individuo, se emplearon las técnicas moleculares de ASPCR (Sección 3.12) y CAPS (Sección 3.13) como métodos rápidos, de exploración masiva, y más simples que la secuenciación.

Este tipo de marcadores cuando se utilizan en especies diploides son codominantes, es decir, es posible detectar los 3 genotipos: RR (homocigota mutante resistente); RS (heterocigota resistente) y SS (homocigota salvaje susceptible). En el caso de especies poliploides, estos marcadores se comportan como dominantes, pudiendo detectar solo los SS o los heterocigotas homeólogos (sin posibilidad de distinguir entre homocigotas y heterocigotas alélicos). La razón más probable de obtener siempre bandas salvajes, es la amplificación de más de un gen ACC homeólogo con los oligocebadores usados en el ensayo, llamada “heterocigosidad homeóloga”. Los heterocigotas homeólogos pueden ser o no heterocigotas alélicos, sin embargo, con estos marcadores o mediante secuenciación no es posible diferenciarlos (Yu et al., 2013a).

Por otro lado, es importante aclarar que la sustitución G2096A no fue encontrada en las primeras instancias explorativas de secuenciación, a partir de ADN genómico de la subpoblación GC-R. Esto puede deberse al nivel de poliploidía de la especie en estudio y/o a una menor proporción de esta mutación en la subpoblación resistente, y el concomitante efecto de dilución de los alelos resistentes. Es por esto que no se diseñaron técnicas de detección rápida para esta sustitución.

4.2.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ASPCR

Sustitución I2041N:

Para determinar las condiciones de amplificación selectiva de los alelos mutantes y salvajes (wild-type, wt) utilizando ADN genómico de plantas individuales de ambas subpoblaciones, se ajustaron la temperatura de hibridación, la concentración de magnesio

(MgCl₂) y de oligocebadores, utilizando como molde las correspondientes secuencias clonadas en el vector pGEMT Easy. En relación a la temperatura de hibridación, se realizó un análisis de gradiente térmico en un rango de 62-68°C, utilizando oligocebadores específicos para la banda salvaje sensible (0,2 µM) (Figura 11A). Se obtuvieron resultados selectivos para cada una de las bandas (mutante resistente y wt susceptible) cuando la temperatura de hibridación de los oligocebadores se llevó a 72°C en una reacción de PCR en dos etapas (desnaturalización y hibridación/síntesis), como se muestra en la Figura 11B.

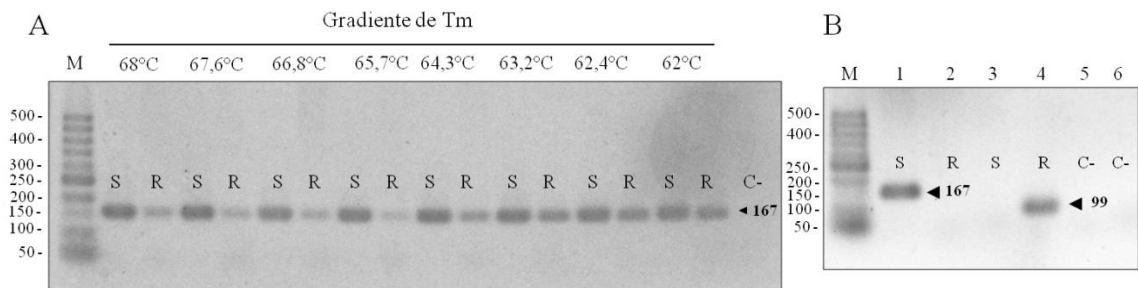


FIGURA 11. Determinación de la temperatura de hibridación selectiva para ASPCR (I2041N). Electroforesis en gel de agarosa 2% (P/V) teñido con bromuro de etidio. A) Análisis por ASPCR de clones sensibles (S) y resistentes (R), utilizando los oligocebadores específicos para la banda wt susceptible ACCR1-1 /ACCR1-2. B) Análisis por ASPCR de clones sensibles (S) y resistentes (R), utilizando los oligocebadores específicos para la banda wt susceptible (ACCR1-1/ ACCR1-2) en las calles 1 y 2 y los específicos para la banda mutante resistente (ACCR1-3/ ACCR1-4) en las calles 3 y 4. C-: control negativo (sin molde). M: Marcador de tamaño molecular (Cincuenta Marker-Biodynamics).

Una vez optimizadas las condiciones para los oligocebadores específicos por separado, se agregó a la reacción de amplificación el tercer cebador correspondiente en cada caso (a una concentración final de 0,2 µM) para obtener siempre la banda de control interno y así evitar falsos negativos (Figura 12A). Al mismo tiempo, se determinaron las concentraciones óptimas de magnesio, un cofactor esencial para el correcto funcionamiento de la Taq polimerasa, utilizando un rango de concentraciones de 1,5 - 3 mM (Figura 12B). En ambos casos se obtuvo como único producto de amplificación la banda de control interno, mostrando que existe competencia cuando se combinan tres oligocebadores. Por otra parte, se observó que se obtiene producto sólo a concentraciones mayores de 2 mM de MgCl₂.

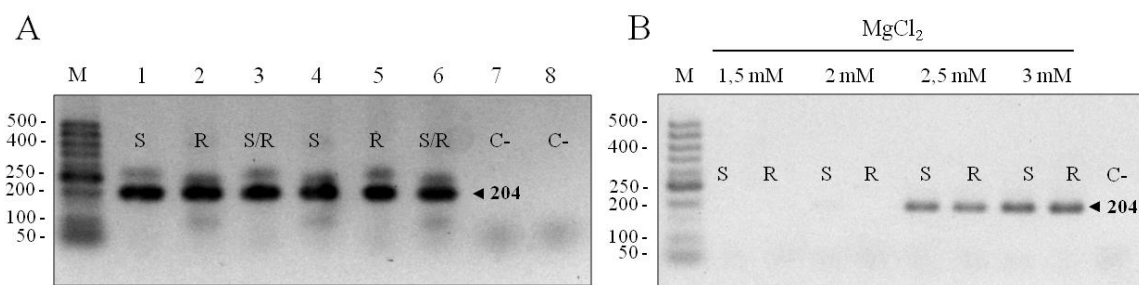


Figura 12. Determinación de condiciones óptimas para ASPCR multiplex (I2041N). Electroforesis en gel de agarosa 2% (P/V) teñido con bromuro de etidio. A) Efecto de la combinación de tres oligocebadores. ASPCR de clones sensibles (S), resistentes (R) y mezcla artificial de ambos moldes (S/R), utilizando la combinación de los oligocebadores *ACCRI-1*, *ACCRI-2* y *ACCRI-3* (calles 1, 2 y 3) y la combinación de los oligocebadores *ACCRI-2*, *ACCRI-3* y *ACCRI-4* (calles 4, 5 y 6). B) Efectos de las distintas concentraciones de MgCl₂. ASPCR de clones sensibles (S) y resistentes (R) utilizando la combinación de los oligocebadores *ACCRI-1*, *ACCRI-2* y *ACCRI-3*. C-: Controles negativos. M: Marcador de tamaño molecular (Cincuenta Marker- Biodynamics).

Por último, para eliminar la competencia, se probaron distintas relaciones de oligocebadores, obteniéndose resultados óptimos con 0,2 μ M de oligocebadores específicos y una concentración limitante de 0,04 μ M del tercer cebador común. Así, estas condiciones fueron las empleadas para el screening de las plantas de la población GC-R.

Sustitución IXXXXT

De igual modo a la sustitución I2041N, primero se optimizaron las condiciones selectivas de los oligocebadores específicos por separado. Para esto, se probaron dos concentraciones de MgCl₂ (2,5 y 3 mM) para la amplificación selectiva, utilizando como molde las secuencias correspondientes clonadas, los oligocebadores específicos para las bandas wt (susceptible) y mutante (resistente) en una concentración 0,2 μ M y una reacción de PCR en dos etapas (desnaturalización y hibridación/síntesis) con la temperatura de hibridación de los oligocebadores de 72°C. Así, cuando se utilizó una concentración de 3 mM de MgCl₂, se obtuvieron condiciones más selectivas y mayor rendimiento para cada uno de las bandas, como se muestra en la Figura 13.

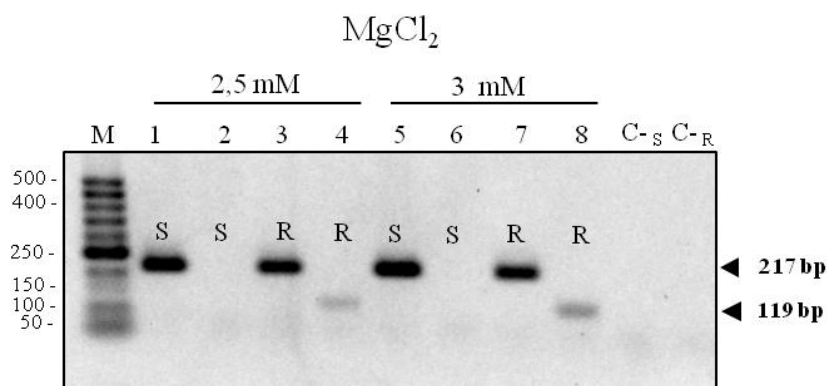


FIGURA 13. Determinación de las condiciones de amplificación selectiva para ASPCR (IXXXXT). Electroforesis en gel de agarosa 2% (P/V) teñido con bromuro de etidio. Análisis por ASPCR de clones sensibles (S) y resistentes (R), utilizando los oligocebadores específicos para banda wt sensible (ACCR2-5 /ACCR2-6) en las calles 1, 3, 5 y 7; y para la banda mutante resistente (ACCR2-7/ ACCR2- 8) en las calles 2, 4, 6 y 8, con dos concentraciones de MgCl₂. C-: control negativo. M: Marcador de tamaño molecular (Cincuenta Marker- Biodynamics).

Luego se agregó a la reacción de amplificación el tercer cebador correspondiente en cada caso y para eliminar la competencia se probaron distintas relaciones de oligocebadores. De este modo, se obtuvieron resultados óptimos con 0,2 μM de oligocebadores específicos y una concentración limitante de 0,02 μM del tercer cebador común.

4.2.4.2. GENOTIPADO DE LAS MUTACIONES EN LOS INDIVIDUOS SELECCIONADOS DE LA SUBPOBLACIÓN GC-R

Una vez optimizados los métodos de genotipado por ASPCR, cada uno de los 12 individuos seleccionados a dosis 1X del herbicida fueron sometidos a evaluación para la búsqueda de las sustituciones I2041N e IXXXXT. Al mismo tiempo, se utilizó CAPS para confirmar la presencia de la mutación 2041. Esta segunda metodología aporta un paso más de control que les otorga mayor confiabilidad a los resultados. En las Figuras 14 y 15 se muestran los análisis realizados en algunos de los individuos seleccionados.

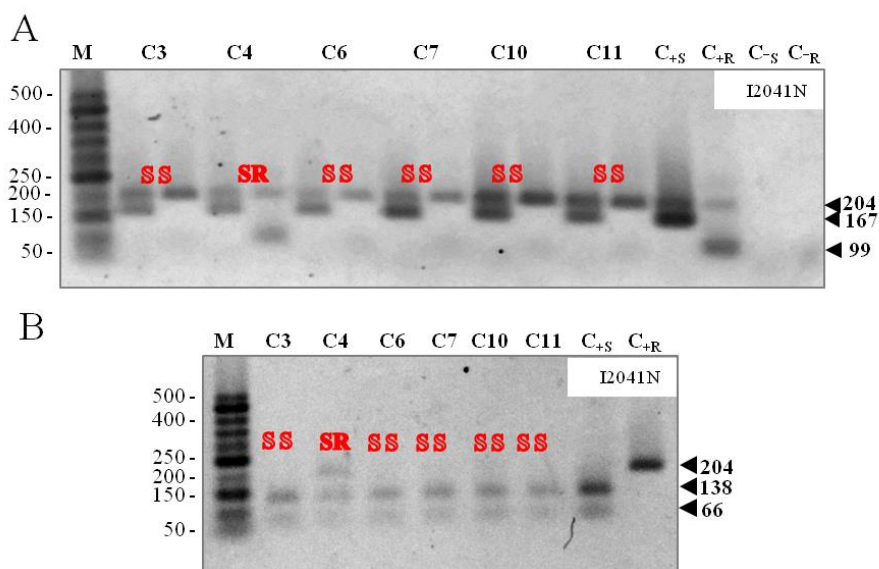


FIGURA 14. Análisis de los individuos seleccionados resistentes (GC-C3, C4, C6, C7, C10 y C11) para I2041N. A) ASPCR, utilizando los oligocebadores ACCR1-1, ACCR1-2 y ACCR1-3 en las calles de la izquierda y los oligocebadores ACCR1-2, ACCR1-3 y ACCR1-4 en las calles de la derecha, en cada caso. C+ y C-: controles positivos y negativos para las bandas wt sensibles y mutantes resistentes, respectivamente. B) CAPS. (SS) homocigota sensible, (SR) heterocigota resistente. M: marcador de tamaño molecular en pares de bases (Cincuenta Marker, Biodynamics).

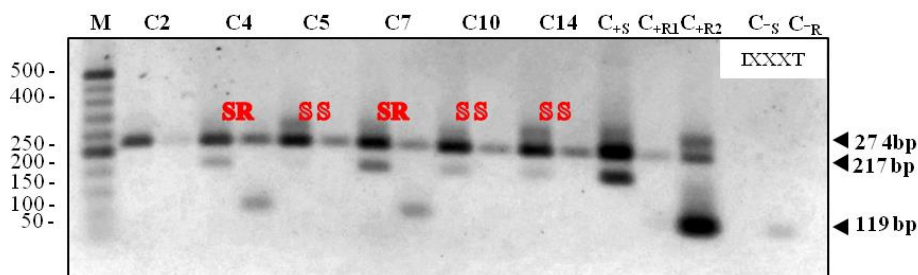


FIGURA 15. Análisis de los individuos seleccionados resistentes (C2, C4, C5, C7, C10 y C14) para IXXXXT. A) ASPCR, utilizando los oligocebadores ACCR2-5, ACCR2-6 y ACCR2-7 en las calles de la izquierda y los oligocebadores ACCR2-6, ACCR2-7 y ACCR2-8 en las calles de la derecha, para cada clon. C+ y C-: controles positivos y negativos para las bandas wt sensibles y mutantes resistentes, respectivamente (SS) homocigota sensible, (SR) heterocigota resistente. M: marcador de tamaño molecular en pares de bases (Cincuenta Marker, Biodynamics).

El análisis de los individuos mediante las técnicas de ASPCR y CAPS permitió identificar al clon vegetativo GC-C4 como portador en heterocigosis de la sustitución I2041N previamente reportada en *S. halepense*, con resistencia confirmada a herbicidas del grupo A. Del mismo modo, se identificaron los clones GC-C4 y GC-C7 como portadores en heterocigosis de la sustitución IXXXXT. En ambos casos, como se explicó anteriormente,

con la metodología utilizada no es posible diferenciar si la heterocigosis homeóloga se presenta a nivel del alelo o solo del gen homeólogo.

Una vez evaluados los 12 individuos seleccionados (mediante la detección descripta) se seleccionaron tres para continuar su caracterización. El clon GC-C4, portador de ambas sustituciones; el clon GC-C7, portador de IXXXX; y el clon GC-C6, que no posee ninguno de los alelos anteriores.

Por otra parte, en los tres clones seleccionados se secuenciaron las dos regiones conservadas que contienen las mutaciones reportadas hasta el momento para la ACCasa con el fin de descartar la presencia de otras sustituciones. Así fue encontrada la sustitución G2096A en los clones GC-C6 y GC-C7. Cabe señalar que esta secuenciación permitió confirmar que las mutaciones halladas en cada clon vegetativo se encontraban en diferentes alelos, tal como se había observado en los estudios exploratorios iniciales (isoformas IV, V y VI).

En la Tabla 16 se resumen las sustituciones encontradas en los tres individuos seleccionados de la subpoblación resistente GC-R.

TABLA 16. Diferencias de aminoácidos encontradas en el marco de lectura abierto del dominio CT de ACCasa de los individuos seleccionados de la subpoblación GC-R resistente en comparación con la secuencia sensible.

Individuos seleccionados	Sustitución de aminoácidos	Isoforma	Alelo
GC-C4	I2041N	IV	R1
	IXXXXT	V	R2
GC-C6	G2096A	VI	R3
GC-C7	G2096A	VI	R3
	IXXXXT	V	R2

Las sustituciones reportadas anteriormente están en negrita. Los aminoácidos están numerados según la secuencia de ACCasa de *Alopecurus myosuroides*. Los denominados alelos R1, R2 y R3 corresponden a los haplotipos 10, 12 y 13, respectivamente (Tabla 15).

4.2.5. EXPERIMENTOS DE DOSIS RESPUESTA CON LOS CLONES VEGETATIVOS DE LOS INDIVIDUOS SELECCIONADOS

Con el objetivo de cuantificar la resistencia de los individuos seleccionados mediante los ensayos moleculares (GC-C4, C6, C7), se realizaron ensayos *in vivo* de dosis respuesta con haloxifop-p-metil (Sección 3.2). En este caso, la dosis más alta utilizada fue de 32 veces la

recomendada a campo y se empleó como referencia un clon vegetativo obtenido al azar de la población Zav-S (Zav-S1).

Las curvas de dosis-respuesta de los clones resistentes mostraron que tanto la biomasa seca como la tasa de supervivencia son significativamente mayores que para el individuo Zav-S1 cuando las plantas fueron expuestas a dosis crecientes de herbicida. El porcentaje de supervivencia (respecto del control no tratado) a la dosis de campo de los tres clones resistentes fue del 100%, mientras que se alcanzó un control del 91,5 % en el clon sensible (Figura 16).

En la tabla 17 se muestran los parámetros obtenidos a partir de los ajustes de las curvas al modelo de regresión no lineal como se describió en sección 3.2. El GR_{50} del clon sensible fue de 3 g ia ha⁻¹, resultando en un valor bastante inferior al obtenido para la subpoblación Zav-S original (47 g ia ha⁻¹). Por el contrario, para reducir el 50% de la biomasa seca de GC-C6 se necesitaron 16 veces la dosis de campo ($GR_{50}= 716$ g ia ha⁻¹). En el caso de los individuos GC-C4 y C7 la dosis máxima testada (2074 g ia ha⁻¹) no fue suficiente para reducir al 50 % la biomasa remanente.

De manera semejante, de acuerdo a la tasa de supervivencia, los individuos GC-C6, GC-C7 y GC-C4 mostraron ser 222, 182 y >370 veces más resistentes que el susceptible Zav-S1, respectivamente, indicando altos niveles de resistencia a haloxifop en los tres clones evaluados. Sin embargo, es importante resaltar que Zav-S1 fue marcadamente susceptible a haloxifop, produciendo así altos FR que podrían estar sobrestimando los niveles de resistencia. Por esto, se compararon también los GR_{50} y LD_{50} de los individuos resistentes con los de la subpoblación sensible (Zav-S) (Tabla 17).

Por comparación de los parámetros de supervivencia entre los clones GC-C6 y GC-C7, no parece haber una contribución significativa de la mutación novedosa IXXXXT a la resistencia a haloxifop-p-metil. Sin embargo, a nivel de biomasa remanente es notable la diferencia observada a favor del clon que la contiene (GC-C7). No obstante, no pueden descartarse mecanismos *NTSR* que estén operando diferencialmente entre ambos clones.

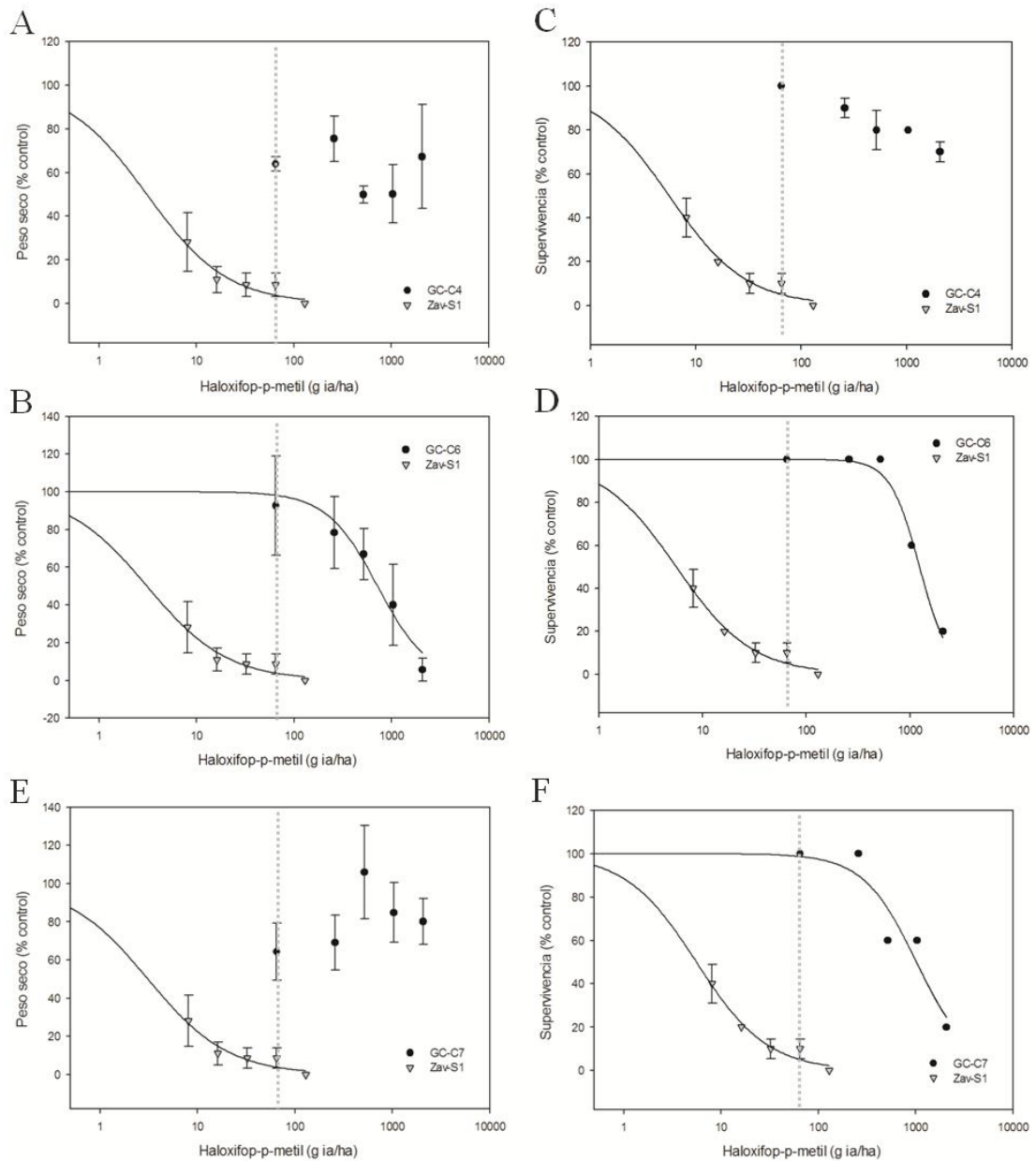


FIGURA 16. Curvas dosis respuesta *in vivo* de individuos seleccionados de *Sorghum halepense* con haloxifop-p-metil. Los resultados se expresan como % peso seco (A-C) y supervivencia (D-F) relativo a los controles no tratados. Los símbolos indican los valores medios y las líneas los valores predictivos para cada población. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media. La línea de puntos indica la dosis de campo recomendada. En algunos casos (A, C y E) 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.

TABLA 17. Parámetros obtenidos de las curvas dosis-respuesta de los clones vegetativos de los individuos seleccionados. Los valores de GR₅₀ y LD₅₀ están expresados en g ia ha⁻¹ y en el caso de los individuos GC-C4 y Zav-S1 son el promedio de dos experimentos independientes. Los factores de resistencia (FR) se calcularon utilizando las concentraciones de herbicidas requeridas para reducir el peso seco (GR₅₀) o la supervivencia (LD₅₀) en un 50%, utilizando como referencia el individuo Zav-S1. Los factores de resistencia (FR*) fueron calculados utilizando la subpoblación original susceptible (Zav-S). Las letras en el superíndice indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,001) después de la comparación de a pares de los GR₅₀ usando *t-test* y de los LD₅₀ usando el test paramétrico de comparaciones múltiples unifactorial *One Way ANOVA* (software Sigmaplot).

Individuos seleccionados	<i>Peso seco</i>				<i>Supervivencia</i>			
	GR ₅₀	FR	FR*	R ²	LD ₅₀	FR	FR*	R ²
Zav -S1	3 (1) ^a			0,9938	5,6 (0,8) ^a			0,9949
GC- C4	> 2074	> 691	>44		> 2074	> 370	>21	
GC-C6	716 (78) ^b	239	15	0,9706	1241 (57) ^b	222	13	0,9889
GC-C7	> 2074	> 691	>44		1021 (183) ^b	182	10	0,9155
Zav - S	47(11)			0,9101	97 (32)			0,9476

Al analizar los parámetros de resistencia reportados para la especie en estudio frente a diferentes herbicidas inhibidores FOP se observa un amplio rango de datos, con valores de GR₅₀ que van desde unas pocas decenas hasta más de dos mil gramos de ingrediente activo por hectárea (Bradley y Hagood, 2001; Kaloumenos y Eleftherohorinos, 2009; Scarabel et al., 2014). Más aún, esta gran variabilidad es observada incluso entre poblaciones con el mismo mecanismo TSR (I2041N) identificado y frente al mismo principio activo (Scarabel et al., 2014). Concretamente, los valores de GR₅₀ para haloxifop-p-metil de dichas poblaciones van desde 31 a 913 g ia ha⁻¹, mientras que los LD₅₀ oscilan entre 479 y 750 g ia ha⁻¹. Comparativamente, los resultados obtenidos en esta tesis estarían mostrando niveles mayores de resistencia a haloxifop-p-metil en la población en estudio. Esta apreciación es válida para cada uno de los clones, pero en particular para el clon GC-C4 (portador de la misma sustitución I2041N). Esta superioridad en los niveles de resistencia (a un mismo principio activo) del clon GC-C4 versus poblaciones de la misma especie, con la misma sustitución, podría explicarse de diferentes maneras: i) por la contribución de otro mecanismo a la resistencia, presente en la población GC-R; ii) por el hecho de que las curvas del estudio de referencia fueron realizadas a partir de semillas y no de rizomas (con la consecuente mayor susceptibilidad frente al herbicida); iii) porque los estudios de referencia no fueron realizados en poblaciones purificadas

(con el consecuente posible efecto de dilución con individuos susceptibles). En resumen, dado que no existen otros antecedentes en *S. halepense* que permitan una comparación válida con nuestros resultados, no es posible arriesgar mayores conclusiones hasta el momento.

4.2.6. EFECTOS DE INHIBIDORES DEL CITOCROMO P450 SOBRE EL TRATAMIENTO CON HALOXIFOP-P-METIL A DOSIS ÚNICA

Para evaluar la posible contribución de una resistencia metabólica mediada por el citocromo P450 se realizaron experimentos con inhibidores del mismo. Tanto el butóxido de piperonilo (PBO) como el 1-aminobenzotriazol (ABT) fueron reportados previamente en la literatura como compuestos químicos inhibidores del sistema citocromo P450 en gramíneas (Chen et al, 2018, Zhang et al., 2017). Además, mas específicamente, en una población de *A. myosuroides* ambos inhibidores (PBO y ABT) tuvieron efecto sinérgico con el haloxifop, sugiriendo la participación del Cit P450 en la metabolización de este principio activo (Letouzé y Gazquez, 2003). Para ver más detalles de los trabajos mencionados ver tabla 12.

Las plantas sensibles (Zav-S) y resistentes (GC-R) se crecieron como se describió en la sección 3.3. En la gráfica de la figura 17.B se muestran los resultados del porcentaje de biomasa seca respecto del control no tratado para los distintos tratamientos. En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos: control, con aplicación de herbicida y con el inhibidor más el herbicida. Además, no se observaron efectos fitotóxicos por los inhibidores PBO o ABT a las concentraciones estudiadas, tanto en la subpoblación sensible como resistente.

Estos resultados podrían indicar ausencia de resistencia metabólica a la dosis de campo o también que los inhibidores, o bien la cantidad utilizada de los mismos, no son los adecuados para inhibir al sistema citocromo P450 que participa en la resistencia metabólica. Más estudios deberían ser realizados para confirmar la ausencia de *NTSR*; por ejemplo, evaluando diferencias en un rango amplio de dosis del herbicida.

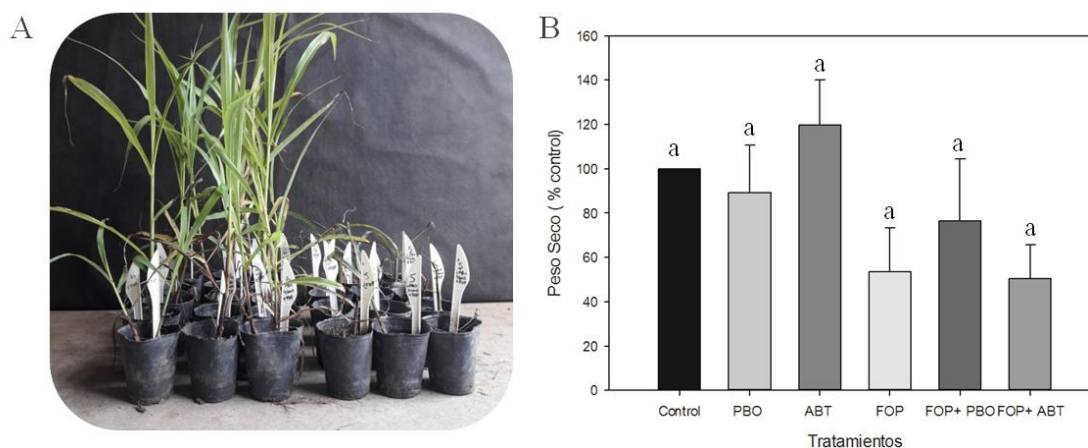


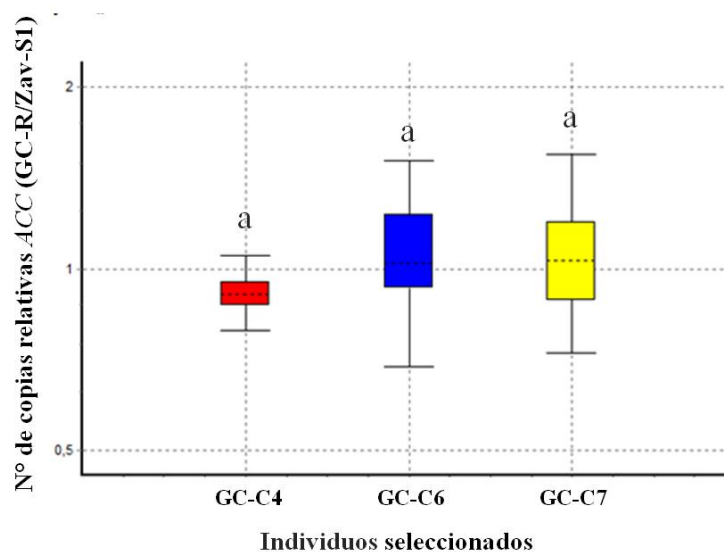
FIGURA 17. Efecto sobre la biomasa del tratamiento con inhibidores del P450 en plantas de la subpoblación Zav-S y GC-R. A) En la foto se muestran plantas resistentes sobrevivientes (izquierda) y plantas sensibles muertas (derecha) tratadas con FOP y FOP + PBO. B) Gráfica que muestra la biomasa seca de las plantas resistentes respecto del control no tratado para los tratamientos realizados. Las barras representan el error estándar y letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas.

4.2.7. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN *ACC* EN INDIVIDUOS SELECCIONADOS

La eventual amplificación del gen *ACC* en la subpoblación bajo investigación se estudió a través de qPCR, como se describió en la Sección 3.14. En principio se testearon dos genes de referencia previamente evaluados en gramíneas: el gen de ubiquitina (*UBQ*, JN599096) (Petit et al., 2012) y el gen de actina (*actina*, XM002456645.2) (Laforest et al., 2017).

Los análisis de un gen por PCR en tiempo real mediante el método $(E+1)^{-\Delta\Delta C_t}$ suponen que la eficiencia de amplificación del gen de interés y el gen normalizador son iguales (Livak y Schmittgen, 2001). Por esto, se decidió utilizar el gen de *UBQ* como normalizador de los valores de C_t , debido a que se obtuvieron valores de eficiencias de amplificación comparables a los del gen de *ACC*.

Como se puede observar en la Figura 18, los individuos seleccionados resistentes (GC-C4, C6 y C7) no mostraron aumento del número de copias en el gen *ACC* respecto al individuo sensible (Zav-S1). Estos resultados descartan un mecanismo de resistencia debido a la amplificación génica.



Individuos	Nº copias relativas	Error Std.	IC (95%)	P(H1)
Zav-S1	1,000			
GC-C4	0,910	0,811 - 0,985	0,791 - 1,039	0,154
GC-C6	1,054	0,861 - 1,336	0,718 - 1,485	0,625
GC-C7	1,048	0,853 - 1,290	0,747 - 1,499	0,620

FIGURA 18. Número de copias relativas del gen ACC en individuos seleccionados. Los resultados fueron normalizados al gen de referencia UBQ y se expresaron en relación al número de copias de Zav-S1. Las barras representan el error estándar y letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas.

4.2.8. EVALUACIÓN DE LA POSIBLE CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE RESISTENCIA Y LA PROPORCIÓN ALÉLICA DEL ALELO R1: ¿EXISTE EFECTO DE DILUCIÓN?

Con el objetivo de evaluar si existe una correlación entre el número de alelos resistentes R1 (I2041N) y el nivel de resistencia observado en las plantas que los portan se comenzó con la identificación del material de estudio: individuos homocigotas y heterocigotas para el alelo R1 obtenidos a partir de la progenie de clon GC-C4 (bajo el supuesto de que dicho individuo era heterocigota alélico y que por autofecundación se podían segregar los individuos homocigotas alélicos). Para ello, se utilizó el marcador CAPS descrito en la sección 3.13.

Analizando los resultados por CAPS en las plántulas obtenidas a partir de la progenie del clon GC-C4 (Sección 3.15), se pudo confirmar que el parental GC-C4 era efectivamente heterocigota alélico debido a que se obtuvieron tanto individuos sensibles como heterocigotas

(si hubiera sido heterocigota homeólogo con homocigosis alélica, no se hubieran detectado individuos sensibles en la progenie) (Figura 19).

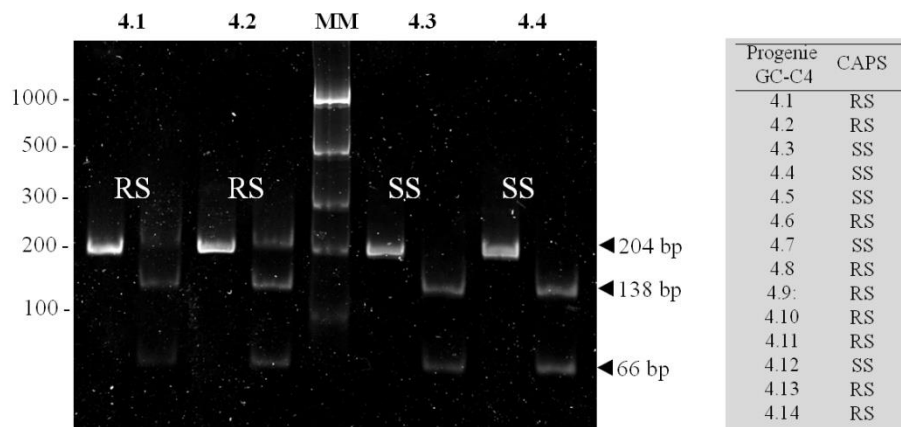


FIGURA 19. Análisis por marcadores CAPS de las plantas de la progenie derivadas del parental GC-C4 para la mutación 2041. Gel de poliacrilamida 6% (P/V) revelado con Sybr safe. En el gel se observan los resultados obtenidos a partir de cuatro muestras. En la tabla se resumen los genotipos encontrados en la progenie.

Posteriormente, las plantas de la progenie que resultaron heterocigotas homeólogas se evaluaron por ASqPCR para encontrar las homocigotas alélicas y así finalmente poder evaluar los fenotipos de resistencia comparativamente.

Para ello, se incluyeron como controles: ADN del individuo parental GC-C4, del clon sensible (Zav-S1) y de plantas de la progenie que fueron confirmadas sensibles mediante CAPS. Los resultados obtenidos por cuantificación absoluta (Sección 3.16) se expresaron como el número de copias del alelo R1 en relación al número total de haplotipos amplificados por los oligocebadores control. Consistentemente, en la progenie se encontraron plantas con igual valor (ratio) que el progenitor (progenie 4.2, heterocigota alélica), otras con el ratio duplicado (progenie 4.1, homocigota alélica) y plantas sensibles, con detección prácticamente nula del alelo R1 (progenie 4.3) (Figura 20).

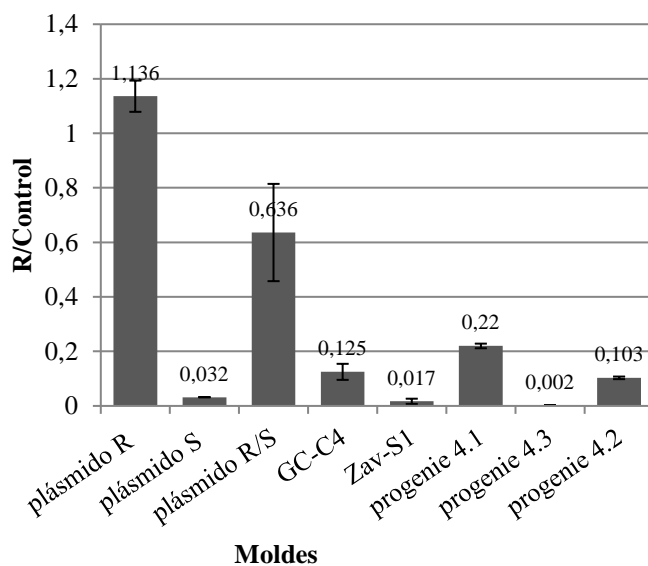


FIGURA 20. Cuantificación de alelos R1 en la progenie del clon GC-C4 mediante ASqPCR. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

El siguiente objetivo es evaluar los niveles de resistencia en las plantas seleccionadas de la progenie (homocigotas y heterocigotas alélicas) con los fines de establecer si existe un efecto de dilución mayor en las plantas heterocigotas versus las primeras, dado que teóricamente la proporción del alelo R1 cambiaría como mínimo de 1/3 a 1/6, bajo el supuesto de tres genes de la ACCasa plastídica en *S. halepense* (ver introducción). Este ensayo se encuentra aún en desarrollo, por lo que no se muestran resultados en esta instancia escrita de la tesis.

4.3. CONCLUSIONES

Como se planteó en la introducción del capítulo, la resistencia a herbicidas inhibidores de ACCasa parece ser una característica compleja gobernada por 16 sustituciones distintas sobre el dominio CT y un cierto número desconocido de genes implicados en la *NTSR*. Por esto, las poblaciones no pueden ser tratadas como entidades homogéneas, debido a que contienen individuos que pueden ser resistentes a un dado herbicida por diferentes mecanismos, mostrando patrones de resistencia cruzada y FR heterogéneos. Además, la mayoría de las poblaciones resistentes contienen individuos sensibles que diluyen el fenotipo de resistencia. Todo esto explica en gran medida las diferencias encontradas entre la resistencia evaluada a nivel de la subpoblación versus los individuos seleccionados a partir de la misma.

La subpoblación Zav-S fue usada como control “sensible” debido que fue aislada de campos nunca antes tratados con herbicidas. Sin embargo, presentó resistencia agronómica (100% supervivencia a la dosis de campo) y debido a que en los análisis de secuencias no se encontró ninguna de las mutaciones que confieren resistencia, es altamente probable que algún mecanismo de *NTSR* esté operando. En cambio, el clon Zav-S1 seleccionado de esta subpoblación resultó hipersensible a haloxifop-p-metil, demostrando la cautela que debe tenerse al comparar los FR de diferentes estudios sin mayores consideraciones.

El análisis de secuencias del dominio CT dentro de la población GC-R arrojó la presencia de dos sustituciones que explican por sí solas el patrón de inhibición de dicha población: las sustituciones I2041N y G2096A, ambas conocidas por otorgar resistencia a los inhibidores FOP y modificar poco o nada la respuesta a los DIM (Délye et. al, 2003, 2005b, 2008; Hochberg et al., 2009; Scarabel et. al, 2014). Paralelamente, se observó una nueva mutación denominada IXXXXT, lo que resulta interesante dado que podría contribuir a la resistencia bajo estudio.

Los experimentos de dosis respuesta de los individuos seleccionados GC-C4, GC-C6 y GC-C7 confirmaron la resistencia a haloxifop-p-metil y justifican los valores de GR_{50} y LD_{50} de la subpoblación original hallada en campos de Gobernador Crespo. Esto es, las curvas de dosis-respuesta de los tres clones resistentes mostraron que tanto la biomasa seca como la tasa de supervivencia son significativamente mayores que para el individuo Zav-S1 (Tabla 17). Los valores de GR_{50} y LD_{50} del individuo GC-C4 (portador de la sustitución I2041N y la sustitución novedosa) fueron mayores a los del individuo GC-C6 (portador de G2096A). Estos resultados

son consistentes con los ensayos inhibitorios de ACCasa resistentes reportados en *A. myosuroides* (Délye et al., 2003; 2005b), que mostraron valores de I_{50} (concentración de herbicida que reduce el 50% de la actividad enzimática) para la sustitución I2041N (209,6 μM) mayores a los de la sustitución G2096A (22,2 μM). De todos modos, hay que ser cautelosos con esta comparación debido a que la resistencia a nivel enzima no siempre se relaciona con la resistencia a nivel planta.

Curiosamente, los GR_{50} y LD_{50} para la sustitución I2041N en *S. halepense* (Scarabel et al., 2014) y para G2096A en *Hordeum glaucum* y *leponirum* (Lovret et al., 2015) reportados previamente fueron menores a los encontrados en este trabajo, dando indicios de que podría existir alguna contribución de *NTSR* en la población bajo estudio. No obstante, en los mencionados trabajos no se emplearon poblaciones purificadas y las condiciones experimentales no fueron idénticas a las utilizadas en esta tesis.

Desde el punto de vista de la supervivencia, el GC-C4 (I2041N + IXXXXT) resultó en el mayor valor de LD_{50} (>32 x), mientras que GC-C6 (G2096A) y GC-C7 (G2096A + IXXXXT) no mostraron diferencias significativas en los valores de LD_{50} . Sin embargo, de acuerdo a la biomasa, GC-C7 fue menos afectado que GC-C6, con un GR_{50} >32 veces la dosis de campo. Estos resultados muestran que la sustitución IXXXXT podría brindar alguna ventaja en la tasa de crecimiento o recuperación de las plantas luego de la aplicación del herbicida. De todos modos, esta hipótesis debe ser confirmada con los estudios correspondientes.

Por otra parte, los resultados de los ensayos de qPCR mostraron la ausencia de un mecanismo de amplificación génica, en tanto que la evaluación de una posible resistencia metabólica no dio indicios de una contribución significativa de este mecanismo a la dosis de campo.

Finalmente, en este trabajo de tesis se optimizó la técnica de ASqPCR para identificar de manera rápida individuos homocigotas alélicos en una especie alotetraploide con múltiples copias del gen de interés. Próximamente serán evaluados los niveles de resistencia *in vivo* de los individuos seleccionados para corroborar si existe la correlación esperada con la proporción de alelos resistentes (posible efecto de dilución de la resistencia propuesto para especies poliploides y poco explorado a la fecha).

CAPÍTULO 2

CLONADO Y EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LAS DIFERENTES VERSIONES DEL DOMINIO CT DE ACCasa

5.1. INTRODUCCIÓN

Las medidas de actividad de la ACCasa a partir de extractos crudos permiten confirmar la presencia de una enzima insensible a los herbicidas utilizados en los ensayos inhibitorios en comparación con la versión sensible. Sin embargo, se necesita gran cantidad de enzima purificada (o extractos enriquecidos con suficiente cantidad de enzima) y un método de medición sensible, como la utilización de radiactivos ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$), debido a que se dosa actividad residual. Además, las versiones resistentes de la enzima se encuentran diluidas con las sensibles. Este efecto es particularmente significativo en especies poliploides, impidiendo la caracterización exclusiva de la enzima mutada de interés.

Por otro lado, la expresión heteróloga de un gen permite la síntesis de grandes cantidades de la proteína de interés. Para ello, el gen correspondiente debe clonarse en un vector de expresión. La composición básica de un vector de expresión típico consiste en un promotor fuerte e inducible, señales de iniciación de la traducción, secuencias que permiten su replicación autónoma en el organismo huésped, un marcador de selección y un sitio de múltiple clonado que posibilita la inserción del gen.

Los vectores del sistema pET (pET-28a ó pET32a) (ver Tabla 8) constituyen un poderoso sistema para el clonado y expresión de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* como huésped heterólogo. Este sistema hace uso de la ARN Polimerasa del bacteriófago T7, una enzima muy activa y procesiva que tiene una alta selectividad para iniciar la transcripción en secuencias promotoras del mismo organismo (Studier et al, 1990). El ADN ó ADNc de interés es inicialmente clonado usando una cepa de *E. coli* que no contiene el gen de la T7 ARN Polimerasa, eliminando así la inestabilidad del plásmido provocada por la producción de proteínas potencialmente tóxicas. Luego, es transferido a un huésped de

expresión que contiene una copia del gen de esta enzima bajo el control de un promotor inducible por IPTG o lactosa.

Las series pET-32 y pET-28 del sistema pET generan proteínas de fusión. La diferencia entre las series reside fundamentalmente en el tipo de proteína de fusión que generan. Así, el vector pET-32 posee una secuencia que codifica un dominio de la proteína tiorredoxina y una secuencia de hexahistidinas que aumentan la solubilidad y facilitan la purificación posterior de la proteína, respectivamente (Figura 21 A). La proteína expresada en el vector pET-32 contiene la secuencia extra en su región amino terminal. En cambio, en la serie pET-28, la proteína de fusión generada carece de la secuencia que codifica para la tiorredoxina, conteniendo sólo la secuencia de hexahistidinas (Figura 21.B). Otra diferencia entre estos vectores es el tipo de gen de selección.

La secuencia de hexahistidina codificada en estos vectores permite la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad mediante el uso de una matriz cargada con iones níquel. Así, la proteína recombinante puede ser recuperada casi a homogeneidad del extracto bacteriano en un único paso y en forma separada de las proteínas endógenas.

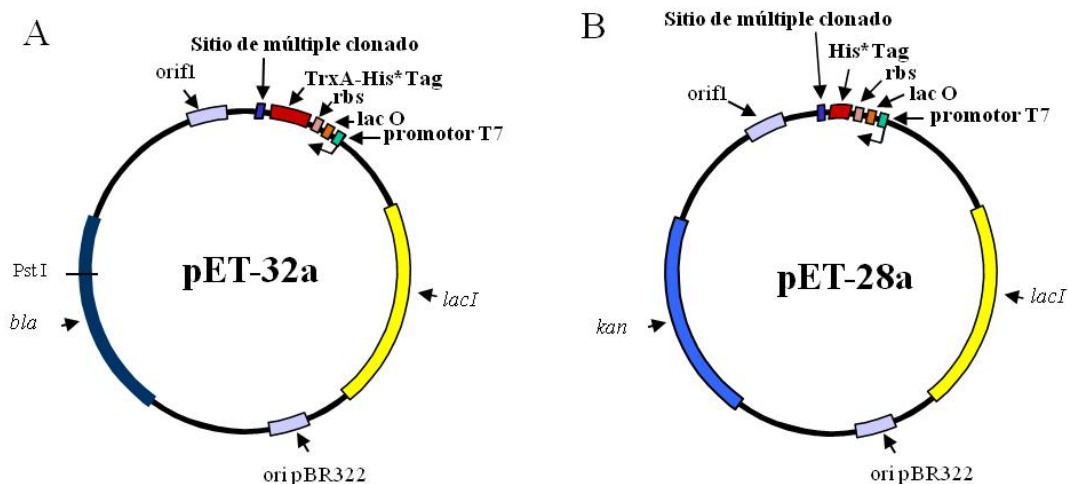


FIGURA 21. Esquema de los plásmidos de expresión del sistema pET. Se muestran las características relevantes de los plásmidos pET-32a (+) y pET-28a (+) utilizados en este trabajo. bla: gen de la enzima β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina. kan: gen de la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina. lacI: gen que codifica para el represor del operón lac. TrxA-His*tag: dominio de 109 aminoácidos de la proteína Tiorredoxina (TrxA) más secuencia de hexahistidinas (His*tag) que permite la purificación de afinidad de las proteínas de fusión. Estos vectores permiten expresar el gen de interés bajo el control de un promotor reconocido por la ARN Polimerasa del bacteriófago T7.

Esta tecnología del ADN proporciona suficientes cantidades de proteína para su caracterización funcional y estructural. Además, permite obtener las versiones mutantes recombinantes de manera aislada y de esta manera poder determinar sus parámetros cinéticos mediante ensayos inhibitorios. Así, la optimización de esta herramienta de análisis permite evaluar de manera rápida nuevos alelos candidatos a conferir resistencia.

Por todo lo expuesto, se decidió obtener las versiones halladas del dominio CT de la ACCasa de *S. halepense* de modo recombinante para su posterior caracterización mediante ensayos inhibitorios.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Clonar, expresar y purificar distintas versiones halladas del dominio carboxil transferasa (CT) de la enzima ACCasa de *S. halepense* en un sistema procariota para su posterior caracterización funcional, con énfasis en la identificación de nuevos alelos responsables de la resistencia.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1. CLONADO Y EXPRESIÓN RECOMBINANTE DEL DOMINIO CT DE LA ACCasa DE *Sorghum halepense*

Cabe recordar que las ACCasas homoméricas de plantas son proteínas diméricas, conformadas por monómeros de aproximadamente 2300 aminoácidos (>250 kDa cada monómero) siendo el ARN mensajero de 7000 pb. Estas características dificultan la expresión de la proteína completa en un sistema recombinante. Por otro lado, todas las mutaciones responsables de la resistencia target reportadas hasta el momento se encuentran en el dominio CT de la ACCasa. Por estas razones, se decidió clonar y expresar sólo la región que codifica este dominio para cumplir los objetivos planteados. Esto es posible gracias a que este dominio aislado presenta actividad enzimática carboxiltransferasa, lo que permite la caracterización *in vitro* de la acción de los inhibidores a evaluar.

Se seleccionaron las versiones CT derivadas de las isoformas I, VI y V halladas en el clon GC-C4 (ver capítulo 1), dado que las isoformas I y VI presentan características confirmadas de respuesta a haloxifop-p-metil, constituyendo excelentes controles para la evaluación de la sustitución novedosa portada por la isoforma V. Esto es, la isoforma I representa la versión salvaje, con alta sensibilidad a los herbicidas del grupo A; mientras que la isoforma VI representa una versión “resistente”, ya que contiene la sustitución I2041N, previamente caracterizada por su menor sensibilidad frente a la inhibición por haloxifop-p-metil (Délye et al., 2003).

Con este fin, se llevaron a cabo dos estrategias en el orden que son presentadas:

Estrategia 1: Expresión del dominio CT 1663 bp

Con el objetivo de expresar de modo recombinante un dominio que sea funcionalmente activo se realizó un análisis bioinformático del dominio de la proteína ACCasa utilizando la Plataforma de datos InterPro. Se usaron como secuencias de referencia la ACCasa de

Alopecurus myosuroides (CAC84161) y la putativa cloroplástica de *Sorghum bicolor* (XP_002446178.1), para definir precisamente los límites de este dominio y diseñar los oligocebadores específicos para amplificar un fragmento de 1663 bp (CT1663) (Tabla 2, Figura 5 de materiales y métodos).

La expresión de las versiones recombinantes CT1663 S1, S2, R1 y R2 en cada plásmido (ver Tabla 9, en materiales y métodos) se indujo por el agregado de 100 μ M de IPTG y se analizó mediante SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie, confirmándose la presencia de una banda diferencial del tamaño esperado para cada proteína de fusión en las células inducidas. Luego, se obtuvieron las fracciones proteicas solubles e insolubles y nuevamente fueron analizadas mediante electroforesis SDS- PAGE. La masa molecular estimada fue de 61 kDa para las proteínas expresadas del vector pET28a y 78 kDa para las del pET32a (Figura 22).

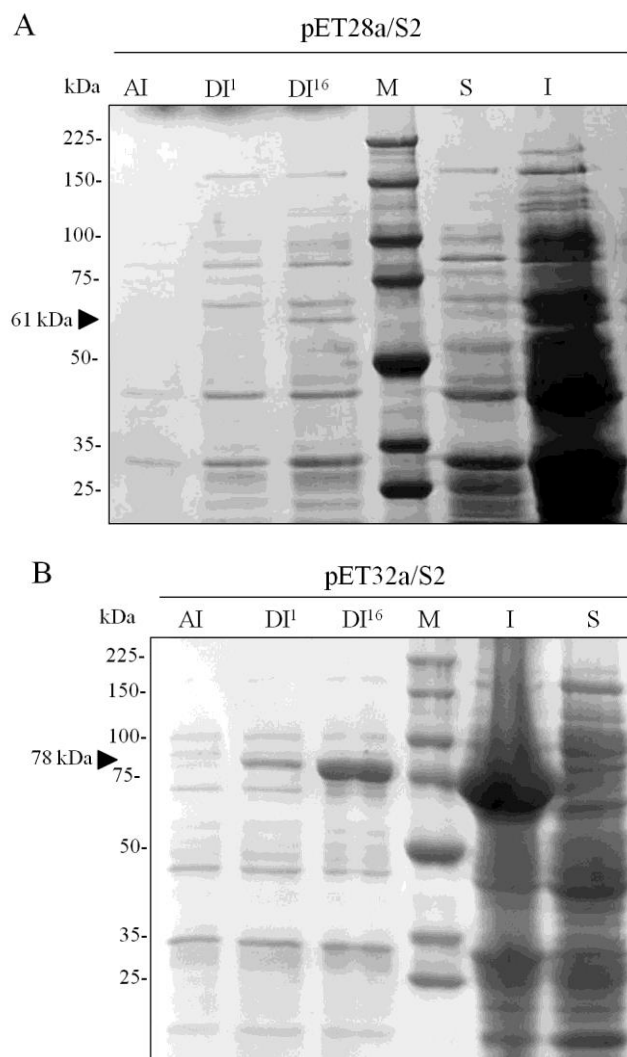


FIGURA 22. Chequeo de la inducción de la proteína recombinante CT1663S2. SDS-PAGE al 10% (p/v) de acrilamida teñido con azul de Coomassie. Expresión recombinante de S2 (CT1663) A) en pET28a y B) en pET32a. AI: antes de inducir; DI¹: 1h después de inducir, DI¹⁶ 16hs después de inducir. (S) Fracciones solubles, (I) Fracciones insolubles. Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína recombinante de interés: pET28/S2= 61 kDa; pET32/S2= 78 kDa.

Como puede apreciarse, la mayoría de la proteína recombinante se encontraba formando cuerpos de inclusión (fracción insoluble), aún en las fracciones obtenidas a partir del pET32a (favorece teóricamente el correcto plegamiento de los dominios proteicos). No obstante, se intentó purificarla a partir de las fracciones solubles, como se describió en la sección 3.25, no lográndose resultados favorables, ni siquiera luego del enriquecimiento de la carga de la columna cromatográfica (Figura 23). Por este motivo se probaron distintas

condiciones de inducción para optimizar la expresión de la proteína en forma soluble, como se describe a continuación.

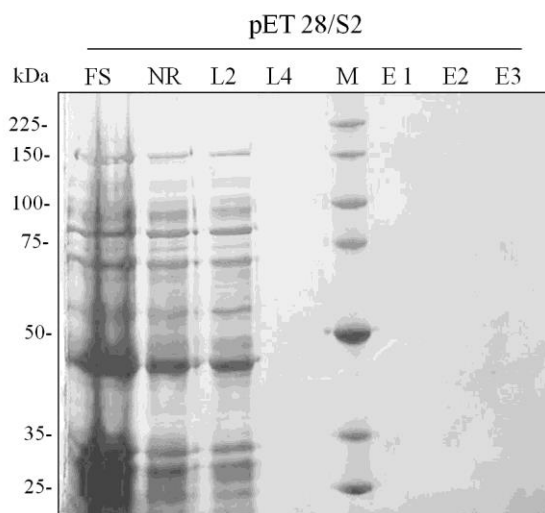


FIGURA 23. Chequeo de la purificación en columnas de níquel agarosa de la proteína recombinante CT1663S2 obtenida en pET28a. SDS-PAGE al 10% (p/v) de acrilamida teñido con azul de Coomassie. FS (fracción de siembra), NR (no retenida), L (lavados con imidazol 20 mM), E (eluciones con imidazol 50 mM). M: Marcador de masa molecular.

En primera instancia, se disminuyó la concentración del inductor para promover una menor velocidad de transcripción que derivara en una traducción y plegamiento gradual del polipéptido, aumentando su solubilidad. Así, se evaluó la inducción con 50 μM de IPTG, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con la concentración inicial de 100 μM (datos no mostrados). Luego se realizó la inducción con 1 μM de IPTG y en este caso, no se observó expresión en el pET28a mientras que en el pET32a la mayoría de la proteína se encontró nuevamente en la fracción insoluble (Figura 24).

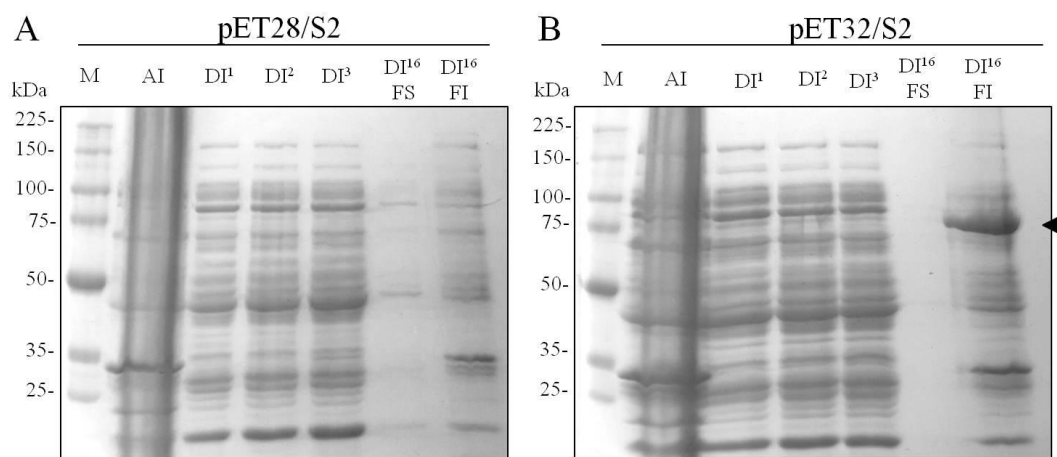


FIGURA 24. Chequeo de la inducción de la proteína recombinante CT1663S2 con 1 μ M de IPTG. SDS-PAGE al 10% (p/v) de acrilamida teñido con azul de Coomassie. Expresión recombinante de S2 (CT1663) en ambos plásmidos: **A)** pET28/S2 **B)** pET32/S2. AI: antes de inducir; DI¹/DI²/DI¹⁶: 1 hora, 2 horas y 16 horas después de inducir, respectivamente. FS (Fracciones solubles), FI (Fracciones insolubles). M: Marcador de masa molecular. Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína recombinante de interés observada de 78 kDa.

Es sabido que una menor temperatura de cultivo durante la inducción ralentiza el metabolismo bacteriano, permitiendo una expresión moderada de las proteínas recombinantes, lo que propicia su correcto plegamiento. Por ello, se realizó la inducción a 16°C con distintas condiciones de inductor: IPTG (100 μ M) y lactosa 1% (P/V). Paralelamente y con el mismo objetivo, se llevó a cabo un protocolo de autoinducción a 16°C y 30°C (sección 3.24) (Figura 25). Luego, se purificaron las proteínas a partir de las fracciones solubles obtenidas en las condiciones más exitosas (a 16°C, con IPTG 100 μ M y a 30°C, con autoinducción). Sin embargo, no se logró obtener la versión recombinante purificada debido a que, al igual que en los ensayos anteriores, la cantidad de proteína soluble resultó insuficiente para obtener un rendimiento apreciable en la purificación.

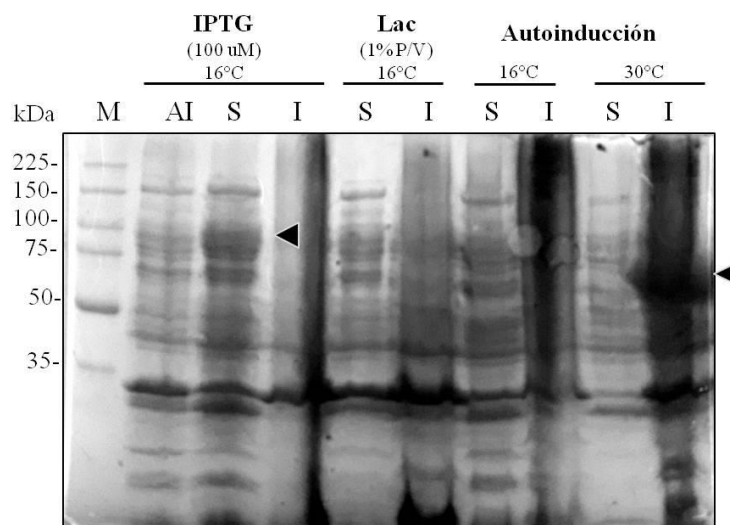


FIGURA 25. Chequeo de distintas condiciones de inducción de la proteína recombinante CT1663S2 obtenida en pET32a. Análisis por SDS-PAGE al 10% (p/v) de acrilamida teñido con azul de Coomassie. Fracciones solubles (S) e insolubles (I) en distintas condiciones de inducción. AI: antes de inducir (extractos proteicos totales de cultivos celulares). M: Marcador de masa molecular.

Cabe señalar que resultados similares se obtuvieron con las demás isoformas CT1663. Finalmente, debido a que en las condiciones ensayadas no se logró obtener suficiente cantidad de proteína recombinante en la fracción soluble a partir de la expresión del dominio CT1663, se decidió cambiar de estrategia.

Estrategia 2: Expresión del dominio CT 2358 bp

Se diseñaron oligocebadores que amplifican un fragmento de 2358 pb (*CT2358*) (Tabla 2, Figura 5 de materiales y métodos) que comprende el dominio CT completo con segmentos adicionales hacia el amino y carboxilo terminal. Se especula que la región extra hacia el amino terminal podría estar relacionada con la estabilidad de la estructura de la región CT (Wang et al., 2011).

Se indujo la expresión de las versiones recombinantes *CT2358 S2*, R1 y R2 en el vector pET28a mediante el agregado de 100 μ M de IPTG (Sección 3.24). Mediante SDS-PAGE se confirmó la presencia de una banda diferencial del tamaño esperado de 88 kDa en las fracciones inducidas y una cantidad apreciable de proteína en ambas fracciones (soluble e insoluble) (Figura 26).

Posteriormente, a partir de las fracciones solubles, se purificaron las proteínas como se describió en la sección 3.25, obteniéndose, finalmente, la proteína de interés purificada (Figura 27).

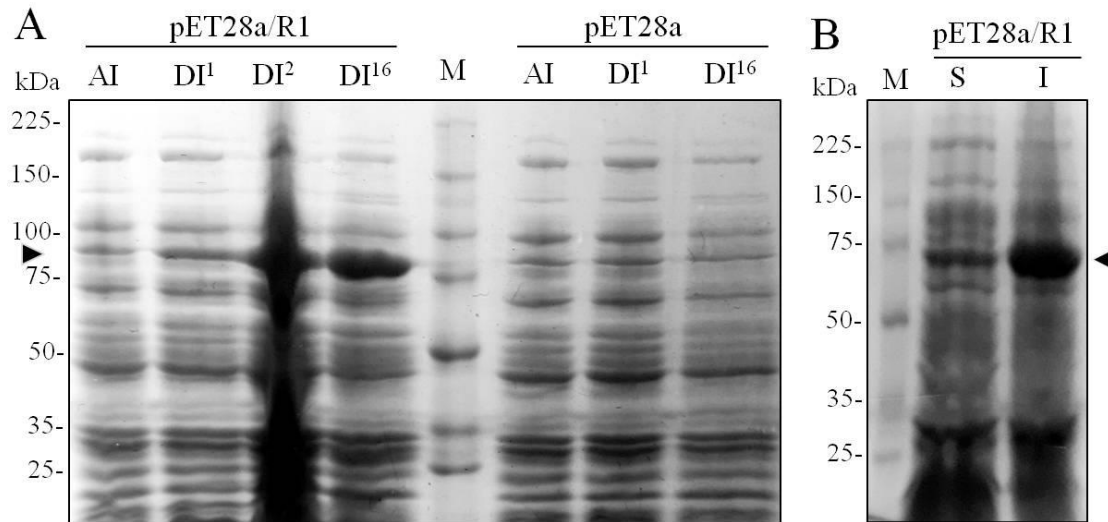


FIGURA 26. Chequeo de la expresión de la proteína recombinante CT2358R1. SDS-PAGE al 8% (p/v) de acrilamida teñido con azul de Coomassie A) Extractos proteicos totales de cultivos celulares. Se muestran los extractos de las células BL21 (DE3) Codon plus transformadas con vector pET28/R1 y con el vector pET28 (Control). AI: antes de inducir; DI¹/DI²/DI¹⁶: 1h, 2 h y 16 h después de inducir, respectivamente. B) Fracciones solubles (S) e insolubles (I). M: Marcador de masa molecular. Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína recombinante de interés de 88 kDa

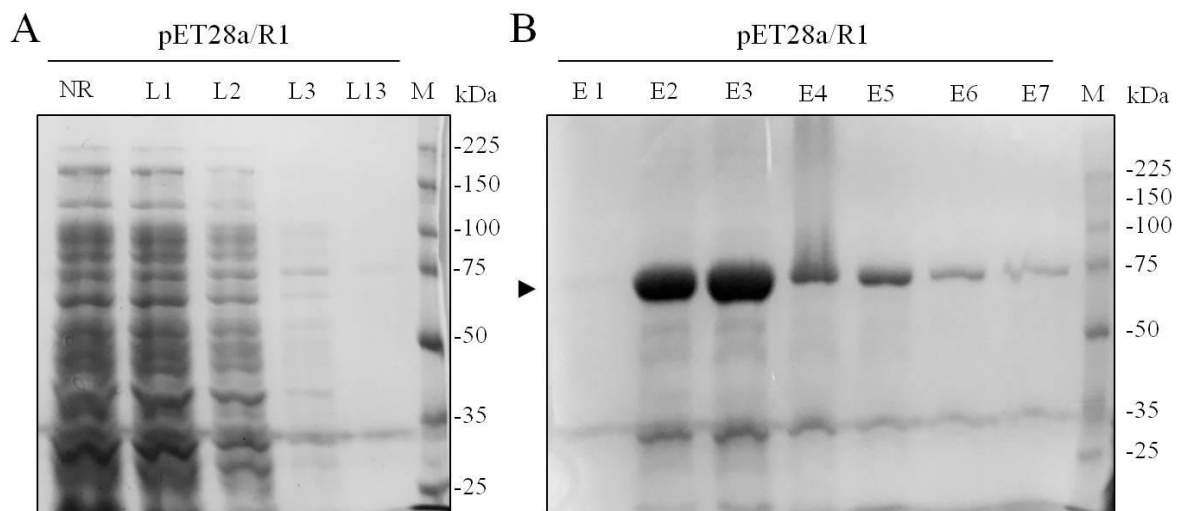


FIGURA 27. Chequeo de la purificación en columnas de níquel agarosa de la proteína recombinante CT2358R1. SDS-PAGE al 8% (p/v) de acrilamida teñido con azul de Coomassie. NR (fracción no retenida), L (lavados con imidazol 20 mM), E (eluciones con imidazol 200 mM). M: Marcador de masa molecular.

5.2.2. MEDIDAS DE ACTIVIDAD DEL DOMINIO CT

Las medidas de actividad enzimática se realizaron sobre extractos proteicos totales, fracciones solubles y purificadas de la proteína recombinante CT2358R1 según se detalla en la sección 3.28. No fue posible obtener resultados positivos en ningún caso, a pesar de haber realizado modificaciones en la composición de los buffers de purificación y de medida. Es importante destacar que se comprobó la funcionalidad del sistema de enzimas acopladas utilizando Acetil CoA como control positivo. Además, existen antecedentes de la evaluación de la actividad carboxiltransferasa de plantas en el sentido reverso de la reacción (Kozaki y Sasaki, 1999), tal como supone el método testado (Guchhait et al., 1974). No obstante, estos estudios se realizaron a partir de la enzima ACCasa completa en extractos enriquecidos en cloroplastos.

Cabe la pregunta, entonces, sobre la estructuración que estaría adquiriendo el dominio CT aislado obtenido de manera recombinante, dado que el mismo *in planta* se encuentra contenido en un polipéptido mayor (isoforma homomérica).

5.2.3. EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL GRADO DE OLIGOMERIZACIÓN DEL DOMINIO CT

A los efectos de analizar si la ausencia de actividad enzimática en la proteína recombinante se debía a un incompleto o incorrecto grado de oligomerización de la misma, se realizó una primera aproximación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, seguida por tinción con el colorante azul de Coomassie (Sección 3.27) (Figura 28).

Teniendo como referencia las migraciones de los estándares de masa molecular incluidos en el gel, la baja movilidad electroforética observada para la proteína recombinante purificada descarta un estado monomérico de la misma (que hubiera explicado la ausencia de actividad enzimática).

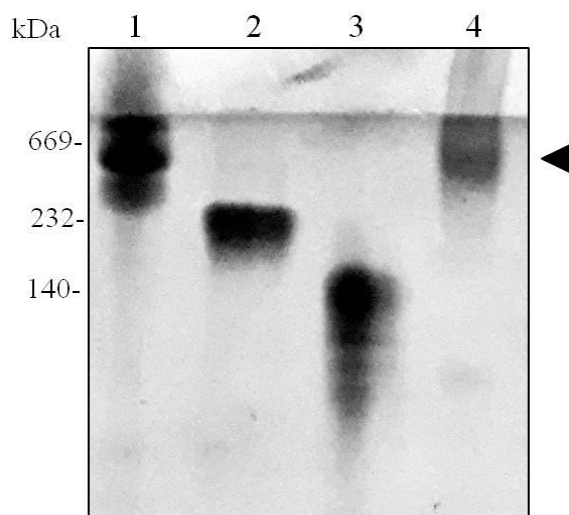


FIGURA 28. Análisis de la movilidad electroforética del dominio CT (CT2358R1) de la ACCasa recombinante purificado en condiciones no desnaturalizantes. Gel de poliacrilamida 6% (P/V) revelado por tinción con azul de Coomassie. Calle 1: Tioglobulina (669 kDa). Calle 2: β -amilasa (232 kDa). Calle 3: Alcohol deshidrogenasa (140 kDa). Calle 4: Proteína recombinante purificada CT2358R1.

Sin embargo, las limitaciones de esta técnica no permiten aseverar que ésta sea la estructura de la enzima en solución. Para profundizar el estudio del estado oligomérico, se debería realizar una cromatografía de exclusión molecular del dominio CT purificado.

5.2.4. EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURACIÓN SECUNDARIA DEL DOMINIO CT POR DICROÍSMO CIRCULAR

Con el motivo de evaluar el estado de plegamiento del dominio CT obtenido de manera recombinante, se registraron espectros de dicroísmo circular (DC) de la versión CT2358R1. Estos espectros fueron calculados tanto en el UV-lejano (Figura 29) como en el UV-cercano.

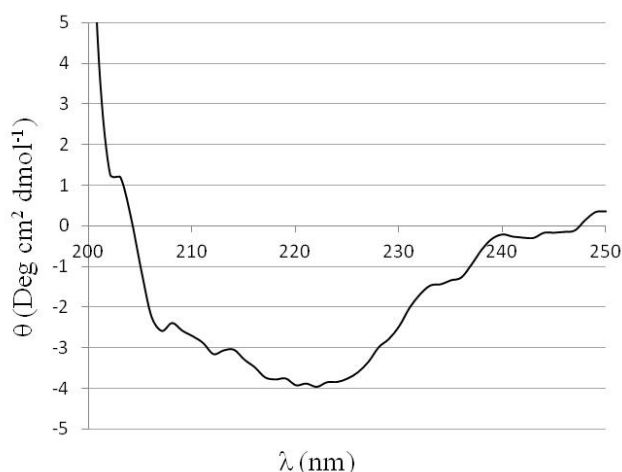


FIGURA 29. Espectro de Dicroísmo Circular en UV lejano del dominio CT (CT2358R1) de la ACCasa recombinante

Los espectros de DC registrados en el UV lejano (180-250 nm) dependen del contenido de estructura secundaria, siendo el cromóforo en esta región el enlace amida de las uniones peptídicas. El UV cercano (250-350) brinda información del plegamiento de la proteína, y los cromóforos evaluados son los residuos aromáticos junto con los puentes disulfuros (Corrêa y Ramos, 2009).

La baja relación señal/ruido obtenida en estos ensayos impidió la estimación de los porcentajes de estructuración secundaria con un grado alto de confianza, por lo que futuros estudios son necesarios para completar este análisis.

Además, la optimización de las condiciones experimentales de esta técnica (eliminación de interferencias como los iones cloruro) permitiría evaluar la capacidad diferencial de unión de cada isoforma CT2358 al herbicida (por comparación de las distorsiones espectrales generadas en presencia de haloxifop-p-metil) (Wang et al., 2011), conduciendo finalmente a la real contribución de la mutación IXXXT en la resistencia a inhibidores de ACCasa.

5.3. CONCLUSIONES

La optimización de una estrategia de expresión heteróloga del dominio CT de la ACCasa de plantas representa la posibilidad de evaluar de forma inequívoca alelos novedosos que puedan encontrarse en poblaciones resistentes. En el presente trabajo se optimizó un método efectivo de obtención del dominio CT de manera recombinante. Se destaca que esta herramienta puede ser utilizada a futuro en otras malezas gramíneas para caracterizar su mecanismo de resistencia. No obstante, la puesta a punto de un método determinante de la respuesta inhibitoria diferencial sobre las isoformas recombinantes resulta ineludible para asegurar el éxito de la estrategia planteada.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A GLIFOSATO EN LA SUBPOBLACIÓN DE *Sorghum halepense* HALLADA EN CAMPOS DE GOBERNADOR CRESPO

6.1. INTRODUCCIÓN

6.1.1. EPSPS (5-ENOLPIRUVILSHIKIMATO 3-FOSFATO SINTASA)

La enzima 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (EC 2.5.1.19), ampliamente conocida bajo su sinónimo 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) constituye el sitio de acción o blanco (target) del herbicida glifosato (Amrhein et al., 1980; Steinrucken y Amrhein, 1980). Cataliza el penúltimo paso en la vía de ácido shikímico, responsable de la síntesis de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina. Esta enzima está presente en todas las plantas verdes, algas, bacterias y hongos, pero ausente en mamíferos e insectos (Oliveira et al., 2003; Weaver, 1997). Estos tres aminoácidos son indispensables para la síntesis de proteínas y son los precursores de muchos compuestos secundarios en plantas, como auxinas, compuestos de defensa de patógenos, fitoalexinas, ácido fólico, ligninas, flavonoides, plastoquinonas y otros metabolitos de plantas alcaloides y fenólicos (Alibhai y Stallings, 2001; Pline-Srnic, 2005). Se estima que el 35% o más de la biomasa vegetal seca está representada por moléculas aromáticas derivadas de estas vías (Franz et al., 1997).

La EPSPS es codificada por el ADN nuclear y 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 de tránsito. El péptido de tránsito es requerido para la translocación de la enzima al estroma de los plastidios, donde luego es

procesado 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 $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$.

La EPSPS cataliza la transferencia de una unidad de enolpiruvil desde el fosfoenolpiruvato (PEP) hacia el shikimato-3-fosfato (S3P), formando los productos 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato (EPSP) y fosfato inorgánico (Figura 30). Esta reacción es inusual ya que procede vía clivaje de la unión carbono-oxígeno de PEP, en lugar del clivaje del enlace fósforo-oxígeno, como ocurre en la mayoría de las enzimas que utilizan PEP (Walsh et al., 1996). La reacción se produce a través de un intermediario tetraédrico formado por S3P y PEP (Anderson y Johnson, 1990).

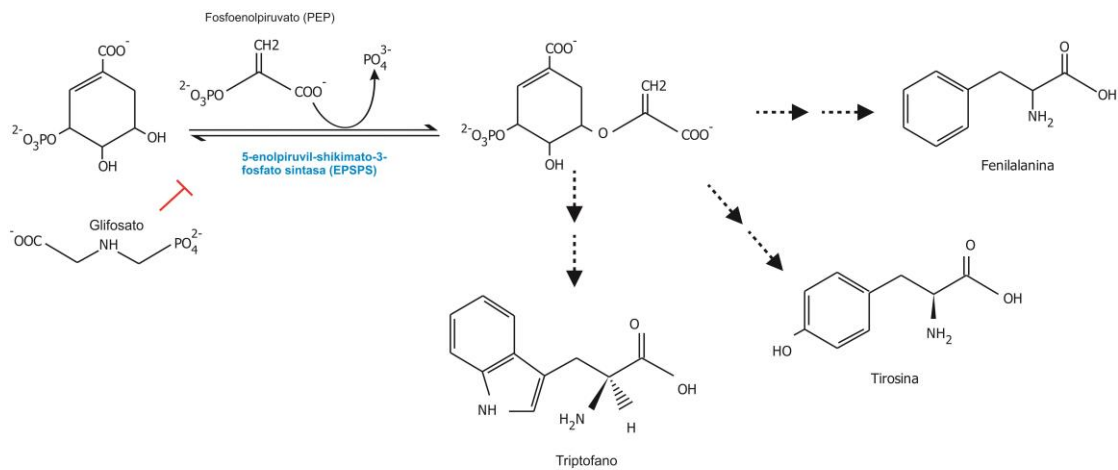


FIGURA 30. Reacción catalizada por la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) y su participación en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. Puede observarse la estructura del inhibidor de la EPSPS, el glifosato, y su analogía al sustrato PEP.

El glifosato inhibe a la EPSPS en una reacción lenta y reversible, de manera competitiva para el PEP y no competitiva para el S3P (Boocock y Coggins, 1983; Steinrücken y Amrhein, 1984).

Después de la inhibición de la reacción de la EPSPS por glifosato, la concentración del precursor S3P aumenta drásticamente. El S3P es una molécula inestable debido al enlace fosfato rico en energía y es rápidamente degradado a la molécula estable de ácido shikímico. El contenido de éste aumenta en las partes de la planta más activas y más jóvenes y puede ser usado como un indicador temprano de daño en las plantas (Harring et al., 1998; Koger et al.,

2005b; Singh y Shaner, 1998). El aumento crítico del ácido shikímico junto con la falta de aminoácidos, proteínas y metabolitos secundarios resultan en daño o muerte de la planta (Pline-Srnic, 2005; Shaner et al., 2005). La inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos también afecta varios compuestos de señalización en plantas, como el ácido salicílico. Esta inhibición podría también tener algún efecto perjudicial y conducir a una mayor susceptibilidad a los patógenos de las plantas, promoviendo la muerte de la planta más rápidamente (Johal y Huber, 2009; Lorentz et al., 2011; Pline-Srnic, 2005; Shaner et al., 2005; Tamagnone et al., 1998). Sin embargo, a pesar de las evidencias que sugieren a la EPSPS como el único sitio de acción del herbicida, la manera exacta por la cual el glifosato provoca la muerte de la planta está aún en discusión.

6.1.2. HERBICIDAS INHIBIDORES DE EPSPS (GRUPO G)

La molécula de glifosato (N-(fosfometil) glicina) fue sintetizada por primera vez en 1950; sin embargo, su utilidad como herbicida fue descubierta y patentada en 1970 por el doctor John E. Franz, investigador de Monsanto (Baird et al., 1971). Rápidamente, en 1974 esta empresa lo introdujo en el mercado para ser comercializado como un herbicida bajo el nombre de Roundup®, siendo hoy el más utilizado a nivel mundial.

El glifosato es un herbicida no selectivo, post-emergente y sistémico que controla una amplia variedad de especies vegetales. Este potente herbicida es absorbido por las plantas a través del follaje y se traslada en la sección longitudinal de tallos y raíces por vía floemática (Amrhein et al., 1980; Sprankle et al., 1975). Se utiliza ampliamente para el control de malezas perennes con reproducción vegetativa, ya que al ser altamente sistémico se transporta a toda la planta (Rosales-Robles et al., 2006).

En lo que respecta a su residualidad, la degradación microbiana ha sido considerada como la principal vía de descomposición del herbicida (Souza et al., 1999). La persistencia del glifosato en el suelo sería moderada, ya que se ha determinado que la molécula tiene una vida media de 45-60 días (Vereecken, 2005; Wauchope et al., 1992).

Con la expiración de la patente del glifosato a comienzos de la década de 1990, se favoreció la comercialización de productos genéricos, y por ende se expandió la oferta del herbicida por una abrupta caída del precio del mismo (Woodburn, 2000). Adicionalmente, la introducción de los cultivos transgénicos de soja, algodón y maíz resistentes a glifosato (RG)

(Roundup Ready®) y su masiva adopción a partir de 1996, provocó la disminución en el uso de otros herbicidas comúnmente utilizados.

Así, la diversidad de estrategias para el control de las malezas fue en detrimento, provocando una severa modificación de los agroecosistemas, ya que el glifosato es empleado exitosamente en pre-siembra y en post-emergencia y controla un amplio espectro de especies de malezas (Dill et al., 2010). Sumado a esto, la siembra directa eliminó la labranza del suelo como herramienta mecánica para el control de malezas. La acción conjunta de estos factores determinó que se ejerza una importante presión de selección sobre las comunidades y poblaciones de malezas, dirigida fundamentalmente a especies adaptadas al no laboreo. Este problema afectó especialmente a los cultivos de soja, maíz y algodón de los Estados Unidos, Argentina y Brasil (Duke y Powles, 2009).

6.1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A GLIFOSATO

RESISTENCIA ASOCIADA AL SITIO DE ACCIÓN (TSR)

El glifosato presenta una gama muy amplia de mecanismos moleculares de resistencia en relación a los otros modos de acción.

Uno de los mecanismos TSR debido a mutaciones en el gen *EPSPS* es la sustitución de prolina por serina en la posición 106 (P106S). Esta sustitución, introducida en la soja transgénica tolerante, fue tempranamente descubierta en *Eleusine indica* (Baerson et al., 2002) y luego reportada en muchas otras especies (más frecuentemente en el género *Lolium*), incluyendo nuevas sustituciones en esa misma posición. Se vio que la sustitución P106 no está involucrada directamente en las interacciones moleculares con glifosato o el sustrato PEP, sin embargo la sustitución a otro aminoácido causa cambios estructurales en el sitio activo reduciendo el espacio disponible (Sammons y Gaines 2014). Por otra parte, una novedosa sustitución simple de treonina por serina en la posición 102 (T102S) ha sido recientemente reportada y asociada a la RG en *Tridax procumbens* (Li et al., 2018).

Estas mutaciones simples en el gen *EPSPS* usualmente confieren bajos niveles de resistencia, a la vez que preservan la eficiencia catalítica de la enzima EPSPS. En *Echinochloa colona* (especie poliploide) las sustituciones simples en homocigosis alélica P106T, P106L ó P106T+ P106L (cada mutación presente en un gen homeólogo) no fueron suficientes para

conferir resistencia a la dosis de campo (Han et al., 2016). Por otra parte, las mutaciones en las posiciones glicina 101 (G101A) y T102 (T102L) han sido detectadas como fuente de resistencia usando mutagénesis dirigida y expresión en *Escherichia coli* y plantas transgénicas de maíz, sin embargo aún no han sido detectadas en malezas RG (Sammons y Gaines, 2014).

Curiosamente, la doble sustitución artificial en la EPSPS llamada “TIPS” (T102I + P106S) conocida por otorgar altos niveles de RG en líneas de maíz comerciales transgénicas (Lebrun et al., 2003) ha sido encontrada en dos especies de malezas (*Eleusine indica* y *Bidens pilosa*) (Alcántara-de la Cruz et al., 2016; Yu et al., 2015), evidenciando el poder de la evolución bajo una presión de selección persistente. Asimismo, una nueva sustitución doble en la EPSPS denominada “TIPT” fue hallada como responsable de la resistencia en poblaciones de *Bidens subalternans* (Takano et al., 2019)

Recientemente, nuestro grupo de trabajo encontró una triple mutación en una población de *Amaranthus hybridus* (Perotti et al., 2019). La misma es causada por cuatro nucleótidos mutados que producen los siguientes cambios de codones: ACA por ATA (T102I), GCG por GTC (A103V) y CCA por TCA (P106S). Como consecuencia, se produce una triple sustitución a la cual se denominó TAP-IVS. Hasta ahora, la evolución natural de la doble sustitución ha sido documentada sólo en dos especies de malezas (Alcántara-de la Cruz, et al., 2016; Yu et al., 2015), convirtiendo a esta población de *A. hybridus* en el tercer reporte a nivel mundial. No obstante, la tercera sustitución presente (A103V) en la enzima, causada por dos mutaciones consecutivas fue posteriormente reportada en la misma especie (*A. hybridus*) por dos grupos independientes (García et al., 2019; Hutchings et al., 2019).

Las mutaciones múltiples TIPS y TAP-IVS confieren mucha más resistencia a glifosato que las mutaciones simples, aunque aún no se sabe concretamente si la mutación A103V agrega resistencia adicional o afecta la cinética de EPSPS en ausencia a glifosato (Gaines et al., 2019).

El otro mecanismo frecuente de TSR a glifosato es la amplificación del gen *EPSPS*. Este mecanismo se ha reportado en varias especies de malezas tales como *Amaranthus palmeri* (Gaines et al., 2010), *Amaranthus tuberculatus* (Tranel et al., 2011), *Kochia scoparia* (Wiersma, 2015), *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* (Salas et al., 2012), *Amaranthus spinosus* (Nandula et al., 2014), *Eleusine indica* (Chen et al., 2015) *Bromus diandrus* (Malone et al., 2016) y *Chloris truncata* (Ngo, et al., 2017). *Amaranthus palmeri* fue la primera especie en la cual la duplicación del gen EPSPS fue reportada, con individuos que llevan un número variable de copias extras del gen EPSPS (de 20 a 100 copias) (Gaines et al., 2010). Más aún, la

participación de una amplificación basada en ADN circular extracromosómico (ADN_{cec}) se ha propuesto recientemente como el mecanismo presente en una población de *Amaranthus palmeri* de Georgia (Koo et al., 2018). En el caso de poblaciones de *Kochia scoparia* se identificaron de tres a diez copias extras del gen *EPSPS* arregladas como duplicaciones en tándem en un simple locus por inserción de elementos genéticos móviles próximos a *EPSPS* (Patterson et al., 2019). Además, en plantas resistentes, esta variación en el número de copias del gen *EPSPS* se correlacionó positivamente con la expresión y contenido de proteína (Patterson et al., 2018).

Estudios recientes en *Lolium perenne* (Yannicari et al., 2017) demostraron que la resistencia se debe a un mecanismo de sobreexpresión constitutivo del gen *EPSPS*, exhibiendo 15 veces más de transcripto y tres veces más actividad de EPSPS. Al mismo tiempo, en *E. indica* se reportó también un mecanismo de sobreexpresión de EPSPS mediante alteraciones en la región 5' no traducible (de las siglas en inglés, 5'UTR) del gen *EPSPS*, sin embargo en este caso es inducible por glifosato (Zhang et al., 2018).

RESISTENCIA AJENA AL SITIO DE ACCIÓN (NTSR)

El mecanismo de resistencia más frecuente para glifosato parece ser la translocación reducida, reportada en *Lolium rigidum* (Lorraine-Colwill, col., 2002), *Conyza canadensis* (Koger y Reddy., 2005a), *Lolium multiflorum* (Ghanizadeh et al., 2016; Nandula et al. 2008; Pérez-Jones et al., 2007) y *Sorghum halepense* (Riar et al., 2011; Vila Aiub et al., 2012). En *C. canadensis* y *Lolium spp* el fenotipo de resistencia ha sido atribuido al secuestro del herbicida en vacuolas (Ge et al., 2011, 2012), pero los genes específicos causantes de la translocación reducida no han sido aún identificados. Se encontraron algunos genes codificantes de transportadores del tipo ABC candidatos, pero no fueron funcionalmente validados (Tani et al., 2015; Yuan et al., 2010).

Uno de los mecanismos NTSR más comunes en malezas es la capacidad aumentada de metabolizar el herbicida; sin embargo para el glifosato no ha sido fehacientemente demostrado. Se han reportado solo dos casos de metabolismo aumentado (de Carvalho et al., 2012; González-Torralva et al., 2012) y, recientemente, un tercer reporte ha propuesto una nueva vía capaz de metabolizar al glifosato en *Echinochloa colona*. Dicha vía tiene como principal protagonista a la enzima aldo cetoglutarato reductasa (Pan et. al., 2019).

Por otra parte, varios genes candidatos fueron diferencialmente transcriptos en biotipos resistentes, como por ejemplo un gen de la citocromo P450 monooxigenasa (Leslie y Baucom, 2014). No obstante, se necesitan más estudios para confirmar la contribución real de este mecanismo.

En el caso de las poblaciones de *S. halepense* RG encontradas en la provincia de Salta en Argentina, éstas mostraron resistencia debido a una disminución de la translocación del herbicida y, para un biotipo en particular, una co-existente absorción reducida (Vila-Aiub et al., 2012). Vila Aiub et al. (2013) estudiaron el efecto de la temperatura sobre el fenotipo de resistencia a glifosato en las poblaciones de *S. halepense* de Argentina y en poblaciones de *L. rigidum* de Australia, encontrando una significativa reducción en el crecimiento y supervivencia cuando se crecieron a temperaturas más bajas respecto a la temperatura de crecimiento óptima para cada especie. Este fenómeno también fue observado en poblaciones de *C. canadensis* con translocación reducida debido al secuestro en vacuolas (Ge et al., 2011); sin embargo, las bases bioquímicas y moleculares se desconocen a la fecha.

Por último, un mecanismo de resistencia único para el grupo G es el fenotipo de muerte celular rápida observado en poblaciones de *Ambrosia trifida*, en el cual todos los mecanismos de resistencia conocidos están ausentes y donde especies reactivas del oxígeno se acumulan a los pocos minutos de aplicado el glifosato en las hojas más viejas de los individuos resistentes. Esta reacción de hipersensibilidad previene la translocación del glifosato a hojas más jóvenes y tejidos en crecimiento, ayudando a la planta a que sobreviva la aplicación (Moretti et al., 2018; Van Horn et al., 2018).

Los costos y beneficios de los mecanismos de resistencia a glifosato varían de acuerdo a la especie y el mecanismo. En cuanto a los mecanismos TSR, cada una de las sustituciones de aminoácidos en EPSPS impacta en el grado de resistencia a glifosato a nivel de la enzima y la planta. Algunas mutaciones afectan la capacidad catalítica normal de la enzima cambiando el metabolismo y el funcionamiento general de la planta.

Las sustituciones en P106 confieren bajo nivel de resistencia sin cambios significativos en la funcionalidad de la enzima. Constituyen una de las formas más comunes de TSR a glifosato y los individuos resistentes no muestran ningún costo a nivel planta y persisten en las poblaciones en ausencia de presión de selección. En cambio, las sustituciones G101A y T102I, que presentan niveles de resistencia relativamente altos, muestran actividad catalítica reducida en *E. coli*, explicando de algún modo la ausencia en la naturaleza de malezas resistente con este

tipo de mutaciones. Por el contrario, la sustitución nueva T102S encontrada en *T. procumbens* confiere bajos niveles de resistencia, pero se especula que no tendría un costo asociado (Vila-Aiub et al., 2019).

Por otra parte, la doble mutación TIPS presenta mayores niveles de resistencia que las sustituciones simples con una significativa reducción de la actividad catalítica, incurriendo en una penalidad (*fitness*) a nivel planta en *E. indica* (Hans, 2017). Sorprendentemente, no se encontró costo alguno asociado a la resistencia debida a la amplificación del gen EPSPS (Vila-Aiub et al., 2019). Sin embargo, la sobreexpresión del gen *EPSPS* parece tener un costo asociado en *L. perenne* (Yannicari et al, 2016; 2017).

En la Tabla 18 se resumen los mecanismos de resistencia a glifosato reportados al momento en distintas especies de malezas.

TABLA 18. Resumen de los mecanismos de resistencia en malezas reportados al momento para glifosato. (Adaptado de Perotti 2020).

Bases genéticas/ Mecanismo	Molécula/ Estructura involucrada	Efectos bioquímicos/fisiológicos	Referencias
TSR , sustitución de aminoácidos en EPSPS P106S/A/T/L; T102S	EPSPS	Reducción de la sensibilidad a glifosato de EPSPS	Sammons (2014); Li (2018)
TSR , doble sustitución de aminoácidos en EPSPS T102I + P106S	EPSPS	Reducción de la sensibilidad a glifosato de EPSPS	Chen (2015); Yu (2015); Alcántara-de la Cruz (2016)
TSR , doble sustitución de aminoácidos en EPSPS T102I + P106T	EPSPS	Reducción de la sensibilidad a glifosato de EPSPS	Takano (2019)
TSR , triple sustitución de aminoácidos en EPSPS: T102S + A103V + P106S	EPSPS	Reducción de la sensibilidad a glifosato de EPSPS	Perotti (2019); García (2019)
TSR , <i>EPSPS</i> amplificación génica (eccDNA)	EPSPS	Mayor actividad de EPSPS	Koo (2018)
TSR , <i>EPSPS</i> amplificación génica (transposon-mediated tandem duplication)	EPSPS	Mayor actividad de EPSPS	Patterson (2019)
TSR , <i>EPSPS</i> amplificación génica (mecanismo desconocido)	EPSPS	Mayor actividad de EPSPS	Dillon (2017) ; Lorentz (2014)
NTSR , bases desconocidas	Desconocido	Absorción foliar y traslocación reducida	Vila-Aiub (2012)
NTSR , bases desconocidas	Desconocido	Traslocación reducida	Ghanizadeh (2017), Feng (2004), Koger (2005a), Lorraine-Colwill (2002), Wakelin (2004)
NTSR , bases desconocidas	Transportadores ABC	Traslocación reducida	Ge (2011); Ge (2012)
NTSR , sobreexpresión génica: M10; M11; M7; P3; ABCG29; ABCC3; ABCG42	Transportadores ABC	Traslocación reducida	Tani (2015); Yuan (2010)
NTSR , bases desconocidas	Desconocido	Rápida muerte celular (“mecanismo Phoenix”)	Van Horn (2018)
NTSR , bases desconocidas	Desconocido	Metabolismo incrementado	de Carvalho (2012)
NTSR , sobreexpresión génica: CYP82D47	Cit P450	Metabolismo incrementado?	Leslie (2014)
NTSR , sobreexpresión génica: AKR	AKR	Metabolismo incrementado	Pan (2019)

Abreviaturas: Cit P450: citocromo P-450; EPSPS: 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa; eccDNA: DNA circular extracromosomal; AKR: aldo cetoglutarato deshidrogenasa.

6.1.4. CASOS DE RESISTENCIA

El primer caso de resistencia a glifosato fue reportado 22 años después de su introducción, en un biotipo de *Lolium rigidum* de Australia (Powles et al., 1998), clasificándose a este principio activo dentro de los herbicidas menos propensos al desarrollo de resistencia. Hasta ese momento se pensaba que la evolución de la resistencia a glifosato era poco probable debido a la ausencia de metabolismo y de transportadores activos conocidos para este herbicida en plantas (Sammons y Gaines, 2014), además de asegurarse que las mutaciones en la enzima EPSPS conducirían a una baja supervivencia (Bradshaw et al., 1997).

El mal uso y abuso de esta herramienta de control químico, propiciado por el cambio en los sistemas agroproductivos detallado anteriormente, venció con creces estas predicciones. Actualmente, la resistencia a este herbicida ha sido confirmada en 47 especies de malezas a nivel mundial (Heap, 2019). En nuestro país, el primer caso de resistencia se detectó en una población de *Sorghum halepense* de la provincia de Salta (Vila-Aiub et al., 2007) y hoy la situación resulta preocupante ya que un gran porcentaje de la superficie agrícola nacional está afectada por esta maleza resistente (Figura 31).

La presencia en el sistema de especies resistentes a glifosato en el sistema productivo modifica sustancialmente el esquema de control, ya que se hace necesario el empleo de estrategias reactivas (ver introducción general). Así, el conocimiento de los mecanismos de resistencia de las distintas especies de malezas 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.

Este capítulo tiene como objetivo general confirmar y cuantificar la resistencia a glifosato en la subpoblación en estudio, con énfasis en la evaluación del mecanismo molecular que se encuentra operando en las plantas resistentes.

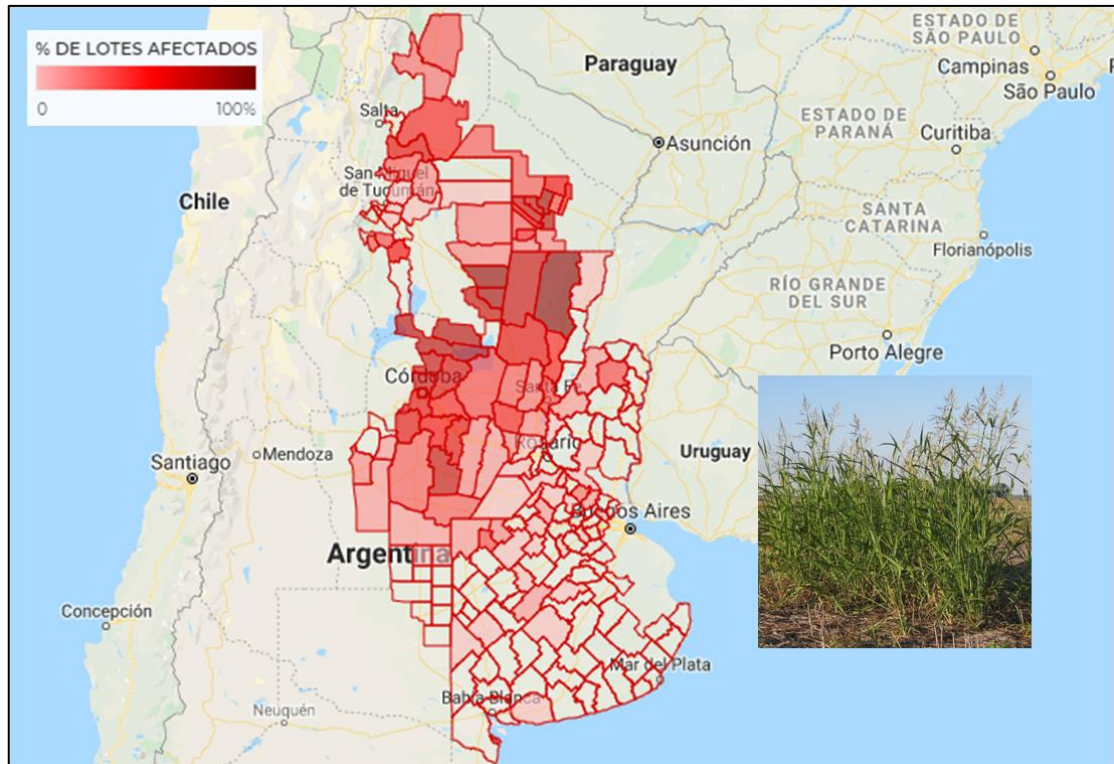


FIGURA 31. Distribución de malezas resistentes a glifosato en Argentina. El sombreado en rojo indica la distribución de poblaciones de *Sorghum halepense* RG. Los datos para la construcción de la figura remiten a un censo acumulativo realizado en 2017 (REM, 2018).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar los niveles de resistencia *in vivo* a glifosato en la subpoblación de Gobernador Crespo.
- 2) Identificar el mecanismo responsable del fenotipo de resistencia a glifosato en los individuos resistentes.

6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1. CONFIRMACIÓN DE LA RESISTENCIA A GLIFOSATO EN LA SUBPOBLACIÓN GC-R

Se realizaron experimentos de dosis-respuesta con glifosato para determinar los niveles de resistencia de la subpoblación GC-R. La subpoblación (Zav-S) se utilizó como control susceptible.

A la dosis de campo ($1080 \text{ g ia ha}^{-1}$), la subpoblación GC-R presentó un porcentaje de biomasa remanente del 29% (Figura 32A) y una tasa de supervivencia cercana al 50%, respecto del control no tratado (Figura 32B). Considerando que las plantas sobrevivientes completaron su ciclo generando descendencia viable, estos resultados confirman la resistencia a glifosato de la subpoblación de Gobernador Crespo. Paralelamente, a esta dosis 1X se alcanzó el control total de las plantas de la subpoblación Zav-S, confirmando su susceptibilidad al herbicida evaluado (Figura 32B).

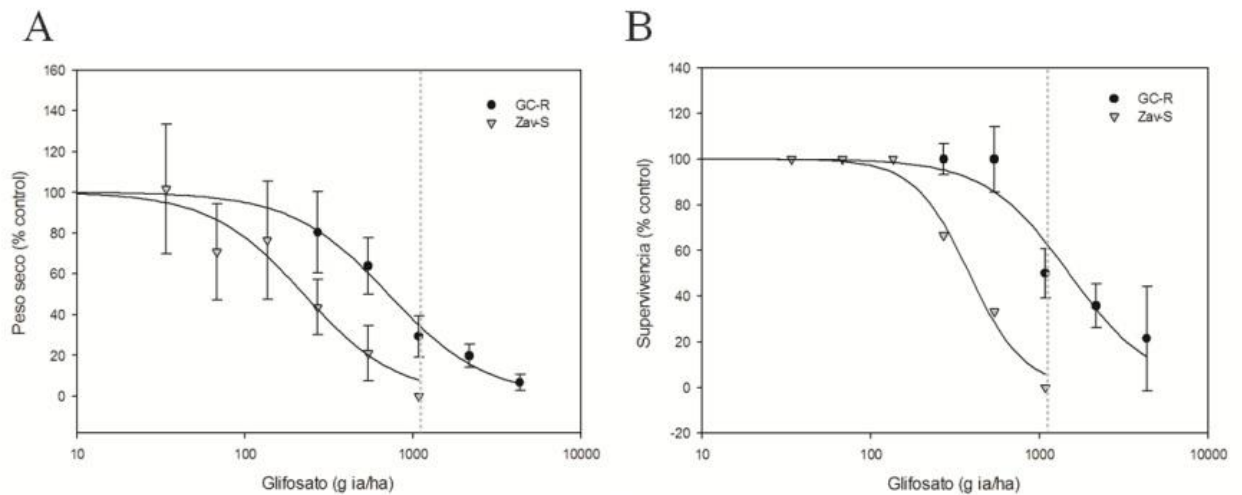


FIGURA 32. Curvas dosis-respuesta de las subpoblaciones de *Sorghum halepense* con glifosato. Las plantas de las subpoblaciones GC-R y Zav-S fueron sometidas a la aplicación de dosis crecientes de glifosato. Los resultados se expresan como porcentaje de peso seco (A) y supervivencia (B) respecto de los grupos controles no tratados. Los símbolos indican los valores medios y las líneas las respuestas predictivas para cada población. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media. La línea de puntos indica la dosis de campo recomendada.

De acuerdo a la tasa de supervivencia, la subpoblación de Gobernador Crespo mostró ser 4,3 veces menos sensible a glifosato que la susceptible de Zavalla (Tabla 19). Además, el valor de GR₅₀ para la subpoblación Zav-S fue de 223 g ia ha⁻¹, mientras que la subpoblación GC-R mostró un valor de GR₅₀ 3,3 veces mayor.

TABLA 19. Parámetros obtenidos de las curvas dosis respuesta de las subpoblaciones con glifosato. Los valores de LD₅₀ y GR₅₀ se expresan en g ia ha⁻¹ y son el promedio de tres curvas repetidas en el tiempo. Los factores de resistencia (FR) se calcularon utilizando la concentración de glifosato requerida para reducir la biomasa seca (GR₅₀) y la tasa de supervivencia en un 50% (LD₅₀). Los valores entre paréntesis son los errores estándar de la media. Las letras en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,001) después de la comparación de pares de los GR₅₀ o LD₅₀ usando *t-test* (software Sigmaplot).

Herbicida	Subpoblación	Peso Seco			Supervivencia		
		GR ₅₀	R ²	FR	LD ₅₀	R ²	FR
Glifosato	GC-R	715 (47) ^a	0,9913	3,3	1494 (256) ^a	0,9264	4,3
	Zav-S	223 (33) ^b	0,9540		382 (23) ^b	0,9880	

Estudios previos mostraron que el fenotipo de resistencia a glifosato en *S. halepense* es dependiente de la temperatura (Vila-Aiub et al., 2013) y del tamaño de las plantas al momento de la aplicación (a partir del estadio de plántula) (Vila- Aiub et al., 2007, 2018), lo que implica su consideración como variables al momento de realizar comparaciones.

La subpoblación GC-R crecida a 25-30°C y aplicada en el estadio de 4-5 hojas (40 cm) mostró un LD₅₀ de 1494 g ia ha⁻¹, en concordancia con una de las poblaciones de Salta (S2B) y de Arkansas (WM) (Tabla 20). Sin embargo, comparativamente, para otras dos poblaciones de Salta (S1B y S2A), los LD₅₀ fueron un poco mayores (entre 2X y 4X). En el caso de los GR₅₀, las tres poblaciones estudiadas previamente (Salta y Arkansas) mostraron valores superiores (2x- 4X) a la población de Gobernador Crespo.

Tabla 20. Valores de LD₅₀ y GR₅₀ previamente reportados en la literatura para *Sorghum halepense* tratado con glifosato.

Población	LD ₅₀	GR ₅₀	temperatura	altura	Referencia
S1B	2182	Nd	primavera- verano	40 cm (4-6 hojas)	(Vila-Aiub., 2007)
S2B	1263	Nd	primavera- verano	40 cm (4-6 hojas)	(Vila-Aiub, 2007)
S2A	>1000	Nd	primavera- verano	40 cm (4-6 hojas)	(Vila-Aiub, 2007)
R1 (S1B)	2740	4588	30°C	30-40 cm (4 hojas)	(Vila-Aiub, 2013)
R2 (S2A)	3929	>4000	30°C	30-40 cm (4 hojas)	(Vila-Aiub, 2013)
R1 (S1B)	3301	2645	25/21°C	40 cm	(Vila-Aiub, 2018)
R2 (S2A)	3545	3390	25/21°C	40 cm	(Vila-Aiub, 2018)
WM	1830	2350	30/20°C	60 cm (5 – 6 hojas)	(Riar et al, 2011)
GC-R	1494	715	30/25°C	40 cm (4-5 hojas)	Este trabajo

S1B, S2B y S2A: poblaciones de Salta (Argentina), WM: poblaciones de West Memphis (Arkansas-EE UU), GC-R: población de Santa Fe (Argentina). Nd: no dterminado.

6.2.2. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA CONSERVADA DEL GEN *EPSPS*

Con el objetivo de estudiar la presencia de mutaciones asociadas a mecanismos TSR en la subpoblación resistente de *S. halepense*, se amplificó mediante PCR y se secuenció la región altamente conservada del gen *EPSPS* (sección 3.10) que comprende todas las mutaciones conocidas como causantes de resistencia a glifosato (Funke et al., 2009; Sammons y Gaines, 2014).

Las secuencias de *EPSPS* de *S. halepense*, *Sorghum bicolor* y *Zea mays* obtenidas del Gen Bank (HQ436351-4, XM_002436379.2 y X63374, respectivamente) fueron utilizadas como referencia para los alineamientos. El gen *EPSPS* en plantas contiene la secuencia codificante para un péptido de tránsito que dirige la proteína al cloroplasto. Debido a que este péptido de tránsito es variable en secuencia y longitud entre las diferentes especies, para facilitar la comparación entre trabajos de investigación, la mayoría de los grupos numeran las posiciones de aminoácidos en relación al primer codón ATG de la proteína madura en plantas (Sammons y Gaines, 2014).

La comparación de secuencias entre plantas susceptibles (Zav -S) y resistentes (GC-R) no reveló ningún cambio de nucleótidos ni de aminoácidos en la región analizada, concluyendo que la resistencia a glifosato no sería proporcionada por una mutación puntual en el gen *EPSPS* (FIGURA 33).

consenso de nucleótidos		292	101	102	103	106	333
<i>Zea mays</i> (S)	G G G A A T G C T G G A A C T G C A A T G C G G C C A T T G A C A G C A G C T G T T						
<i>Sorghum bicolor</i> (S)	G G G A A T G C T G G A A C T G C A A T G C G G C C A T T G A C A G C A G C T G T T						
<i>Sorghum halepense</i> (S)	G G G A A T G C T G G A A C T G C A A T G C G G C C A T T G A C A G C A G C T G T T						
Zav-S (S)	G G G A A T G C T G G A A C T G C A A T G C G G C C A T T G A C A G C A G C T G T T						
GC-C4 (R)	G G G A A T G C T G G A A C T G C A A T G C G G C C A T T G A C A G C A G C T G T T						
GC-C6 (R)	G G G A A T G C T G G A A C T G C A A T G C G G C C A T T G A C A G C A G C T G T T						
GC-C7 (R)	G G G A A T G C T G G A A C T G C A A T G C G G C C A T T G A C A G C A G C T G T T						
consenso de aminoácidos			101	102	103	106	
<i>Zea mays</i> (S)	G N A G T A M R P L T A A V						
<i>Sorghum bicolor</i> (S)	G N A G T A M R P L T A A V						
<i>Sorghum halepense</i> (S)	G N A G T A M R P L T A A V						
Zav-S (S)	G N A G T A M R P L T A A V						
GC-C4 (R)	G N A G T A M R P L T A A V						
GC-C6 (R)	G N A G T A M R P L T A A V						
GC-C7 (R)	G N A G T A M R P L T A A V						

FIGURA 33. Alineamiento de las secuencias parciales del gen *EPSPS*. Secuencia de nucleótidos (superior) y aminoácidos (inferior) en la región conservada de *EPSPS* de las especies de referencias (*Z. mays*, *S. bicolor* y *S. halepense*) y de plantas de la subpoblación sensible (Zav-S) y resistente (GC-R). Los aminoácidos son enumerados de acuerdo a la numeración de *EPSPS* de plantas usada por Padgett (1996).

6.2.3. ESTUDIO DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN *EPSPS*

Se estimó el numero relativo de copias del gen *EPSPS* en los individuos seleccionados de la subpoblación GC-R (GC-C4, C6 y C7) respecto de dos individuos seleccionados de la

subpoblación Zav-S (Zav S1 y S2), mediante PCR cuantitativa en tiempo real, según el protocolo descrito en la sección 3.14.

Los individuos de la subpoblación resistente no presentaron aumento en el número de copias del gen *EPSPS* en relación a la subpoblación sensible (Tabla 21 y Figura 34), descartando un mecanismo de amplificación génica.

TABLA 21. Estimación del número de copias relativo del gen *EPSPS* mediante qPCR.

Gen	Nº copias relativas	Error estándar	IC (95%)	P(H1)
<i>EPSPS</i>	0,915	0,525-1,437	0,341-2,740	0,701
<i>UBQ</i>	1,000			

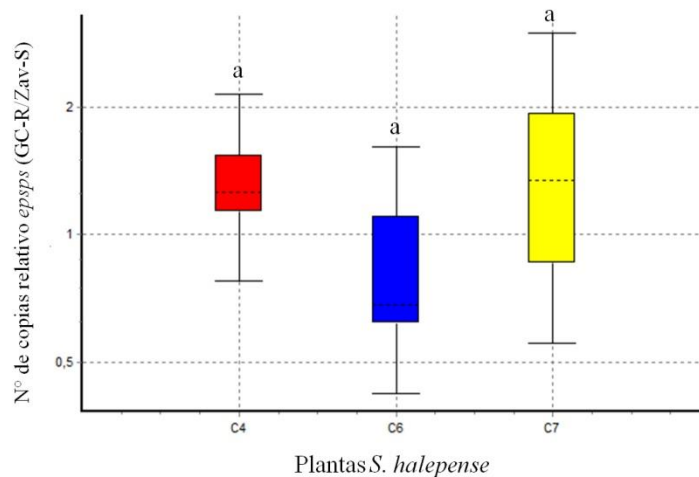


FIGURA 34. Número relativo de copias del gen *EPSPS* en los individuos seleccionados de GC-R respecto a los individuos sensibles (Zav- S1 y S2). Las barras verticales representan el error estándar de la media. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

Curiosamente, en las poblaciones de *S. halepense* de Salta y Arkansas discutidas anteriormente tampoco se identificó un mecanismo TSR, sino que se evidenció una tasa reducida de translocación del glifosato desde la hoja a la corona basal y raíces (Riar et al, 2011; Vila Aiub et al., 2012). Esta translocación basipetal reducida corresponde a una mayor retención del glifosato absorbido en las hojas tratadas en relación a las plantas sensibles. Adicionalmente, se propuso que el glifosato activa transportadores tipo ABC que son proteínas de membrana

que secuestran el herbicida en la vacuola o lo bombean al apoplasto (Yuan et al., 2007). A su vez Ge et al., (2010) demostraron que el secuestro en vacuolas es el mecanismo de resistencia a glifosato en *Coniza canadensis* mediante estudios de resonancia magnetica nuclear (RMN).

Estos antecedentes de mecanismos NTSR, los únicos reportados para *S. halepense* a la fecha, en conjunto con los resultados obtenidos en esta tesis, abren las puertas a futuros estudios orientados a evaluar la presencia de una translocación reducida en la población en estudio.

6.3. CONCLUSIONES

La resistencia a glifosato en la subpoblación de Gobernador Crespo fue confirmada mediante los experimentos de dosis respuesta, presentando valores del parámetro LD₅₀ del orden de los reportados previamente para biotipos resistentes de la misma especie. No obstante, las plantas sobrevivientes presentaron valores de biomasa notoriamente inferiores a los reportados para dichos biotipos.

En lo que respecta al estudio de los mecanismos moleculares causantes de la resistencia a glifosato, los estudios realizados en la presente tesis permitieron descartar la presencia de mutaciones de punto en la secuencia conservada de *EPSPS* y una amplificación génica (ambos mecanismos TSR), aportando evidencias de un probable mecanismo NTSR, en coincidencia con reportado para la especie bajo estudio.

7. CONCLUSIÓN FINAL

El estudio de las secuencias de nucleótidos del dominio CT del gen de la enzima ACCasa permitió realizar una exploración preliminar para conocer la variabilidad genética de las subpoblaciones bajo estudio, encontrándose 13 haplotipos distintos. El análisis de las secuencias traducidas a partir de estos haplotipos hallados entre ambas poblaciones, arrojó que existirían hipotéticamente seis variantes aminoacídicas en los plastidios de las mismas (I-VI) (Tabla 15), tres de las cuales son exclusivas de la población resistente (IV, V y VI).

Las sustituciones I2041N (IV) y G2096A (VI) halladas en la ACCasa de la subpoblación en estudio ya habían sido reportadas en la bibliografía como responsables de conferir altos niveles de resistencia a algunos principios activos de la familia química de los FOPs (Delye 2005a, Petit et al., 2010), en concordancia con lo observado en este trabajo (mediante ensayos de dosis respuesta tanto a nivel poblacional como a nivel de individuos seleccionados). Además, la sustitución I2041N es la única reportada para *Sorghum halepense* hasta el momento (Scarabel et al., 2014), constituyendo así la sustitución G2096A un interesante hallazgo de la presente tesis.

Por su parte, la novedosa sustitución hallada en la población resistente (IXXXT o variante aminoacídica V) demuestra la factibilidad del objetivo general propuesto, representando un descubrimiento con potencial aplicación de innovación biotecnológica. La confirmación de su contribución a la resistencia mediante ensayos de unión al herbicida con la versión recombinante correspondiente es un objetivo a completar en un futuro trabajo experimental.

La amplificación del gen blanco quedó completamente descartada como mecanismo de resistencia en la población en estudio, en tanto que la evaluación de una posible resistencia metabólica parece indicar una baja o ausente contribución de la misma.

En resumen, los resultados obtenidos confirman que la resistencia a haloxifop-p-metil de la subpoblación de Gob. Crespo (GC-R) se debe principalmente a un mecanismo *TSR* con al menos dos mutaciones contribuyendo al fenotipo de resistencia.

La resistencia asociada al sitio de acción (TSR) a inhibidores de ACCasa frecuentemente muestra dominancia parcial cuando es evaluada con un rango de dosis de herbicida. Es decir, el efecto de alelos resistentes puede verse “diluido” a medida que aumenta el porcentaje de alelos sensibles. Mediante una técnica molecular (ASqPCR) se logró identificar individuos homocigotas alélicas para la sustitución I2041N. La evaluación *in vivo* de estos individuos y la comparación con el fenotipo de resistencia de su parental heterocigota, permitirán comprobar la hipótesis de “efecto de dilución” en una especie tetraploide. Es importante destacar que ambos individuos evaluados comparten el mismo acervo genético, siendo éste un estudio pionero nunca antes reportado.

Finalmente, se confirmó la resistencia a glifosato en la población GC-R, hallándose valores de LD₅₀ 1,4 veces mayor a la dosis recomendada a campo. Paralelamente, la secuenciación de la región conservada del gen codificante de la EPSPS, junto con la evaluación del número de copias de dicho gen, permitieron descartar un mecanismo asociado al sitio de acción. Estos resultados, conjuntamente con los antecedentes ya informados en la especie bajo estudio (Riar et al., 2011; Vila Aiub et al., 2012), parecen indicar un mecanismo ajeno al sitio de acción como responsable de la resistencia a glifosato.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad-Hamdani, M. S., Yu, Q., Han, H., Cawthray, G. R., Wang, S. F. y Powles, S. B. (2013). Herbicide resistance endowed by enhanced rates of herbicide metabolism in wild oat (*Avena spp.*). *Weed Science*, 61(1), 55-62.
- Alarcon-Reverte, R. (2009) Understanding and combatting the threat posed by *Lolium multiflorum* as a weed of arable crops. PhD Thesis, University of Reading, Reading, UK.
- Alcántara-de la Cruz, R., Fernández-Moreno, P. T., Ozuna, C. V., Rojano-Delgado, A. M., Cruz-Hipolito, H. E., Domínguez-Valenzuela, J. A., Barro F. y De Prado, R. (2016). Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1492.
- Alibhai, M. F., y Stallings, W. C. (2001). Closing down on glyphosate inhibition—with a new structure for drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(6), 2944-2946.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P. y Steinrücken, H. C. (1980). The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. *Plant Physiology*, 66(5), 830-834.
- Anderson, D. D., Roeth, F. W. y Martin, A. R. (1996). Occurrence and control of triazine-resistant common waterhemp (*Amaranthus rudis*) in field corn (*Zea mays*). *Weed Technology* 10(3), 570-575.
- Anderson, K. S. y Johnson, K. A. (1990). Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: lessons from EPSP synthase. *Chemical Reviews*, 90(7), 1131-1149.
- Anonymous. (1998). Herbicide resistance and herbicide tolerance denned. *Weed Technology* 12, 789.
- Baerson, S. R., Rodríguez, D. J., Tran, M., Feng, Y., Biest, N. A. y Dill, G. M. (2002). Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant physiology*, 129(3), 1265-1275.

- Baird, D., Upchurch, R., Homesley, W. y Franz, J. (1971). Introduction of a new broadspectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. Proceedings North Central Weed Control Conference 64-68.
- Bakkali, Y., Ruiz-Santaella, J. P., Osuna, M. D., Wagner, J., Fischer, A. J. y De Prado, R. (2007). Late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): mechanisms involved in the resistance to fenoxaprop-p-ethyl. Journal of agricultural and food chemistry, 55(10), 4052-4058.
- Baylis, A. D. (2000). Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 56(4), 299-308.
- Beckie, H. J. y Reboud, X. (2009). Selecting for weed resistance: herbicide rotation and mixture. Weed Technology, 23(3), 363-370.
- Beckie, H. J., Warwick, S. I., y Sauder, C. A. (2012). Basis for herbicide resistance in Canadian populations of wild oat (*Avena fatua*). Weed Science, 60(1), 10-18.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. Journal of Molecular Biology, 340,783-795.
- Boocock, M. R. y Coggins, J. R. (1983). Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. Febs Letters, 154(1), 127-133.
- Bradley, K. W. y Hagood, E. S. (2001a). Identification of a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype resistant to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides in Virginia. Weed technology, 15(4), 623-627.
- Bradley, K. W., Wu, J., Hatzios, K. K. y Hagood, E. S. (2001b). The mechanism of resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides in a johnsongrass biotype. Weed science 49(4), 477-484.
- Bradshaw, L. D., Padgett, S. R., Kimball, S. L. y Wells, B. H. (1997). Perspectives on glyphosate resistance. Weed Technology, 11(1), 189-198.
- Bravin, F., Zanin, G. y Preston, C. (2001). Resistance to diclofop-methyl in two *Lolium spp.* populations from Italy: studies on the mechanism of resistance. Weed research, 41(5), 461-473.
- Bridghes, B. A. (1997). Hypermutation under stress. Nature, 387, 557-558.

- Burgos, N. R., Tranel, P. J., Streibig, J. C., Davis, V. M., Shaner, D., Norsworthy, J. K., y Ritz, C. (2013). Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. *Weed Science*, 61(1), 4-20.
- Burke, I. C., Wilcut, J. W. y Cranmer, J. (2006). Cross-resistance of a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides. *Weed technology*, 20(3), 571-575.
- Burton, J. D., Gronwald, J. W., Keith, R. A., Somers, D. A., Gegenbach, B. G. y Wyse, D. L. (1991). Kinetics of inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by sethoxydim and haloxyfop. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 39:100–109
- Busi, R., Gaines, T. A. y Powles, S. B. (2017). Phorate can reverse P450 metabolism-based herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Pest Management Science* 73:410–417.
- Busi, R., Gaines, T. A., Walsh, M. J. y Powles, S. B. (2012). Understanding the potential for resistance evolution to the new herbicide pyroxasulfone: field selection at high doses versus recurrent selection at low doses. *Weed Research*, 52(6), 489-499.
- Busi, R., Powles, S. B. (2009). Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. *Heredity* 103:318-325.
- Busi, R., Powles, S. B., Beckie, H. J. y Renton, M. (2020). Rotations and mixtures of soil-applied herbicides delay resistance. *Pest Management Science*, 76(2), 487-496.
- Busi, R., Vila-Aiub, M. M. y Powles, S. B. (2011). Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity* 106(5), 817.
- Chen, G., Xu, H., Zhang, T., Bai, C. y Dong, L. (2018). Fenoxaprop-P-ethyl resistance conferred by cytochrome P450s and target site mutation in *Alopecurus japonicus*. *Pest Management Science* 74(7), 1694-1703
- Chen, J., Huang, H. y Zhang, C. (2015). Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta* 242, 859–868.
- Christoffers, M. J. (1999). Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technology* 13, 647-652.

- Christoffers, M. J., Berg, M. L. y Messersmith, C. G. (2002). An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat. *Genome* 45(6), 1049-1056.
- Christopher, J. T. y Holtum, J. A. (2000). Dicotyledons lacking the multisubunit form of the herbicide-target enzyme acetyl coenzyme A carboxylase may be restricted to the family Geraniaceae. *Functional Plant Biology* 27(9), 845-850.
- Claros, M. G., Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry*, 241, 770-786.
- Cocker, K. M., Coleman, J. O. D., Blair, A. M., Clarke, J. H. y Moss, S. R. (2000). Biochemical mechanisms of cross-resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides in populations of *Avena* spp. *Weed research*, 40(4), 323-334.
- Cocker, K. M., Moss, S. R. y Coleman, J. O. (1999). Multiple mechanisms of resistance to fenoxaprop-P-ethyl in United Kingdom and other European populations of herbicide-resistant *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 65(3), 169-180.
- Cocker, K. M., Northcroft, D. S., Coleman, J. O. D. y Moss, S. R. (2001). Resistance to ACCase-inhibiting herbicides and isoproturon in UK populations of *Lolium multiflorum*: mechanisms of resistance and implications for control. *Pest Management Science: antes Pesticide Science*, 57(7), 587-597.
- Collavo, A., Panozzo, S., Lucchesi, G., Scarabel, L. y Sattin, M. (2011). Characterisation and management of *Phalaris paradoxa* resistant to ACCase-inhibitors. *Crop Protection* 30(3), 293-299.
- Corrêa, D. H. y Ramos, C. H. (2009). The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(5), 164-173.
- Cruz-Hipolito, H., Domínguez-Valenzuela, J. A., Osuna, M. D. y De Prado, R. (2012). Resistance mechanism to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Phalaris paradoxa* collected in Mexican wheat fields. *Plant and Soil* 355(1-2), 121-130.

- Cruz-Hipolito, H., Osuna, M. D., Dominguez-Valenzuela, J. A., Espinoza, N. y De Prado, R. (2011). Mechanism of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in wild oat (*Avena fatua*) from Latin America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(13), 7261-7267.
- Cummins, I., Bryant, D. N., y Edwards, R. (2009). Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Plant biotechnology journal* 7(8), 807-820.
- Cummins, I., Cole, D. J. y Edwards, R. (1999). A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *The Plant Journal* 18(3), 285-292.
- Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E., Sellars J.D., Knight, K., Edwards, L., Hughes, D., Kaundun, S. S., Hutchings, S-J., Steel, P.G. y Edwards, R. (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(15), 5812-5817.
- De Carvalho, L. B., Alves, P., Gonzalez-Torralva, F. et al. (2012) Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:615–622.
- De Prado, J. L., Osuna, M. D., Heredia, A. y De Prado, R. (2005). *Lolium rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6), 2185-2191.
- De Prado, R., Jorin, J. y Garcia-Torres, L. (1997). *Weed and crop resistance to herbicides*. Kluwer Academic Publishers ISBN: 0-7923-4581-9.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S. C., Klein, B. K., Shah, D. M., Fraley, R. T. y Kishore, G. M. (1986). Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(18), 6873-6877.
- Délye, C. (2005a). Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Science* 53:728–746

- Délye, C. (2013b). Unravelling the genetic bases of non-target-site based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science* 69(2), 176-187.
- Délye, C., Calmes, E. y Matějček, A. (2002a). SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA-carboxylase inhibiting herbicides. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6-7), 1114-1120.
- Délye, C., Duhoux, A., Pernin, F., Riggins, C. W. y Tranel, P. J. (2015). Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Science* 63:91–115.
- Délye, C., Gardin, J. A. C., Boucansaud, K., Chauvel, B. y Petit, C. (2011b). Non-target-site-based resistance should be the centre of attention for herbicide resistance research: *Alopecurus myosuroides* as an illustration. *Weed Research* 51(5), 433-437.
- Délye, C., Jasieniuk, M. y Le Corre, V. (2013a). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics* 29(11), 649-658.
- Délye, C., Matějček, A. y Gasquez, J. (2002b). PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest management science*, 58(5), 474-478.
- Délye, C., Matějček, A. y Michel, S. (2008). Cross-resistance patterns to ACCase-inhibiting herbicides conferred by mutant ACCase isoforms in *Alopecurus myosuroides* Huds (black-grass), re-examined at the recommended herbicide field rate. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(11), 1179-1186.
- Délye, C., Michel, S. (2005c). ‘Universal’primers for PCR-sequencing of grass chloroplastic acetyl-CoA carboxylase domains involved in resistance to herbicides. *Weed Research*, 45(5), 323-330.
- Délye, C., Michel, S., Bérard, A., Chauvel, B., Brunel, D., Guillemin, J. P. y Le Corre, V. (2010). Geographical variation in resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase-inhibiting herbicides across the range of the arable weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *New Phytologist* 186(4), 1005-1017.

- Délye, C., Pernin, F. y Michel, S. (2011a). Universal PCR assays detecting mutations in acetyl-coenzyme A carboxylase or acetolactate synthase that endow herbicide resistance in grass weeds. *Weed research* 51(4), 353-362.
- Délye, C., Straub, C., Michel, S. y Le Corre, V. (2004). Nucleotide variability at the acetyl coenzyme A carboxylase gene and the signature of herbicide selection in the grass weed *Alopecurus myosuroides* (Huds.). *Molecular Biology and Evolution* 21(5), 884-892.
- Délye, C., Wang, T., y Darmency, H. (2002c). An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. *Planta*, 214(3), 421-427.
- Délye, C., Zhang, X. Q., Chalopin, C., Michel, S. y Powles, S. B. (2003). An isoleucine residue within the carboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to cyclohexanedione inhibitors. *Plant Physiology* 132(3), 1716-1723.
- Délye, C., Zhang, X. Q., Michel, S., Matějček, A., y Powles, S. B. (2005b). Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant physiology* 137(3), 794-806.
- Dill, G. M., Sammons, D., Feng, P., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J. L., Farmer, D., Wright, D. y Haupfear E. A. (2010). Glyphosate: discovery, development, applications and properties. *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management* pp:1–33. Willey & Sons, Nueva Jersey.
- Dillon, A. J., Varanasi, V. K., Danilova, T., Koo, D.H., Nakka, S., Peterson, D., Tranel, P., Friebe, B., Gill, B.S. y Jugulam, M. (2017). Physical mapping of amplified copies of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene in glyphosate-resistant *Amaranthus tuberculatus*. *Plant Physiology*, 173,1226–1234.
- Dinelli, G., Bonetti, A., Marotti, I., Minelli, M., y Catizone, P. (2005). Possible involvement of herbicide sequestration in the resistance to diclofop-methyl in Italian biotypes of *Lolium* spp. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 81(1), 1-12.

- Dominguez-Valenzuela, J. A., Gherekhloo, J., Fernández-Moreno, P. T., Cruz-Hipolito, H. E., Alcántara-de la Cruz, R., Sánchez-González, E. y De Prado, R. (2017). First confirmation and characterization of target and non-target site resistance to glyphosate in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) from Mexico. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 212-218.
- Duke, S.O. y Powles S.B. (2009) Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. *AgBioForum* 12:346-357.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G. (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and cleavage sites. *Protein Science*. 8, 978–984.
- Faris, J., Sirikhachornkit, A., Haselkorn, R., Gill, B. y Gornicki, P. (2001). Chromosome mapping and phylogenetic analysis of the cytosolic acetyl-CoA carboxylase loci in wheat. *Molecular Biology and Evolution* 18(9) 1720-1733.
- Feng, P. C. C., Tran, M., Chiu, T. (2004). Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science* 52:498–505.
- Fernández, L., Haro, L., Distefano, A., Martínez, M.C., Lía, V., Papa, J. C., Olea, I., Tosto, D., Hopp, H. (2013). Population genetics structure of glyphosate resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense* L. Pers) does not support a single origin of the resistance. *Ecology and Evolution*. 3(10), 3388-3400.
- Figueiredo, M. R., Leibhart, L. J., y Reicher, Z. J. (2018) Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid contributes to resistance in a common waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population. *Pest Management Science* 74:2356–2362.
- Fisher, A. J. (2013). Resistencia a herbicidas: mecanismos y mitigación. *Revista Especial de Malezas*, 29, 13-19.
- Franz, J. E., Mao, M. K., y Sikorski, J. A. (1997). Glyphosate: a unique global herbicide. American Chemical Society.
- Friedman, T., y Horowitz, M. (1970). Phytotoxicity of subterranean residues of three perennial weeds. *Weed research* 10(4), 382-385.
- Funke T., Yang Y., Han H., Healy-Fried M., Olesen S., Becker A., Schönbrunn E. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97→Ile and Pro101→Ser in 5-

- enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284:9854–9860 (2009).
- Gaines, T. A., Lorentz, L., Figge, A., Herrmann, J., Maiwald, F., Ott, M. C, Han H., Busi R., Yu Q., Powles S. B. y Beffa, R. (2014). RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. *The Plant Journal* 78(5), 865-876.
- Gaines, T. A., Patterson, E. L. y Neve, P. (2019). Molecular mechanisms of adaptive evolution revealed by global selection for glyphosate resistance. *New Phytologist*, 223: 1770–1775.
- Gaines, T. A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S. T., Shaner, D. L., Nissen S. J., Patzoldt, W. L., Tranel, P. J., Culpepper A. S., Grey, T. L., Webster, T. M., Vencill W. K.; Sammons, R. D., Jiang, J., Preston, C., Leach, J. E. y Westra, P. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 1029-1034.
- García, M. J., Palma-Bautista, C., Rojano-Delgado, A. M., Bracamonte, E., Portugal, J., Alcántara-de la Cruz, R. y De Prado, R. (2019). The Triple Amino Acid Substitution TAP-IVS in the EPSPS Gene Confers High Glyphosate Resistance to the Superweed *Amaranthus hybridus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2396.
- Ge X., d'Avignon, D. A., Ackerman J. J. H. y Sammons R. D. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *PestManagement Science* 66:345–348 (2010).
- Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J., Collavo, A., Sattin, M., Ostrander, E. L., Hall E.L., Sammons R.D. y Preston, C. (2012). Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: a 31P NMR investigation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(5), 1243-1250.
- Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J., Duncan, B., Spaur, M. B. y Sammons, R. D. (2011). Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by 31P NMR. *Pest Management Science*, 67(10), 1215-1221.

- Ghanizadeh, H. y Harrington, K. C. (2017). Non-target site mechanisms of resistance to herbicides. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36(1), 24-34.
- Ghanizadeh, H., Harrington, K. C. y James, T. K. (2016). Genetic inheritance of restricted herbicide translocation in a glyphosate-resistant *Lolium perenne* population. *New Zeal. Journal of agricultural research*. 59, 269–279.
- Goggin, D. E., Cawthray, G. R. y Powles, S. B. (2016). 2,4-D resistance in wild radish: reduced herbicide translocation via inhibition of cellular transport. *Journal of Experimental Botany* 67:3223–3235.
- González-Torralva, F., Rojano-Delgado, A. M., de Castro, M. D. L., Mülleder, N. y De Prado, R. (2012). Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *Journal of plant physiology*, 169(17), 1673-1679.
- Gressel J. (2011). Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Management Science* 67, 253-257.
- Guchhait, R. B., Polakis, S. E., Dimroth, P., Stoll, E., Moss, J., Lane, M. D. (1974). Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli* purification and properties of the biotin carboxylase, carboxyltransferase, and carboxyl carrier protein components. *Journal of Biological Chemistry*, 249(20), 6633-6645.
- Guo, W., Zhang, L., Wang, H., Li, Q., Liu, W. y Wang, J. (2017). A rare Ile-2041-Thr mutation in the ACCase gene confers resistance to ACCase-inhibiting herbicides in shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis*). *Weed Science* 65(2), 239-246.
- Hall, L., Moss, S. y Powles, S. B. (1997). Mechanisms of resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in two resistant biotypes of *Alopecurus myosuroides* (blackgrass): herbicide metabolism as a cross-resistance mechanism. *Pest Biochem Physiol* 57:87–98.
- Han H, Vila-Aiub, M. M., Jalaludin, A., Yu, Q. y Powles, S. B. (2017). A double EPSPS gene mutation endowing glyphosate resistance shows a remarkably high resistance cost. *Plant, Cell and Environment*, 40: 3031–3042.

- Han, H., Yu, Q., Widderick, M. J., y Powles, S. B. (2016). Target-site EPSPS Pro-106 mutations: sufficient to endow glyphosate resistance in polyploid *Echinochloa colona*? *Pest Management Science*, 72(2), 264-271.
- Harring, T., Streibig, J. C. y Husted, S. (1998). Accumulation of shikimic acid: a technique for screening glyphosate efficacy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4406-4412.
- Hatzios, K. K. y Burgos N. R. (2004). Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. *Weed Science* 52:454–467.
- Heap, I. (2019). The international survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org>. Último acceso noviembre 2019.
- Hidayat, I. y Preston, C. (1997). Enhanced Metabolism of Fluazifop Acid in a Biotype of *Digitaria sanguinalis* Resistant to the Herbicide Fluazifop-P-Butyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 57(2), 137-146.
- Hochberg, O., Sibony, M., y Rubin, B. (2009). The response of ACCase-resistant *Phalaris paradoxa* populations involves two different target site mutations. *Weed Research* 49(1), 37-46.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Faris, J. D., Su, X., Gill, B. S., Haselkorn, R. y Gornicki, P. (2002). Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses. *Plant Molecular Biology* 48(5-6), 805-820.
- Hurley, T. M. y Frisvold, G. (2016) Economic barriers to herbicide-resistance management. *Weed Science* 64:585–594
- Hutchings S.J., McIndoea E., Carlinb R. et al., 2019. A triple target-site mutation confers high levels of resistance to glyphosate in an *Amaranthus quitensis* population from Argentina. Oral communication. Resistance 2019, Hertz, UK.
- Iwakami, S., Kamidate, Y., Yamaguchi, T., Ishizaka, M., Endo, M., Suda, H., Nagai, K., Sunohara, Y., Toki, S., Uchino, A., Tominaga, T. y Matsumoto, H. (2019). CYP 81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. *New Phytologist*, 221(4), 2112-2122.

- Iwakami S, Uchino A y Kataoka Y et al (2014) Cytochrome P450 genes induced by bispyribac sodium treatment in a multiple herbicide resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Manag Sci* 70:549–558.
- Iwakami, S., Uchino, A., Watanabe, H., Yamasue, Y. y Inamura, T. (2012). Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. *Pest Management Science* 68(7), 1098-1106.
- Jasieniuk, M., Brûlè Babel, A. L. y Morrison, I. N. (1996). The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science* 44, 176-193.
- Johal, G. S. y Huber D. M. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of agronomy*, 31(3), 144-152.
- Kaloumenos, N. S., y Eleftherohorinos, I. G. (2009). Identification of a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype resistant to ACCase-inhibiting herbicides in Northern Greece. *Weed Technology* 23(3), 470-476.
- Kaundun, S. S. (2010). An aspartate to glycine change in the carboxyl transferase domain of acetyl CoA carboxylase and non-target-site mechanism (s) confer resistance to ACCase inhibitor herbicides in a *Lolium multiflorum* population. *Pest Management Science* 66(11), 1249-1256.
- Kaundun, S. S. (2014). Resistance to acetyl-CoA carboxylase inhibiting herbicides. *Pest Management Science* 70(9), 1405-1417.
- Kaundun, S. S., Bailly, G. C., Dale, R. P., Hutchings, S. J. y McIndoe, E. (2013b). A novel W1999S mutation and non-target site resistance impact on acetyl-CoA carboxylase inhibiting herbicides to varying degrees in a UK *Lolium multiflorum* population. *PLoS One* 8(2), e58012.
- Kaundun, S. S., Hutchings, S. J., Dale, R. P. y McIndoe, E. (2013a). Role of a novel I1781T mutation and other mechanisms in conferring resistance to acetyl-CoA carboxylase inhibiting herbicides in a black-grass population. *PLoS One* 8(7), e69568.
- Koger, C. H. y Reddy, K. N. (2005a) Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* 53:84–89.

- Koger, C. H., Shaner, D. L., Henry, W. B., Nadler-Hassar, T., Thomas, W. E. y Wilcut, J. W. (2005b). Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed science*, 53(5), 559-566.
- Konishi, T., Shinohara, K., Yamada, K. y Sasaki, Y. (1996). Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant and Cell Physiology* 37(2), 117-122.
- Koo, D. H., Molin, W. T., Saski, C. A., Jiang, J. y Putta, K. Jugulam, M., Friebe, B. y Gill, B. S. (2018). Extrachromosomal circular DNA-based amplification and transmission of herbicide resistance in crop weed *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(13), 3332-3337.
- Kozaki, A., Sasaki, Y. (1999). Light-dependent changes in redox status of the plastidic acetyl-CoA carboxylase and its regulatory component. *Biochemical journal*, 339(3), 541-546.
- Labrada, R., Caseley, J. C., y Parker, C. (Eds.). (1994). *Weed management for developing countries* (Vol. 120). Food and Agriculture Org.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lalforest, M., Soufiane, B., Simard, M. J., Obeid, K., Page, E. y Nurse, R. E. (2017). Acetyl-CoA carboxylase overexpression in herbicide-resistant large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Pest Management Science* 73(11), 2227-2235.
- Lebrun, M., Sailland, A., Freyssinet, G. y Degryse, E. (2003). Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. Bayer CropScience SA US Patent N° 6.566.587 pp:1-17.
- Leguizamón, E. S. (2006). *Sorghum halepense* L. Pers. (sorgo de alepo): Base de conocimientos para su manejo en sistemas de producción. Disponible en: www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_combate_de_plagas_y_malezas/94-sorghumhalepense. Ultimo acceso en junio 2019.
- Leslie, T. y Baucom, R. S. (2014). De novo assembly and annotation of the transcriptome of the agricultural weed *Ipomoea purpurea* uncovers gene expression changes associated with herbicide resistance. *G3-Genes Genomes Genetics* 4: 2035-2047.

- Letouzé, A. y Gasquez, J. (2001). Inheritance of fenoxaprop-P-ethyl resistance in a blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) population. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(2-3), 288-296.
- Letouzé, A. y Gasquez, J. (2003). Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes: a suggested mechanism responsible for multiple resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). *Agronomie* 23 (2003) 601–608
- Li, J., Peng, Q., Han, H., Nyporko, A., Kulynych, T., Yu, Q. y Powles, S. (2018). Glyphosate resistance in *Tridax procumbens* via a novel EPSPS Thr-102-Ser substitution. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(30), 7880-7888.
- Li, L., Du, L., Liu, W., Yuan, G. y Wang, J. (2014). Target-site mechanism of ACCase-inhibitors resistance in American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne* Steud.) from China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 110, 57-62.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, 82: 923-928.
- Liu, W., Harrison, D. K., Chalupska, D., Gornicki, P., O'Donnell, C. C., Adkins, S. W, Haselkorn R. y Williams R. R. (2007). Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(9), 3627-3632.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lorentz L. (2012). Molecular and physiological characterization of the glyphosate resistant weeds *Amaranthus* spp. and *Sorghum* spp. PhD Thesis, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Alemania.
- Lorentz, L., Beffa, R., y Kraehmer, H. (2011). Recovery of plants and histological observations on advanced weed stages after glyphosate treatment. *Weed Research*, 51(4), 333-343.
- Lorentz, T.A. Gaines, S.J. Nissen, P. Westra, H. Streck, H.W. Dehne, J.P. Ruiz-Santaella y R. Beffa. (2014). Characterization of glyphosate resistance in *Amaranthus tuberculatus* populations, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62 8134–8142.

- Lorraine-Colwill, D. F., Powles, S. B., Hawkes, T. R., Hollinshead, P., Warner, S. A. J., y Preston, C. (2002). Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74(2), 62-72.
- Lovreet S. S., Malone, J., Boutsalis, P., Preston, C. y Gill, G. (2015). Target-site point mutations conferring resistance to ACCase-inhibiting herbicides in smooth barley (*Hordeum glaucum*) and hare barley (*Hordeum leporinum*). *Weed Science* 63(2), 408-415.
- Ma, R., Kaundun, S. S., Tranel, P. J., Riggins, C. W, McGinness D. L., Hager, A. G., Hawkes, T., McIndoe, E. y Riechers, D. E. (2013) Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. *Plant Physiology* 163:363–377.
- Malone J.M., Morran S., Shirley N., Boutsalis P., Preston C. (2016) EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Bromus diandrus*. *Pest Management Science* 72:81–88.
- Malone, J. M., Boutsalis, P., Baker, J. y Preston, C. (2014). Distribution of herbicide-resistant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles in *Lolium rigidum* across grain cropping areas of South Australia. *Weed Research* 54(1), 78-86.
- Manalil, S. (2014). Evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum* under low herbicide rates: an Australian experience, *Crop Science* 54 461–474.
- Manalil, S., Busi, R., Renton, M. y Powles, S. B. (2011). Rapid evolution of herbicide resistance by low herbicide dosages. *Weed Science*, 59(2), 210-217.
- Maneechote, C., Preston, C. y Powles, S. B. (1997). A diclofop-methyl-resistant *Avena sterilis* biotype with a herbicide-resistant acetyl-coenzyme A carboxylase and enhanced metabolism of diclofop-methyl. *Pesticide Science*, 49(2), 105-114.
- Matthews, N., Powles, S. B. y Preston, C. (2000). Mechanisms of resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase-inhibiting herbicides in a *Hordeum leporinum* population. *Pest Management Science: antes Pesticide Science*, 56(5), 441-447.
- Matzrafi, M., Seiwert, B., Reemtsma, T., Rubin, B. y Peleg, Z. Climate change increases the risk of herbicide-resistant weeds due to enhanced detoxification, *Planta* 244 (2016) 1217–1227.

- McWhorter, C. G. «History, biology, and control of johnsongrass», *Weed Science* vol. 4, pp. 85-121, 1989.
- Menchari, Y., Chauvel, B., Darmency, H. y Délye, C. (2008). Fitness costs associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. *Journal of Applied Ecology* 45(3), 939-947.
- Menendez, J. y De Prado, R. (1996). Diclofop-methyl Cross-Resistance in a Chlorotoluron-Resistant Biotype of *Alopecurus myosuroides*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 56(2), 123-133.
- Mikula, B. C. (1995). Environmental programming of heritable epigenetic changes in paramutant r-gene expression using temperature and light at a specific stage of early development in maize seedlings. *Genetics* 140(4), 1379-1387.
- Moretti, M. L., Van Horn, C. R., Robertson, R., Segobye, K., Weller, S. C., Young, B. G., Johnson W.G., Douglas Sammons R, Wang D., Ge X. y d'Avignon, A. (2018). Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 2. Rapid response physiology and non-target-site resistance. *Pest Management Science*, 74(5), 1079-1088.
- Moss, S. (2019a). Integrated weed management (IWM): why are farmers reluctant to adopt non chemical alternatives to herbicides? *Pest management science* 75(5), 1205-1211.
- Moss, S. R., Cocker, K. M., Brown, A. C., Hall, L. y Field, L. M. (2003). Characterisation of target-site resistance to ACCase-inhibiting herbicides in the weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *Pest Management Science*, 59(2), 190-201.
- Moss, S., Ulber, L., y den Hoed, I. (2019b). A herbicide resistance risk matrix. *Crop protection* 115, 13-19.
- Mousdale, D. M. y Coggins, J. R. (1993). Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L. *Planta*, 163(2), 241-249.
- Naito, K., Zhang, F., Tsukiyama, T., Saito, H., Hancock, C. N., Richardson, A. O., Okumoto, Y., Tanisaka, T. y Wessler, S. R. (2009). Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature* 461, 1130-1134.

- Nakka, S., Thompson, C. R., Peterson D.E. y Jugulam M. (2017). Target site–based and non–target site based resistance to ALS inhibitors in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Science* 65:681–689.
- Nandula, V. K., Wright, A. A., Bond, J. A., Ray, J. D., Eubank, T. W., Molin, W. T. (2014). EPSPS amplification in glyphosate-resistant spiny amaranth (*Amaranthus spinosus*): a case of gene transfer via interspecific hybridization from glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Pest Management Science* 70:1902–1909.
- Nandula, V. Reddy, K. Poston, D. Rimando, A. y Duke, S. (2008). Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. *Weed Science* 56: 344-349.
- Neve, P. y Powles, S. (2005a). Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(6), 1154-1166.
- Neve, P. y Powles, S. (2005b). High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. *Heredity*, 95(6), 485-492.
- Neve, P., Diggle, A., Smith, F. y Powles, S. B. (2003). Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* I: population biology of a rare resistance trait. *Weed Research* 43:404–417.
- Newman, D. (1989). Element stewardship abstract for *Sorghum halepense*. The Nature Conservancy, Tucson, Arizona. September, 11.
- Ngo T.D., 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 Management Science*, 74:1094–1100.
- Nikolau, B., Ohlrogge, J. y Wurtele, E. (2003). Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 211-222.
- Norsworthy, J. K., Ward S. M., Shaw, D. R., Llewellyn R. S., Nichols, R. L., Webste T. M., Bradley, K. W., Frisvold, G., Powles, S, B., Burgos, N. R., Witt, W. W. y Barrett, M. (2012).

- Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. *Weed Science* 60:31–62.
- Oliveira, J. S., Mendes, M. A., Palma, M. S., Basso, L. A. y Santos, D. S. (2003). One-step purification of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, 28(2), 287-292.
- Oliveira, M. C., Gaines, T. A., Dayan, F. E., Patterson, E. L., Jhala, A. J., y Knezevic, S. Z. (2018). Reversing resistance to tembotrione in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from Nebraska, USA with cytochrome P450 inhibitors. *Pest management science*, 74(10), 2296-2305.
- Owen, M. D. (2016). Diverse approaches to herbicide-resistant weed management. *Weed Science* 64(SP1), 570-584.
- Padgett, S. R., Re, D. B., Barry, G. F., Eichholtz, D. E., Xavier, D., Fuchs, R. L., Kishore, G. M. y Fraley, R. T. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready TM gene. (1996). *Herbicide Resistant Crops: Agricultural, Economic, Environmental, Regulatory and Technological Aspects*, ed. by Duke S. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 53–84
- Pan, L., Gao, H., Xia, W., Zhang, T. y Dong, L. (2016). Establishing an herbicide-metabolizing enzyme library in *Beckmannia syzigachne* to identify genes associated with metabolic resistance. *Journal of Experimental Botany* 67(6), 1745-1757.
- Pan, L., Li, J., Zhang, T., Zhang, D. y Dong, L. Y. (2015). Cross-resistance patterns to acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibitors associated with different ACCase mutations in *Beckmannia syzigachne*. *Weed Research* 55(6), 609-620.
- Pan, L., Yu, Q., Han, H., Mao, L., Nyporko, A., Fan, L., Bai, L. y Powles, S. (2019). Aldo-keto reductase metabolizes glyphosate and confers glyphosate resistance in *Echinochloa colona*. *Plant physiology*, 181(4), 1519-1534.
- Panozzo, S., Scarabel, L., Tranel, P.J. y Sattin, M. (2013). Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105:93–101.

- Patterson, E. L., Pettinga, D. J., Ravet, K., Neve, P. y Gaines, T. A. (2018). Glyphosate resistance and EPSPS gene duplication: convergent evolution in multiple plant species. *Journal of Heredity* 109: 117–125.
- Patterson, E. L., Saski, C., Sloan, D. B., Tranel, P. J., Westra, P. y Gaines, T. A. 2019. The draft genome of *Kochia scoparia* and the mechanism of glyphosate resistance via transposon-mediated EPSPS tandem gene duplication. *BioRxiv*. doi: 10.1101/ 600072
- Peeters, N. y Small, I. (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1541(1-2), 54-63.
- Pérez, J. J. (2005). Dimensión ética del desarrollo sostenible de la agricultura. *Revista de Ciencias Sociales* 11(2), 246-255.
- Perez-Jones, A., Park, K. W., Polge, N., Colquhoun, J. y Mallory-Smith, C. A. (2007). Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta*, 226(2), 395-404.
- Perotti, V. E., Larran, A. S., Palmieri, V. E., Martinatto, A. K. y Permingeat, H. R. (2020). Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and technologies. *Plant Science*, 290: 110255.
- Perotti, V. E., Larran, A. S., Palmieri, V. E., Martinatto, A. K., Alvarez, C. E., Tuesca, D. y Permingeat H. R. (2019). A novel triple amino acid substitution in the EPSPS found in a high-level glyphosate resistant *Amaranthus hybridus* population from Argentina. *Pest Management Science* 75: 1242–1251.
- Peterson, M. A., Collavo, A., Ovejero, R., Shivrain, V., y Walsh, M. J. (2018). The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. *Pest management science* 74(10), 2246-2259.
- Petit, C., Bay, G., Pernin, F., y Delye, C. (2010). Prevalence of cross-or multiple resistance to the acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors fenoxaprop, clodinafop and pinoxaden in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in France. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 66(2), 168-177.
- Petit, C., Pernin, F., Heydel, J. M. y Délye, C. (2012). Validation of a set of reference genes to study response to herbicide stress in grasses. *BMC research notes* 5(1), 18.

- Pline-Srnic, W. (2005). Technical performance of some commercial glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(3), 225-234.
- Pognolote J., Bragachini M., Casini C. y Gaido M. B. (2011). Siembra directa. Actualización Técnica N° 58. INTA, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación.
- Pornprom, T., Mahatamnuchoke, P. y Usui, K. (2006). The role of altered acetyl-CoA carboxylase in conferring resistance to fenoxaprop-P-ethyl in Chinese sprangletop (*Leptochloa chinensis* (L.) Nees). *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science* 62(11), 1109-1115.
- Powles, S. B. y Yu, Q. (2010) Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61:317–347.
- Powles, S. B., Lorraine-Colwill, D. F., Dellow, J. J. y Preston, C. (1998). Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed science*, 46(5), 604-607.
- Preston, C. y Powles, S. B. (1998). Amitrole Inhibits Diclofop Metabolism and Synergises Diclofop-methyl in a Diclofop-methyl-resistant Biotype of *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62(3), 179-189.
- Preston, C., Tardif, F. J., Christopher, J. T. y Powles, S. B. (1996). Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 54(2), 123-134.
- REM, 2019. Red de conocimiento de malezas resistentes. Disponible en: <https://www.aapresid.org.ar/rem>. Último acceso en diciembre 2019.
- Rendina, A. R., Craig-Kennard, A. C., Beaudoin, J. D. y Breen, M. K. (1990). Inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by two classes of grass-selective herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38:1282–1287.
- Riar, D. S., Norsworthy, J. K., Johnson, D. B., Scott, R. C. y Bagavathiannan, M. (2011) Glyphosate resistance in a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. *Weed Science* 59:299–304.

- 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
- Saini, R. K., Malone, J., Preston, C. y Gill, G. (2015). Target enzyme-based resistance to clethodim in *Lolium rigidum* populations in Australia. *Weed Science* 63(4), 946-953.
- Saini, R. K., Malone, J., Preston, C. y Gill, G. (2017). Persistence of Resistance Alleles 1781, 2041, and 2078 in the Absence of Herbicide Selection. *Agronomy Journal* 109(5), 1806-1810.
- Salas, R. A., Dayan, F. E., Pan, Z., Watson, S. B., Dickson, J. W., Scott, R. C., & Burgos, N. R. (2012). EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest Management Science*, 68(9), 1223-1230.
- Sammons R.D. y Gaines T.A. (2014) Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science* 70:1367–1377.
- Sasaki, Y. y Nagano, Y. (2004). Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68(6) 1175-1184.
- Scarabel, L., Panozzo, S., Savoia, W., Sattin, M. (2014). Target-Site ACCase-Resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense*) Selected in Summer Dicot Crops. *Weed Technology* 28(2), 307-315
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. y Kabsch, W. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1376-1380.
- Seefeldt, S.S., Jensen, J.E. and Fuerst, E.P. (1995) Log Logistic Analysis of Herbicide Dose Response Relationships. *Weed Technology*, 9, 218-227.
- Shaner, D. L. y Beckie, H. J. (2014). The future for weed control and technology. *Pest Management Science* 70:1329–1339.
- Shaner, D. L., Lindenmeyer, R. B., y Ostlie, M. H. (2012). What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? *Pest management science*, 68(1), 3-9.

- Shaner, D. L., Nadler-Hassar, T., Henry, W. B. y Koger, C. H. (2005). A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, 53(6), 769-774.
- Singh, B. K. y Shaner, D. L. (1998). Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology*, 12(3), 527-530.
- Slack, A., Thornton, P.C., Magner, D. B., Rosenberg, S. M. y Hastings, P. J. (2006). On the mechanism of gene amplification induced under stress in *Escherichia coli*. *Public Library of Science Genetics* 2, 385-398.
- Smith, B. R. (1984). *Methods in Molecular Biology. Proteins. Vol.1*, J. M. Walker (ed). Humana Press, Clifton, New Jersey
- Souza, A., Ferreira, F., Silva, A., Cardoso, A. y Ruiz, H. (1999). Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr. *Planta Daninha*, 17:387-398.
- Sprinkle, P., Meggitt, W. y Penner, D. (1975). Adsorption, action and translocation of glyphosate. *Weed Science* 23: 235-240
- Stallings, W. C., Abdel-Meguid, S. S., Lim, L. W., Shieh, H. S., Dayringer, H. E., Leimgruber, N. K., Stegeman, R.A., Anderson K. S., Sikorski, J A, Padgett, S R y Kishore, G. M. (1991). Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 5046-5050.
- Steinrücken, H. C. y Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94(4), 1207-1212.
- Steinrücken, H. C. y Amrhein, N. (1984). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*: 2. Inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine]. *European journal of biochemistry*, 143(2), 351-357.
- Stewart, C. N., Tranel, P. J., Horvath, D. P., Anderson, J. V., Rieseberg, L. H., Westwood, J. H., Mallory-Smith, C. A., Zapiola, M. L. y Dlugosch, K. M. (2009). Evolution of Weediness and Invasiveness: Charting the Course for Weed Genomics. *Weed Science* 57, 451-462.
- Streibig, J. C. (2003). Assessment of herbicide effects. *EWRS Weed Book*, 44.

- Switzer, C.M. (1957). The existence of 2,4-D-resistant strains of wild carrot, Proc. Northeast, Weed Control Conf. 11 315–318.
- Takano, H. K., Fernandes, V. N., Adegas, F. S., Oliveira Jr, R. S., Westra, P., Gaines, T. A., y Dayan, F. E. (2020). A novel TIPT double mutation in EPSPS conferring glyphosate resistance in tetraploid *Bidens subalternans*. Pest management science. 76(1), 95-102
- Tal, A. y Rubin, B. (2004). Molecular characterization and inheritance of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. Pest Management Science: formerly Pesticide Science 60(10), 1013-1018.
- Tamagnone, L., Merida, A., Stacey, N., Plaskitt, K., Parr, A., Chang, C. F., Lynn, D., Maxwell Dow J., Roberts K. y Martin, C. (1998). Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. The Plant Cell, 10(11), 1801-1816.
- Tani, E., Chachalis, D. y Travlos, I. S. (2015). A glyphosate resistance mechanism in *Conyza canadensis* involves synchronization of EPSPS and ABC-transporter genes. Plant Molecular Biology Reporter 33: 1721–1730.
- Thomas T (1992). Cytogenetics of Avena. In: Marshall HG, Sorrells ME (eds). Oat Science and Technology. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America: Madison, WI, pp 473–507.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22, 4673-80.
- Tong, L. (2013). Structure and function of biotin-dependent carboxylases. Cellular and Molecular Life Sciences 70(5), 863-891.
- Torra J, Rojano-Delgado AM, Rey-Caballero J et al. (2017) Enhanced 2,4-D metabolism in two resistant *Papaver rhoeas* populations from Spain. Frontiers in Plant Science 8:1584.
- Tranel, P. J., Riggins, C. W., Bell, M. S. y Hager, A. G. (2011). Herbicide resistances in *Amaranthus tuberculatus*: a call for new options. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59:5808–5812

- Trigo E. J. (2011). Quince años de cultivos genéticamente modificados en la agricultura argentina. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, Buenos Aires.
- Tuesca, D. y Nisensohn, L. (2001) Resistance of *Amaranthus hybridus* to imazethapyr and clorimuron-ethyl. Pesquisa Agropecuária Brasileira 36:601–606.
- Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M. y Hall, J. C. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. Weed science 51(4), 472-495.
- Van Horn, C. R., Moretti, M. L., Robertson, R. R., Segobye, K., Weller, S. C., Young, B. G., Johnson W.G., Schulz B., Green A.C., Lespérance, M. A. (2018). Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 1. Novel rapid cell death response to glyphosate. Pest Management Science, 74(5), 1071-1078.
- Vencill, W. K., Nichols, R. L., Webster, T. M., Soteris, J. K., Mallory-Smith, C., Burgos, N. R., Johnson, W. G. y McClelland, M. R. (2012). Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. Weed Science 60(SP1), 2-30.
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: a review. Pest Management Science 61:1139–1151.
- Vila Aiub, M. M. y Fischer A. (2014). Resistencia a Herbicidas. En: Malezas e invasoras de la Argentina: ecología y manejo. Fernandez, OA, Leguizamón, E, Acciaresi, HA (Eds.) Editorial de la Universidad Nacional del Sur, Ediuns, Bahía Blanca. pp 425.
- Vila-Aiub, M. M., Balbi, M. C., Distéfano, A. J., Fernández, L., Hopp, E., Yu, Q. y Powles, S. B. (2012). Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. Pest Management Science, 68(3), 430-436.
- Vila-Aiub, M. M., Balbi, M. C., Gundel, P. E., Ghersa, C. M. y Powles, S. B. (2007). Evolution of glyphosate-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean. Weed Science, 55(6), 566-571.

- Vila-Aiub, M. M., Gundel, P. E., Yu, Q. y Powles, S. B. (2013). Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. *Pest Management Science*, 69(2), 228-232.
- Vila-Aiub, M. M., Neve, P. y Powles, S. B. (2005a). Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. *New Phytologist* 167(3), 787-796.
- Vila-Aiub, M. M., Neve, P. y Powles, S. B. (2009a). Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist* 184(4), 751-767.
- Vila-Aiub, M. M., Neve, P. y Powles, S. B. (2009b). Evidence for an ecological cost of enhanced herbicide metabolism in *Lolium rigidum*. *Journal of Ecology*, 97(4), 772-780.
- Vila-Aiub, M. M., Neve, P., Steadman, K. J., Powles, S. B. (2005b). Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. *Journal of Applied Ecology*, 42(2), 288-298.
- Vila-Aiub, M. M., Yu, Q. y Powles, S. B. (2019). Do plants pay a fitness cost to be resistant to glyphosate? *New Phytologist*. 223(2), 532-547.
- Vila-Aiub, M. M., Yu, Q., Han, H. y Powles, S. B. (2015). Effect of herbicide resistance endowing Ile-1781-Leu and Asp-2078-Gly ACCase gene mutations on ACCase kinetics and growth traits in *Lolium rigidum*. *Journal of experimental botany* 66(15), 4711-4718.
- Vila-Aiub, M., Casas, C. y Gundel, P. E. (2018). The role of plant size in the selection of glyphosate resistance in *Sorghum halepense*. *Pest management science*, 74(11), 2460-2467.
- Wakelin, A. M., Lorraine-colwill, D. F., Preston, C. (2004) Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Research* 44:453–459.
- Walsh, C. T., Benson, T. E., Kim, D. H. y Lees, W. J. (1996). The versatility of phosphoenolpyruvate and its vinyl ether products in biosynthesis. *Chemistry and biology*, 3(2), 83-91.
- Wang, C. S., Lin, W. T., Chiang, Y. J. y Wang, C. Y. (2017). Metabolism of fluazifop-P-butyl in resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Taiwan. *Weed science* 65(2), 228-238.

- Wang, H., Li, J., Lv, B., Lou, Y. y Dong, L. (2013). The role of cytochrome P450 monooxygenase in the different responses to fenoxaprop-P-ethyl in annual bluegrass (*Poa annua* L.) and short awned foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 107(3), 334-342.
- Wang, R. J., Zheng, L. Y., Yang, X. Y., Yang, Y., Wang, X. J., Cao, S. G. (2011). Expression of ACCase CT Domain in *E. coli* and Interaction with Herbicide. *Chemical Journal of Chinese Universities*, (12), 25.
- Warwick, S. I., y Black, L. D. (1983). The biology of Canadian weeds: 61. *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Canadian Journal of Plant Science*, 63(4), 997-1014.
- Wauchope, R., Butler, T., Hornsby, A., Augustijn-Beckers, P. y Burt, J. (1992). The SCS/ARS/CES pesticide properties database: select values for environmental decision-making. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 123:1–164.
- Weaver, L. M. y Herrmann, K. M. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science*, 2(9), 346-351.
- White, G. M., Moss, S. R. y Karp, A. (2005). Differences in the molecular basis of resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim in *Lolium multiflorum*. *Weed Research* 45(6) 440-448.
- Wiersma A.T., Gaines T.A., Preston C. et al. (2015) Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. *Planta* 241:463–474.
- Willey, N. J. (2016). *Environmental plant physiology*. Garland Science, pp 323.
- Woodburn, A. (2000). Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science* 56:309–312.
- Xiang, S., Callaghan, M. M., Watson, K. G., y Tong, L. (2009). A different mechanism for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase by tepraloxym. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49), 20723-20727.
- Xu, H., Li, J., Zhang, D., Cheng, Y., Jiang, Y. y Dong, L. (2014). Mutations at codon position 1999 of acetyl-CoA carboxylase confer resistance to ACCase-inhibiting herbicides in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*). *Pest Management Science* 70(12), 1894-1901.

- Yanniccari, M., Gómez-Lobato, M. E., Istilart, C., Natalucci, C., Giménez, D. O., y Castro, A. M. (2017). Mechanism of Resistance to Glyphosate in *Lolium perenne* from Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5, 123.
- Yanniccari, M., Vila-Aiub, M., Istilart, C., Acciaresi, H., y Castro, A. M. (2016). Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is associated with a fitness penalty. *Weed Science*, 64(1), 71-79.
- Yu L. P. C., Yi, S. K. y Tong, L. (2010). Mechanism for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase by pinoxaden. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(51), 22072-22077.
- Yu, Q., Abdallah, I., Han, H., Owen, M. y Powles, S. (2009). Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta*, 230(4), 713-723.
- Yu, Q., Ahmad-Hamdani, M. S., Han, H., Christoffers, M. J. y Powles, S. B. (2013a). Herbicide resistance-endowing ACCase gene mutations in hexaploid wild oat (*Avena fatua*): insights into resistance evolution in a hexaploid species. *Heredity* 110(3), 220.
- Yu, Q., Collavo, A., Zheng, M. Q., Owen, M., Sattin, M. y Powles, S. B. (2007). Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. *Plant physiology* 145(2), 547-558.
- Yu, Q., Han, H., Cawthray, G. R., Wang, S. F. y Powles, S. B. (2013b). Enhanced rates of herbicide metabolism in low herbicide-dose selected resistant *Lolium rigidum*. *Plant, cell and environment*, 36(4), 818-827.
- Yu, Q., Jalaludin, A., Han, H., Chen, M., Sammons, R. D. y Powles, S. B. (2015). Evolution of a double amino acid substitution in the EPSP synthase in *Eleusine indica* conferring high level glyphosate resistance. *Plant Physiology*, pp-00146.
- Yuan, J. S., Abercrombie, L. L., Cao, Y., Halfhill, M. D., Zhou, X., Peng, Y. y Sammons, R. D. (2010). Functional genomics analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. *Weed Science*, 58(2), 109-117.

- Yuan, J. S., Tranel, P. J. y Stewart Jr, C. N. (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in plant science* 12(1), 6-13.
- Yun, M. S., Yogo, Y., Miura, R., Yamasue, Y. y Fischer, A. J. (2005). Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and-susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 83(2-3), 107-114.
- Zagnitko, O., Jelenska, J., Tevzadze, G., Haselkorn, R. y Gornicki, P. (2001). An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(12), 6617-6622.
- Zhang, C., Feng, L. y Tian, X. S. (2018). Alterations in the 5' untranslated region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene influence EPSPS overexpression in glyphosate-resistant *Eleusine indica*. *Pest Management Science*, 74(11), 2561-2568.
- Zhang, H., Tweel, B., y Tong, L. (2004). Molecular basis for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme-A carboxylase by haloxyfop and diclofop. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 5910-5915.
- Zhang, H., Yang, Z., Shen, Y. y Tong, L. (2003). Crystal structure of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase. *Science* 299(5615), 2064-2067.
- Zhang, P., Wu, H., Xu, H., Gao, Y., Zhang, W. y Dong, L. (2017). Mechanism of Fenoxaprop-P-ethyl Resistance in Italian Ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from China. *Weed Science* 65(6), 710-717.
- Zhang, X. Q. y Devine, M. D. (2000). A possible point mutation of plastidic ACCase gene conferring resistance to sethoxydim in green foxtail (*Setaria viridis*). *Weed Science Society of America* (Vol. 40, p. 33).
- Zhang, X. Q. y Powles, S. B. (2006). Six amino acid substitutions in the carboxyl-transferase domain of the plastidic acetyl-CoA carboxylase gene are linked with resistance to herbicides in a *Lolium rigidum* population. *New Phytologist* 172(4), 636-645.
- Zhao, N., Yan, Y., Ge, L. A., Zhu, B., Liu, W. y Wang, J. (2019). Target site mutations and cytochrome P450s confer resistance to fenoxaprop-P-ethyl and mesosulfuron-methyl in *Alopecurus aequalis*. *Pest management science* 75(1), 204-214.