



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**Base genética de la resistencia al herbicida glifosato en una
población de *Amaranthus palmeri* S. Wats de Argentina**

Dra. Valeria E. Perotti

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL

DIRECTOR: Dr. Guillermo Pratta

CO- DIRECTOR: Dr. Marcos Yannicari

2025

Base genética de la resistencia al herbicida glifosato en una población de *Amaranthus palmeri* S. Wats de Argentina

Valeria Elisa Perotti

Lic. en Biotecnología - UNR

Dra. en Ciencias Biológicas - UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, 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 los años 2021 y 2024, bajo la dirección del Dr. Guillermo Pratta y la co-dirección del Dr. Marcos Yanniccari.

Valeria E. Perotti

Guillermo Pratta

Marcos Yanniccari

Defendida:

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo, la guía y el aliento de muchas personas, a quienes quiero agradecer sinceramente.

En primer lugar, a mis directores, Guillermo y Marcos, por su constante predisposición y por acompañarme con dedicación desde el inicio de esta tesis. A Hugo, por su confianza incondicional a lo largo de todo el proceso.

A mis compañeros del laboratorio, por la buena onda de cada día, que hace mucho más ameno nuestro trabajo cotidiano.

A mis amigos, que, de diferentes maneras, siguen siendo parte fundamental de mi vida.

A mis viejos, hermanos, sobrinos y cuñados, por seguir compartiendo nuestras vidas y acompañarnos en las buenas y en las malas.

Y a Iván, Pauli y Jaz, mi familia pequeña, por la paciencia infinita, por el apoyo constante en cada meta que me propuse, y por darme la vida que siempre soñé, y más.

A Iván, Pauli y Jaz

Publicaciones y Presentaciones a Congresos

RESISTENCIA AL HERBICIDA GLIFOSATO EN UNA POBLACIÓN DE *Amaranthus palmeri* S. WATS DE ARGENTINA. Perotti Valeria, Barnada Belén, Salomone Alejandro, Balassone Federico, Permingeat Hugo, Yanniccari Marcos, Pratta Guillermo. LIBRO DE RESÚMENES XXVI Congreso y XLIV Reunión Anual de la SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE ROSARIO. Vol. 1, Núm. 1 (2024) ISSN 2314-1484.

Indice

Abreviaturas.....	VII
Resumen	1
Introducción.....	4
Mecanismos de resistencia a herbicidas	7
Resistencia a glifosato y su impacto en <i>Amaranthus palmeri</i>	8
Genética de la resistencia a herbicidas	11
La genética cuantitativa y su aplicación en el estudio de la resistencia a herbicidas	13
Hipótesis de trabajo	15
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Materiales y Métodos	17
Obtención del material de estudio.....	17
Evaluación fenotípica	17
Genotipado dirigido mediante dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence).....	19
Estimación de frecuencias génicas y genotípicas en la población G1 para <i>EPSPS</i>	20
Aplicación de métodos bioestadísticos	20
Resultados.....	22
Obtención de la población G ₀	22
Caracterización fenotípica y genotipado dirigido de las 25 familias de medio-hermanos seleccionadas (G ₁)	23
Análisis descriptivo de las fuentes de variación	27
Examen del Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) en la población generada (G ₁)	31
Tratamiento bioestadístico y cálculo de heredabilidad en sentido estricto	32
Discusión	42
<i>Amaranthus palmeri</i> : complejidad biológica vs simpleza metodológica	43
Contribución relativa de mecanismos RT y RNT a la resistencia al glifosato en <i>A. palmeri</i>	44
Conclusión.....	47
Bibliografía	48
ANEXO.....	57

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: análisis de la varianza

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

dCAPS: derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EHW: equilibrio Hardy-Weinberg

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

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

h^2 : heredabilidad en sentido estricto

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

MLG: modelo lineal generalizado

MoA: modo de acción

N° de alelos R (número de alelos portadores de la mutación P106S)

P106S: sustitución de la prolina 106 de la EPSPS por serina

pb: pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa

RG: resistente a glifosato

RNT: resistencia no target

RT: resistencia target

TBE: tampón Tris-borato-EDTA

Tot: Totoras

μ l: microlitros

WSSA: Weed Science Society of America, Sociedad Americana de Malezas

Wt: wild type, salvaje

1X: dosis de herbicida recomendada a campo

Resumen

El glifosato es un herbicida no selectivo de amplio espectro que ha sido adoptado masivamente por su eficacia y bajo costo. Sin embargo, su uso intensivo ha derivado en la evolución de resistencia en numerosas malezas. Actualmente, 50 especies en todo el mundo, 15 de ellas en Argentina, presentan resistencia a glifosato. Dentro del género *Amaranthus*, *A. palmeri* resulta ser la más agresiva y económicamente perjudicial.

A. palmeri es una planta dioica, con metabolismo C4, elevada capacidad fotosintética, rápido crecimiento (hasta 4 cm diarios) y gran producción de biomasa. Estas características, junto con su polinización cruzada, alta producción de semillas (hasta 600.000 por planta) y capacidad de adaptación, la convierten en una maleza difícil de controlar. Además, su variabilidad genética facilita la evolución de mecanismos de resistencia.

Los mecanismos de resistencia *target* (RT) en *A. palmeri* incluyen principalmente la mutación P106S en el gen *EPSPS* (que codifica para la enzima blanco de acción del herbicida) y la amplificación del mismo, atribuida repetidamente a la presencia de un ADN extracromosómico circular. Por otro lado, los mecanismos de resistencia *no target* (RNT), como una menor absorción o translocación del herbicida, han sido menos estudiados pero empiezan a cobrar relevancia en ésta y otras malezas.

Nuestro grupo de investigación previamente caracterizó la resistencia a glifosato en una población de *A. palmeri*, identificando la mutación puntual P106S en el gen *EPSPS* como el único mecanismo de RT detectable. No obstante, la supervivencia de ciertos individuos tratados con glifosato, en los cuales se descartó la presencia de ambos mecanismos de RT conocidos hasta el momento, sugirió la posible participación de mecanismos de RNT.

La caracterización de la RNT representa un reto mayor, ya que no depende de una única mutación, sino de múltiples rasgos genéticos heredables que actúan en conjunto. Esto hace necesario aplicar enfoques de genética cuantitativa, que permiten estudiar cómo se combinan diversos genes en la expresión de un rasgo. Hasta ahora, estos métodos han sido poco utilizados en el estudio de malezas, principalmente por la dificultad de generar líneas genéticas controladas y por los recursos necesarios.

En este trabajo se adoptó una estrategia simplificada: a partir de la población resistente de *A. palmeri* mencionada anteriormente se generaron familias de medio-hermanos mediante cruzamientos controlados. Se caracterizaron 25 familias frente a una dosis única de glifosato evaluando cuatro variables fenotípicas: Área foliar, Delta

de área (diferencia entre el área a los 21 días post-aplicación y el área inicial), Biomasa fresca y Biomasa seca, determinando mediante la técnica de dCAPS el genotipo de cada individuo para la presencia/ausencia de la mutación P106S. De esta manera se pudo establecer el N° de alelos R para cada individuo y su valor fenotípico para las cuatro variables analizadas.

Se confirmó que la población estaba en equilibrio Hardy-Weinberg, estableciendo una base genética adecuada para el análisis de la resistencia. Los resultados mostraron que la resistencia al glifosato no puede explicarse completamente por mecanismos de RT, ya que la mutación P106S solo explica una parte de la variabilidad observada. El análisis de varianza reveló una heredabilidad en sentido estricto de 0,40 a 0,49 para la variable "Delta de área", lo que indica un control genético oligogénico significativo, propio de un mecanismo de RNT.

El análisis de las otras variables fenotípicas mediante modelos lineales generalizados permitió ampliar la comprensión de los mecanismos involucrados en la resistencia, apoyando la idea de una acción combinada de los mecanismos RT y RNT. Para el Área foliar, se detectó un efecto significativo atribuible al componente Familia, mientras que la influencia del número de alelos R no mostró significancia estadística. En contraste, las variables de Biomasa seca y Biomasa fresca exhibieron un patrón de respuesta aditivo en función del número de alelos R, con un incremento progresivo en las medias ajustadas desde el genotipo homocigota sensible (rr) hasta el homocigota resistente (RR). Estos resultados respaldan un efecto aditivo de la mutación en el gen *EPSPS*, en concordancia con observaciones previas en otras especies.

En conclusión, la aplicación de métodos de genética cuantitativa, incluso de forma simplificada, permitió desentrañar la arquitectura genética de la resistencia, reforzando la importancia de integrar enfoques moleculares, poblacionales y biométricos para comprender la base genética de la resistencia y diseñar estrategias de control más eficaces.

Palabras Clave: *Amaranthus palmeri*; resistencia a glifosato; heredabilidad

Abstract

Genetic basis of resistance to glyphosate herbicide in a population of *Amaranthus palmeri* S. Wats from Argentina

Previously, our research group characterized glyphosate resistance in a population of *A. palmeri*, identifying the P106S point mutation in the *EPSPS* gene as the only detectable target-site resistance (TSR) mechanism. However, the survival of certain individuals treated with glyphosate—despite the absence of known TSR mechanisms—suggested the possible involvement of non-target-site resistance (NTSR) mechanisms.

In this study, we adopted a simplified approach: half-sibling families were generated through controlled crosses from the aforementioned resistant *A. palmeri* population. Twenty-five families were evaluated following treatment with a single glyphosate dose, using four phenotypic variables: leaf area, area delta, fresh biomass, and dry biomass. Each individual was genotyped for the presence or absence of the P106S mutation using the dCAPS technique.

The population was confirmed to be in Hardy–Weinberg equilibrium. The results showed that glyphosate resistance cannot be fully explained by TSR mechanisms, as the P106S mutation was involved only in part of the observed variability. Analysis of variance revealed narrow-sense heritability estimates ranging from 0.40 to 0.49 for the variable “area delta,” indicating a significant oligogenic genetic component, consistent with an NTSR mechanism.

Further analysis of the remaining phenotypic variables using a generalized linear model (MLGM) also supported the involvement of both TSR and NTSR mechanisms in conferring resistance.

In conclusion, methods of quantitative genetics have allowed knowing the genetics of glyphosate resistance in *A. palmeri*. It reinforces the importance of integrating molecular, biometrics and population approaches to understanding genetic basis of herbicide resistance as input to designing control strategies.

Key words: *Amaranthus palmeri*; resistance to glyphosate; heritability

Introducción

La creciente demanda de alimentos a nivel mundial es un factor de gran importancia en la transformación de los sistemas agropecuarios actuales. Éstos deben maximizar los rendimientos logrando óptimas condiciones ecofisiológicas para el desarrollo de los cultivos. Por lo tanto, cualquier amenaza para los sistemas de producción afecta directamente la sostenibilidad global. Una de estas amenazas se asocia a procesos de enmalezamientos que provocan pérdidas estimadas de más del 30% del rendimiento (Oerke, 2006).

Las malezas son poblaciones vegetales que crecen en ambientes perturbados por el hombre sin haber sido sembradas (Leguizamón, 2008). La presencia de malezas en los agroecosistemas causa considerables pérdidas en el rendimiento y calidad del cultivo e incrementa los costos de producción. Esta disminución en el rendimiento y la calidad se debe a que las malezas compiten con las plantas cultivadas por los recursos ambientales, hospedan insectos y microorganismos que pueden transmitir enfermedades, y pueden liberar compuestos químicos que inhiben el crecimiento del cultivo. Además, obstruyen el proceso de cosecha, lo que incrementa los costos de tales operaciones y contaminan la producción (Labrada et al., 1994).

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

En la agricultura actual, el control químico de las malezas se realiza por medio de la aplicación de herbicidas, siendo la principal herramienta en todos los programas de manejo de malezas (Anderson, 1996; Owen, 2016). Los herbicidas son productos químicos capaces de alterar la fisiología de la planta causando la muerte o un desarrollo anormal de la misma (Cobb, 2022).

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

La Sociedad Americana de Malezas (WSSA, Weed Science Society of

America) y el Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas (HRAC, Herbicide Resistance Action Committee) desarrollaron esquemas de clasificación basados en el modo de acción (MoA) de los herbicidas. Dicha clasificación de herbicidas facilita la rotación de modos de acción, lo cual es fundamental en el control de las malezas, para variar la presión de selección ejercida y así, retrasar la aparición de malezas resistentes.

Cuando se aplica un herbicida, se crean artificialmente condiciones ambientales negativas extremas para la vegetación en general. Dentro de una comunidad o dentro de la población de una especie existe, en general, una gran diversidad, lo que implica que algunos genotipos, eventualmente, puedan sobrevivir frente a esa agresión. Si este ambiente, artificialmente generado, persiste y/o se reitera en el tiempo lo que se logra es una reducción significativa en la frecuencia de los genotipos susceptibles y un incremento de los resistentes o tolerantes (Papa, 2002). Por lo tanto, el uso continuo del mismo herbicida o la aplicación de herbicidas con el mismo MoA inevitablemente condujo a la selección de poblaciones de malezas resistentes (Shaner, 2014).

La resistencia de malezas a herbicidas es un proceso evolutivo y, según Powles y Yu (2010), su dinámica e impacto dependen de los factores genéticos, la biología de las especies de malezas, el herbicida y aspectos técnicos (Figura 1).

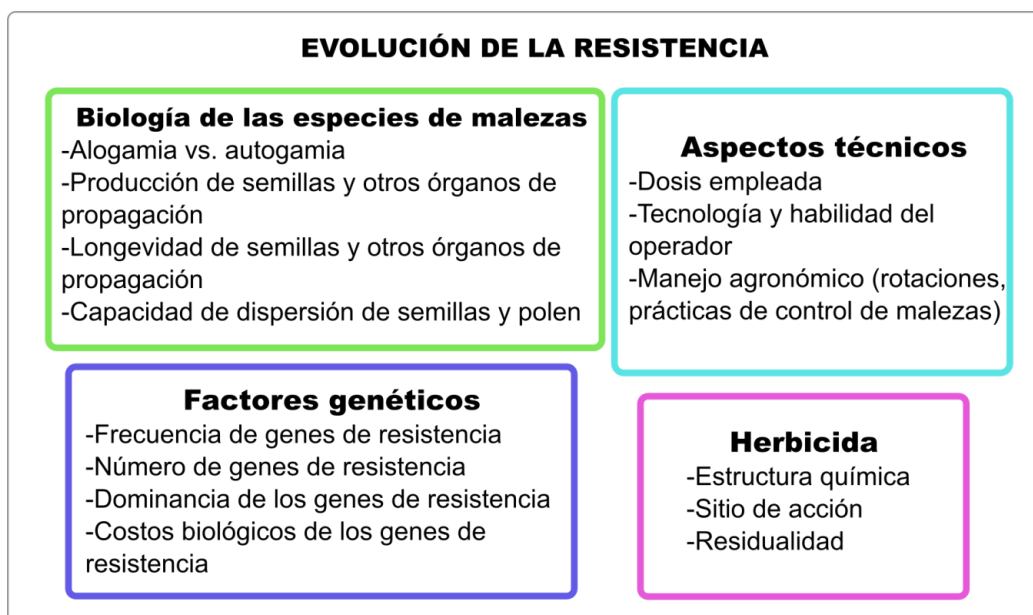


Figura 1. Resumen de los factores que influyen en la evolución de las malezas resistentes a herbicidas. Adaptado de Powles y Yu, 2010.

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

Por otro lado, la biología de las especies de malezas condiciona la difusión de la resistencia en la población. El porcentaje de alogamia y autogamia, la producción de semillas y su longevidad en el banco de semillas del suelo y el flujo génico por medio de semillas y polen cobran trascendencia al considerar sus efectos sobre la dispersión y frecuencia de genes de resistencia (Jasieniuk et al., 1996; Busi et al., 2008).

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

Por último, los aspectos técnicos que incluyen las dosis empleadas, la tecnología y la habilidad del operador para llevar a cabo la tarea de control químico junto a otros factores de manejo agronómico (prácticas alternativas de control de malezas, rotación de cultivos y principios activos) son de gran importancia y estos factores son los primeros sobre los que se puede actuar para minimizar los riesgos de aparición de malezas resistentes (Jasieniuk et al., 1996, Norsworthy et al., 2012; Perotti et al., 2020).

Las malezas pueden ser tolerantes o adquirir resistencia a un herbicida particular, por lo cual resulta relevante diferenciar estos dos conceptos que muy frecuentemente son confundidos. La tolerancia es la capacidad natural y heredable que tienen todos los individuos de una especie de soportar la dosis de uso de un herbicida debido a características morfológicas y/o fisiológicas que le son propias; por lo tanto, las poblaciones tolerantes a un herbicida nunca fueron susceptibles (WSSA, 1998; Papa, 2002). Cabe señalar que, aun dentro de la tolerancia, puede existir una sensibilidad diferencial entre biotipos (variabilidad intraespecífica) (Panigo et al., 2012). Por otro lado, la resistencia es la capacidad natural y heredable de un subgrupo de individuos dentro de una población de una especie de no ser controlada por un

herbicida que con anterioridad le afectaba intensamente (WSSA, 1998). Así, la resistencia representa una capacidad adquirida de sobrevivir y reproducirse frente a la acción fitotóxica de un herbicida.

Las malezas resistentes comenzaron a ser un problema en la década de 1970 y a principios de la década de 1980 debido a las aplicaciones repetidas de atrazina y simazima en los cultivos de maíz. Los productores recurrieron a los herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) y de la de la acetil coenzima A carboxilasa (ACCase) en la década del '80 para controlar las malezas resistentes a las triazinas; y luego, a cultivos transgénicos resistentes a glifosato, en la década de '90, para controlar las malezas resistentes a inhibidores de la ALS, ACCase y triazinas. La adopción extensiva de cultivos transgénicos resistentes a herbicidas llevó a la industria agroquímica a invertir menos en el desarrollo de nuevos principios activos y menos aún en nuevos MoA. La rápida eficacia combinada con la simplicidad de operación de estos sistemas resultó en el uso excesivo de un pequeño número de herbicidas, lo que favoreció el aumento del número de casos de malezas resistentes (Heap, 2014).

Mecanismos de resistencia a herbicidas

Múltiples mecanismos de resistencia que interfieren con la acción del herbicida han evolucionado en las malezas. Estos mecanismos se pueden dividir en dos categorías amplias: los mecanismos asociados al sitio de acción (o *target*) y los mecanismos no asociados al sitio de acción (o *no target*).

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

Los mecanismos de RT incluyen: 1) una sobreproducción de la proteína blanco por mutaciones en regiones regulatorias o por amplificación génica, que sobrepasa la actividad inhibitoria de los herbicidas, 2) mutaciones en el gen blanco que modifican la organización tridimensional y las propiedades electroquímicas de la proteína blanco, disminuyendo la afinidad de unión con el mismo. En el caso de la RNT, los mecanismos incluyen: 1) una reducción en la penetración del herbicida por alteraciones en las propiedades de la cutícula de la planta, 2) una translocación

reducida del herbicida hacia el sitio de acción, 3) una degradación metabólica aumentada del herbicida, 4) una neutralización aumentada de moléculas citotóxicas generadas por la acción del herbicida (Délye et al., 2013^a). De lo expresado se puede deducir que mientras que los mecanismos RT son generalmente monogénicos o cualitativos, los mecanismos de RNT tienen base oligo o poligénica, o sea, son caracteres cuantitativos.

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

Actualmente, la base de datos de malezas resistentes a herbicidas www.weedscience.com (Heap, 2025) informa que se ha desarrollado resistencia a 23 de los 26 sitios de acción de herbicidas conocidos, siendo los grupos más problemáticos los inhibidores de la ACCasa, de la ALS, de la EPSPS, de la PPO, del fotosistema II y las auxinas sintéticas. No obstante, en muchos casos se reporta la resistencia, confirmada por curvas dosis-respuesta, sin dilucidar el mecanismo interviniente.

Resistencia a glifosato y su impacto en *Amaranthus palmeri*

El glifosato es un herbicida no selectivo, sistémico y post-emergente que controla más especies de malezas que cualquier otro herbicida conocido. La efectividad del glifosato en cultivos resistentes al mismo, combinada con su amplio espectro de control a un costo relativamente bajo, condujo a una tasa de adopción rápida en soja, maíz, algodón y canola. Desde su adopción ha habido un aumento constante en el número de las especies de malezas resistentes a glifosato en todo el mundo (Heap y Duke, 2017). Actualmente, 50 especies de malezas han desarrollado resistencia a glifosato en los cinco continentes (Heap, 2025) y en Argentina, 15 de estas especies ya han sido detectadas.

De los 163 géneros de la familia Amaranthaceae, el único género que ha desarrollado resistencia a glifosato es *Amaranthus*. Cuatro especies de este género poseen resistencia a glifosato: *A. palmeri*, *A. tuberculatus*, *A. hybridus* y *A. spinosus*, todas ellas vulgarmente conocidas como “yuyos colorados” (Yanniccari et al., 2022). Estas malezas son las de mayor abundancia en nuestro país, con 20,5 millones de hectáreas afectadas, siendo las provincias de Córdoba, Buenos Aires y Santa Fe las que concentran el 75% de la superficie afectada (REM, 2025).

De estas especies, la que mayor impacto económico tiene en los cultivos es *A. palmeri* (Heap y Duke, 2017). Brevemente, se trata de una especie anual, diclino dioica, de metabolismo C4 con alta capacidad fotosintética, nativa del sudoeste de los Estados Unidos y Norte de México. Posee una tasa de crecimiento diario de 2-4 cm/día (plantas erectas pueden alcanzar una altura superior a los 2,5 m), siendo este crecimiento y también su ganancia de biomasa mayor al de otras especies del género *Amaranthus*. Este rápido crecimiento implica un mayor consumo de agua y nutrientes, favorecido por su sistema radicular profundo y ramificado, y una mayor competencia por el espacio y la luz, para lo cual *A. palmeri* destina gran parte de su biomasa hacia sus hojas (Palmieri, 2020). Al ser una especie dioica, la polinización es cruzada, lo que incrementa la variabilidad genética y la tasa de evolución de los mecanismos de resistencia, ya que además puede hibridar con otras especies del género (Trucco et al., 2007). Recientemente, se observó que el estrés hídrico afecta la sincronía de floración y la expresión sexual en *A. palmeri*. Bajo condiciones de estrés hídrico se produce un desfase en el período de antesis entre las plantas con flores masculinas y femeninas y un aumento en la relación pies femeninos/masculinos (Mesgaran et al., 2019). Las plantas de *A. palmeri* pueden producir hasta 600.000 semillas, las cuales son capaces de germinar durante toda la estación de crecimiento (Jha et al., 2007; Tuesca et al., 2013). Adicionalmente, algunos autores postulan que es una especie apomíctica facultativa (Ribeiro et al., 2014). Estas características biológicas convierten a *A. palmeri* en una maleza sumamente agresiva y muy difícil de manejar eficazmente con los recursos tecnológicos actualmente disponibles.

La resistencia a glifosato en *A. palmeri* está asociada principalmente a mecanismos *target*. La amplificación del gen *EPSPS* ha sido el mecanismo de RT más común descrito en esta especie (Gaines et al., 2010; Küpper et al., 2017). Este no posee un costo biológico para *A. palmeri*, lo cual lo hace un mecanismo de resistencia a glifosato importante y generalizado (Vila-Aiub et al., 2014). Recientemente, se ha propuesto la participación de una amplificación basada en ADN circular extracromosómico como el mecanismo genético presente en una población de *A. palmeri* del estado de Georgia, en Estados Unidos (Koo et al., 2018). Por otro lado, se ha encontrado la sustitución P106S en la EPSPS de algunas poblaciones de yuyo colorado de México y Argentina (Domínguez-Valenzuela et al., 2017; Kaundun et al., 2019; Larran et al., 2020) como mecanismo de RT contribuyente.

Los mecanismos de RNT a glifosato parecían no ser tan relevantes en *A. palmeri*. Sin embargo, algunas poblaciones de esta especie resistentes a glifosato, recolectadas en campos de algodón, mostraron mecanismos de RNT y RT

(Domínguez-Valenzuela et al., 2017). La caracterización de los escasos mecanismos de RNT detectados en el género demostró una absorción reducida y una translocación alterada del glifosato (Domínguez-Valenzuela et al., 2017; Palma-Bautista et al., 2019).

Nuestro grupo de trabajo caracterizó la resistencia a glifosato en tres poblaciones de *A. palmeri* con diferentes niveles de resistencia agronómica (poblaciones que llamamos r1, R2 y R3), hallando la mutación P106S como único mecanismo de RT contribuyente. Resultó interesante la supuesta presencia de un mecanismo RNT contribuyente en la población R3 (población de Totoras, objeto de este proyecto), dada la supervivencia a glifosato de plantas de dicha población en las cuales se habían descartado los mecanismos de RT (Larran et al., 2020). A diferencia de lo reportado para otras poblaciones de la especie, se descartó la presencia del mecanismo de amplificación génica de EPSPS. En sintonía con esto, un estudio reciente concluye que los biotipos resistentes a glifosato (RG) de *A. palmeri* de Argentina habrían evolucionado localmente a partir de la introducción de la especie hacia 1980, a diferencia de lo acontecido en Uruguay y Brasil, donde el mecanismo preponderante sí parece ser el aumento del número de copias del gen *EPSPS*, probablemente debido a la introducción en estos países de biotipos ya resistentes (Gaines et al., 2020a).

Finalmente, es imperioso destacar un estudio genético de poblaciones RG de *A. tuberculatus* (Kreiner et al., 2020), que demuestra que la contribución de mecanismos poligénicos en la evolución de la resistencia (RNT) ha sido notablemente subestimada. Dado que los fenotipos determinados por sistemas poligénicos son estudiados por métodos de la Genética Cuantitativa, resulta de interés combinar enfoques moleculares, mendelianos, poblacionales y biométricos a fin de aportar mayor certidumbre al conocimiento de su estructura y su función. Al respecto, un reciente artículo de perspectiva señala la importancia del enfoque integral mencionado (León et al., 2020).

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

fundamentalmente para hacer frente a poblaciones con resistencia múltiple.

Genética de la resistencia a herbicidas

La herencia y la base genética de los distintos mecanismos de resistencia tienen indudablemente implicaciones evolutivas. Como se ha descrito anteriormente, muchos caracteres de resistencia, particularmente en la RT, requieren de un cambio en una sola enzima y, en consecuencia, se heredan como caracteres monogénicos. Además, los alelos de resistencia a herbicidas a menudo actúan de forma aditivo-dominante. Debido a esta naturaleza monogénica, aditivo-dominante de muchas resistencias a herbicidas, su evolución puede ser rápida y pueden dispersarse efectivamente tanto por semillas como por polen (Jasieniuk et al., 1996).

La naturaleza aditivo-dominante de muchos caracteres de resistencia a herbicidas significa que el alelo de resistencia a menudo se seleccionará en plantas heterocigóticas, especialmente en casos en los que la magnitud de la resistencia es alta. Por ejemplo, una simple mutación en ALS puede conferir coeficientes de resistencia de 100 veces o más, en relación a biotipos sensibles (Foes et al., 1998). En tales casos, los heterocigotos y las plantas homocigotas resistentes tendrán respuestas similares a las dosis de campo típicas del herbicida, incluso si el alelo no es completamente dominante. En este caso puede considerarse «funcionalmente» dominante. Por el contrario, cambios de un solo aminoácido en EPSPS confieren niveles muy modestos de resistencia (normalmente, 10 veces o menos). En *Eleusine indica*, una mutación en EPSPS mostró ser aditiva (Huffman et al., 2016). En consecuencia, en este caso, las plantas heterocigotas para dicha mutación podrían controlarse con las dosis máximas recomendadas de glifosato, y el uso de dosis reducidas fomentaría la evolución de la resistencia.

Los ejemplos conocidos de resistencia a herbicidas heredada como carácter recesivo se limitan a la RT a herbicidas que se unen a la tubulina y a unos pocos casos de resistencia a herbicidas auxínicos. Debido a la naturaleza recesiva de estos caracteres, este tipo de resistencia se ha observado casi exclusivamente en especies autógamas (Gaines et al., 2020^b).

La discusión de la herencia de la resistencia a herbicidas hasta aquí ha incluido sólo genes nucleares. Una excepción importante a la herencia nuclear de la resistencia a herbicidas es la herencia materna de la resistencia a los inhibidores del PSII, descrita hace más de 40 años (Machado et al., 1978). Ahora se sabe que la base de esta herencia materna es la proteína D1 insensible a los herbicidas, que está codificada por un gen cloroplástico y, por tanto, transmitida sólo por vía materna. Para

las especies predominantemente autóгамas, la falta de dispersión de este rasgo de resistencia mediada por el polen no tiene grandes consecuencias. Sin embargo, en las especies alógamas, la diseminación de los caracteres heredados exclusivamente por vía materna muestra un notable retraso de la evolución de la resistencia respecto a la herencia nuclear. Esto podría explicar por qué la RNT a la atrazina codificada por el núcleo es más común que la RT a la atrazina heredada por vía materna en *A. tuberculatus* (Patzoldt et al., 2003). No obstante, se sabe que la RT a inhibidores del PSII también incurre en una penalización significativa de la aptitud (Gronwald, 1994), lo que también desfavorecería la evolución de esta resistencia.

La herencia de la resistencia a glifosato conferida por la duplicación de *EPSPS* en algunos casos es coherente con un modelo de un solo gen. Esta aparente herencia monogénica ocurre cuando las copias se encuentran juntas en el genoma como repeticiones en tándem (Jugulam et al., 2014). En otros casos, especialmente en *A. palmeri*, las copias *EPSPS* están presentes como ADN circular extracromosomal, como se mencionó anteriormente y, en consecuencia, la herencia no sigue un modelo de gen único. De hecho, el número de copias de *EPSPS* parece ser inestable en la transmisión genética, ya que la progenie segregante F2 de *A. palmeri* fue muy variable en cuanto al número de copias de *EPSPS*, desde menos que el número de copias del progenitor hasta más que la suma de ambos progenitores (Gaines et al., 2011).

Por otra parte, la RNT a veces muestra una herencia que sigue un modelo de un solo gen. Algunos ejemplos son la resistencia a atrazina en *A. tuberculatus*, la resistencia a paraquat en *Lolium rigidum*, la resistencia a glifosato en *Conyza canadensis*, y resistencia a 2,4-D en *Sisymbrium orientale* (Huffman et al., 2015; Dang et al., 2018; Zelaya et al., 2004). No obstante, con mayor frecuencia, la NTSR parece estar mediada por múltiples genes.

La naturaleza multigénica de la RNT a menudo se ha descrito como resistencia «progresiva», en la que la magnitud de la resistencia aumenta lentamente con la selección repetida de herbicidas, presumiblemente debido al apilamiento de alelos de resistencia de pequeño efecto en la población (Gressel, 2009).

Adicionalmente, la evolución de la RNT también podría implicar factores epigenéticos (Markus et al., 2018). Por ejemplo, los cambios en el estado de metilación de un gen pueden afectar a su expresión. La participación epigenética en la resistencia a herbicidas es un tema poco estudiado, con sólo algunos antecedentes como la observación de la metilación diferencial de *EPSPS* entre biotipos resistentes y sensibles al glifosato de *C. canadensis* (Margaritopoulou et al., 2018). Sin embargo, aún no está claro si esta metilación diferencial contribuye a la resistencia.

Interesantemente, en *A. palmeri* se ha propuesto que plantas madre expuestas a condiciones de estrés ambiental podrían inducir cambios epigenéticos en determinados rasgos fenotípicos de su descendencia, lo que favorecería su supervivencia frente a la acción de herbicidas (Osipitan et al., 2021).

La genética cuantitativa y su aplicación en el estudio de la resistencia a herbicidas

En términos genéticos, una población se define como un conjunto de individuos que pertenecen a una especie dotada de reproducción sexual, que constituyen una unidad reproductiva, es decir, que se reproducen mediante cruzamientos entre sus miembros. La población se puede describir en cada generación y en cuanto a la transmisión de una generación a otra. La descripción de los caracteres hereditarios variables sólo adquiere pleno sentido en un contexto poblacional.

En genética de poblaciones, el principio de Hardy-Weinberg establece que en una población grande, con apareamiento al azar, en ausencia de fuerzas sistemáticas de cambio (migración, mutación y selección) las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación, guardando, además, una relación simple entre ellas (Falconer, 1996). La relación es ésta: si las frecuencias génicas de dos alelos entre los padres son p y q , entonces las frecuencias genotípicas en la progeie son p^2 , $2pq$ y q^2 (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias génicas de los padres y genotípicas de la progeie en una población en equilibrio Hardy-Weinberg.

	Genes		Genotipos		
	A_1	A_2	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
Frecuencias	p	q	p^2	$2pq$	q^2

Gráficamente, los valores probables de frecuencias génicas y genotípicas en una población en equilibrio estarán comprendidos en las posibilidades representadas en la Figura 2.

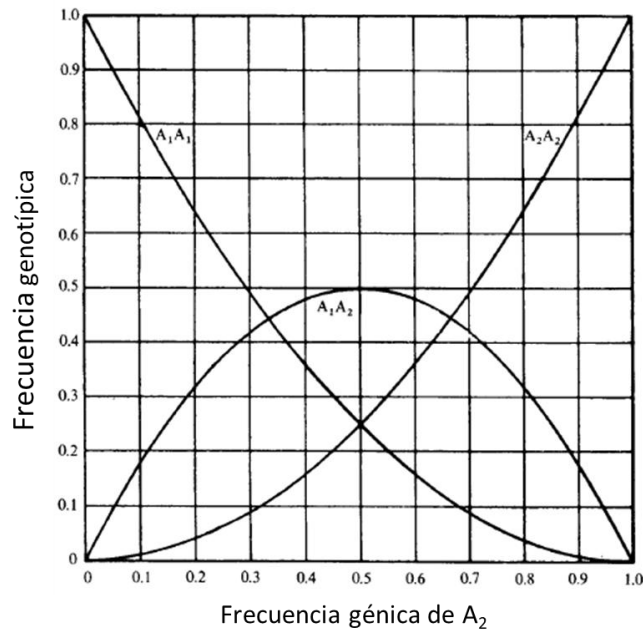


Figura 2. Relación entre las frecuencias genotípicas y la frecuencia génica para dos alelos en una población en equilibrio Hardy-Weinberg.

Las poblaciones de malezas en campos de producción agrícola son sometidas al manejo actual basado principalmente en herramientas de control químico (herbicidas), por lo que es difícil suponer que se encuentren en equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), dado el fenómeno de selección constante mencionado. No obstante, en ausencia de esta presión de selección, como proponemos en esta tesis para la generación de las familias de medio-hermanos, una generación sería suficiente para restablecer dicho equilibrio, por lo que merece la pena la pregunta y su evaluación.

Como se mencionó en el apartado anterior, la población objeto de estudio de esta tesis es una población de *A. palmeri* previamente caracterizada a nivel molecular, donde la mayoría de los individuos presentó un mecanismo de resistencia por mutación de punto en la conocida prolina 106 del gen *EPSPS*, blanco de inhibición del glifosato, aunque se detectaron unos pocos individuos sobrevivientes a la aplicación del herbicida que no presentaban ningún mecanismo RT (ni mutación de punto ni aumento en el número de copias). Esto nos llevó a plantear la hipótesis de que existe un mecanismo RNT contribuyendo al fenotipo de resistencia observado. Dicho fenotipo, bajo este supuesto, constituye un carácter cuantitativo.

La genética cuantitativa proporciona enfoques comunes para la mejora de cultivos; muchos esquemas de selección están bien descritos y estos podrían adaptarse a la mayoría de los casos de estudio, ya sea para interpretar los patrones de herencia, diseñar y preparar material vegetal adecuado para el estudio de los

mecanismos de resistencia, o para simular el funcionamiento de una población al inicio de la resistencia bajo diversas presiones de selección.

Así, el enfoque metodológico postulado consiste en utilizar herramientas de la Genética Cuantitativa para obtener una estimación de la varianza aditiva para la resistencia, a partir de la cual se puede estimar la heredabilidad del carácter en una población donde se encuentran presentes los dos tipos de mecanismos (RT y RNT).

Para esto, se propone que la asignación dicotómica mendeliana de fenotipos “*resistente*” y “*susceptible*” puede resolverse en una medida biométrica de variación continua a través de cuatro variables fenotípicas: Área foliar, Delta de área, Biomasa fresca y Biomasa seca. También se plantea la determinación de la contribución de cada mecanismo, considerando que la presencia del primero (RT) puede identificarse *a priori* mediante la técnica molecular de dCAPS. El efecto de los poligenes puede medirse a través de la heredabilidad, para lo que existen numerosos modelos estadísticos, los cuales asumen que la población está en EHW. En este caso, se propuso trabajar con familias de medio-hermanos para estimar la heredabilidad en sentido estricto, aplicando la metodología descrita en Kearsey and Pooni (1996) respecto a desglosar la regresión dentro de las familias de medio-hermanos, calcular mediante la pendiente el efecto de los genes mayores (RT) y con el residual, el efecto de los genes menores (RNT).

Hipótesis de trabajo

La población de *Amaranthus palmeri* S. Wats recolectada a campo en la zona de Totoras, provincia de Santa Fe, con resistencia a glifosato presenta varianza genética para dicho carácter y dicha varianza se desglosa en dos componentes: un componente que se debe a los genes mayores (mecanismo de RT) y un componente de genes menores (mecanismo de RNT).

Objetivo general

Establecer las bases genéticas de la resistencia al herbicida glifosato hallada en una población de *A. palmeri* de Totoras.

Objetivos específicos

1. Evaluar fenotípicamente cada una de las familias de medio-hermanos generadas a partir de semillas provenientes de la población original de *A. palmeri* de Totoras.
2. Estimar las frecuencias génicas y genotípicas en la población para el alelo *EPSPS P106S*.
3. Aplicar métodos bioestadísticos para determinar la contribución de cada mecanismo, RT y RNT, y si estos últimos son efectivamente multigénicos.

Materiales y Métodos

Obtención del material de estudio

La población de *Amaranthus palmeri* resistente a glifosato (R3) que dio origen a esta tesis se caracterizó previamente (Larran et al., 2020), obteniéndose las curvas Dosis-Respuesta que se muestran en el Anexo (Figura S1). A partir de semillas de dicha población R3 se cultivaron bajo condiciones controladas (25°C con un fotoperíodo de 16:8 horas día/noche y una intensidad lumínica de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 148 plantas de *A. palmeri*, 58 de las cuales resultaron pie femenino y 90 pie masculino. El sustrato consistió en una mezcla de tierra, arena y perlita (70-20-10%, respectivamente). Para lograr la panmixia en estas condiciones artificiales de cultivo, se propició la polinización de las inflorescencias femeninas manualmente por diseminación periódica de una mezcla de polen recolectado de las 90 plantas masculinas. Luego, se cosecharon y limpiaron separadamente las inflorescencias maduras provenientes de cada madre y las semillas así obtenidas se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización. De este modo se obtuvieron 58 familias de medio-hermanos.

Cabe señalar que las 58 madres fueron genotipadas para la presencia/ausencia de la mutación en la prolina 106 del gen *EPSPS*, seleccionándose luego 25 familias para la caracterización fenotípica y molecular. Dicha caracterización fue realizada en 9 plantas por familia, en promedio, lo que dio un total de 228 plantas analizadas.

Evaluación fenotípica

Se evaluaron en promedio 9 individuos de cada una de las 25 familias de medio-hermanos seleccionadas, estableciendo como variables cuantitativas del nivel de daño producido por una aplicación de glifosato 1/2X (540 g i.a./ha) luego de los 21 días de la aplicación, la Biomasa fresca y seca de cada individuo (parte aérea) así como también el Área foliar total determinada mediante el *software* Easy Leaf Area (Easlon y Bloom, 2014). Además, se registró el área de cobertura total inicial *in planta* (Área inicial), para considerar la posible heterogeneidad en cuanto al tamaño al momento de la aplicación. Una cuarta variable denominada “Delta de área” fue calculada a partir de la diferencia entre el Área foliar o Área final (21 días post-aplicación) y el Área inicial.

Cabe aclarar que la Biomasa fresca se determinó en una balanza analítica (Boeco) inmediatamente luego de la recolección de las muestras y la Biomasa seca,

luego del secado en estufa a 60 °C durante 48 horas. Con respecto a la determinación del área foliar, se utilizó el *software* Easy Leaf Area con la referencia de 2 cm² exigida por el programa (cuadrado rojo). La siguiente figura ejemplifica las determinaciones realizadas en cada momento (Figura 3).

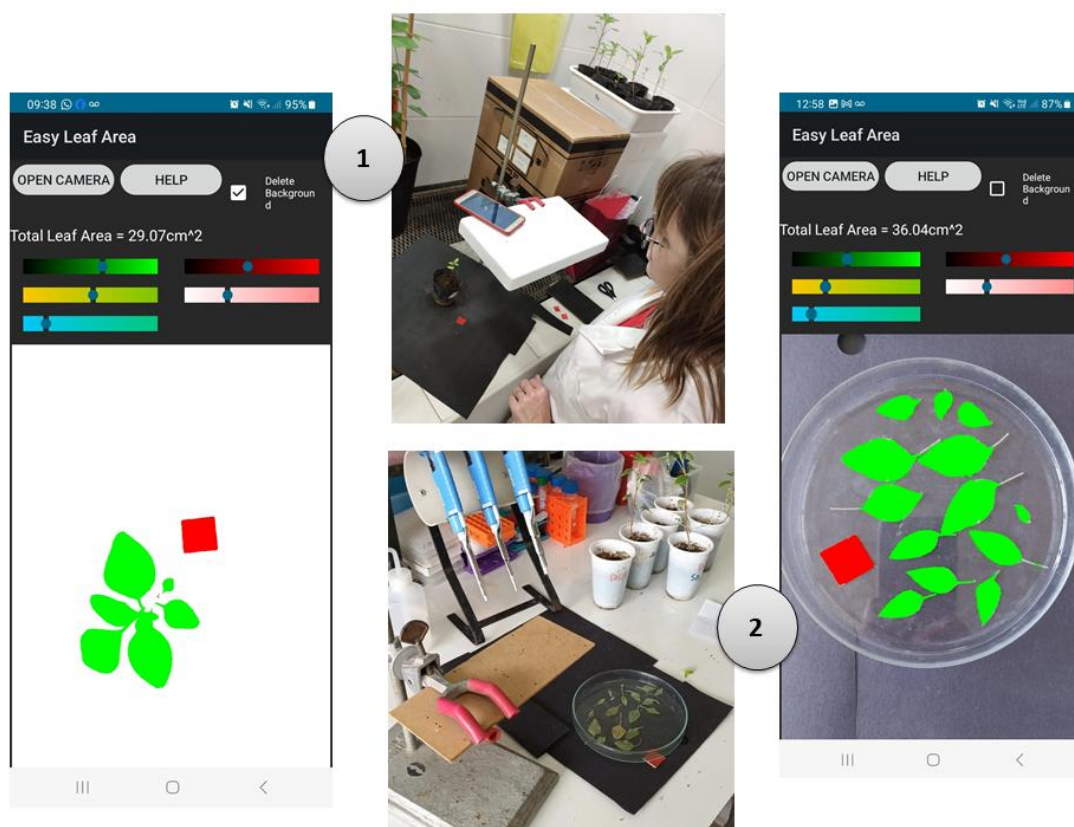


Figura 3. Determinación del área foliar total de las plantas antes de la aplicación (1) y 21 días post-aplicación (2) del herbicida glifosato, mediante el *software* Easy Leaf Area. Cabe aclarar que el Área inicial (antes de la aplicación) fue determinada in planta mientras que el Área foliar (al cabo de los 21 días) fue determinada en un solo plano, juntando las partes de la planta. Este procedimiento minimiza el error en la determinación del área con el *software*, dado que la referencia utilizada y la muestra se encuentran en el mismo plano.

Con el fin de detectar posibles relaciones colineales entre las variables fenotípicas evaluadas se realizó un análisis de correlación entre las mismas, y un análisis gráfico de su comportamiento en función de la variable número de alelos.

Genotipado dirigido mediante dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

Con el fin de determinar la presencia/ausencia del mecanismo RT caracterizado para la población original estudiada (mutación en la P106 del gen *EPSPS*, que de aquí en adelante denominaremos alelo R), se extrajo una muestra de ADN genómico de cada individuo previo a la aplicación del herbicida (que se realizó en el estadio de 3 a 4 hojas verdaderas aproximadamente), la cual fue sometida a un ensayo de digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas (dCAPS).

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

La PCR y la digestión se llevaron a cabo como se describe en Chatham et al. (2015), con modificaciones menores. Los cebadores se diseñaron para detectar mutaciones puntuales en el gen *EPSPS* que generan una sustitución en la prolina 106. El cebador directo es EPSdcapsF1 (5'-ATGTTGGACGCTCTCAGAACTCTTGGT-3'), mientras que el reverso fue modificado para generar especificidad para las poblaciones locales del género *Amaranthus* (EPSdcapsR1: 5'-TCCAGCAACGGCAACCGCAGCTGTCCATG-3'). Las digestiones se realizaron a 37 °C durante toda la noche, utilizando la enzima de restricción NcoI (Promega, Cat. R6513), que reconoce y corta específicamente la secuencia C[^]CATGG presente en la secuencia de tipo salvaje.

Las bandas de ADN se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6% P/V teñidos con SYBR safe (Invitrogen®, Cat. S33102) Las electroforesis se realizaron utilizando un equipo Bio-Rad Mini-PROTEAN III. Se prepararon geles al 6% P/V con acrilamida: bisacrilamida (29:1) 30% P/V, TBE 5X (Tris 0,044 M; ácido bórico 0,036 M; EDTA 0,05 M; pH:8), APS 10% P/V y TEMED. Las muestras a sembrar se diluyeron con buffer de siembra (azul de bromofenol 0,25% P/V, xilencianol 0,25% P/V y glicerol 30% V/V). Se empleó como buffer de corrida al TBE 0,5X y las corridas electroforéticas se realizaron a 100 V.

Muestras de ADN previamente secuenciadas se incluyeron como controles para validar la fidelidad de la prueba. La secuencia salvaje produce una única banda digerida de 156 pb, mientras que una mutación puntual en el tercer nucleótido codificante de la P106 produce la pérdida del sitio de restricción y la visualización de una única banda no digerida de 181 pb. Así, aquellas plantas que presentaron sólo la banda no digerida de 181 pb o ambas bandas fueron clasificadas como homocigotas y heterocigotas mutantes en P106, respectivamente (RR y Rr), mientras que las que presentaron sólo la banda de 156 pb fueron clasificadas como homocigotas salvajes para la P106 (rr). Las muestras con genotipo “dudoso” se enviaron a secuenciar para definir qué alelos estaban efectivamente presentes.

Esta misma metodología se utilizó sobre las plantas madres (pie femenino generador de cada familia), a los fines de constatar la variabilidad genética de la población.

Estimación de frecuencias génicas y genotípicas en la población G1 para *EPSPS*

De acuerdo con las frecuencias de homocigotas de cada tipo (D y R, siendo $f(RR)$ y $f(rr)$, respectivamente) y de heterocigotas (H, $f(Rr)$) observadas en la segregación de las 25 familias de medio-hermanos seleccionadas, se estimaron las frecuencias alélicas $p = D + \frac{1}{2} H$ y $q = R + \frac{1}{2} H$. A partir de estas frecuencias alélicas se estimaron las frecuencias genotípicas esperadas en el EHW, y las frecuencias genotípicas observadas se cotejaron con las esperadas mediante la prueba no paramétrica del Chi-cuadrado (Liu, 2017).

Aplicación de métodos bioestadísticos

Para la evaluación del nivel de resistencia se analizaron cuatro variables respuesta: Biomasa fresca, Biomasa seca, Área foliar y Delta de área. Para poder aplicar un análisis de la varianza (ANOVA), bajo el cumplimiento de los supuestos requeridos (normalidad de los residuos y homocedasticidad), se utilizó la variable Delta de área. Para poder considerar ambas fuentes de variación (Familia y número de alelos R) en conjunto, se utilizó la estrategia de descomposición propuesta por Kearsey and Pooni (1996). La misma consiste en desglosar la regresión dentro de las familias de medio-hermanos, calcular mediante la pendiente el efecto de los genes mayores (RT) y con el residual, el efecto de los genes menores (RNT). En otras palabras, al combinar regresión con ANOVA se “limpia” el error con el que se prueba el significado de la pendiente de regresión. Para esto, se toman los datos del ANOVA y de la regresión y se calcula la suma de cuadrados del residual (por diferencia entre

SM de Familia – SM de la Regresión). Luego se estima el CM del residual, considerando los grados de libertad correspondientes. Finalmente, se calcula la estadística F y su p – valor asociado tanto para la regresión ($F = \text{CM de la Regresión} / \text{CM del Residual}$) como para el residual ($F = \text{CM del Residual} / \text{CM del Error del modelo}$).

Teniendo en cuenta que la covarianza entre familias de medio-hermanos es $\frac{1}{4}$ Varianza Aditiva (V_a) involucrada en la determinación del carácter, se calcula la heredabilidad en sentido estricto (h^2) multiplicando el coeficiente de correlación intraclass (t) del modelo de ANOVA por 4 (Kearsey and Pooni, 1996).

$$\text{Esto es: } h^2 = V_a/V_p \rightarrow 4 t$$

Las otras variables fenotípicas (Área foliar, Biomasa fresca y Biomasa seca) no pudieron ser analizadas de este modo, dada la falta de cumplimiento de los supuestos para la aplicación del ANOVA (lo más crítico resultó ser la heterocedasticidad que presentaron los datos de estas variables). Por otro lado, si se lograba sortear estos incumplimientos mediante la transformación de la variable, se perdía información por los valores nulos, lo que dejaba afuera del análisis a un número significativo de datos, alterando las conclusiones. Por lo tanto, estas variables fueron analizadas mediante el uso de Modelos Lineales Generalizados, utilizando como predictores a las variables Familias de medio-hermanos y número de alelos R, y como covariable al Área inicial.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el Software InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

Resultados

Obtención de la población G_0

Se obtuvo una población (G_0) de 58 familias de medio-hermanos, entendiéndose como tal a las semillas cosechadas sobre una misma madre, siendo el padre una mezcla de polen de la población original (a partir de 90 pies masculinos) (Figura 4). Dichas familias fueron generadas a partir de la muestra de semillas de la población original de *A. palmeri* de Totoras, previamente caracterizada (Larran et al., 2020). En el Anexo de esta Tesis se exponen las curvas Dosis-Respuesta obtenidas para la población original de Totoras, en comparación con una población susceptible (Figura S1). Considerando estos resultados previos, se eligió una dosis de glifosato igual a la mitad de la dosis recomendada a campo (1/2 de 1080 g i.a./ha) para evaluar la respuesta frente al herbicida en el mayor número de plantas sobrevivientes.



Figura 4. Generación de las familias de medio-hermanos a partir de la población resistente de Totoras. Cultivo en cámara cálida de *A. palmeri* a partir de una muestra de semillas representativa de la población resistente a glifosato (de Totoras) (1). Se obtuvieron 58 pies femeninos y 90 pies masculinos. Cosecha individualizada y limpieza de semillas de cada una de las 58 plantas madres (2 y 3).

Mediante la técnica de dCAPS fue posible caracterizar la presencia de la mutación en la posición 106 de EPSPS (alelo que llamaremos R), y el grado de cigosis en las 58 madres de las familias generadas. A modo de ejemplo, en la Figura 5 se

muestra la evaluación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida para 13 madres de familia evaluadas, con la asignación del genotipo correspondiente.

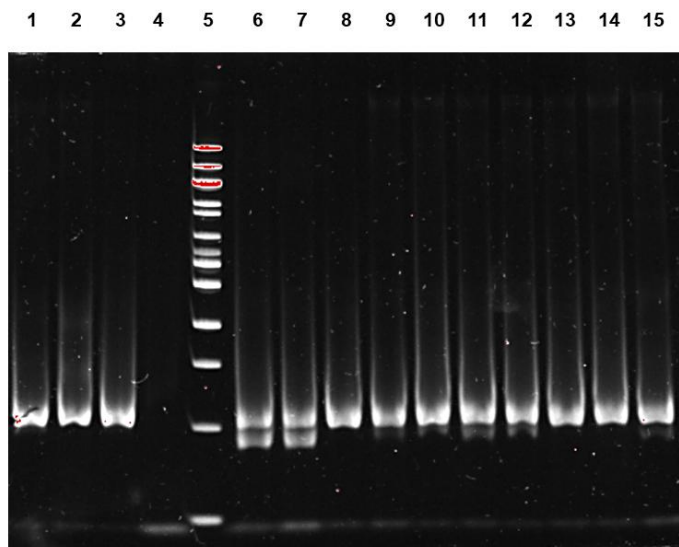


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% P/V teñido con SYBR safe para detectar la presencia/ausencia de la sustitución P106S en la EPSPS (Ensayo de dCAPS). Calle 5: Marcador de peso molecular 100 pb. Calles 1-3 y 6-15: plantas madres evaluadas. La secuencia salvaje (Wt) produce una banda única digerida de 156 pb, mientras que la mutante es insensible a la digestión y produce una banda no digerida de 186 pb. Todas las plantas resultaron RR, a excepción de las sembradas en las calles 6 y 7, que fueron genotipadas como Rr, correspondientes a las familias 30 y 38.

De las 58 madres, sólo 4 resultaron heterocigotas para el alelo mutante (Rr), siendo las 54 restantes, homocigotas resistentes (RR). No fue posible hallar ninguna madre homocigota rr. De este modo, las 4 madres Rr fueron incluidas en la caracterización fenotípica, junto con 21 madres RR seleccionadas al azar.

Caracterización fenotípica y genotipado dirigido de las 25 familias de medio-hermanos seleccionadas (G₁)

A los fines de caracterizar la varianza fenotípica y genotípica dentro de cada familia, nueve individuos promedio de cada familia fueron sometidos a la aplicación del herbicida y posteriormente evaluados, tal como se detalla en materiales y métodos.

Con respecto a la caracterización fenotípica de las plantas sometidas al

herbicida glifosato (media dosis de uso), las variables determinadas fueron cuatro: Biomasa fresca y seca, Área foliar y Delta de área, todas ellas evaluadas 21 días post aplicación.

En relación a la caracterización genotípica, nuevamente, a modo de ejemplo, se muestra el resultado de la electroforesis obtenida luego de la digestión de los productos de PCR correspondientes a 9 plantas individuales derivadas de las familias analizadas (Figura 6). En algunos casos, fue necesario repetir el ensayo para determinar inequívocamente el genotipo asignado e incluso secuenciar el producto de PCR (Figura 7).

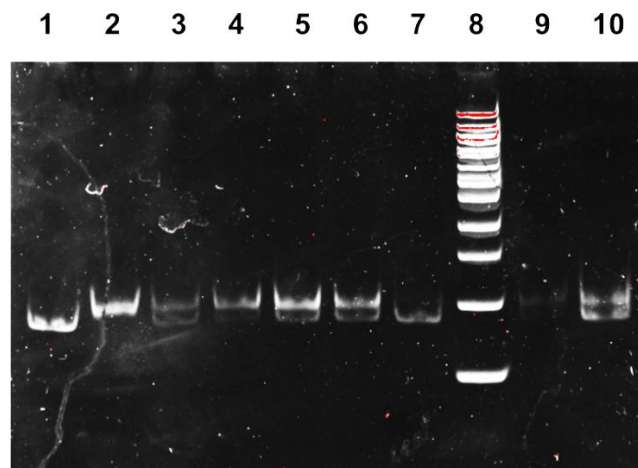


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% P/V teñido con SYBR safe para detectar la presencia/ausencia de la sustitución P106S en la EPSPS (dentro de cada familia). Calle 8: Marcador de peso molecular 100 pb. Calles 1-5: 5 plantas de la familia 38. Calles 6-10: 4 plantas de la familia 42. Plantas que fueron genotipadas como RR: calle 2; como Rr: calles 3, 4, 5, 6, 9 y 10 y como rr: 1 y 7.

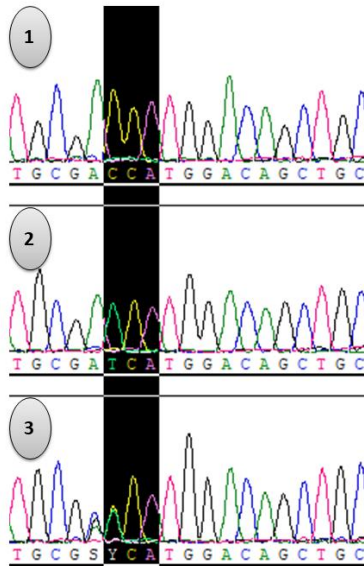


Figura 7. Cromatogramas obtenidos por secuenciación de productos de PCR. En negro se resalta el codón codificante para la prolina 106 de la secuencia salvaje (rr). Cada uno de los tres cromatogramas son representativos de muestras clasificadas con los siguientes genotipos: 1) rr; 2) RR y 3) Rr.

En el Anexo se presenta la tabla completa con los datos obtenidos tanto de la cuantificación fenotípica como genotípica de las 25 familias de medio-hermanos, que luego fueron utilizados para el análisis bioestadístico (Tabla S1). A continuación, se muestra una tabla que resume las variables determinadas por familia (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de las variables fenotípicas y genotípicas determinadas sobre la población G₁.

Planta Madre	Familia	Área foliar	Delta de área	Biomasa fresca	Biomasa seca	Número de plantas				
						Totales	Muertas	RR	Rr	rr
RR	53	19,66	7,66	1,24	0,25	8	1	2	6	0
		±	±	±	±					
RR	33	10,57	9,06	0,79	0,16	9	0	7	2	0
		±	±	±	±					
RR	34	19,47	7,44	1,16	0,23	9	0	7	2	0
		±	±	±	±					
RR	34	9,67	9,39	0,69	0,14	9	0	7	2	0
		±	±	±	±					
RR	34	12,18	4,20	0,78	0,18	9	0	7	2	0
		±	±	±	±					
RR	34	9,08	5,52	0,69	0,17	9	0	7	2	0
		±	±	±	±					

RR	58	26,33 ±	18,83 ±	1,20 ±	0,24 ±	9	0	9	0	0
		19,87	15,54	1,03	0,22					
RR	5	23,72 ±	0,33 ±	2,00 ±	0,39 ±	9	0	9	0	0
		11,17	20,69	1,45	0,28					
RR	23	13,23 ±	6,01 ±	0,91 ±	0,18 ±	9	2	8	1	0
		16,91	13,61	1,24	0,23					
RR	54	9,40 ±	5,55 ±	0,54 ±	0,10 ±	10	0	10	0	0
		8,13	7,16	0,41	0,07					
RR	32	16,49 ±	9,18 ±	0,77 ±	0,17 ±	8	2	8	0	0
		13,03	8,61	0,59	0,13					
RR	20	24,66 ±	12,66 ±	1,53 ±	0,30 ±	9	0	9	0	0
		13,71	14,11	0,88	0,19					
RR	7	20,86 ±	7,59 ±	1,53 ±	0,31 ±	7	0	7	0	0
		10,76	15,22	0,71	0,13					
RR	46	21,76 ±	8,20 ±	1,49 ±	0,32 ±	8	0	8	0	0
		17,08	12,55	1,05	0,24					
RR	16	21,38 ±	10,50 ±	1,43 ±	0,29 ±	8	1	8	0	0
		13,34	10,80	0,83	0,17					
RR	40	25,60 ±	11,31 ±	1,43 ±	0,27 ±	9	0	9	0	0
		11,55	12,78	0,66	0,16					
RR	21	21,95 ±	-0,35 ±	1,63 ±	0,33 ±	10	0	9	1	0
		9,67	12,34	1,02	0,20					
RR	56	19,18 ±	12,96 ±	0,73 ±	0,11 ±	8	0	8	0	0
		11,94	8,07	0,49	0,10					
RR	8	25,72 ±	9,82 ±	1,48 ±	0,27 ±	9	0	6	3	0
		14,43	9,15	1,03	0,20					
RR	13	27,94 ±	15,19 ±	1,20 ±	0,23 ±	9	0	9	0	0
		12,04	12,64	0,59	0,13					
RR	1	8,62 ±	1,63 ±	0,86 ±	0,17 ±	9	0	7	2	0

		5,79	6,63	0,37	0,07					
RR	31	12,03 ±	10,07 ±	0,69 ±	0,14 ±	7	1	2	5	0
		8,12	8,89	0,37	0,07					
RR	48	8,49 ±	7,24 ±	0,74 ±	0,15 ±	9	0	0	9	0
		5,86	5,96	0,29	0,06					
RR	39	5,43 ±	4,41 ±	0,57 ±	0,11 ±	9	0	0	9	0
		5,70	5,22	0,34	0,07					
Rr	52	19,59 ±	3,71 ±	1,15 ±	0,23 ±	11	2	1	10	0
		18,23	10,70	0,85	0,17					
Rr	42	16,28 ±	6,13 ±	0,85 ±	0,16 ±	12	2	0	11	1
		13,79	9,36	0,83	0,14					
Rr	38	14,69 ±	1,89 ±	0,93 ±	0,18 ±	13	2	8	4	1
		12,93	6,73	0,75	0,15					
Rr	30	0,58 ±	-2,17 ±	0,05 ±	0,01 ±	10	9	0	6	4
		1,82	3,58	0,16	0,03					

Las variables Área y Delta de área se expresan en cm²; las variables Biomasa fresca y seca, en gramos. Para cada variable se muestra la media ± el desvío estándar. El genotipo de las 25 madres de las familias estudiadas se indica en la primera columna.

Análisis descriptivo de las fuentes de variación

Entre las 228 plantas, 22 no sobrevivieron tras la aplicación con glifosato, dentro de las cuales sólo tres presentaron el genotipo rr. A los fines de considerar el efecto del estadio en el que fueron aplicadas, se grafica el Área inicial para todas las familias, señalando las 22 plantas que resultaron muertas luego del tratamiento con el herbicida. Se puede apreciar que, en la mayoría de los casos, la no supervivencia no puede atribuirse a una aplicación muy temprana en el desarrollo de la plántula, dada la supervivencia en paralelo de otros individuos de similar Área inicial, e incluso menor (Figura 8).

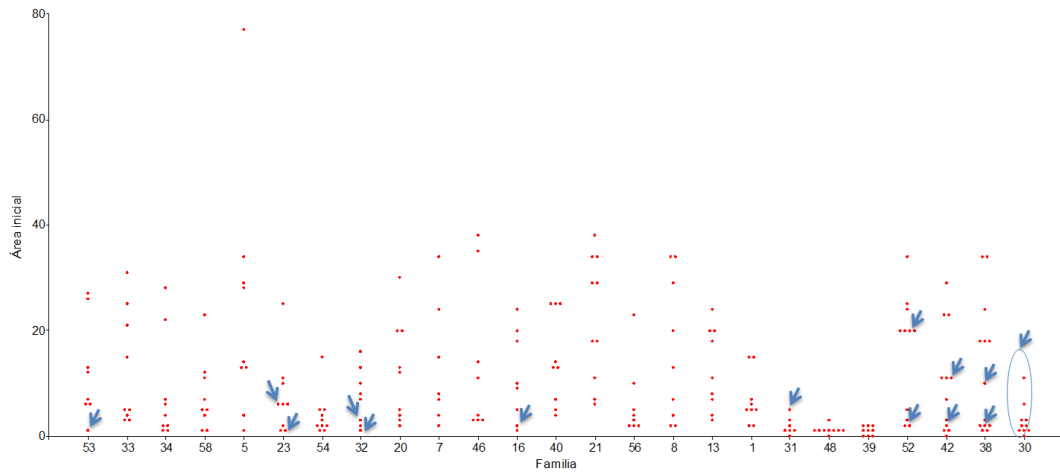


Figura 8. Área inicial (al momento de la aplicación del herbicida) para cada planta. Con flechas azules y un elipse se señalan las plantas de cada familia que luego no sobrevivieron a la aplicación del glifosato.

En la figura 9 se puede observar que de las cuatro variables fenotípicas medidas para evaluar el efecto del herbicida, tres son independientes, ya que las variables Biomasa fresca y Biomasa seca son claramente colineales (coeficiente de correlación de 0,98).

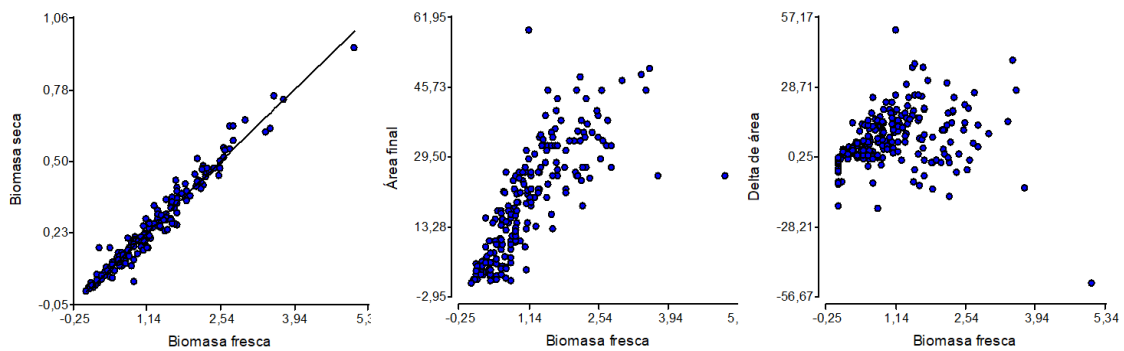


Figura 9. Gráfico de dispersión para Biomasa seca, Área foliar y Delta de área en función de la Biomasa fresca. Se observa una relación lineal para la Biomasa seca en función de la Biomasa fresca (pendiente 0,20 $R^2= 0,98$).

Respecto a la variabilidad dentro y entre las familias, un análisis preliminar de los gráficos de cajas muestra la gran heterogeneidad presente para las variables fenotípicas (Figura 10).

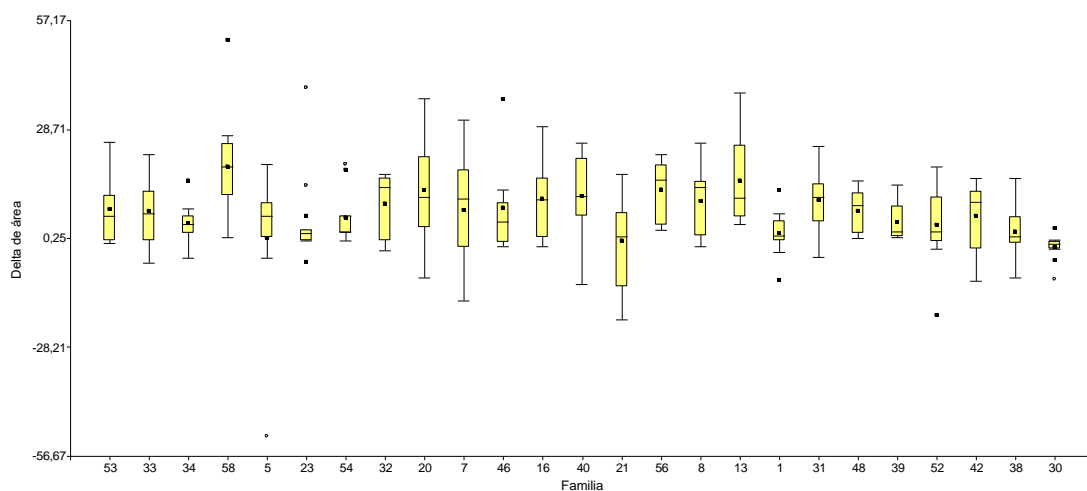
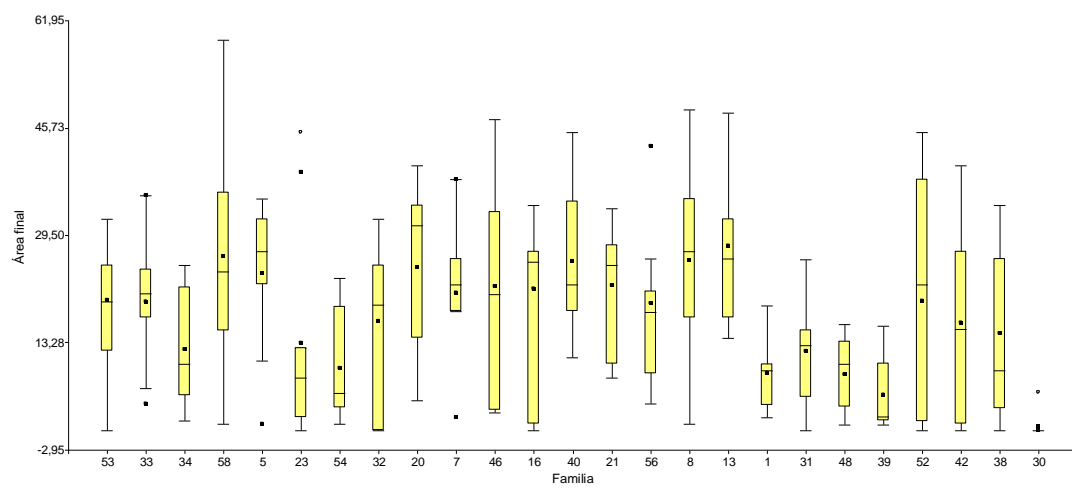
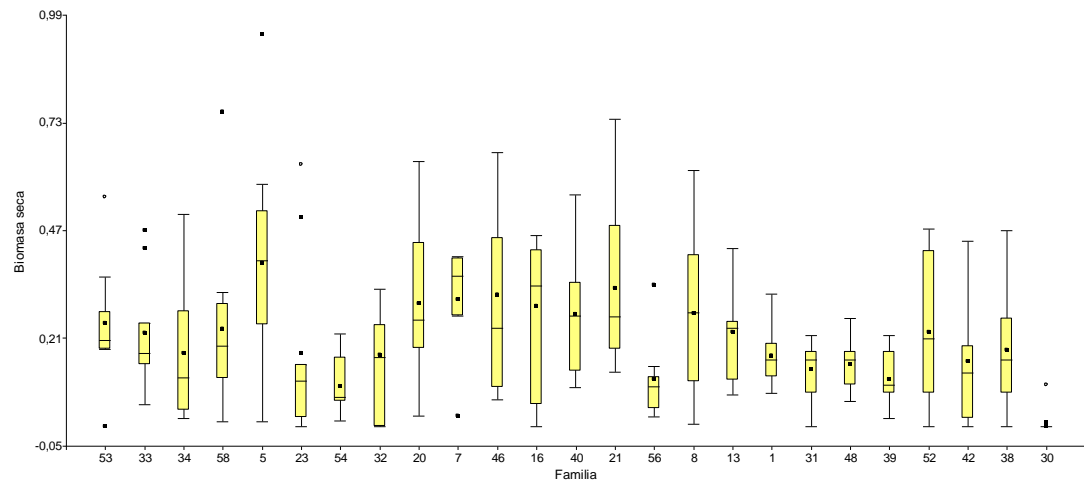


Figura 10. Box-Plot para cada una de las variables fenotípicas en las 25 familias evaluadas. Los puntos negros indican el valor medio de cada variable para cada familia. Las cajas representan el rango intercuartílico (IQR), donde el límite inferior y superior de la caja corresponden al primer y tercer cuartil,

respectivamente, y la línea central dentro de la caja muestra la mediana. Líneas enteras indican los percentiles 5% (0,05) y 95% (0,95). Los puntos fuera de estos límites son considerados outliers. Se puede observar heterogeneidad tanto en las medias como en la dispersión de datos entre diferentes familias.

Por otro lado, cuando se analiza cada variable fenotípica en función del factor número de alelos R, sin discriminar el efecto familia, se observa un patrón de regresión lineal en todos los casos (Figura 11).

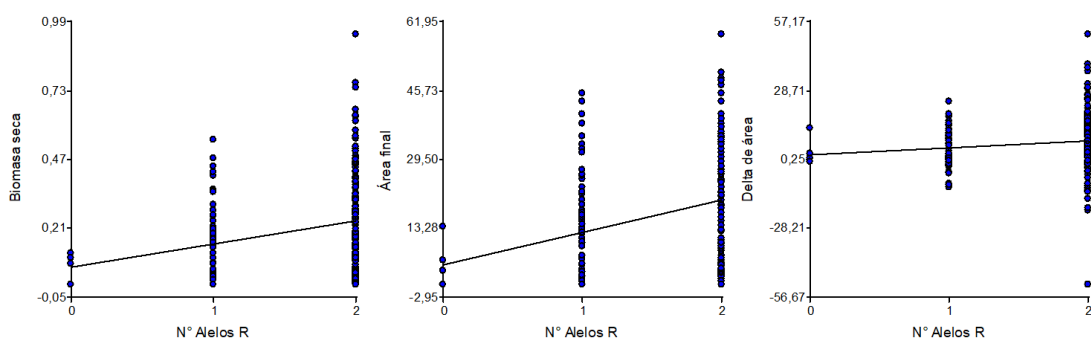


Figura 11. Análisis gráfico de las variables fenotípicas en función del número de alelos R. En todos los casos se observa una tendencia lineal positiva entre la variable fenotípica y el número de alelos resistentes, aunque con diferente pendiente.

Cabe señalar que no se cumple el supuesto de igualdad de varianzas en todos los casos, por lo que solo se grafican las curvas de regresión lineal con fines descriptivos, no estadísticos. Sólo para la variable Delta de área se cumplen los supuestos para el análisis de regresión lineal, el cual resulta significativo (Tabla 3), lo que se interpreta como una confirmación de la contribución del mecanismo RT.

Tabla 3: Análisis de regresión lineal para la variable Delta de área. En amarillo se resaltan los parámetros determinantes para la conclusión estadística.

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Delta de área	228	0,02	0,01	127,63	1753,33	1763,61

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	2,11	2,40	-2,61	6,83	0,88	0,3798		
num Alelo R	2,93	1,39	0,18	5,67	2,10	0,0368	4,41	1,00

Sin embargo, el coeficiente de determinación de la regresión lineal es particularmente bajo ($R^2 = 0,02$), lo que implica que sólo el 2% de la varianza en la variable dependiente se explica por la variable número de alelos R. En otras palabras, la contribución del mecanismo RT es relativamente baja, debiendo existir otras fuentes de variación que expliquen la varianza de esta variable fenotípica. A continuación, se establece la metodología para determinar qué fuentes de variación están en juego significativamente en nuestro sistema de estudio.

Examen del Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) en la población generada (G₁)

A partir del conteo de cada genotipo (6 rr, 70 Rr y 151 RR), se estimaron las frecuencias alélicas p y q y se realizó el cálculo de las frecuencias genotípicas esperadas en el EHW (Tabla 4). Dichas frecuencias genotípicas esperadas permitieron el cálculo de los valores esperados para cada clase genotípica en la muestra analizada ($n= 228$) y se cotejaron con los observados mediante la prueba no paramétrica del Chi-cuadrado. El valor de Chi-cuadrado calculada resultó en 0,30, mientras que el valor de Chi-cuadrado tabulada para 1 grado de libertad y nivel de significación $\alpha=0,05$ es de 3,84, por lo que no se puede rechazar H_0 . Esto es, según este test de bondad de ajuste, los datos observados se ajustan a la distribución esperada para una población en EHW (Tabla 5).

Tabla 4. Estimación de las frecuencias genotípicas esperadas para la población en estudio, bajo el supuesto de que se encuentre en EHW.

	Frecuencias genotípicas observadas	Frecuencias alélicas observadas	Frecuencias genotípicas esperadas
D	151/228		0,67
H	71/228		0,30
R	6/228		0,03
p		0,818	
q		0,182	

Dado que $p = D + \frac{1}{2} H$ y $q = R + \frac{1}{2} H$, se estimaron las frecuencias alélicas observadas a partir de las frecuencias genotípicas obtenidas empíricamente. Luego, dado que en una población en EHW, $D= p^2$; $H= 2pq$; $R= q^2$, se estimaron las frecuencias genotípicas esperadas a partir de p y q observados.

Tabla 5. Valores observados versus esperados para cada genotipo dentro de la población analizada (n=228).

Genotipos	Valor Observado	Valor Esperado
RR	151	153
Rr	71	68
rr	6	7
total	228	228

Tratamiento bioestadístico y cálculo de heredabilidad en sentido estricto

La variable Delta de área fue utilizada para la estimación de la heredabilidad en sentido estricto, mediante el análisis de la varianza (ANOVA), por ser la única que presentó homocedasticidad ($p > 0,05$ de la prueba de Levene) y una distribución cuasi normal de residuos ($W^* = 0,97$ del test de Shapiro-Wilks modificado).

En primer lugar se realizó un ANOVA para dicha variable considerando como único factor a la Familia, siendo éste significativo ($p = 0,005$). Paralelamente, se analizó la relación entre esta variable y el número de alelos R (portadores de la mutación P106S), obteniéndose una regresión lineal también significativa ($p = 0,037$). Dado que esta última variable no se encuentra igualmente representada dentro de la variable Familia, no es correcto analizar ambos efectos (Familia y número de alelos R) aplicando un ANOVA bifactorial. Tampoco puede ser utilizarla como covariable, ya que se trata de una variable discreta con sólo tres valores posibles: 0, 1 y 2. Por lo tanto, no corresponde realizar un ANOVA bifactorial para ponderar correctamente las fuentes de variación que operan en nuestro sistema de estudio, dado que los niveles del factor número de alelos R son sólo tres y no se encuentran igualmente representados dentro de cada familia de medio-hermanos (resulta lógico, dado que de las 25 madres, sólo cuatro fueron Rr, y sólo de éstas derivan individuos rr). Así, la metodología aplicada para estimar si ambas fuentes de variación son significativas consistió en los siguientes pasos:

- 1) Un ANOVA unifactorial para analizar si el efecto de Familia es significativo (Tabla 6).

Tabla 6: Análisis de la varianza para la variable Delta de área, utilizando como único factor a Familia. Para las comparaciones entre Medias se utilizó el test de Duncan ($\alpha = 0,05$). En amarillo se resaltan los parámetros determinantes para la conclusión estadística.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Delta de área	228	0,19	0,10	155,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5562,15	24	231,76	2,01	0,0050
Familia	5562,15	24	231,76	2,01	0,0050
Error	23421,94	203	115,38		
Total	28984,09	227			

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 115,3790 gl: 203

Familia	Medias	n	E.E.						
30	-2,17	10	3,40	A					
21	-0,35	10	3,40	A	B				
5	0,33	9	3,58	A	B	C			
1	1,63	9	3,58	A	B	C	D		
38	1,89	13	2,98	A	B	C	D		
52	3,71	11	3,24	A	B	C	D	E	
34	4,20	9	3,58	A	B	C	D	E	
39	4,42	9	3,58	A	B	C	D	E	
54	5,55	10	3,40	A	B	C	D	E	
23	6,01	9	3,58	A	B	C	D	E	
42	6,14	12	3,10	A	B	C	D	E	
48	7,24	9	3,58	A	B	C	D	E	F
33	7,44	9	3,58	A	B	C	D	E	F
7	7,59	7	4,06	A	B	C	D	E	F
53	7,66	8	3,80	A	B	C	D	E	F
46	8,20	8	3,80	A	B	C	D	E	F
32	9,18	8	3,80	A	B	C	D	E	F
8	9,82	9	3,58	A	B	C	D	E	F
31	10,07	7	4,06	A	B	C	D	E	F
16	10,50	8	3,80		B	C	D	E	F
40	11,31	9	3,58		B	C	D	E	F
20	12,66	9	3,58			C	D	E	F
56	12,96	8	3,80				D	E	F
13	15,19	9	3,58					E	F
58	18,83	9	3,58						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- 2) Un análisis de regresión lineal con respecto a la segunda fuente de variación: el número de alelos R, para ver si es significativa (el mismo que se muestra anteriormente, pero en este caso, se incluye el ANOVA correspondiente) (Tabla 7).

Tabla 7: Análisis de regresión lineal para la variable Delta de área y ANOVA correspondiente. En amarillo se resaltan los parámetros determinantes para la conclusión estadística.

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Delta de área	228	0,02	0,01	127,63	1753,33	1763,61

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	2,11	2,40	-2,61	6,83	0,88	0,3798		
num Alelo R	2,93	1,39	0,18	5,67	2,10	0,0368	4,41	1,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	554,77	1	554,77	4,41	0,0368
num Alelo R	554,77	1	554,77	4,41	0,0368
Error	28429,32	226	125,79		
Total	28984,09	227			

3) La combinación de ambos análisis, para descomponer la fuente principal de variación (Familia) considerando la regresión lineal con la variable número de alelos R dentro de Familia, para ver si sigue siendo significativa la regresión y además, si lo es el residual (Tabla 8).

Tabla 8: Análisis combinado para la variable Delta de área aplicando la metodología descrita en Kearsey y Pooni (1996). La suma de cuadrados residual se despejó de la siguiente manera: SC Residual: 5562,15 - 554,77 = 5007,38. El cuadrado medio residual resultó: CM Residual = 5007,38 / 23 = 217,71. En amarillo se resaltan los parámetros determinantes para la conclusión estadística.

Combinación de ANOVA y Regresión

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5562,15	24	231,76	2,01	0,0050
Regresión	554,77	1	554,77	2,55	< 0,050
Residual	5007,38	23	217,71	1,88	< 0,050
Familia	5562,15	24	231,76	2,01	0,0050
Error	23421,94	203	115,38		
Total	28984,09	227			

Si bien ambos efectos resultaron significativos ($p < 0,05$), lo que confirma la presencia de ambos mecanismos de resistencia (RT y RNT), cabe recordar la baja contribución del mecanismo RT, como se explicó anteriormente (dado el bajo R^2 de la regresión).

Por otro lado, al estimar la h^2 , considerando que la varianza ambiental (V_e) se puede deducir del CM del error ($V_e = 115,38$), y que la varianza entre familias (V_{entre}) se despeja del CM entre familias (231,76), restándole el CM del error y luego dividiendo por el n promedio ($V_{entre} = (231,76 - 115,38) / 9,12 = 12,76$), lo que en este modelo de familias de medio-hermanos resulta igual a $\frac{1}{4}$ de la varianza aditiva (V_a), se obtiene:

$$h^2 = V_a/V_p \rightarrow 4 t \rightarrow 4 V_{entre}/(V_{entre} + V_{dentro}) \rightarrow 4 \times 12,76/(12,76 + 115,38) = \mathbf{0,40}$$

Una heredabilidad menor a 0,45 estaría indicando que el carácter es poligénico, en concordancia con la observación anterior, donde el mecanismo de RT (monogénico) no parece preponderante en el modelo.

Ahora bien, si en el ANOVA se considera además al Área inicial como covariable, ésta resulta significativa y con pendiente negativa. Para considerar este efecto, se repite el análisis para el cálculo de h^2 , considerando la covariable Área inicial (Tabla 9).

Tabla 9: Análisis completo combinado para la variable Delta de área aplicando la metodología descrita en Kearsey y Pooni (1996), utilizando como covariable al Área inicial. La suma de cuadrados residual se despejó de la siguiente manera: $SC: 5708,18 - 554,77 = 5153,41$. El cuadrado medio residual resultó: $CM \text{ Residual} = 5153,41 / 23 = 224,06$. En amarillo se resaltan los parámetros determinantes para la conclusión estadística.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Delta de área	228	0,27	0,18	148,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	7757,45	25	310,30	2,95	<0,0001	
Familia	5708,18	24	237,84	2,26	0,0012	
Área inicial	2195,30	1	2195,30	20,89	<0,0001	-0,33
Error	21226,64	202	105,08			
Total	28984,09	227				

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 105,0824 gl: 202

Familia	Medias	n	E.E.					
30	-4,68	10	3,29	A				
1	0,52	9	3,43	A	B			
39	1,34	9	3,48	A	B	C		
38	2,70	13	2,85	A	B	C		
54	3,41	10	3,28	A	B	C		
34	3,42	9	3,42	A	B	C		
21	3,59	10	3,35	A	B	C		
48	4,24	9	3,48	A	B	C	D	
5	4,64	9	3,54	A	B	C	D	
23	4,98	9	3,42	A	B	C	D	
52	5,54	11	3,12	A	B	C	D	
42	6,07	12	2,96	A	B	C	D	
31	7,31	7	3,92		B	C	D	E
33	7,99	9	3,42		B	C	D	E
32	8,17	8	3,63		B	C	D	E
53	8,21	8	3,63		B	C	D	E
7	8,55	7	3,88		B	C	D	E
46	9,26	8	3,63		B	C	D	E
16	10,67	8	3,62		B	C	D	E
56	11,60	8	3,64		B	C	D	E
8	11,65	9	3,44		B	C	D	E
40	12,61	9	3,43			C	D	E
20	13,20	9	3,42			C	D	E
13	15,98	9	3,42				D	E
58	17,89	9	3,42					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Delta de área	228	0,02	0,01	127,63	1753,33	1763,61

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	2,11	2,40	-2,61	6,83	0,88	0,3798		
num Alelo R	2,93	1,39	0,18	5,67	2,10	0,0368	4,41	1,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	554,77	1	554,77	4,41	0,0368
num Alelo R	554,77	1	554,77	4,41	0,0368
Error	28429,32	226	125,79		
Total	28984,09	227			

Combinación de ANOVA y Regresión

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	7757,45	25	310,30	2,95	<0,0001	
Regresión	554,77	1	554,77	2,5	<0,050	
Residual	5153,41	23	224,06	2,1	<0,050	
Familia	5708,18	24	237,84	2,26	0,0012	
Área inicial	2195,30	1	2195,30	20,89	<0,0001	-0,33
Error	21226,64	202	105,08			
Total	28984,09	227				

Al estimar la h^2 , considerando que la varianza ambiental (V_e) se puede deducir del CM del error ($V_e = 105,08$), y que la varianza entre familias (V_{entre}) se despeja del CM entre familias (237,84), restándole el CM del error y luego dividiendo por el n promedio ($V_{entre} = (237,84 - 105,08) / 9,12 = 14,55$), se obtiene:

$$h^2 = Va/Vp \rightarrow 4 t \rightarrow 4 \times 14,55 / (14,55 + 105,08) = 0,49$$

Como puede observarse, no hay grandes cambios en la estimación de la heredabilidad en sentido estricto, lo que significa que ambos mecanismos (RT y RNT) siguen siendo significativos, aunque con una tendencia hacia un mecanismo oligogénico, tal vez ya no poligénico.

La idea original de este trabajo fue confirmar la presencia de ambos mecanismos y evaluar la contribución de cada uno de ellos, estimando la heredabilidad en sentido estricto a partir de las diferentes variables fenotípicas evaluadas. Esto sólo fue posible con la variable descrita hasta aquí, por razones estadísticas, como se explicó anteriormente. A continuación, se muestra el análisis realizado con las demás variables y su interpretación en términos biológicos, lo que intenta complementar esta descripción.

En estadística, el modelo lineal generalizado (MLG) es una generalización flexible de la regresión lineal ordinaria que permite variables de respuesta que tienen modelos de distribución de errores distintos de una distribución normal. El MLG

generaliza la regresión lineal al permitir que el modelo lineal esté relacionado con la variable de respuesta a través de una función de enlace y al permitir que la magnitud de la varianza de cada medición sea una función de su valor predicho. Así, las variables fenotípicas Área foliar, Biomasa fresca y Biomasa seca fueron modeladas en función de los predictores Familia y número de alelos R, utilizando la covariable Área inicial. A continuación se muestran los modelos obtenidos para estas variables, cuando éstos resultaron convergentes.

Para la variable Área foliar, considerando que se comporta según una distribución de Poisson, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 10.

Tabla 10: Análisis de la variable Área foliar con MLG en función de los predictores Familia y número de alelos R, utilizando la covariable Área inicial. En amarillo se resaltan los parámetros determinantes para la conclusión estadística.

General

Familia Enlace Convergencia Escala
poisson log Alcanzada 1,00

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
228	2542,59	2638,61	-1243,29	1572,40

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			227	2783,07	
Familia	24	809,12	203	1973,94	<0,0001
num.Alelo.R	2	14,59	201	1959,35	0,0007
Area.inicial	1	386,95	200	1572,40	<0,0001

Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Familia	24	200	12,89	<0,0001
num.Alelo.R	2	200	1,75	0,1757
Area.inicial	1	200	406,31	<0,0001

Area.final - Medias ajustadas y errores estándares para Familia

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0
LSD Fisher (Alfa=0,05)

Estimaciones para la siguiente combinación de valores de las covariables

Covariable	Valor
Area.inicial	Media

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Familia	PredLin	E.E.	Media	E.E.					
58	3,24	0,10	25,62	2,67	A				
13	3,15	0,10	23,32	2,39	A	B			
20	3,03	0,11	20,71	2,18		B	C		
40	3,02	0,10	20,47	2,13		B	C	D	
8	2,97	0,10	19,52	1,94		B	C	D	E

56	2,96	0,11	19,38	2,23	B	C	D	E											
16	2,93	0,11	18,76	2,09		C	D	E											
53	2,89	0,11	18,01	1,95		C	D	E											
46	2,82	0,11	16,75	1,86			D	E	F										
7	2,81	0,12	16,69	1,93			D	E	F										
33	2,81	0,11	16,60	1,79				E	F										
52	2,79	0,10	16,29	1,66				E	F	G									
32	2,79	0,12	16,27	1,94				E	F	G									
42	2,79	0,10	16,23	1,58				E	F	G									
31	2,71	0,13	15,06	1,99				E	F	G	H								
21	2,63	0,10	13,89	1,44					F	G	H								
23	2,57	0,12	13,05	1,58						G	H	I							
38	2,50	0,10	12,13	1,19							H	I							
34	2,48	0,12	11,97	1,45							H	I	J						
5	2,47	0,11	11,79	1,32							H	I	J						
48	2,43	0,14	11,38	1,58							H	I	J						
54	2,33	0,13	10,25	1,36								I	J	K					
1	2,19	0,14	8,96	1,22									J	K					
39	1,99	0,16	7,29	1,19															K
30	-0,26	0,41	0,77	0,32															L

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Este modelo indica que existe efecto significativo tanto del predictor Familia como número de alelos R, siendo además significativa la covariable Área inicial. Sin embargo, el test de Wald sólo resulta significativo para Familia y la covariable, lo que implica que el valor del coeficiente para el predictor número de alelos podría ser perfectamente cero. Por lo tanto, esa variable no influye a la hora de determinar la variable respuesta y podría ser eliminada del modelo. Por ello, sólo se muestran las comparaciones entre familias.

No obstante, haciendo un paralelismo con el análisis efectuado para la variable Delta de área, si se analiza únicamente el efecto del número de alelos R, modelando sólo con este predictor, se obtiene lo mostrado en la Tabla 11.

Tabla 11: Análisis de la variable Área foliar con MLG en función del predictor número de alelos R. En amarillo se resaltan los parámetros determinantes para la conclusión estadística.

General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
poisson	log	Alcanzada	1,00

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
228	3446,66	3456,95	-1720,33	2526,48

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
num.Alelo.R	2	225	102,64	<0,0001

Area final - Medias ajustadas y errores estándares para num.Alelo.R

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

num.Alelo.R	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
2	3,00	0,02	20,00	0,36	A
1	2,53	0,03	12,52	0,42	B
0	1,34	0,21	3,83	0,80	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Este modelo, si bien no supera al anterior (cuyo índice de AIC es menor), explica parte de la variabilidad del Área foliar como una función lineal del número de alelos R (dada la proporcionalidad que guardan las medias). Sin embargo, un análisis combinado similar al efectuado para la variable Delta de área no es posible por limitaciones estadísticas, por lo que sólo podemos describir cualitativamente que ambos factores tienen influencia en la variable respuesta, siendo Familia el preponderante.

Al realizar este mismo modelado sobre las dos variables restantes (Biomasa seca y Biomasa fresca), pero ahora utilizando la familia de distribución Gamma, ya que los valores de biomasa suelen tener esta distribución (previa modificación de los valores nulos por casi nulos), los modelos no convergen. Al analizar estas variables modelando los valores con la distribución de Poisson, no da significativo ninguno de los predictores. Sólo fue posible obtener un modelo predictivo confiable que explique la varianza de la Biomasa (seca o fresca) con el predictor número de alelos R (Tablas 12 y 13).

Tabla 12: Análisis de la variable Biomasa seca con MLG en función del predictor número de alelos R. En amarillo se resaltan los parámetros determinantes para la conclusión estadística.

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
228	-285,25	-271,53	146,62	408,74	225,00

AIC y BIC menores implica mejor

Familia

Family link
Gamma inverse

Pruebas de hipótesis marginales

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
num.Alelo.R	2	225	8,13	0,0004

Biomasasecacorreg - Medias ajustadas y errores estándares para num.Alelo.R

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

num.Alelo.R	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
0	19,98	6,55	0,05	0,02	A
1	6,32	0,60	0,16	0,02	B
2	4,16	0,27	0,24	0,02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 13: Análisis de la variable Biomasa fresca con MLG en función del predictor número de alelos R. En amarillo se resaltan los parámetros determinantes para la conclusión estadística.

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
228	457,53	471,25	-224,77	399,72	225,00

AIC y BIC menores implica mejor

Familia

Family link
Gamma inverse

Pruebas de hipótesis marginales

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
num.Alelo.R	2	225	8,73	0,0002

Biomasafrescacorreg - Medias ajustadas y errores estándares para num.Alelo.R

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

num.Alelo.R	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
0	4,00	1,28	0,25	0,08	A
1	1,25	0,12	0,80	0,07	B
2	0,82	0,05	1,22	0,08	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Para ambas variables fenotípicas, la comparación entre las medias ajustadas para número de alelos R arroja que el homocigota resistente (RR) presenta una media superior a los demás genotipos, siendo la media del genotipo heterocigota (Rr) un valor intermedio entre las de RR y rr. Desde el punto de vista biológico, esto indicaría que la mutación en *EPSPS* podría ser aditiva, en consonancia, además, con la

regresión lineal que observamos para la variable Delta de área en función del número de alelos R.

Discusión

La resistencia *no target* es un tipo de respuesta de las plantas que no depende de un solo gen, sino de muchos loci que actúan en conjunto. Se cree que esta forma de resistencia no surge de mutaciones nuevas, sino de genes y variantes ya presentes en las poblaciones vegetales (Délye et al., 2013^b). Si se estudian estos genes por separado, es posible que se pasen por alto los efectos combinados entre ellos (efectos aditivos e interacciones). Por eso, los enfoques de la genética cuantitativa, que permiten analizar cómo se suman o interactúan múltiples genes, son clave para entender mejor este fenómeno.

A pesar de su utilidad, pocos estudios han aplicado enfoques de genética cuantitativa para investigar la resistencia. En general, se suele trabajar con muestras recolectadas directamente del campo, sin generar previamente plantas con características genéticas controladas, lo cual sería ideal para este tipo de análisis. Por ejemplo, se ha señalado la falta de líneas isogénicas como una limitación importante para estudiar aspectos como el costo en términos de adaptación o “aptitud” (Vila-Aiub et al., 2009). Las desventajas de seleccionar el material vegetal adecuado son el tiempo necesario para generar las plantas y los desafíos que implica realizar los cruzamientos. Para estimar el número de genes independientes que conducen a un fenómeno observado, o para determinar la aditividad génica, interacciones, dominancia o epistasis, se requiere el cálculo de muchos índices basados en varias generaciones de datos: progenitores, híbridos (F1), progenie autofecundada del híbrido (F2) y retrocruzamientos con ambos progenitores (BC1), en los casos más simples. Este procedimiento completo rara vez se ha utilizado en el estudio de la resistencia a herbicidas en malezas. Solo podemos citar algunos ejemplos como los de *Lolium rigidum* (Busi et al., 2013) y *Alopecurus myosuroides* (Rosenhauer et al., 2015).

En esta tesis se postula un enfoque más simple de genética cuantitativa para proporcionar información valiosa a partir de la evaluación de varianzas para diferentes variables fenotípicas, en respuesta a dosis única del herbicida, con relativamente bajo costo y moderado tiempo experimental adicional. Esta perspectiva metodológica implicó la generación de familias de medio-hermanos, a partir de las cuales se evaluaron las varianzas correspondientes que permitieron la estimación de la heredabilidad en sentido estricto, previa corroboración del equilibrio Hardy-Weinberg. A continuación se discuten los principales hallazgos obtenidos y su implicancia en este campo del conocimiento.

***Amaranthus palmeri*: complejidad biológica vs simpleza metodológica**

Amaranthus palmeri es una maleza reconocida por su extraordinaria plasticidad biológica: presenta una alta variabilidad genética, ciclos de vida cortos y una notable capacidad de adaptación. Estos factores la han convertido en una de las especies más problemáticas en sistemas agrícolas modernos del norte y del sur de América (Gaines et al., 2020a), especialmente por su rápida evolución de resistencia a herbicidas.

Paralelamente, el cruzamiento en *A. palmeri* resulta sorprendentemente simple. Al ser una especie dioica con polinización cruzada obligada, el intercambio genético entre individuos es natural y eficiente. Esta característica facilita tanto los estudios genéticos como la generación de poblaciones experimentales, lo que representa una ventaja para la investigación en comparación con otras malezas de reproducción más restringida.

En este trabajo se pudieron cosechar semillas de 58 familias de medio-hermanos generadas exitosamente en condiciones controladas (cámara de cultivo) por polinización artificial de 58 pies femeninos con una mezcla de polen proveniente de 90 pies masculinos. La proporción esperada de plantas femeninas y masculinas en una población en condiciones normales es aproximadamente 1:1. No obstante, factores ambientales (como el estrés por sequía, densidad de siembra o herbicidas) pueden alterar esta proporción, aunque la base genética tienda al equilibrio (Borgato et al., 2023; Mesgaran et al., 2021; Korres y Norsworthy, 2017). La alta densidad de siembra empleada en nuestros experimentos pudo haber determinado el desequilibrio en favor de los pies masculinos.

Un aspecto interesante de la biología reproductiva de *A. palmeri* es la posibilidad de que ocurra apomixis. Las tasas de apomixis pueden estar reguladas por las condiciones ambientales; por lo tanto, las plantas femeninas apomícticas putativas no siempre están presentes en poblaciones de especies dioicas (Hojsgaard y Hörandl, 2019). Ribeiro y colaboradores (2014) confirmaron que plantas femeninas de *A. palmeri* sensibles y resistentes al glifosato, aisladas reproductivamente, produjeron semillas viables. Sin embargo, es importante mencionar que los autores no pudieron confirmar progenie apomíctica mediante marcadores de ADN.

La influencia del ambiente materno en el crecimiento y desarrollo de la progenie vegetal ha sido ampliamente documentada. Se ha sugerido que las plantas madre sometidas a estrés ambiental pueden modificar epigenéticamente (a través de la metilación del ADN, modificaciones de histonas y expresión de smRNAs) ciertos rasgos fenotípicos en su progenie, lo que podría mejorar la supervivencia de la descendencia frente al mismo o incluso a diferentes tipos de estrés ambiental en

diversas etapas del ciclo de vida. En este sentido, se observaron efectos maternos que promueven la tolerancia a la sequía en las semillas de la progenie de *A. palmeri* (Matzrafi et al., 2021). Más aún, se observó que el estrés hídrico materno reduce la sensibilidad de la descendencia a herbicidas en esta especie (Osipitan et al., 2021).

Cabe señalar que en esta tesis se emplearon condiciones normales de cultivo para la obtención de las madres de las familias de medio-hermanos, por lo que la influencia de efectos maternos inducidos por estrés se encuentra minimizada.

Contribución relativa de mecanismos RT y RNT a la resistencia al glifosato en *A. palmeri*

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que la población de *Amaranthus palmeri* analizada se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), lo cual sugiere que, en ausencia de fuerzas evolutivas como selección, migración o deriva genética, las frecuencias génicas se mantienen estables en la generación evaluada (G1). Este hallazgo proporciona un marco de referencia sólido para evaluar posteriormente el impacto de los mecanismos de resistencia al herbicida glifosato.

A pesar de que se observaron muertes tras la aplicación del herbicida, el análisis del Área inicial permitió descartar que la mortalidad se deba exclusivamente a un estadio fenológico temprano, lo que sugiere una respuesta diferencial al tratamiento, atribuible a factores genéticos y ambientales.

En cuanto a las cuatro variables fenotípicas evaluadas, las dos referidas a biomasa resultaron colineales. Podría pensarse *a priori* que el porcentaje de agua en condiciones controladas de riego es relativamente constante, lo que justifica esta correlación. De la pendiente de dicha relación se puede deducir que estas plantas presentaron en promedio un 80% de agua, lo cual condice con lo esperable: el contenido acuoso representa entre el 80 y 90% del peso fresco de la mayoría de las plantas herbáceas jóvenes (levinsh, 2023). No obstante, esto podría haberse visto afectado por los mecanismos de resistencia que están operando, por ello valió la pena su evaluación.

El análisis de regresión lineal entre el número de alelos R y la variable Delta de área mostró una relación significativa. Sin embargo, el bajo valor del coeficiente de determinación ($R^2 = 0,02$) indica que la contribución del mecanismo de RT es baja (explica solo el 2 % de la variación en dicha variable) y que otras fuentes de variación, como mecanismos de RNT y factores ambientales, estarían influyendo en la respuesta fenotípica observada.

El análisis de varianza permitió estimar una heredabilidad en sentido estricto

(h^2) de 0,40 para la variable Delta de área, lo que sugiere un control poligénico del carácter. Al incluir el Área inicial como covariable, la heredabilidad aumentó ligeramente a 0,49, sin alterar sustancialmente la interpretación. Estos valores apoyan la hipótesis de que ambos mecanismos de resistencia, RT y RNT, están operando simultáneamente, aunque el RNT parece tener un peso relativo mayor.

Curiosamente, al considerar al Área inicial como covariable, ésta resultó con pendiente negativa. Desde la fisiología no tiene lógica esta relación (a menor Área inicial, mayor Delta de área, o sea, mayor velocidad de crecimiento) en condiciones normales, si se tiene en cuenta que las plantas aplicadas se encuentran en la zona inicial de la curva sigmoidea de crecimiento, por lo que el incremento en el área foliar sería exponencial. Esta relación negativa tampoco responde al supuesto de que las plantas más pequeñas son las más afectadas por el herbicida, más bien está indicando lo contrario. Entonces se podría pensar que las plantas más pequeñas pueden haber quedado parcialmente protegidas por el dosel de las más grandes o bien, que el mecanismo de resistencia que está operando es más robusto en estadios tempranos. De todos modos, cabe aclarar que en todos los casos se respetó la condición indicada para el control de *A. palmeri* por glifosato: estadios fenológicos tempranos, de 4 a 6 hojas al momento de la aplicación y la aplicación se realizó espaciando suficientemente cada planta.

El modelado mediante modelos lineales generalizados para las otras variables fenotípicas permitió complementar el análisis bioestadístico. En el caso del Área foliar (determinada a los 21 días de la aplicación), se identificó un efecto significativo de la familia, y aunque el número de alelos R mostró cierta influencia, no resultó significativo según el test de Wald ($p=0,1757$). En cambio, para las variables Biomasa seca y Biomasa fresca, se observó un patrón aditivo asociado al número de alelos R, con medias ajustadas que aumentan de rr a RR, lo que respalda la hipótesis de que la mutación en *EPSPS* actúa de forma aditiva, como ya se ha reportado en otras especies (Huffman et al., 2016).

Estos resultados colectivamente permiten afirmar que, en la población estudiada, ambos mecanismos de resistencia están presentes, aunque el componente genético de RT (la mutación en la Prolina 106) presenta una influencia moderada. La heredabilidad intermedia y el patrón aditivo observado en algunas variables fenotípicas refuerzan la noción de un control oligogénico del carácter, con implicancias importantes para la evolución y manejo de la resistencia en esta especie.

Un estudio reciente en *Amaranthus tuberculatus* alcanzó conclusiones similares, basándose en que el 25 % de la resistencia fenotípica fue atribuido a

mecanismos de RNT, con 250 genes asociados identificados, dentro de una muestra donde los mecanismos de RT estaban ampliamente presentes (en el 80 % de los individuos), explicando el 33 % de la variación en la resistencia (Kreiner et al., 2020).

En conjunto, estos hallazgos resaltan la importancia subestimada de los mecanismos poligénicos de RNT en la evolución de la resistencia, que no sólo pueden conferir resistencia en ausencia de RT, sino que también pueden actuar como modificadores de la resistencia en presencia de RT.

Conclusión

La población de *Amaranthus palmeri* de Totoras presenta varianza genética significativa para resistencia a glifosato, lo que confirma que existe heredabilidad del carácter ($h^2 = 0,40-0,49$). El análisis de regresión lineal mostró que el número de alelos R (RT) explica apenas el 2 % de la variación en la variable Delta de área, evidenciando un efecto aditivo moderado de un gen mayor. El componente restante, asociado a mecanismos no-target (RNT), aporta la mayor parte de la variación fenotípica y refleja un control oligogénico. Estos resultados validan la hipótesis de que la varianza genética en esta población se descompone en un componente de genes mayores (RT) y otro de genes menores (RNT), y subrayan la necesidad de estrategias de manejo que aborden ambos mecanismos simultáneamente.

Bibliografía

- Anderson, W. P. (1996). *Weed science: Principles and applications* (3rd ed.). West Pub. Co.
- Ashigh, J., & Tardif, F. J. (2009). An amino acid substitution at position 205 of acetohydroxyacid synthase reduces fitness under optimal light in resistant populations of *Solanum ptychanthum*. *Weed Research*, 49(6), 479–489.
- Bastida, F., & Menéndez, J. (2001). Producción integrada y manejo integrado de malas hierbas. En *Uso de herbicidas en la agricultura del siglo XXI* (pp. 307–316).
- Borgato, E. A., Ohadi, S., Brunharo, C. A., Patterson, E. L., & Matzrafi, M. (2025). *Amaranthus palmeri* S. Watson reproduction system: Implications for distribution and management strategies. *Weed Research*, 65(1), e12626.
- Busi, R., Yu, Q., Barrett-Lennard, R., & Powles, S. B. (2008). Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(8), 1281–1290.
- Busi, R., Neve, P., & Powles, S. (2013). Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. *Evolutionary Applications*, 6(2), 231–242.
- Chatham, L. A., Wu, C., Riggins, W. C., Hager, A. G., Young, B. G., Roskamp, G. K., & Tranel, P. J. (2015). EPSPS gene amplification is present in the majority of glyphosate-resistant Illinois waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. *Weed Technology*, 29(1), 48–55.
- Cobb, A. H. (2022). *Herbicides and plant physiology* (3rd ed.). Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-119-15769-4.
- Dang, H. T., Malone, J. M., Boutsalis, P., Krishnan, M., Gill, G., & Preston, C. (2018). Reduced translocation in 2,4-D-resistant oriental mustard populations (*Sisymbrium orientale* L.) from Australia. *Pest Management Science*, 74(7), 1524–1532.
- Délye, C., Deulvot, C., & Chauvel, B. (2013)^b. DNA analysis of herbarium specimens of the grass weed *Alopecurus myosuroides* reveals herbicide resistance pre-dated herbicides. *PLOS ONE*, 8(10), e75117.

- Délye, C., Jasieniuk, M., & Le Corre, V. (2013)^a. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), 649–658.
- Délye, C., Duhoux, A., Pernin, F., Riggins, C. W., & Tranel, P. J. (2015). Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Science*, 63(1), 91–115.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). *InfoStat versión 2020*. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Domínguez-Valenzuela, J. A., Gherekhloo, J., Fernández-Moreno, P. T., Cruz-Hipolito, H. E., Alcántara-de la Cruz, R., Sánchez-González, E., & 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.
- Easlon, H. M., & Bloom, A. J. (2014). Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. *Applications in plant sciences*, 2(7), 1400033.
- Falconer, D. S. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. Pearson Education India.
- Foes, M. J., Liu, L., Tranel, P. J., Wax, L. M., & Stoller, E. W. (1998). A biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistant to triazine and ALS herbicides. *Weed Science*, 46(5), 514–520.
- Gaines, T. A., Slavov, G., Hughes, D., Kuepper, A., Sparks, C., Oliva, J., Vila-Aiub, M., Garcia, M., Merotto Jr, A., & Neve, P. (2020a). Investigating the origins and evolution of a glyphosate-resistant weed invasion in South America. *Authorea Preprints*.
- Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A., Tranel, P. J., Küpper, A., & Dayan, F. E. (2020b). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30), 10307–10330.
- 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., & Westra, P. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 1029–1034.

- Gaines, T. A., Shaner, D. L., Ward, S. M., Leach, J. E., Preston, C., & Westra, P. (2011). Mechanism of resistance of evolved glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 5886–5889.
- Gressel, J. (2009). Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest Management Science*, 65(11), 1164–1173. <https://doi.org/10.1002/ps.1813>
- Gronwald, J. W. (1994). Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. In S. B. Powles & J. A. M. Holtum (Eds.), *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry* (pp. 27–60). CRC Press.
- Heap, I. (2014). Herbicide resistant weeds. In D. Pimentel & R. Peshin (Eds.), *Integrated Pest Management* (Vol. 3, pp. 21–301). Springer.
- Heap, I. (2025). The international survey of herbicide resistant weeds. Retrieved November 2020, from <http://www.weedscience.org>
- Heap, I., & Duke, S. O. (2017). Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Management Science*, 74(5), 1040–1049. <https://doi.org/10.1002/ps.4538>
- Hojsgaard, D., & Hörandl, E. (2019). The rise of apomixis in natural plant populations. *Frontiers in Plant Science*, 10, 358. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00358>
- Huffman, J. L., Riggins, C. W., Steckel, L. E., & Tranel, P. J. (2016). The EPSPS Pro106Ser substitution solely accounts for glyphosate resistance in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from Tennessee, United States. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(7), 1304–1312. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61103-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61103-1)
- Huffman, J., Hausman, N. E., Hager, A. G., Riechers, D. E., & Tranel, P. J. (2015). Genetics and inheritance of nontarget-site resistances to atrazine and mesotrione in a waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population from Illinois. *Weed Science*, 63(4), 799–809. <https://doi.org/10.1614/WS-D-14-00152.1>
- Ievinsh, G. (2023). Water content of plant tissues: So simple that almost forgotten? *Plants*, 12(6), 1238. <https://doi.org/10.3390/plants12061238>

- Jasieniuk, M., Brûlé-Babel, A. L., & Morrison, I. N. (1996). *The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds*. *Weed Science*, 44(1), 176–193. <https://doi.org/10.1017/S0043174500095231>
- Jha, P., Norsworthy, J. K., & Malik, M. S. (2007). *Effect of tillage and soybean canopy formation on temporal emergence of Palmer amaranth from a natural seed bank*. *Proceedings of the Southern Weed Science Society*, 60, 11.
- Jugulam, M., Niehues, K., Godar, A. S., Koo, D.-H., Danilova, T., Friebe, B., Sehgal, S., Varanasi, V. K., Wiersma, A., Westra, P., Stahlman, P. W., & Gill, B. S. (2014). *Tandem amplification of a chromosomal segment harboring EPSPS locus confers glyphosate resistance in Kochia scoparia*. *Plant Physiology*, 166(3), 1200–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245858>
- Kaundun, S. S., Jackson, L. V., Hutchings, S. J., Galloway, J., Marchegiani, E., Howell, A., McIndoe, E., Tuesca, D., & Moreno, R. (2019). *Evolution of target-site resistance to glyphosate in an Amaranthus palmeri population from Argentina and its expression at different plant growth temperatures*. *Plants*, 8(12), 512. <https://doi.org/10.3390/plants8120512>
- Kearse, M. J., & Pooni, H. S. (1996). *The genetical analysis of quantitative traits*. Chapman & Hall.
- Koo, D. H., Molin, W. T., Sasaki, C. A., Jiang, J., Putta, K., Jugulam, M., Friebe, B., & 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(14), 3332–3337. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719354115>
- Korres, N. E., & Norsworthy, J. K. (2017). *Palmer amaranth (Amaranthus palmeri) demographic and biological characteristics in wide-row soybean*. *Weed Science*, 65(4), 491–503. <https://doi.org/10.1017/wsc.2017.17>
- Kreiner, J. M., Tranel, P. M., Weigel, D., Stinchcombe, J. R., & Wright, S. (2020). *The genetic architecture and genomic context of glyphosate resistance*. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.03.933539>
- Küpper, A., Borgato, E. A., Patterson, E. L., Netto, A. G., Nicolai, M., de Carvalho, S. J., Scott, J. N., Gaines, T. A., & Christoffoleti, P. J. (2017). *Multiple resistance to glyphosate and acetolactate synthase inhibitors in Palmer*

- amaranth (Amaranthus palmeri) identified in Brazil. Weed Science, 65(3), 317–326. <https://doi.org/10.1017/wsc.2016.57>*
- Labrada, R., Caseley, J. C., & Parker, C. (1994). *Weed management for developing countries (Vol. 120). Food & Agriculture Organization.*
 - Larran, A. S., Palmieri, V. E., Tuesca, D., Permingeat, H. R., & Perotti, V. E. (2020). *Coexistence of target-site and non-target-site mechanisms of glyphosate resistance in Amaranthus palmeri populations from Argentina. Acta Scientiarum. Agronomy, 44, e55183. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v44i1.55183>*
 - Leguizamón, E. (2008). *Historia de la agricultura y el control de malezas en la Argentina (Material didáctico FCA-UNR).*
 - Leon, R. G., Dunne, J. C., & Gould, F. (2020). *The role of population and quantitative genetics and modern sequencing technologies to understand evolved herbicide resistance and weed fitness. Pest Management Science. <https://doi.org/10.1002/ps.6031>*
 - Liu, B. H. (2017). *Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press.*
 - Machado, V. S., Bandeen, J. D., Stephenson, G. R., & Lavigne, P. (1978). *Uniparental inheritance of chloroplast atrazine tolerance in Brassica campestris. Canadian Journal of Plant Science, 58(4), 977–981. <https://doi.org/10.4141/cjps78-143>*
 - Margaritopoulou, T., Tani, E., Chachalis, D., & Travlos, I. (2018). *Involvement of epigenetic mechanisms in herbicide resistance: the case of Conyza canadensis. Agriculture, 8(2), 17. <https://doi.org/10.3390/agriculture8020017>*
 - Markus, C., Pecinka, A., Karan, R., Barney, J. N., & Merotto, A. (2018). *Epigenetic regulation—contribution to herbicide resistance in weeds? Pest Management Science, 74(2), 275–281. <https://doi.org/10.1002/ps.4741>*
 - Matzrafi, M., Osipitan, O. A., Ohadi, S., & Mesgaran, M. B. (2021). *Under pressure: maternal effects promote drought tolerance in progeny seed of Palmer amaranth (Amaranthus palmeri). Weed Science, 69(1), 31–38. <https://doi.org/10.1017/wsc.2020.42>*

- Mesgaran, M. B., Matzrafi, M., & Ohadi, S. (2019). *Sex lability and dimorphism in dioecious Palmer amaranth (Amaranthus palmeri)*. *bioRxiv*, 769935. <https://doi.org/10.1101/769935>
- Mesgaran, M. B., Matzrafi, M., & Ohadi, S. (2021). *Sex dimorphism in dioecious Palmer amaranth (Amaranthus palmeri) in response to water stress*. *Planta*, 254(1), 17. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03569-5>
- Neve, P., Diggle, A., Smith, F., & Powles, S. B. (2003). *Simulating evolution of glyphosate resistance in Lolium rigidum I: population biology of a rare resistance trait*. *Weed Research*, 43(6), 404–417. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.2003.00373.x>
- Norsworthy, J. K., Ward, S. M., Shaw, D. R., Llewellyn, R., Nichols, R. L., Webster, T. M., Bradley, K. W., Stephen, G. F., Powles, S. B., Burgos, N. R., Witt, W. W., & Barret, M. (2012). *Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations*. *Weed Science*, 60(2), 31–62. <https://doi.org/10.1614/WS-D->
- Oerke, E. C. (2006). *Crop losses to pests*. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Osipitan, O. A., Matzrafi, M., Ohadi, S., & Mesgaran, M. B. (2021). *Maternal water stress reduces sensitivity of offspring to herbicides in Amaranthus palmeri (Palmer amaranth)*. *Weed Research*, 61(6), 486–495. <https://doi.org/10.1111/wre.12467>
- Owen, M. D. K. (2016). *Diverse approaches to herbicide-resistant weed management*. *Weed Science*, 64(3), 570–584. <https://doi.org/10.1614/WS-D-15-00070.1>
- Palma-Bautista, C., Torra, J., García, M. J., Bracamonte, E., Rojano-Delgado, A. M., Alcántara-de la Cruz, R., & De Prado, R. (2019). *Reduced absorption and impaired translocation endows glyphosate resistance in Amaranthus palmeri harvested in glyphosate-resistant soybean from Argentina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(4), 1052–1060. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06182>
- Palmieri, V. E. (2020). *Caracterización del mecanismo de resistencia a inhibidores ALS y glifosato en una subpoblación de Amaranthus palmeri*

identificada a campo (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.

- Panigo, E. S., Dellaferrera, I. M., Acosta, J. M., Bender, A. G., Garetto, J. I., & Perreta, M. G. (2012). Glyphosate-induced structural variations in *Commelina erecta* L. (Commelinaceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.10.011>
- Papa, J. C. (2002). Malezas tolerantes y resistentes a herbicidas. En *Actas del Seminario de Sustentabilidad de la Producción Agrícola*. INTA, JICA, Buenos Aires.
- Patzoldt, W. L., Dixon, B. S., & Tranel, P. J. (2003). Triazine resistance in *Amaranthus tuberculatus* (Moq) Sauer that is not site-of-action mediated. *Pest Management Science*, 59(11), 1134–1142. <https://doi.org/10.1002/ps.741>
- Perotti, V. E., Larran, A. S., Palmieri, V. E., Martinatto, A. K., & Permingeat, H. R. (2020). Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. *Plant Science*, 290, 110255. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110255>
- Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 317–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Radosevich, S., Holt, J., & Ghersa, M. (1997). *Weed ecology: Implications for management* (2nd ed.). Wiley & Sons.
- REM (2025). Red de conocimiento de malezas resistentes. Recuperado de <http://www.aapresid.org.ar/rem/las-malezas-siguen-ganando-terreno/>
- Ribeiro, D. N., Pan, Z., Duke, S. O., Nandula, V. K., Baldwin, B. S., Shaw, D. R., & Dayan, F. E. (2014). Involvement of facultative apomixis in inheritance of EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri*. *Planta*, 239(1), 199–212. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1965-6>
- Rosenhauer, M., Felsenstein, F. G., Piepho, H. P., Höfer, M., & Petersen, J. (2015). Segregation of non-target-site resistance to herbicides in multiple-resistant *Alopecurus myosuroides* plants. *Weed Research*, 55(3), 298–308. <https://doi.org/10.1111/wre.12127>
- Shaner, D. L. (2014). Lessons learned from the history of herbicide resistance. *Weed Science*, 62(3), 427–431. <https://doi.org/10.1614/WS-D-14-00054.1>

- Tranel, P. J., & Wright, T. R. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Science*, 50(6), 700–712. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0700:ROWTAH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0700:ROWTAH]2.0.CO;2)
- Trucco, F., Zheng, D., Woodyard, A. J., Walter, J. R., Tatum, T. C., Rayburn, A. L., & Tranel, P. J. (2007). Nonhybrid progeny from crosses of dioecious amaranths: Implications for gene-flow research. *Weed Science*, 55(1), 119–122. <https://doi.org/10.1614/WS-06-019R.1>
- Tuesca, D., Papa, J. C., & Morichetti, S. (2013). *Amaranthus palmeri*, una maleza arribada a nuestro país desde el hemisferio norte. INTA, Centro Regional Santa Fe, Estación Experimental Agropecuaria Oliveros.
- Tuesca, D., Papa, J. C., & Morichetti, S. (2016). Manejo de malezas problema. *Amaranthus palmeri* (S.) Watson: Bases para su manejo y control en sistemas de producción. *Red de conocimiento en malezas resistentes*, ISSN N° 2250-5350, Volumen VI.
- Vercellino, R. B., Pandolfo, C. E., Breccia, G., Cantamutto, M., & Presotto, A. (2018). AHAS Trp574Leu substitution in *Raphanus sativus* L.: Screening, enzyme activity and fitness cost. *Pest Management Science*, 74(7), 1600–1607. <https://doi.org/10.1002/ps.4865>
- Vila-Aiub, M. M., Neve, P., & Powles, S. B. (2009). Fitness cost associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist*, 184(4), 751–767. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03094.x>
- Vila-Aiub, M. M., Goh, S. S., Gaines, T. A., Han, H., Busi, R., Yu, Q., & Powles, S. B. (2014). No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri*. *Planta*, 239(3), 793–801. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-2022-x>
- Wang, T., Picard, J. C., Tian, X., & Darmency, H. (2010). A herbicide-resistant ACCase 1781 *Setaria* mutant shows higher fitness than wild type. *Heredity*, 105(5), 394–400. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.56>
- Weed Science Society of America Terminology Committee. (1998). Resistance and tolerance definitions. *Weed Technology*, 12(3), 789. Recuperado de <http://wssa.net/wssa/weed/resistance/herbicide-resistance-and-herbicide-tolerance-definitions/>

- Yanniccari, M., Gaines, T., Scursoni, J., Prado, R. D., & Vila-Aiub, M. (2022). *Global patterns of herbicide resistance evolution in Amaranthus spp.: An analysis comparing species, cropping regions and herbicides. Advances in Weed Science, 40(spe2), e0202200037. <https://doi.org/10.1111/awf.12345>*
- Zelaya, I. A., Owen, M. D. K., & VanGessel, M. J. (2004). *Inheritance of evolved glyphosate resistance in Conyza canadensis (L.) Cronq. Theoretical and Applied Genetics, 110(1), 58–70. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1674-7>*

ANEXO

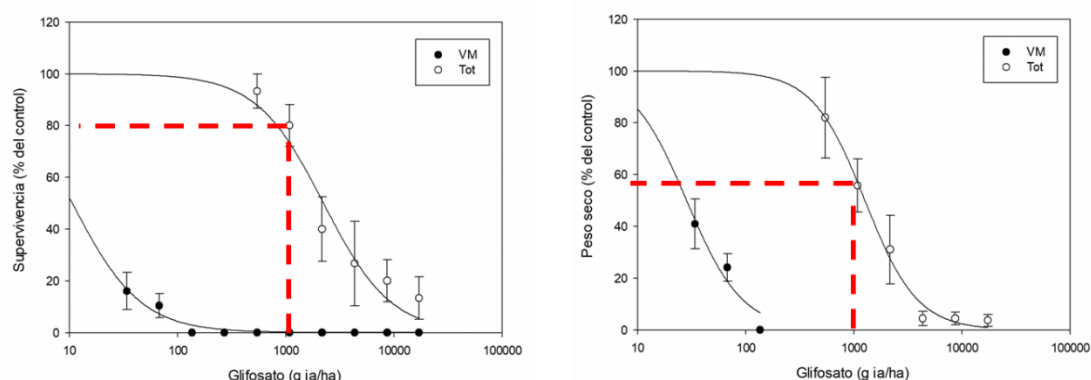


Figura S1. Curvas Dosis-Respuesta de la población de Totoras frente al glifosato. Efecto del glifosato sobre la supervivencia y biomasa de la población de Totoras (Tot). Las plantas de las poblaciones Tot (resistente) y VM (susceptible) fueron sometidas a la aplicación de dosis crecientes de glifosato. Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia (gráfico de la izquierda) y peso seco (gráfico de la derecha) respecto de los grupos controles no tratados. En línea punteada en rojo se indica la dosis aplicada a campo (1X) de glifosato. Las barras verticales representan \pm el error estándar de la media. Datos tomados de Larran et al., 2020.

Tabla S1. Determinación de las variables fenotípicas y los genotipos en 9 plantas promedio de cada una de las 25 familias de medio-hermanos seleccionadas para el análisis.

Familia	Planta	Área inicial	Área foliar	Delta de área	Biomasa fresca	Biomasa seca	Genotipo
53	1	12,50	19,00	6,50	0,9350	0,2100	Rr
	2	12,00	12,00	0,00	0,9010	0,2000	Rr
	3	6,50	31,90	25,40	1,5300	0,2760	RR
	4	6,00	17,40	11,40	0,8600	0,1870	Rr
	5	26,50	32,00	5,50	2,7170	0,5530	RR
	6	26,00	25,00	-1,00	1,7354	0,3603	Rr
	7	6,00	20,00	14,00	1,2298	0,2058	Rr
	8	0,50	0,00	-0,50	0,0000	0,0000	Rr
33	1	24,50	35,50	11,00	2,1390	0,4290	RR
	2	14,50	21,30	6,80	0,6580	0,1500	Rr
	3	2,50	6,30	3,80	0,3130	0,0530	Rr
	4	30,50	24,40	-6,10	2,3813	0,4734	RR
	5	21,00	20,00	-1,00	1,2703	0,2473	RR
	6	2,50	20,70	18,20	1,1302	0,1758	RR

	7	4,50	4,00	-0,50	0,6394	0,1037	RR
	8	4,50	17,00	12,50	0,7862	0,1497	RR
	9	3,75	26,00	22,25	1,0965	0,2494	RR
34	1	28,00	23,00	-5,00	1,5300	0,3550	Rr
	2	2,00	3,50	1,50	0,2040	0,0400	Rr
	3	6,00	14,00	8,00	0,6400	0,1180	RR
	4	4,00	10,00	6,00	0,8070	0,1660	RR
	5	1,75	5,75	4,00	0,3070	0,0610	RR
	6	0,75	1,50	0,75	0,1010	0,0190	RR
	7	0,85	5,20	4,35	0,2130	0,0320	RR
	8	6,50	21,70	15,20	1,1383	0,2796	RR
	9	22,00	25,00	3,00	2,1151	0,5125	RR
58	1	11,00	36,00	25,00	1,6750	0,3240	RR
	2	3,50	15,00	11,50	0,6400	0,1160	RR
	3	1,00	2,20	1,20	0,2454	0,1686	RR
	4	0,50	1,00	0,50	0,0761	0,0113	RR
	5	7,00	59,00	52,00	1,1616	0,2122	RR
	6	5,00	18,80	13,80	0,9071	0,0343	RR
	7	23,00	50,00	27,00	3,5723	0,7605	RR
	8	12,00	31,00	19,00	1,5122	0,2973	RR
	9	4,50	24,00	19,50	1,0393	0,1946	RR
5	1	4,00	10,50	6,50	0,5890	0,1150	RR
	2	13,50	27,00	13,50	1,3957	0,2450	RR
	3	12,50	22,00	9,50	1,3834	0,2676	RR
	4	12,50	32,00	19,50	1,7185	0,4013	RR
	5	28,00	32,00	4,00	2,7982	0,5840	RR
	6	76,50	25,00	-51,50	5,0861	0,9461	RR
	7	0,50	1,00	0,50	0,1290	0,0122	RR
	8	34,00	29,00	-5,00	2,6000	0,5200	RR
	9	29,00	35,00	6,00	2,2615	0,4523	RR
23	1	9,50	9,00	-0,50	0,5000	0,1100	RR
	2	25,00	39,00	14,00	2,5338	0,5043	RR
	3	0,50	2,00	1,50	0,1685	0,0209	RR
	4	5,50	8,00	2,50	0,6049	0,1490	RR
	5	10,50	12,50	2,00	0,6988	0,1238	RR
	6	5,50	45,00	39,50	3,4937	0,6327	RR
	7	2,00	3,60	1,60	0,2130	0,0451	RR
	8	0,50	0,00	-0,50	0,0000	0,0000	Rr
	9	6,00	0,00	-6,00	0,0000	0,0000	RR
54	1	15,00	18,70	3,70	1,1040	0,2230	RR
	2	4,50	6,30	1,80	0,3100	0,0650	RR
	3	2,00	3,40	1,40	0,3573	0,0603	RR
	4	5,00	23,00	18,00	1,0499	0,1735	RR
	5	1,50	1,00	-0,50	0,0483	0,0126	RR

	6	3,00	5,00	2,00	0,4741	0,0898	RR
	7	2,00	4,00	2,00	0,2232	0,0600	RR
	8	1,00	2,60	1,60	0,2436	0,0406	RR
	9	4,00	10,00	6,00	0,3600	0,0755	RR
	10	0,50	20,00	19,50	1,1800	0,1674	RR
32	1	10,00	25,00	15,00	1,2039	0,2446	RR
	2	6,50	7,00	0,50	0,4600	0,1651	RR
	3	3,00	0,00	-3,00	0,0000	0,0000	RR
	4	13,00	30,00	17,00	1,2865	0,3315	RR
	5	7,50	24,00	16,50	0,8482	0,1679	RR
	6	0,50	0,00	-0,50	0,0000	0,0000	RR
	7	16,00	31,90	15,90	1,6083	0,3298	RR
	8	2,00	14,00	12,00	0,7500	0,1416	RR
20	1	12,50	34,00	21,50	2,5528	0,4772	RR
	2	30,00	20,00	-10,00	1,5118	0,2837	RR
	3	5,00	6,40	1,40	0,6766	0,1476	RR
	4	4,00	14,00	10,00	1,1292	0,2100	RR
	5	11,50	38,00	26,50	2,7300	0,6395	RR
	6	20,10	31,00	10,90	1,1077	0,1884	RR
	7	3,30	40,00	36,70	1,7137	0,2564	RR
	8	20,10	34,00	13,90	2,2780	0,4443	RR
	9	1,50	4,50	3,00	0,1089	0,0260	RR
7	1	7,50	18,00	10,50	1,2033	0,2668	RR
	2	15,00	26,00	11,00	2,0793	0,4067	RR
	3	1,50	2,00	0,50	0,1408	0,0260	RR
	4	4,00	22,00	18,00	1,3593	0,2929	RR
	5	34,00	18,00	-16,00	2,2239	0,4095	RR
	6	24,15	22,00	-2,15	1,8918	0,3624	RR
	7	6,75	38,00	31,25	1,8061	0,3762	RR
46	1	37,50	47,00	9,50	3,0174	0,6625	RR
	2	35,00	33,00	-2,00	2,0646	0,4550	RR
	3	11,00	14,00	3,00	0,9182	0,1999	RR
	4	3,50	2,70	-0,80	0,2037	0,0656	RR
	5	2,50	8,40	5,90	1,0876	0,1557	RR
	6	2,50	3,00	0,50	0,3750	0,0932	RR
	7	2,50	39,00	36,50	1,4823	0,2741	RR
	8	14,00	27,00	13,00	2,7981	0,6407	RR
16	1	17,50	25,00	7,50	1,6366	0,3650	RR
	2	20,00	33,00	13,00	2,1759	0,4265	RR
	3	8,50	27,00	18,50	2,2956	0,4603	RR
	4	24,00	25,00	1,00	2,1426	0,4295	RR
	5	0,50	1,00	0,50	0,4480	0,0537	RR
	6	4,50	34,00	29,50	1,3642	0,3148	RR
	7	10,00	26,00	16,00	1,3624	0,2802	RR

	8	2,00	0,00	-2,00	0,0000	0,0000	RR
40	1	24,50	12,80	-11,70	1,6250	0,3466	RR
	2	13,50	34,60	21,10	1,3891	0,2666	RR
	3	12,50	21,00	8,50	1,3537	0,2975	RR
	4	5,00	11,00	6,00	0,8210	0,1328	RR
	5	12,50	37,00	24,50	2,3382	0,4630	RR
	6	6,75	18,00	11,25	0,7500	0,1175	RR
	7	25,00	45,00	20,00	2,6080	0,5588	RR
	8	3,90	29,00	25,10	1,1607	0,1672	RR
	9	25,00	22,00	-3,00	0,8587	0,0947	RR
21	1	6,00	10,00	4,00	0,5852	0,1317	RR
	2	37,50	25,00	-12,50	3,7472	0,7420	RR
	3	6,50	9,00	2,50	0,6257	0,1346	RR
	4	29,00	27,00	-2,00	2,2250	0,4856	RR
	5	34,00	33,00	-1,00	2,6416	0,5468	Rr
	6	11,00	28,00	17,00	1,5000	0,2343	RR
	7	18,00	25,00	7,00	0,8970	0,1856	RR
	8	29,00	8,00	-21,00	0,7866	0,2032	RR
	9	18,00	33,50	15,50	1,4372	0,2937	RR
	10	34,00	21,00	-13,00	1,9020	0,3869	RR
56	1	1,50	4,00	2,50	0,1349	0,0230	RR
	2	3,30	21,00	17,70	0,6894	0,0986	RR
	3	1,50	15,00	13,50	0,4877	0,0499	RR
	4	10,00	15,00	5,00	0,6332	0,0948	RR
	5	1,50	20,80	19,30	0,9070	0,1193	RR
	6	3,90	26,00	22,10	0,9722	0,1451	RR
	7	23,00	43,00	20,00	1,7284	0,3424	RR
	8	5,00	8,60	3,60	0,2939	0,0437	RR
8	1	34,00	48,50	14,50	3,4140	0,6189	RR
	2	12,50	26,00	13,50	1,0836	0,2021	RR
	3	3,90	10,00	6,10	0,4976	0,0821	Rr
	4	29,00	27,00	-2,00	1,8730	0,4138	Rr
	5	34,00	35,00	1,00	2,4266	0,4767	RR
	6	1,50	17,00	15,50	0,7528	0,1070	RR
	7	1,50	1,00	-0,50	0,0636	0,0060	RR
	8	20,00	35,00	15,00	1,6200	0,2810	Rr
	9	6,75	32,00	25,25	1,6010	0,2753	RR
13	1	3,90	17,00	13,10	0,5405	0,0772	RR
	2	11,00	17,00	6,00	0,6160	0,1114	RR
	3	24,15	28,00	3,85	1,7083	0,4290	RR
	4	20,10	24,50	4,40	0,9543	0,1947	RR
	5	20,10	26,00	5,90	1,3587	0,2515	RR
	6	7,50	32,00	24,50	1,4147	0,2536	RR
	7	18,00	48,00	30,00	2,1755	0,3991	RR

	8	6,75	45,00	38,25	1,5506	0,2382	RR
	9	3,30	14,00	10,70	0,4422	0,0884	RR
1	1	6,05	18,80	12,75	1,2000	0,2400	Rr
	2	2,40	2,00	-0,40	0,4000	0,0800	Rr
	3	7,07	3,60	-3,47	0,6000	0,1200	RR
	4	5,16	9,60	4,44	0,9000	0,1800	RR
	5	5,08	4,80	-0,28	0,8000	0,1600	RR
	6	14,50	3,80	-10,70	0,7000	0,1400	RR
	7	2,42	9,00	6,59	0,5000	0,1000	RR
	8	15,00	16,00	1,00	1,6000	0,3200	RR
	9	5,30	10,00	4,71	1,0000	0,2000	RR
31	1	0,47	5,00	4,54	0,4000	0,0800	Rr
	2	0,82	15,20	14,38	0,8000	0,1600	Rr
	3	4,66	0,00	-4,66	0,0000	0,0000	RR
	4	1,14	12,40	11,26	0,9000	0,1800	Rr
	5	3,45	13,00	9,55	0,9000	0,1800	RR
	6	1,75	12,80	11,05	1,1000	0,2200	Rr
	7	1,40	25,80	24,40	0,7000	0,1400	Rr
48	1	1,09	10,00	8,91	0,9000	0,1800	Rr
	2	0,35	1,80	1,45	0,5000	0,1000	Rr
	3	1,15	15,10	13,95	0,3000	0,0600	Rr
	4	0,80	16,00	15,21	0,8000	0,1600	Rr
	5	1,43	13,40	11,97	1,3000	0,2600	Rr
	6	1,34	4,70	3,36	0,5000	0,1000	Rr
	7	3,17	3,60	0,43	0,7000	0,1400	Rr
	8	0,58	0,80	0,22	0,8000	0,1600	Rr
	9	1,32	11,00	9,69	0,9000	0,1800	Rr
39	1	0,22	2,11	1,90	0,1000	0,0200	Rr
	2	1,88	12,24	10,37	0,9000	0,1800	Rr
	3	1,54	15,80	14,26	0,9000	0,1800	Rr
	4	1,64	10,17	8,54	0,6000	0,1200	Rr
	5	1,04	2,11	1,08	0,2000	0,0400	Rr
	6	0,88	1,50	0,62	0,4000	0,0800	Rr
	7	0,38	1,07	0,69	0,5000	0,1000	Rr
	8	0,43	0,80	0,38	0,4000	0,0800	Rr
	9	1,22	3,11	1,90	1,1000	0,2200	Rr
52	1	20,00	0,00	-20,00	0,0000	0,0000	RR
	2	20,00	38,00	18,00	2,2190	0,4756	Rr
	3	34,00	45,00	11,00	2,1139	0,4237	Rr
	4	20,00	26,00	6,00	1,2000	0,2624	Rr
	5	2,50	0,00	-2,50	0,0000	0,0000	Rr
	6	24,15	43,00	18,85	2,3000	0,4765	Rr
	7	25,00	32,00	7,00	1,6880	0,2623	Rr
	8	20,00	22,00	2,00	1,2046	0,2124	Rr

	9	5,05	6,00	0,95	0,8000	0,1600	Rr
	10	1,95	2,20	0,25	0,4000	0,0800	Rr
	11	2,00	1,30	-0,70	0,7000	0,1400	Rr
42	1	11,00	27,00	16,00	1,0962	0,1933	Rr
	2	11,00	1,00	-10,00	0,0846	0,0299	Rr
	3	2,50	0,00	-2,50	0,0000	0,0000	Rr
	4	23,00	32,00	9,00	1,7323	0,3015	Rr
	5	23,00	31,00	8,00	1,9034	0,3503	Rr
	6	11,00	0,00	-11,00	0,0000	0,0000	Rr
	7	29,00	40,00	11,00	2,5244	0,4469	Rr
	8	6,75	17,00	10,25	0,9152	0,1716	Rr
	9	0,89	3,03	2,15	0,1000	0,0200	Rr
	10	1,90	14,30	12,40	0,7000	0,1400	Rr
	11	0,43	13,57	13,14	0,6000	0,1200	rr
	12	1,23	16,41	15,18	0,6000	0,1200	Rr
38	1	10,00	0,00	-10,00	0,0000	0,0000	RR
	2	18,00	21,00	3,00	0,9895	0,1958	RR
	3	18,00	26,00	8,00	1,0308	0,2088	RR
	4	34,00	33,00	-1,00	1,9700	0,3682	RR
	5	18,00	34,00	16,00	1,6440	0,2613	RR
	6	1,50	0,00	-1,50	0,0000	0,0000	RR
	7	24,15	24,00	-0,15	2,2050	0,4733	RR
	8	34,00	26,50	-7,50	1,7356	0,3883	RR
	9	2,23	5,00	2,78	0,3000	0,0600	Rr
	10	1,32	9,00	7,68	0,8000	0,1600	Rr
	11	1,54	2,20	0,66	0,6000	0,1200	Rr
	12	1,18	7,00	5,83	0,4000	0,0800	Rr
	13	2,58	3,30	0,73	0,4000	0,0800	rr
30	1	3,04	5,77	2,73	0,5000	0,1000	rr
	2	10,50	0,00	-10,50	0,0000	0,0000	Rr
	3	0,80	0,00	-0,80	0,0000	0,0000	rr
	4	0,72	0,00	-0,72	0,0000	0,0000	rr
	5	5,50	0,00	-5,50	0,0000	0,0000	Rr
	6	2,50	0,00	-2,50	0,0000	0,0000	Rr
	7	2,00	0,00	-2,00	0,0000	0,0000	Rr
	8	1,50	0,00	-1,50	0,0000	0,0000	Rr
	9	0,68	0,00	-0,68	0,0000	0,0000	rr
	10	0,20	0,00	-0,20	0,0000	0,0000	Rr

Los valores de área están expresados en cm², los de biomasa, en g. En celeste se muestran las únicas 4 familias provenientes de una madre heterocigota (Rr), siendo las restantes madres homocigotas (RR); en verde se resaltan las 6 plantas que presentaron el genotipo rr y en naranja, aquellas plantas que murieron luego de la aplicación del herbicida.