

# ¿Cuánto le cuesta al nabón (*Raphanus sativus* L.) ser resistente a herbicidas inhibidores de AHAS?: Implicancias para el manejo

Vercellino, R.B.<sup>1</sup>; Pandolfo, C.E.<sup>1</sup>; Breccia, G.<sup>2</sup>; Hernández, F.<sup>3</sup>; Cantamutto, M.<sup>4</sup>; Presotto, A.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>CERZOS, Dpto. Agronomía, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, Bahía Blanca. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario, Universidad Nacional de Rosario (IICAR, UNR)-CONICET, Zavalla. <sup>3</sup>EEA-INTA Hilarío Ascasubi. <sup>4</sup>rbvercellino@cerzos-conicet.gobar

Citar como: |o|o|o|o|

## Resumen

El nabón (*Raphanus sativus* L.) es una maleza problemática ampliamente difundida en las regiones templadas de América que ha desarrollado resistencia a los herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) debido a la mutación Trp574Leu. Las mutaciones que aportan resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS pueden estar asociadas a efectos pleiotrópicos negativos sobre la aptitud biológica, también llamados costos de resistencia. Este estudio informa los efectos de la mutación Trp574Leu sobre la actividad enzimática AHAS, los caracteres reproductivos de nabón sin interferencia interespecífica y la biomasa seca aérea total y los caracteres reproductivos de nabón cultivado bajo la interferencia de dos densidades de trigo. La actividad enzimática AHAS fue 3,2 veces mayor en el biotipo susceptible respecto al resistente. En ausencia de interferencia interespecífica, el biotipo resistente mostró un número de semillas 22–38% menor y una producción de semillas por planta 21–47% menor que el biotipo susceptible. En condiciones de interferencia con trigo, el bio-

tipo resistente mostró una biomasa aérea total 36–46% menor, un número de semillas 26–47% menor y una producción de semillas por planta 36–53% menor que el biotipo susceptible, y estas diferencias fueron más evidentes a mayor densidad de plantas. El costo de resistencia encontrado podría reducir la frecuencia del alelo resistente en ambientes no tratados con herbicidas inhibidores de AHAS. Nuestros resultados sugieren que la ausencia de aplicación de herbicidas inhibidores de AHAS dentro de un programa integrado de manejo de malezas y el mantenimiento de banquinas, caminos rurales y márgenes de los campos como refugios de plantas susceptibles brinda una oportunidad para minimizar o revertir la evolución de la resistencia a herbicidas. Finalmente, la interferencia de nabón podría resultar en pérdidas de rendimiento de trigo superiores al 65%.

**Palabras clave:** nabón, resistencia a herbicidas, costo de resistencia, mutación Trp574Leu, actividad enzimática AHAS.

## Summary

Feral radish (*Raphanus sativus* L.) is a prob-



lematic weed widely distributed in temperate zones of the Americas that has become resistant to acetohydroxyacid synthase (AHAS) inhibitor herbicides due to the Trp574Leu mutation. AHAS gene mutations endowing herbicide resistance may have negative pleiotropic effects on fitness, also called cost of resistance. This study reports the effects of the Trp574Leu mutation on AHAS activity, reproductive traits of feral radish under no interspecific interference and total dry-biomass and reproductive traits of feral radish under two wheat densities interference. AHAS activity was 3.2-fold higher in the susceptible biotype than in the resistant one. Under no interspecific interference, the resistant biotype showed 22–38% lower seeds per plant and 21–47% lower plant yield than the susceptible. Under wheat interference, the resistant biotype had 36–46% less total above-ground biomass, 26–47% less seeds per plant, and 36–53% less plant yield than the susceptible one, and these differences were more evident at higher plant density. The fitness costs could reduce the frequency of the resistant allele in areas untreated with AHAS inhibiting herbicides. Our results suggest that incorporating non-AHAS herbicidal approaches into integrated weed-management programs and maintaining fence lines, roadsides and fields margin as refuges of susceptible plants provides an opportunity to minimize or reverse

herbicide resistance evolution. Finally, feral radish interference could result in wheat yield losses greater than 65 %.

**Keywords:** feral radish, herbicide resistance, resistance cost, Trp574Leu mutation, AHAS activity.

## INTRODUCCIÓN

El rábano o rabanito (*Raphanus sativus* L., familia Brassicaceae) es una especie hortícola, domesticada independientemente en Europa y el este de Asia hace al menos 5000 años, también empleada como forrajera y recientemente difundida como cultivo de cobertura invernal (Snow & Campbell, 2005; Lawley *et al.*, 2011; Bertolotto & Marzetti, 2017). La especie es autoincompatible, polinizada por insectos y presenta alto flujo de genes (Ellstrand *et al.* 1989). Aunque la especie carece de un antecesor silvestre reconocido, en diversas partes del mundo ha desarrollado biotipos invasores, que forman poblaciones extendidas, vulgarmente conocidas como “nabón”. Se considera que las poblaciones de nabón corresponden a formas de-domesticadas (ferales) derivadas del cultivo (Snow & Campbell, 2005; Pandolfo *et al.*, 2018). El nabón es una maleza problemática ampliamente difundida en zonas templadas de Sudamérica y en Estados Unidos (Snow & Campbell, 2005). Ha desarrollado resistencia a los herbicidas

inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS, comúnmente conocida como acetolactato sintetasa (ALS), (grupo 2) en Brasil, Chile y Argentina (Theisen, 2008; Pandolfo *et al.*, 2013; Heap, 2021).

En la Argentina, el nabón es una maleza frecuente, conocida desde la década del 30' (Ibarra, 1937). Actualmente existen registros de su naturalización en al menos 20 provincias (Pandolfo *et al.*, 2018). Crece principalmente en ambientes disturbados, como márgenes de caminos, borde de los alambrados y en suelos agrícolas. Es una maleza habitual en cultivos de cereales, oleaginosas y algunos cultivos forrajeros y horticolas (Pandolfo *et al.*, 2018; Vercellino *et al.*, 2018). Presenta un ciclo de vida anual, otoño-inverno-primaveral, aunque si las condiciones son favorables también puede desarrollar un segundo ciclo estival (Pandolfo *et al.*, 2018). En el sudeste bonaerense, un área principalmente agrícola en la que predomina (>90 %) la labranza cero, altamente dependiente de herbicidas, el nabón es una de las malezas con mayor incremento en los últimos 40 años (Scursioni *et al.*, 2014). En esta región, se demostró la presencia de la mutación Trp574Leu responsable de la resistencia a las cinco familias de herbicidas inhibidores de AHAS (Pandolfo *et al.*, 2016; Vercellino *et al.*, 2018). Desde su detección en 2008, la distribución de nabón resistente a herbicidas inhibidores de AHAS incrementó rápidamente, y en 2019, se informó su presencia en el sur de la provincia de Buenos Aires, y en las provincias de Salta y Tucumán (AAPRESID, 2019).

La enzima AHAS/ALS, es la primera enzima involucrada en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina, y es el sitio de acción de cinco familias químicas de herbicidas: sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil-benzoatos y sulfonil-amino-carbonil-triazolinonas (Duggleby *et al.*, 2008). Desde su introducción en la década del 80', los herbicidas inhibidores de AHAS han sido globalmente utilizados debido a su amplio espectro de control de malezas a muy bajas dosis de aplicación, amplia selectividad de cultivos, alta eficacia de control, alta

actividad residual en el suelo, bajo impacto ambiental, baja toxicidad en mamíferos y costo relativamente bajo (Duggleby *et al.*, 2008). El uso repetido y generalizado de estos herbicidas, sumado al incremento en la adopción de los sistemas de labranza cero y la reducción en las rotaciones de cultivos, resultó en la evolución de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS en al menos 165 especies en todo el mundo (Kraehmer *et al.*, 2014; Yu & Powles, 2014; Heap, 2021). Esta resistencia se debe principalmente a mutaciones puntuales en la secuencia del gen que codifica la enzima (Yu & Powles, 2014). Hasta la fecha, se han identificado 29 mutaciones en ocho posiciones del gen AHAS que confieren resistencia a herbicidas, apareciendo en mayor frecuencia la mutación Trp574Leu en condiciones de campo (Tranel *et al.*, 2021).

Las mutaciones que confieren resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS pueden estar asociadas a efectos pleiotrópicos negativos, también llamado “costo de resistencia” (Vila-Aiub *et al.*, 2009). Este costo puede afectar la persistencia y evolución de los alelos resistentes en ambientes sin selección por herbicidas (Baucom, 2019; Vila-Aiub, 2019). En este caso, el costo de resistencia se debe a que las mutaciones en el sitio de unión de los herbicidas pueden alterar la actividad enzimática, debido a que algunos residuos de aminoácidos son esenciales tanto para la unión del herbicida como para el mantenimiento de su actividad catalítica (Duggleby *et al.*, 2008; Yu & Powles, 2014). Dependiendo de la especie, distintas mutaciones de resistencia a inhibidores de AHAS mostraron reducción (Li *et al.*, 2013), incremento (Yu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013) o ausencia de efectos pleiotrópicos (Zhao *et al.*, 2020) de la actividad enzimática.

La modificación en la actividad enzimática no necesariamente se traduce en costos biológicos a nivel de planta entera (Yu & Powles, 2014). La expresión de los costos de resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS parece ser variable, dependiendo de la mutación específica, la especie de maleza y las condiciones ecológicas (Tardif *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013;



Panozzo *et al.*, 2017). Por ejemplo, *Lolium rigidum*, *Raphanus raphanistrum* y *Kochia scoparia*, con cinco, cuatro y dos mutaciones de resistencia en *AHAS*, respectivamente, incluyendo la mutación Trp574Leu, no mostraron efectos significativos sobre el crecimiento y la competitividad (Yu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Yu & Powles, 2014). En estos casos, es probable que los alelos de resistencia permanezcan en la población, aún en ambientes sin selección con herbicidas. Contrariamente, la mutación Trp574Leu mostró fuertes efectos pleiotrópicos sobre la morfología y anatomía de las hojas en *Amaranthus powellii*, resultando en reducciones significativas en el crecimiento y la producción de semillas (Tardif *et al.*, 2006). En este caso, podría esperarse la reducción de los alelos resistentes en ambientes sin aplicaciones de herbicidas inhibidores de AHAS. En *Echinochloa crus-galli*, la mutación de resistencia Ala122Asn redujo 43 % la producción de semillas en ausencia de competencia, pero ese efecto no se manifestó bajo condiciones de alta competencia. Esta observación sugi-

ere que mantener la densidad de plantas tan baja como sea posible podría incrementar el éxito reproductivo de biotipos susceptibles y por ende contribuir a la reducción de los alelos resistentes (Panozzo *et al.*, 2017). Una mayor comprensión del efecto de los alelos de resistencia a herbicidas sobre la aptitud biológica de las malezas es esencial para predecir la evolución de la resistencia y desarrollar estrategias de manejo en contra de los alelos resistentes.

La comparación de múltiples poblaciones susceptibles y resistentes o de individuos susceptibles y resistentes provenientes de la misma población constituyen dos de los métodos utilizados para reducir el efecto de las diferencias en el fondo genético (Vila-Aiub *et al.*, 2011; Keshkar *et al.*, 2019). El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad enzimática AHAS y los caracteres reproductivos de individuos de nabón susceptible y resistente a herbicidas inhibidores de AHAS con la mutación Trp574Leu, cultivados sin interferencia interespecífica (costo fisiológico) y en interferencia con el cultivo de trigo (costo ecológico).



**Figura 1.** Biomasa de *Vicia villosa* (barras blancas) y *Triticum secale* (barra negra) en monocultura de vicia (V) y vicia consociada con triticale (V+T), al momento del secado de los cultivos de cobertura.

**Figura 1.** Distribución de las accesiones de nabón susceptibles (S, verde) y resistentes (R, rojo) a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron dos accesiones resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS con la mutación Trp574Leu (R), PIE y BAL, y cuatro accesiones susceptibles (S), BAL-S, VIL, ASC y PRI, caracterizadas por Pandolfo *et al.* (2013, 2016) y Vercellino *et al.* (2018, 2021), colectadas en el sur de la provincia de Buenos Aires (Figura 1). PIE y BAL fueron colectadas en campos cultivados con girasol (*Helianthus annuus* Clearfield® (CL) y colza (*Brassica napus*) CL bajo labranza cero, luego de la aplicación de dosis comercial de imazapir e imazetapir, respectivamente. A partir de BAL, se generó una accesión homocigota R con la mutación Trp574Leu (BAL-R) utilizando un marcador CAPS específico (Pandolfo *et al.*, 2016). En el campo donde se colectó la accesión BAL, la población de nabón se distribuía en un continuo que incluía la invasión de lotes cultivados, márgenes de los lotes y banquinas. La accesión BAL-S, de probada susceptibilidad (Vercellino *et al.* 2018, 2021), fue colectada en adyacencias a BAL (<50 m), en sectores que no habían sido pulverizados. Esta accesión fue utilizada como contraparte S para reducir el efecto de las diferencias debidas al fondo genético (Vila-Aiub *et al.*, 2011; Keshkar *et al.*, 2019; Vercellino *et al.*, 2021). VIL fue colectada en un campo cultivado con girasol, PRI en un área sin aplicaciones de herbicidas, y ASC en un campo con riego de Hilario Ascasubi (Vercellino *et al.* 2018). Antes de los experimentos, las accesiones fueron cultivadas en jardín común en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional de Sur (UNS), Bahía Blanca (38°41'38"S, 62°14'53"O). La contaminación por polen entre accesiones fue prevenida encerrando a cada accesión en carpas construidas con malla antiáfidos y la polinización fue facilitada agregando un núcleo de abejas dentro de cada carpa. Las silicuas maduras fueron cosechadas, trilladas, y las semillas almacenadas a temperatura ambiente.

En el experimento 1, se utilizaron las acce-

siones PIE y PRI, en el experimento 2, las accesiones PIE, BAL, BAL-S, VIL, ASC y PRI, y en el experimento 3, las accesiones BAL-R y BAL-S.

### Experimento 1: Actividad de la enzima AHAS in vitro

La actividad enzimática AHAS *in vitro* fue evaluada en el tejido foliar de plántulas en estado de 2-3 hojas de las accesiones PRI (S) y PIE (R), siguiendo los métodos de Yu *et al.* (2010) con modificaciones propuestas por Breccia *et al.* (2013). El acetolactato producido fue convertido a acetoina y cuantificado utilizando un método colorimétrico. La absorbancia fue medida espectrofotométricamente a 530 nm y la actividad enzimática AHAS fue calculada como la media de tres repeticiones independientes, expresadas en  $\mu\text{M}$  de acetoina  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  de peso fresco. La actividad enzimática AHAS extraíble fue comparada entre R y S utilizando la prueba *t* de Student en el software estadístico R 3.3.1.

### Experimento 2: Evaluación de la aptitud reproductiva sin interferencia interespecífica

Se realizaron dos experimentos en el campo experimental para evaluar los caracteres reproductivos de nabón R y S, sin competencia con un cultivo. El suelo del campo experimental es de textura arenosa-franca con buen drenaje, 1,1 % de materia orgánica y pH 7,7. El biotipo R estuvo representado por las dos accesiones con la mutación Trp574Leu (PIE y BAL) y el biotipo S por las cuatro accesiones S (BAL-S, VIL, ASC y PRI), obtenidas en una amplia gama de condiciones ambientales (Figura 1). La comparación de múltiples accesiones R y S permitió reducir el efecto de las diferencias en el origen genético y evaluar la importancia de los diferentes orígenes genéticos sobre la aptitud de los genes de resistencia (Vila-Aiub *et al.*, 2011; Vila-Aiub *et al.*, 2015; Keshkar *et al.*, 2019). Los experimentos fueron realizados en dos estaciones de crecimiento, mayo - diciembre (2016) y agosto - enero (2016/17) para simular la dinámica de crecimiento de nabón, que se considera una especie facultativa (Snow & Campbell,

2005), ya que dos cohortes pueden ser observadas comúnmente en el agroecosistema.

Las plántulas de las seis accesiones se cultivaron en invernáculo ( $20 \pm 5$  °C, luz natural y riego diario). En el estado de plántula de 3-4 hojas, 200 plántulas de tamaño similar de cada accesión se trasplantaron al campo experimental en bloques completos con cuatro repeticiones. Las parcelas consistieron en cinco hileras espaciadas a 1 m, con 10 plantas por hilera a intervalos de 0.3 m. Las plantas fueron regadas mediante riego por goteo complementario y fertilizadas con 50 kg ha<sup>-1</sup> de fosfato diamónico al trasplante y 120 kg ha<sup>-1</sup> urea en el estado de roseta. Se realizó desmalezado manual para evitar interferencia interespecífica. Los experimentos se realizaron de la misma manera en ambas estaciones de crecimiento.

En el estado de madurez, se evaluó altura y número de ramas primarias en tres plantas adyacentes en el medio de la hilera central de cada parcela. Las silicuas fueron cosechadas, secadas en condiciones de laboratorio, contadas y trilladas. Las semillas se pesaron para obtener producción de semillas por planta. El peso unitario de las semillas se estimó mediante el peso promedio de cuatro réplicas de 100 semillas. El número de semillas por planta se estimó dividiendo la producción de semillas por planta dividido el peso de las semillas para cada planta. El número de semillas por silicua resultó del cociente entre el número total de semillas por planta y el número de silicuas por planta. Los datos de las tres plantas de cada parcela se promediaron para el análisis estadístico.

Para investigar las diferencias en altura, número de ramas, número de silicuas, semillas por silicua, número de semillas, peso de las semillas y producción de semillas por planta entre biotipos R y S se utilizó un modelo lineal mixto basado en la estimación de máxima verosimilitud restringida (REML) con PROC MIXED en el software SAS. Las estaciones de crecimiento y los biotipos (R y S) se consideraron efectos fijos, y los bloques dentro de cada estación de crecimiento, accesión dentro de biotipo y

la interacción entre estación de crecimiento y accesión fueron considerados efectos aleatorios.

### Experimento 3: Evaluación de la aptitud biológica en interferencia con trigo

En el campo experimental se realizaron dos experimentos para evaluar la biomasa seca aérea total y los caracteres reproductivos de nabón R y S en condiciones de interferencia con trigo. Los biotipos R y S estuvieron representados por las accesiones R homocigota para la mutación Trp574Leu (BAL-R) y su contraparte S (BAL-S), proveniente de la misma población, para minimizar las diferencias debidas al fondo genético (Vila-Aiub *et al.*, 2015; Keshkar *et al.*, 2019). Los experimentos se realizaron en dos estaciones de crecimiento, al igual que los experimentos anteriores. Se sembraron los cultivares de trigo ACA 360 a mediados de mayo (ciclo largo) y KLEIN PROTEO a principios de agosto (ciclo corto) de 2018, a densidades óptimas ajustadas a 200 y 350 plantas m<sup>-2</sup>, respectivamente. Las parcelas consistieron en nueve líneas de siembra espaciadas a 0,2m y 1,5m de largo. En el estado de 2-3 hojas de trigo, se trasplantaron plántulas de nabón R y S de tamaño similar (en el estado de 2-3 hojas cultivadas en invernáculo) entre las plantas de trigo ubicadas en el campo experimental de acuerdo al plan de densidad. Las densidades de nabón fueron 0 (control), 4, y 12 plantas m<sup>-2</sup>. Las plantas fueron regadas mediante riego por goteo complementario y fertilizadas con 90 kg ha<sup>-1</sup> de fosfato diamónico a la siembra y 200 kg ha<sup>-1</sup> de urea en el estado de cinco hojas del trigo. Las malezas no clasificadas como nabón se removieron regularmente en forma manual. Se utilizó un diseño en bloques completos al azar con cuatro repeticiones, y ambos experimentos fueron realizados de la misma manera.

En el estado de madurez, se midió altura y número de ramas primarias sobre cuatro plantas de nabón ubicadas en el centro de cada parcela. Las plantas fueron cortadas a nivel de superficie, secadas en estufa a 60 °C hasta peso constante y pesadas para eval-



uar biomasa seca aérea total por planta y por unidad de superficie. El número de silicuas y semillas por planta, el número de semillas por silicua, el peso de las semillas y producción de semillas por planta fueron evaluados de manera similar al experimento previo. En cada parcela, el rendimiento de trigo se estimó cosechando y trillando manualmente tres réplicas de 0,5 m de largo, ubicadas en las tres líneas centrales de cada parcela. El rendimiento de trigo fue estandarizado a 13,5 % de humedad. Los datos de trigo y de nabón de cada parcela se promediaron para el análisis estadístico.

La producción de biomasa seca aérea total por planta y por unidad de superficie, altura, número de ramas primarias, número de silicuas, semillas por silicua, número de semillas, peso de las semillas y producción de semillas por planta entre los biotipos R y S fueron comparadas utilizando ANOVA con PROC GLM en SAS. El modelo incluyó estación de crecimiento, biotipo (R y S), densidad y todas sus interacciones. Además, se utilizó ANOVA para evaluar el efecto de la interferencia de dos densidades de nabón R y S sobre el rendimiento de trigo. El modelo incluyó estación de crecimiento, densidad de maleza, biotipo, todas sus interacciones y bloque dentro de estación de crecimiento. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 38 especies resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS debido a la mutación Trp574Leu (Heap, 2021), sólo en unas pocas especies se ha evaluado el costo de resistencia (Vila-Aiub *et al.*, 2009). En el presente estudio, se observó que la actividad enzimática AHAS en el biotipo S ( $731,6$   $\mu\text{M}$  acetoína h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>) fue 3,2 veces más alta que en el biotipo R ( $226,4$   $\mu\text{M}$  acetoína h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>). Estos resultados concuerdan con lo observado en el pariente silvestre *Raphanus raphanistrum* (Li *et al.*, 2013), aunque en algunas especies los datos han sido opuestos (Yu *et al.*, 2010; Cross *et al.*, 2015), indicando que hay una interacción entre la mutación y la especie, mecanismo que aún no ha sido dilucidado (Yu & Powles, 2014). La menor producción de aminoácidos de cadena ramificada debido a la menor actividad enzimática AHAS en las plantas R podría impactar negativamente sobre la síntesis de proteína y, por lo tanto, afectar el metabolismo en algún punto del ciclo de vida de las plantas conduciendo a una menor aptitud (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

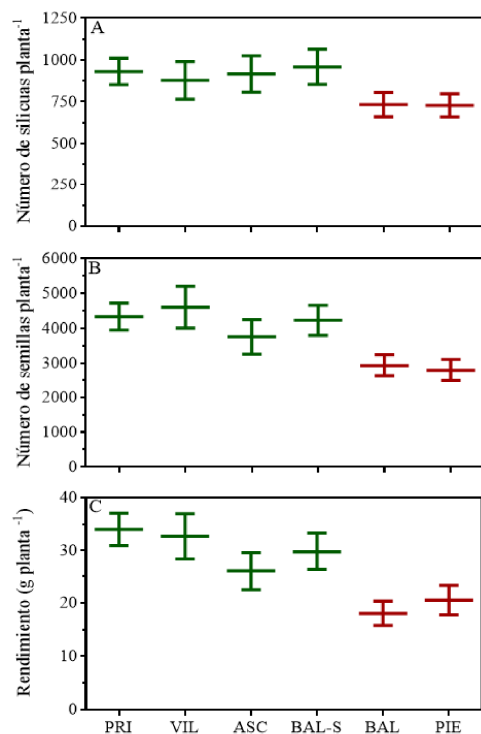
Tanto en los experimentos realizados en ausencia de interferencia interespecífica como en los realizados bajo interferencia con trigo, no se encontró ninguna interacción entre fuentes de variación. Por lo tanto, los datos de las dos estaciones de crecimiento fueron agrupados para cada experimento (Figuras 2 y 3). En ausencia de interferencia interespecífica, no se encontraron diferencias significativas en altura, número de ramas, semillas por silicua y peso de las semillas entre biotipos ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, el biotipo R mostró un número de silicuas 17 a 24% menor ( $P = 0,0473$ ), un número de semillas 22 a 39% menor ( $P = 0,0166$ ), y una producción de semillas por planta 21 a 47% menor ( $P = 0,0146$ ), respecto al biotipo S (Fig. 2).

Bajo interferencia con trigo, no se encontraron diferencias significativas entre biotipos en altura de planta, número de ramas y semillas por silicua ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, el biotipo R mostró una biomasa seca aérea total 36 – 46% menor ( $P < 0,0001$ ), que resultó en un número de silicuas 20 – 48% menor ( $P = 0,0008$ ), una biomasa de

semillas 10 – 11% menor ( $P = 0,0004$ ), un número de semillas 26 – 47% menor ( $P = 0,0006$ ) y finalmente en una producción de semillas por planta ura36 – 53% menor ( $P < 0,0001$ ) respecto a su contraparte S en ambas densidades de maleza (Figura 3). Los costos sobre la biología reproductiva encontrados en competencia con el cultivo de trigo fueron levemente superiores a los encontrados sin interferencia con cultivos

(Figuras 2 y 3).

Estos estudios revelan que el costo de resistencia asociados a la mutación Trp574Leu en las plantas de nabón fue evidente en un amplio rango de condiciones ambientales. El mecanismo fisiológico responsable del costo biológico encontrado tanto en ausencia de interferencia interespecífica, como en interferencia con dos densidades de trigo, probablemente estuvo asociado al efecto



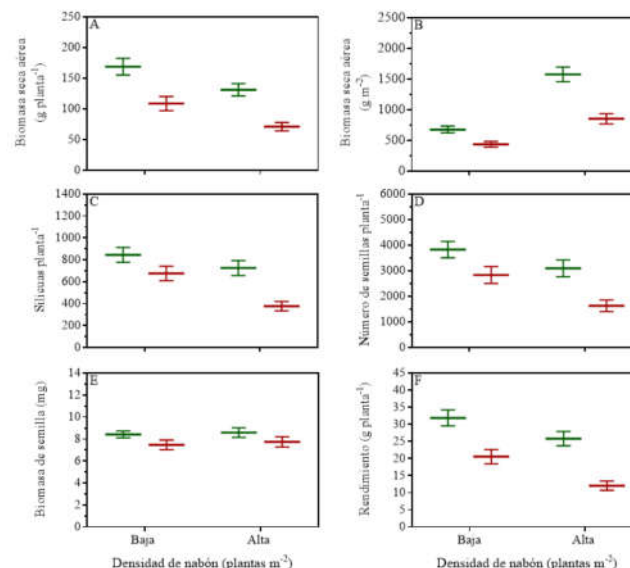
**Figura 2.** Número de silicuas (A), número de semillas (B) y producción de semillas por planta (C) de seis accesiones de nabón divididas en dos biotipos, susceptible (PRI, VIL, ASC y BAL-S) y resistente (BAL y PIE) a herbicidas inhibidores de AHAS con la mutación Trp574Leu. Los datos son promedio de dos estaciones de crecimiento. La línea horizontal y vertical indica la media  $\pm 1$  error estándar, respectivamente.

adverso de esta mutación sobre la actividad enzimática AHAS en los individuos R respecto a los S. La mutación Trp574Leu también mostró costo de resistencia en *Amaranthus powellii* (Tardif *et al.*, 2006).

En cuanto al cultivo, el rendimiento de trigo se redujo significativamente debido a la interferencia de nabón ( $P < 0,0001$ ). No se encontraron interacciones, ni diferencias en rendimiento entre fechas de siembra. En concordancia con el costo de resistencia, el biotipo R redujo en menor medida el rendimiento de trigo que su contraparte S, en las dos densidades evaluadas. Las plantas R y S redujeron el rendimiento de trigo 38 y 49 % a la menor y 54 y 66 % a la mayor densidad

de nabón, respectivamente (Figura 4).

Las implicancias ecológicas y evolutivas de una mutación adaptativa, como la mutación Trp574Leu, depende de múltiples interacciones entre factores de manejo relacionados con las aplicaciones de herbicidas, factores genéticos relacionados con el costo/beneficio biológico de la resistencia, factores biológicos relacionados con la ecología y el ciclo de vida de las malezas, y el tamaño poblacional (Vila-Aiub, 2019). El nabón es una especie de polinización cruzada obligada, polinizada por insectos (Snow & Campbell, 2005) y el alelo Trp574Leu de resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS es dominante (Yu *et al.*, 2014), por



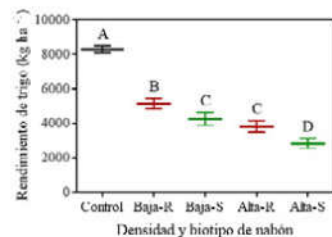
**Figura 3.** Biomasa seca aérea total por planta (A), biomasa seca aérea total (g/m<sup>2</sup>) (B) número de silicuas (C), número de semillas (D), biomasa de las semillas (E) y producción de semillas por planta (F) de nabón resistente a herbicidas inhibidores de AHAS con la mutación Trp574Leu (R) y su contraparte susceptible (S), cultivado a dos densidades, baja (4 plantas m<sup>-2</sup>) y alta (12 plantas m<sup>-2</sup>), en interferencia con trigo. Los datos son promedio de dos estaciones de crecimiento. La línea horizontal y vertical indica la media  $\pm 1$  error estándar, respectivamente.

lo tanto, el flujo de genes entre poblaciones cercanas podría facilitar la propagación de la mutación de resistencia a herbicidas. En sistemas agrícolas, los herbicidas son el principal agente de selección de las comunidades de malezas, por lo tanto, en áreas tratadas con herbicidas inhibidores de AHAS, se espera que la mutación Trp574Leu incremente su frecuencia (Pandolfo *et al.*, 2016). Sin embargo, este estudio muestra que la mutación Trp574Leu está asociada a un costo sobre la biología reproductiva de nabón en ambientes con y sin interferencia con cultivos, sugiriendo la reducción gradual de la frecuencia de los alelos R en ambientes cultivados y no cultivados, en ausencia de presión de selección por herbicidas inhibidores de AHAS (Baucom, 2019; Vila-Aiub, 2019).

En especies autoincompatibles de polinización cruzada obligada, como el nabón (Snow & Campbell, 2005), el flujo de genes entre poblaciones R y S podría modificar la dinámica de los alelos resistentes (Maino *et al.*, 2019). El flujo de genes desde poblaciones con nulo o bajos niveles de resistencia podría actuar como refugio, al incrementar la proporción de alelos S, ret-

rasando la evolución de la resistencia en poblaciones con altos niveles de selección y/o reduciendo más rápidamente la frecuencia de alelos R en áreas no tratadas con herbicidas, de manera similar a la estrategia utilizada en los cultivos con tecnología Bt (Maino *et al.*, 2019). De acuerdo con ello, se destaca la importancia de generar menor presión de selección y mantener las banquinas, caminos vecinales y/o bordes de los lotes sin aplicaciones de herbicidas (Maino *et al.*, 2019). De manera similar, la inundación de los lotes altamente infestados con nabón R con alelos S resultado de la utilización de *R. sativus* como cultivo de cobertura invernal también podría reducir la frecuencia de alelos R; sin embargo, el flujo de genes cultivo-maleza podría facilitar el escape del cultivo y/o estimular la invasividad de las poblaciones de malezas (Ellstrand *et al.*, 2013). En consecuencia, se debería estudiar el efecto del flujo de genes entre las poblaciones de nabón y *R. sativus* cultivo de cobertura sobre la evolución de las poblaciones de maleza previo a su utilización. Por otro lado, las semillas de nabón tienen requerimientos de oscuridad para germinar y están encerradas dentro de silicuas indehiscentes que imponen dormición fisiológica (Vercellino *et al.*, 2019), rasgos que favorecen la persistencia en el banco de semillas del suelo, que también podría actuar como refugio y provocar retraso tanto en la evolución de la resistencia como en la reducción de las poblaciones resistentes.

El costo de resistencia encontrado en este estudio representa una oportunidad para aplicar prácticas de manejo orientadas a reducir la evolución de la resistencia en nabón. La ausencia de aplicación de herbicidas inhibidores de AHAS, en conjunto con prácticas integradas de manejo de malezas, por ejemplo utilización de cultivos de cobertura (no *R. sativus*), rotación de cultivos, elección de cultivares competitivos, reducción de distanciamiento entre hileras, recolección y destrucción de semillas durante la cosecha, limpieza de las maquinarias agrícolas, y cualquier otra práctica orientada a la reducción de la producción y/o dispersión de semillas de nabón, podrían ser utilizadas para reducir la evolución de los alelos R. Estas



**Figura 4.** Rendimiento de trigo bajo interferencia de dos densidades de nabón resistente a herbicidas inhibidores de AHAS con la mutación Trp574Leu (R) y su contraparte susceptible (S); baja (4 plantas m<sup>-2</sup>) y alta (12 plantas m<sup>-2</sup>). Los datos son promedio de dos estaciones de crecimiento. La línea horizontal y vertical indica la media  $\pm$  ES, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$  LSD de Fisher).

prácticas deberían ser acompañadas por la rotación de los modos de acción herbicida y la aplicación de herbicidas de múltiples modos de acción a dosis y tamaño de malezas recomendadas para reducir el riesgo de evolución de resistencia a otros modos de acción (Norsworthy *et al.*, 2012).

## CONCLUSIONES

Estos resultados revelaron que la mutación Trp574Leu impone efectos pleiotrópicos

negativos tanto a nivel enzimático como sobre los caracteres reproductivos de nabón cultivados en ausencia de interferencia interespecifica y en interferencia con el cultivo de trigo. Este costo biológico podría reducir la frecuencia de los alelos resistentes y la velocidad de propagación de las poblaciones resistentes en ambientes sin selección por herbicidas inhibidores de AHAS. Además, la interferencia de nabón podría resultar en pérdidas de rendimiento del cultivo de trigo superiores al 65 %.

## Bibliografía

- ASOCIACIÓN ARGENTINA DE PRODUCTORES EN SIEMBRA DIRECTA (AAPRESID) (2019) Red de manejo de plagas (REM): Monitoreo de resistencia. Disponible en: <https://www.aapresid.org.ar/rem-malezas/>, Último acceso: 17 de febrero 2021.
- BAJOCOM RS (2019) Evolutionary and ecological insights from herbicide-resistant weeds: what have we learned about plant adaptation, and what is left to uncover? *New Phytol* 223, 68–82.
- BERTOLOTTI M & MARZETTI M (2017) Manejo de malezas problema. Cultivos de cobertura: Bases para su manejo en sistemas de producción. *Aapresid vol.* VII, 1–32.
- BRECCIA G, VEGA T, FELITTI SA, PICARDI L & NESTARES G (2013) Differential expression of acetylhydroxyacid synthase genes in sunflower plantlets and its response to imazapyr herbicide. *Plant Sci*, 208, 28–33.
- CROSS RB, MCCARTHY LB, MCELROY JS, THARAYIL N & BRIDGES WC (2015) Comparison of enzyme and growth characteristics in ALS-inhibitor susceptible and resistant annual bluegrass (*Poa annua*) biotypes. *Weed Sci*, 63, 220–226.
- DUGGLEBY RG, MCCOURT JA & GUDDAT LW (2009) Structure and mechanism of inhibition of plant acetylhydroxyacid synthase. *Plant Physiol. Biochem*, 46, 309–324.
- ELLSTRAND NC, DEVLINT B, & MARSHALL DL (1989) Gene flow by pollen into small populations: Data from experimental and natural stands of wild radish. *PNAS* 86, 9044–9047.
- ELLSTRAND NC, MEIRMAN P, RONG J et al. (2013) Introgression of crop alleles into wild or weedy populations. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 44, 323–345.
- HEAP I (2021) The International Herbicide-Resistant Weed Database. Disponible en: [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org), Último acceso: 17 de febrero 2021.
- IBARRA FE (1997) Malezas más comunes del trigo y del lino. *Almanaque del Ministerio de Agricultura, Ministerio de Agricultura*, Buenos Aires, p. 405–410.
- KESHIKAR E, ZIAND E, SASANFAR H et al. (2019) Assessing fitness costs from a herbicide-resistance management perspective: A review and insight. *Weed Sci*, 67, 137–148.
- KRAEHRER H, VAN ALMSICK A, BEFFA R et al. (2014) Herbicides as weed control agents: state of the art. II. Recent achievements. *Plant Physiol*, 166, 1132–18.
- LAWLEY YE, WEIL RR & TEASDALE JR (2011) Forage radish cover crop suppresses winter annual weeds in fall and before corn planting. *Agron. J.* 103, 137–144.
- LI M, YU Q, HAN H, VILA-AIUB M & POWLES SB (2013) ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: Evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. *Pest Manag. Sci.* 69, 689–695.
- MAINO JL, RENTON M, HOFFMANN AA & LUMINA PA (2019) Field margins provide a refuge for pest genes: beneficial to resistance management. *J. Pest Sci.* 32, 1017–1026.
- NORSWORTHY JK, WARD SM, SHAW DR et al. (2012) Reducing the risks of herbicide resistance: Best management practices and recommendations. *Weed Sci*, 60, 31–62.
- PANDOLFO CE, PRESOTTO A, MORENO F et al. (2016) Broad resistance to acetylhydroxyacid-synthase-inhibiting herbicides in feral radish (*Raphanus sativus* L.) populations from Argentina. *Pest Manag. Sci.* 72, 354–361.
- PANDOLFO CE, PRESOTTO A, POVERENE M & CANTAMUTTO M (2013) Limited occurrence of resistant radish (*Raphanus*

- sativus*) to AHAS-inhibiting herbicides in Argentina. *Planta Daninha* 31, 667–666.
- PANDOLFO CE, PRESOTTO A & CANTAMUTTO M (2018). *Raphanus sativus* L. - *Raphanus raphanistrum* L. En: Accarelli HA, Fernández OA & Leguizamón ES. Malezas e Invasoras de la Argentina, Tomo III: historia y biología, p. 625–636.
- PANZOZO S, SCARABELL L, ROSAN V & SATTIN M (2017) A New Ala-122-Asn amino acid change confers decreased fitness to ALS-Resistant Echinochloa crus-galli. *Front. Plant Sci.* 8, 2042.
- SCURSONI JA, GIGÓN R, MARTÍN AN et al. (2014). Changes in weed communities of spring wheat crops of Buenos Aires province of Argentina. *Weed Sci*, 62, 51–62.
- SNOW AA & CAMPBELL LG (2005) Can feral radishes become weeds? En: Gressel J. Crop Fertility and Volunteerism: A Threat to Food Security in the Transgenic Era? Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 193–206.
- TARCFI FJ, RAJCAN I & COSTEA M (2006) A mutation in the herbicide target site acetylhydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. *New Phytol*, 169, 251–264.
- THEISEN G (2008) Aspectos botánicos e relatos de resistencia de rabo silvestre aos herbicidas inhibidores de ALS. *Embrapa Clima Temperado*, Pelotas, Brasil, pp. 1–24.
- TRANEL PJ, WRIGHT TR & HEAP M (2021) Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Disponible en: <http://www.weedscience.com>, Último acceso: 17 de febrero 2021.
- VERCELLINO RB, PANDOLFO CE, BRECCIA G, CANTAMUTTO M & PRESOTTO A (2018) AHAS Trp574Leu substitution in *Raphanus sativus* L.: screening, enzyme activity and fitness cost. *Pest Manag. Sci.* 74, 1600–1607.
- VERCELLINO RB, PANDOLFO CE, CERRIOTA A, CANTAMUTTO M & PRESOTTO A (2019) The roles of light and pericarp on seed dormancy and germination in feral *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *Weed Res.* 59, 396–406.
- VERCELLINO RB, HERNÁNDEZ F, PANDOLFO CE, CANTAMUTTO M & PRESOTTO A (2021) Ecological fitness cost associated with the AHAS Trp574Leu mutation in feral *Raphanus sativus*. *Weed Res.* <https://doi.org/10.1111/wre.12472>
- VILA-AIUB MM (2019) Fitness of herbicide-resistant weeds: Current knowledge and implications for management. *Plants* 8, 469–480.
- VILA-AIUB MM, GUNDEL PE & PRESTON C (2015) Experimental methods for estimation of plant fitness costs associated with herbicide-resistance genes. *Weed Sci*, 63, 203–216.
- VILA-AIUB MM, NEVE P & POWLES SB (2009) Fitness costs associated with evolved herbicide resistance genes in plants. *New Phytol*, 184, 751–767.
- VILA-AIUB MM, NEVE P & ROUX F (2011) A unified approach to the estimation and interpretation of resistance costs in plants. *Heredity* 107, 386–394.
- YU Q, HAN H, VILA-AIUB MM & POWLES SB (2010) AHAS herbicide resistance endowing mutations: Effect on AHAS functionality and plant growth. *J. Exp. Bot.* 61, 3925–3934.
- YU Q & POWLES SB (2014) Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Manag. Sci.* 70, 1340–1350.
- ZHAO N, YAN Y, DU L, ZHANG X, LIU W & WANG J. (2020) Unravelling the effect of two herbicide resistance mutations on acetolactate synthase kinetics and growth traits. *J. Exp. Bot.* 71, 3535–3542.