



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN AGRONOMÍA

**CARACTERIZACIÓN AGROECOLÓGICA DE
POBLACIONES DE NABÓN (*Raphanus sativus* L.) CON
RESISTENCIA A HERBICIDAS AHAS**

Ing. Agr. Román Boris Vercellino

Director: Dr. Alejandro Presotto

Codirector: Dr. Miguel Cantamutto

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2020

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre marzo de 2016 y junio de 2019, bajo la dirección del Dr. Alejandro Presotto y la codirección del Dr. Miguel Cantamutto.

Ing. Agr. Román Boris Vercellino
DNI 34.708.359



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mereciendo la calificación de(.....)

Dedico esta tesis a mi
familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Ricardo Rubén Vercellino y Gladys Beatriz Weimann, pilares fundamentales de mi vida. Por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haber sido una guía para poder llegar hasta acá.

A Alejandro Presotto, director de esta tesis, quien estuvo siempre presente durante todos estos años. Por el tiempo y esfuerzo dedicado en mi formación, por su constante guía, sus consejos, sugerencias y siempre buena predisposición.

A Miguel Cantamutto, co-director de esta tesis. Por haber confiado en mí y haberme dado la posibilidad de presentarme a una Beca Doctoral, por su valiosa revisión y sabios consejos durante la escritura de la presente tesis.

A Alejandro Presotto, Claudio Pandolfo y Fernando Hernández. Colegas y amigos, con quienes comparto el día a día. Por todos los momentos compartidos, sus valiosos aportes en todo momento y su buena predisposición.

A Soledad Ureta. Por sus consejos y por estar siempre presente.

A Marta Miravalles. Por sus sabios consejos.

A Francisco Torres Carbonell y Selva Cuppari. Por su valiosa ayuda en los experimentos de laboratorio.

Al grupo de trabajo, Alejandro Presotto, Claudio Pandolfo, Fernando Hernández, Marta Miravalles, Soledad Ureta, Mónica Poverene, Francisco Torres Carbonell, Miguel Cantamutto, Sofía Tilleria, Ignacio Fanna. Por su compañerismo y siempre buena predisposición

A los tesinistas Maximiliano Ribes, Lucia Alonzi, Natanel Schlaps y Ana Julia Lurlund, por su colaboración en la toma de datos.

A la Dra. Gabriela Breccia y MSc. Graciela Nestares por recibirme en su grupo de investigación, durante una corta, pero valiosa estadía.

Al Dr. Roque Craviotto, de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Oliveros, Santa Fe, por su gran ayuda y predisposición en el experimento con rayos X.

A la Ing. Agr. Liliana Beatriz Iriarte, de la Chacra Experimental Integrada INTA Barrow, por facilitarme el híbrido de colza utilizado en dos experimentos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme una Beca Doctoral.

Al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y al Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS-CONICET) por brindarme las instalaciones, los medios y la libertad para desarrollar mis estudios de posgrado.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por financiar algunos de los experimentos realizados.

RESUMEN

La dinámica de germinación y la resistencia a herbicidas están entre los rasgos adaptativos más importantes para la evolución de las malezas en los sistemas agrícolas actuales. La dinámica de germinación puede determinar el éxito de una maleza en un agro-ecosistema y está modulada por las condiciones ambientales y los componentes endógenos y exógenos de las semillas. Por otro lado, la evolución de la resistencia a herbicidas, modulada por los factores biológicos vinculados a la especie y aquellos asociados a las prácticas de manejo, puede estar condicionada por los costos biológicos asociados a los alelos de resistencia. *Raphanus sativus* L. (nabón) es una maleza problemática en las regiones templadas de Sudamérica que ha desarrollado resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) debido a la mutación Trp-574-Leu. Actualmente, se desconocen los mecanismos que gobiernan la dormición y germinación en nabón, el efecto de la mutación Trp-574-Leu sobre su biología, y el efecto de su interferencia sobre los cultivos de invierno y de verano. Los objetivos de esta tesis fueron: evaluar la germinación de las semillas, aisladas y dentro de silicuas, en condiciones contrastantes de luz, temperatura y tiempos de madurez post-cosecha; estudiar los aspectos físicos, químicos y/o fisiológicos del fruto involucrados en la dormición; evaluar la dormición, germinación y emergencia de semillas y silicuas, en individuos susceptibles y resistentes, en condiciones contrastantes de luz, temperatura, humedad y profundidad; evaluar la actividad enzimática AHAS y los caracteres vegetativos y reproductivos en individuos resistentes y susceptibles en condiciones de baja (costo fisiológico) y alta (costo ecológico) interferencia; y cuantificar la merma en el rendimiento de los cultivos de colza, trigo y girasol debidas a la interferencia de densidades crecientes de nabón resistente. En este estudio, las semillas aisladas recién cosechadas no mostraron dormición primaria, pero la germinación se redujo por la exposición a la luz y la presencia del pericarpio, especialmente a bajas temperaturas. El pericarpio impuso dormición fisiológica por restricción mecánica del endocarpio a la expansión del embrión o a la absorción total de agua por las semillas. Ello tendría el potencial de dispersar o escalonar la germinación y emergencia por un período extendido y dificultar el control del nabón. El biotipo resistente mostró mayor germinación bajo exposición a la luz y, en consecuencia, mayor germinación de semillas sobre la superficie del suelo, sugiriendo mayor germinación en sistemas que podrían asemejarse a labranza cero, respecto al biotipo susceptible. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre biotipos en la germinación en oscuridad y en la emergencia desde semillas/silicuas enterradas. En condiciones de secano, el biotipo resistente mostró retraso y reducción en la emergencia final, pero estas diferencias no fueron encontradas en condiciones de alta disponibilidad hídrica. Por otro lado, el biotipo resistente mostró menor actividad enzimática AHAS, menor materia seca aérea total y menor aptitud reproductiva que el susceptible con y

sin interferencia con un cultivo. Este costo biológico podría reducir la frecuencia de los alelos resistentes en ambientes sin selección con herbicidas. Finalmente, la interferencia de nabón durante toda la estación de crecimiento resultó en graves pérdidas de rendimiento en colza y trigo, pero menores en girasol. Los resultados encontrados en esta tesis podrían ser utilizados para desarrollar estrategias de manejo en contra de las poblaciones de nabón resistente.

ABSTRACT

Germination dynamic and herbicide resistance are among the most important adaptive traits for weed evolution under current agricultural systems. Germination dynamic may determine the success of a weed in an agroecosystem and it is modulated by environmental conditions and endogenous and/or exogenous components of the seeds. On the other hand, the evolution of herbicide resistance, modulated by biological factors related to weed species and those factors associated with management practices, may be conditioned by fitness cost associated with herbicide resistance alleles. *Raphanus sativus* L. (feral radish) is a problematic weed in temperate zones of South America that has developed resistance to acetohydroxyacid synthase (AHAS) inhibitor herbicides due to the Trp-574-Leu mutation. At present, there are no information on seed dormancy and germination, the effect of the Trp-574-Leu mutation on fitness and the effect of the interference of feral radish on winter and summer crops. The objectives of this thesis were to evaluate germination of seeds, isolated and inside pods, under contrasting conditions of light, temperature and post-harvest times; evaluate physical, chemical and/or physiological aspects of pods involved in seed dormancy; evaluate dormancy, germination and emergence of seeds, isolated and inside pods, in individuals with and without the Trp-574-Leu mutation under contrasting conditions of light, temperature, humidity and depth; evaluate AHAS activity and vegetative and reproductive traits in feral radish individuals susceptible and resistant with the Trp-574-Leu mutation under low (physiological cost) and high (ecological cost) interference; and quantify yield losses in oilseed rape, wheat and sunflower crops due to season-long interference with increasing densities of resistant feral radish. Here, fresh isolated seeds showed no primary dormancy, but germination was reduced by exposure to light and the presence of the pericarp, especially under low temperatures. The pericarp imposed physiological dormancy by mechanical restriction of the endocarp to the embryo expansion and/or to full water uptake by seeds inside it. This would have the potential to spread the germination and emergence timing over a more extended period and hindering the control of feral radish. In addition, eight of 17 feral radish accessions presented individuals widely resistant to AHAS herbicides. The resistant biotype showed higher germination under light and consequently higher germination in seeds placed on soil surface, which could increase seed germination under no-tillage system respect to the susceptible biotype. However, no differences were found between biotypes on germination in dark and emergence from buried seeds/pods. Under rainfed conditions, the resistant biotype showed delay and final reduction in emergence; however, these differences were not found under high water availability. On the other hand, the resistant biotype showed lower AHAS activity, dry biomass and reproductive traits than the susceptible under low and high intra/interspecific competition. This fitness cost could reduce frequency of the resistant alleles without herbicide selection. Finally, season-

long feral radish interference resulted in serious yield losses in oilseed rape, wheat but less reduction in sunflower. The results found in this study could be used to develop management strategies against resistant feral radish populations.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados

Firma del Director

ÍNDICE

PREFACIO	2
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
LISTA DE TABLAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN GENERAL	17
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	25
<i>Objetivo general</i>	25
<i>Objetivos específicos</i>	25
CAPÍTULO 1: Rol de la luz y el pericarpio sobre la dormición y germinación de las semillas de <i>Raphanus sativus</i> (nabón)	27
INTRODUCCIÓN	27
MATERIALES Y MÉTODOS	31
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN	47
CAPÍTULO 2: Detección y costo de aptitud de la mutación de resistencia a AHAS Trp-574-Leu en poblaciones ferales de <i>Raphanus sativus</i> (nabón).	52
INTRODUCCIÓN	52
MATERIALES Y METODOS	54
RESULTADOS	59
DISCUSIÓN	64
CAPÍTULO 3: Aptitud de una población feral de <i>Raphanus sativus</i> (nabón) resistente a herbicidas AHAS: Dormición, germinación y emergencia	70
INTRODUCCIÓN	70
MATERIALES Y MÉTODOS	73
RESULTADOS	76
DISCUSIÓN	85
CAPÍTULO 4: Aptitud de una población feral de <i>Raphanus sativus</i> (nabón) resistente a herbicidas AHAS: Biología vegetativa y reproductiva	89
INTRODUCCIÓN	89
MATERIALES Y MÉTODOS	92

RESULTADOS	99
DISCUSIÓN.....	108
CAPÍTULO 5: Interferencia de <i>Raphanus sativus</i> resistente a herbicidas AHAS sobre colza, trigo y girasol	112
INTRODUCCIÓN.....	112
MATERIALES Y MÉTODOS.....	114
RESULTADOS	120
DISCUSIÓN.....	132
CONSIDERACIONES FINALES	136
BIBLIOGRAFÍA.....	139
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA EN EL TRANCURSO DE ESTA TESIS	155
ANEXO	157

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1.: Análisis de un modelo binomial para la germinación de semillas aisladas y semillas dentro de silicuas intactas, a tres temperaturas alternas, dos condiciones de luz y cinco tiempos de almacenamiento en seco.	39
Tabla 2.1.: Características de las poblaciones de <i>Raphanus sativus</i> (nabón) utilizadas en la presente tesis.	60
Tabla 2.2.: GLMM para los rasgos de aptitud biológica de nabón resistente y susceptible a herbicidas inhibidores de AHAS.	63
Tabla 3.1.: GLM para la germinación de semillas aisladas y semillas dentro de silicuas intactas bajo dos condiciones de luz, tres temperaturas alternas, cuatro momentos de almacenamiento en seco y dos biotipos (resistente y susceptible).....	77
Tabla 3.2.: ANOVA para la emergencia de plántulas desde semillas aisladas y semillas dentro de silicuas intactas en dos biotipos de nabón (resistente y susceptible), en condiciones de campo bajo dos condiciones hídricas.	83
Tabla 4.1.: ANOVA para los caracteres de aptitud biológica de dos biotipos de nabón (resistente y susceptible), evaluados en dos estaciones de crecimiento y dos densidades	105
Tabla 5.1.: Rasgos de colza bajo la interferencia de cinco densidades de nabón.	124
Tabla 5.2.: ANOVA para los efectos de cinco densidades de nabón sobre los rasgos reproductivos de colza.	124
Tabla 5.3.: Rasgos de trigo bajo interferencia de tres densidades de nabón.....	125
Tabla 5.4.: ANOVA para los efectos de tres densidades de nabón sobre los rasgos reproductivos de trigo.....	125
Tabla 5.5.: Rasgos de girasol bajo interferencia de cinco densidades de nabón.....	126
Tabla 5.6.: ANOVA para los efectos de cinco densidades de nabón sobre los rasgos reproductivos de girasol.	126
Tabla 5.7.: Parámetros estimados para las funciones que describen el efecto de la densidad de nabón sobre la biomasa seca, el número de silicuas y la producción de semillas por planta y por metro cuadrado de nabón.	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.: Distribución geográfica de las poblaciones de nabón utilizadas en esta tesis.	24
Figura 1.1.: Silicuas y semillas de nabón.	29
Figura 1.2.: Germinación acumulada de semillas aisladas y semillas dentro de silicuas intactas, incubadas en condiciones de luz/oscuridad y oscuridad constante, a tres temperaturas alternas y cinco momentos de almacenamiento en seco.	40
Figura 1.3.: Efecto de 0, 2, 4, 8, y 12 semanas de estratificación en frío sobre la germinación de semillas dentro de silicuas intactas, incubadas a 21/9 °C en condiciones de oscuridad y luz/oscuridad.	41
Figura 1.4.: Efecto de los pericarpios desprendidos sobre la germinación de las semillas de nabón, incubados a 21/9 °C en oscuridad constante.	44
Figura 1.5.: Imbibición de las semillas de nabón medida por incremento en peso. Resultados para semillas aisladas, semillas dentro de silicuas quebradas e intactas, y silicuas intactas para diez momentos de imbibición.	44
Figura 1.6.: Tasa de secado de las semillas de nabón extraídas de las silicuas al inicio del experimento o permanecidas dentro de las mismas.	45
Figura 1.7.: Sección transversal del pericarpio de nabón, observada bajo microscopio.	46
Figura 1.8.: Imágenes de rayos X de silicuas de nabón, tomadas pre- y pos (15 días)-imbibición.	46
Figura 2.1.: Inhibición de la actividad de la enzima AHAS <i>in vitro</i> debido a la aplicación de dosis crecientes de dos herbicidas inhibidores de AHAS (imazetapir y metsulfuron-metil) en los biotipos resistente y susceptible.	61
Figura 2.2.: Número de silicuas, número de semillas y rendimiento por planta de seis poblaciones de nabón, dos resistentes y cuatro susceptibles.	64
Figura 3.1.: Germinación acumulada de semillas aisladas de dos biotipos de nabón (resistente y susceptible), incubadas en condiciones de luz/oscuridad y oscuridad constante, a tres temperaturas alternas y cuatro momentos de almacenamiento en seco. .	78
Figura 3.2.: Germinación acumulada de semillas dentro de silicuas intactas de dos biotipos de nabón (resistente y susceptible) incubadas en condiciones de luz/oscuridad y oscuridad constante, a tres temperaturas alternas y cuatro momentos de almacenamiento en seco.	79
Figura 3.3.: Dinámica de emergencia de plántulas de dos biotipos de nabón (resistente y susceptible) a partir de semillas aisladas y semillas dentro de silicuas intactas enterradas a 0, 1, 4, 8, 12 y 16 cm de profundidad.	80

Figura 3.4.: Temperaturas mínimas y máximas del aire (°C) y precipitaciones (mm) diarias en el CCT-Bahía Blanca desde febrero de 2018 hasta febrero de 2019.	82
Figura 3.5.: Dinámica de emergencia de plántulas de dos biotipos de nabón (resistente y susceptible) a partir de semillas aisladas y semillas dentro de silicuas intactas enterradas a 0,5 cm de profundidad bajo dos condiciones hídricas, durante un año.....	84
Figura 4.1.: Diagrama de series de reemplazo para ancho y largo foliar, número de hojas y biomasa seca aérea de nabón resistente y susceptible.....	101
Figura 4.2.: Respuesta del ancho y largo foliar y la biomasa seca aérea de las plantas de nabón susceptibles y resistentes, criadas en condiciones de interferencia generada por incrementos en la biomasa seca aérea del cultivo de trigo.	102
Figura 4.3.: Biomasa seca aérea total por planta y por metro cuadrado, número de silicuas por planta, número de semillas por planta, biomasa de las semillas y rendimiento por planta, de plantas de nabón resistentes y susceptibles criadas en condiciones de interferencia con el cultivo de trigo.	106
Figura 4.4.: Partición de la biomasa seca aérea total, en tallos, hojas y ramas, silicuas y semillas, para las plantas resistentes y susceptibles de nabón criadas en condiciones de interferencia con el cultivo de trigo.	107
Figura 4.5.: Rendimiento de trigo bajo interferencia de dos densidades de nabón resistente y susceptible.	107
Figura 5.1.: Relaciones entre densidad de nabón y pérdida de rendimiento de los cultivos de nabón, trigo y girasol.	122
Figura 5.2.: Vista del experimento de interferencia de nabón sobre el cultivo de colza.	122
Figura 5.3.: Vista del experimento de interferencia de nabón sobre el cultivo de trigo.....	123
Figura 5.4.: Vista del experimento de interferencia de nabón sobre el cultivo de girasol. ...	123
Figure 5.5.: Relaciones entre la densidad de nabón y biomasa seca por planta y por metro cuadrado de nabón en colza, trigo y girasol.	128
Figura 5.6.: Relaciones entre la densidad de nabón y el número de silicuas por planta y por metro cuadrado de nabón en colza, trigo y girasol.	129
Figura 5.7.: Relaciones entre densidad de nabón y el número de semillas por planta y por metro cuadrado de nabón en colza, trigo y girasol.	130

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCasa: acetil coenzima A carboxilasa.

AHAS: enzima acetohidroxiácido sintasa.

Ala-122: Alanina en la posición 122 de la enzima AHAS.

Ala-122-Asn: Sustitución de asparagina por alanina en la posición 122 de la enzima AHAS.

Ala-122-Tyr: Sustitución de tirosina por alanina en la posición 122.

Ala-205: Alanina en la posición 205 de la enzima AHAS.

Ala-205-Val: Sustitución de valina por alanina en la posición 205.

ALS enzima acetolactato sintetasa

ANOVA: Análisis de la varianza.

Arg-377: Arginina en la posición 377 de la enzima AHAS.

Asp-376: Ácido aspártico en la posición 205 de la enzima AHAS

Asp-376-Glu: Sustitución de ácido glutámico por ácido aspártico en la posición 376.

CAPS: Marcadores de secuencia polimórfica amplificada y cortada

CL: Clearfield®

CTAB: Bromuro de cetil trimetil amonio

DDT: Días después del trasplante

ES: Error estandar

FAA: Formaldehído, alcohol etílico, ácido acético.

FR: Factor de resistencia

g.l.: Grados de libertad

GLM: modelos lineales generalizados

GLMM modelos mixtos lineales generalizados

Gly-654: Glicina en la posición 654 de la enzima AHAS.

HCl: Ácido clorhídrico

I_{50} : Concentración de herbicida que causa 50 % de inhibición de la actividad de la enzima

IMI: Imidazolinonas

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Ln: Logaritmo natural

NaOH: Hidróxido de sodio

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Phe-206: Fenilalanina en la posición 206 de la enzima AHAS.

Pro-197: Prolina en la posición 197 de la enzima AHAS.

Pro-197-Arg: Sustitución de arginina por prolina en la posición 197.

Pro-197-Ser: Sustitución de serina por prolina en la posición 197.

Pro-197-Thr: Sustitución de treonina por prolina en la posición 197.

p/v: Peso/volumen

PVPP: Polivinilpirrolidona.

R: Resistente a herbicidas.

RCC: Coeficiente de amontonamiento relativo.

REML: Estimación de máxima verosimilitud restringida.

RGR: Tasa de crecimiento relativa.

RSBA1: Población de Sierra de la Ventana.

RSBA2: Población de Coronel Pringles.

RSBA3: Subpoblación agrestal de Balcarce.

RSBA3-R: Subpoblación artificial homocigota resistente creada a partir de RSBA3.

RSBA3-S: Subpoblación ruderal de Balcarce.

RSBA7: Población de Necochea.

RSBA10: Población de Pieres.

RSBA11: Población de Lobería.

RSBA12: Población de Ibarra.

RSBA13: Población de La Dulce.

RSBA14: Población del establecimiento "El Tupungato" (Necochea).

RSBA15: Población del INTA Hilario Ascasubi.

RSBA16: Población de Villalonga.

RSBA17: Población del establecimiento "Morales" (Necochea).

RSBA18: Población de Azul.

RSBA19: Población del establecimiento "La Isaura" (Balcarce).

RSBA20: Población de Pieres.

RSLP2: Población de Falucho (La Pampa).

S: Susceptible a herbicidas

Ser-653: Serina en la posición 653 de la enzima AHAS.

SU: Sulfonilureas.

TPP: Tiamina pirofosfato.

Trp-574: Triptofano en la posición 574 de la enzima AHAS

Trp-574-Leu: Sustitución de leucina por triptofano en la posición 574.

UV-C: Luz ultravioleta.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El aumento de la población mundial exigirá una mayor producción de alimentos, que solo puede lograrse aumentando los rendimientos de los cultivos y aplicando un enfoque sustentable (Carvalho, 2006; Alexandratos y Bruinsma, 2012). La productividad de los cultivos destinados a consumo humano se encuentra amenazada por interferencia y/o daño a partir de adversidades bióticas, especialmente malezas, enfermedades y plagas (Oerke, 2006). Las malezas, plantas indeseables que interfieren con la agricultura y los recursos naturales, se consideran la principal limitante para la producción de alimentos en los sistemas agrícolas de todo el mundo (Oerke, 2006; Vencill *et al.*, 2012). En los agroecosistemas, las malezas incrementan los costos de producción y afectan negativamente el rendimiento de los cultivos al competir por recursos esenciales como la luz, el espacio, los nutrientes, y el agua, y/o liberando sustancias químicas tóxicas (alelopáticas) (Zimdahl, 2007; Cobb y Reade, 2010; Swanton *et al.*, 2015). Además, comprometen la calidad de los cultivos, al contaminar las semillas y reducir el valor de los productos cosechados, interfieren con las labores de siembra y cosecha, y actúan como hospederos para plagas y enfermedades (Zimdahl, 2007; Cobb y Reade, 2010; Norsworthy *et al.*, 2012). Por lo tanto, el control de malezas es un componente importante en el éxito de la producción de cultivos.

El control de malezas se puede lograr a través de métodos manuales, mecánicos, culturales, químicos y biológicos (Shaner y Beckie, 2014). El control químico mediante herbicidas se ha convertido en el método más económico, más adoptado y posiblemente el más efectivo para controlar las malezas en los sistemas agrícolas en todo el mundo (Gianessi, 2013; Bajwa, 2014; Varanasi *et al.*, 2016). A pesar de la existencia de 26 diferentes modos de acción de herbicidas (Cobb y Reade, 2010; Heap, 2019), los agricultores generalmente utilizan un número limitado de ellos, con poca o ninguna diversidad en las prácticas de manejo (Shaner y Beckie, 2014). A su vez, la sobredependencia de los herbicidas para reducir las infestaciones de malezas ha resultado en la selección de características adaptativas que permitieron su supervivencia y reproducción (Powles y Yu, 2010; Hicks *et al.*, 2018). Como resultado de este proceso, existe un sustancial incremento en la incidencia de malezas resistentes. Actualmente existen en el mundo 502 casos de malezas resistentes a herbicidas en 258 especies (150 dicotiledóneas y 108 monocotiledóneas). Las malezas han desarrollado resistencia a 23 de los 26 sitios de acción de herbicidas conocidos, en más de 93 cultivos en al menos 70 países (Heap, 2019).

La enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS), también conocida como acetolactato sintasa (ALS), es la primera enzima involucrada en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina (Duggleby *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2016). La enzima AHAS es el sitio de acción común de cinco familias químicas de herbicidas: sulfonilureas

(SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas, pirimidinil-benzoatos y sulfonil-aminocarbonil-triazolinonas (Tan *et al.*, 2006; Duggleby *et al.*, 2008). Estos herbicidas inhiben la enzima AHAS mediante el bloqueo de un canal a través del cual los sustratos acceden al sitio activo (inhibición no-competitiva) (McCourt *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2016). Desde la introducción del clorimurón en 1982, 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 su costo relativamente bajo (Duggleby *et al.*, 2008).

Las malezas resistentes a inhibidores de AHAS han emergido rápidamente en cultivos de cereales, oleaginosas, forestales, y en las banquinas de carreteras, caminos secundarios y vías de ferrocarril como resultado del uso repetido y generalizado de estos herbicidas (Heap, 1997). En 1987, solo 5 años después de la introducción de la primer SU, se encontraron biotipos de *Lactuca serriola* L. y *Kochia scoparia* L. resistentes a herbicidas AHAS (Mallory-Smith *et al.*, 1990; Hashem y Dhammu, 2002; Tranel y Wright, 2002), aunque el primer caso de resistencia a inhibidores AHAS fue hallado en una población de *Lolium rigidum* con resistencia metabólica a diclofop-metil. Este herbicida es un inhibidor de acetil coenzima A carboxilasa (ACCCase, una enzima clave en la síntesis de ácidos grasos), estaba muy difundido previamente a la introducción al mercado de los herbicidas AHAS (Heap y Knight, 1986). A nivel mundial, varios biotipos de al menos 162 especies de malezas han desarrollado resistencia a herbicidas AHAS (Heap, 2019).

La evolución de la resistencia a herbicidas AHAS se debe mayormente a mutaciones puntuales en la secuencia del gen que codifica para la enzima AHAS, con el consecuente cambio en la secuencia de aminoácidos. Estos cambios reducen la sensibilidad de la enzima a estos herbicidas (Yu y Powles, 2014). Debido a ello, la medición de la actividad de la enzima AHAS se considera un método de diagnóstico de la resistencia (Breccia *et al.*, 2013). Hasta el momento se han identificado 29 sustituciones de aminoácidos en ocho posiciones (Ala-122, Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377, Trp-574, Ser-653 y Gly-654) del gen AHAS que aportan resistencia a herbicidas en poblaciones de malezas (Yu y Powles, 2014; Heap, 2019). Las mutaciones más comúnmente identificadas son en la posición Pro-197 y Trp-574 (Yu y Powles, 2014; Heap, 2019). Ello puede reflejar el patrón de uso de herbicidas, los herbicidas SU seleccionan principalmente para la mutación Pro-197, mientras que SU + IMI seleccionan principalmente para la mutación Trp-574-Leu (Yu y Powles, 2014). Por lo tanto, la resistencia provocada por mutaciones puntuales en el gen AHAS, el alto número de mutaciones funcionales encontradas, y la prolongada presión de selección causada por la residualidad en el suelo de estos herbicidas han provocado que

los herbicidas inhibidores de la enzima AHAS comprendan uno de los grupos más propensos a generar malezas resistentes (Beckie, 2006; Heap, 2019).

La evolución a través de la selección natural es un proceso continuo que permite a las poblaciones de malezas superar, eventualmente, las presiones de selección impuestas por las estrategias de erradicación. Los cambios evolutivos que confieren adaptación a un nuevo ambiente, por ejemplo la resistencia a herbicidas, pueden traer aparejados efectos pleiotrópicos negativos sobre la biología en el ambiente original, también llamado costo adaptativo (Vila-Aiub *et al.*, 2009; Cousens y Fournier-Level, 2018). Estos costos pueden evitar la fijación de un nuevo alelo adaptativo y contribuir al mantenimiento de los polimorfismos genéticos en las poblaciones (Vila-Aiub *et al.*, 2009; Powles y Yu, 2010). Los principales factores que influyen la dinámica de evolución de la resistencia a herbicidas pueden ser clasificados en aquellos relacionados a la biología de la especie, los relacionados con la genética de la resistencia y los vinculados a las prácticas de manejo (Roux *et al.*, 2008). El ciclo de vida, la producción, dormición y longevidad de las semillas, el sistema de reproducción y la distancia de migración de polen y semillas son los principales factores relacionados a la biología de la especie que determinan el ritmo de dispersión/evolución de la resistencia. Entre los factores relacionados a la genética de la resistencia se encuentra la frecuencia inicial de genes de resistencia en la población, el tipo de herencia (dominante o recesiva) y el costo adaptativo de los alelos de resistencia. Los factores vinculados a las prácticas de manejo dependen principalmente de los patrones espaciales y temporales relacionados con la aplicación de herbicidas, la dosis y características de los herbicidas, la mezcla y rotación de modos de acción de herbicidas, las prácticas culturales y las demás prácticas de manejo, que van a incidir en la intensidad de selección (Roux y Reboud, 2007).

La aptitud biológica representa la capacidad de un individuo o genotipo para sobrevivir y reproducirse en un ambiente determinado, y consecuentemente, de aportar genes/individuos a la siguiente generación (Orr, 2009; Vila-Aiub *et al.*, 2009; Cousens y Fournier-Level, 2018). Desde el punto de vista relativo, la aptitud refleja la capacidad que tiene una clase de organismos con respecto a otros, de perpetuarse en la siguiente generación dentro de una población (Vila-Aiub *et al.*, 2015; Keshtkar *et al.*, 2019). El mecanismo fisiológico responsable de la resistencia a herbicidas puede afectar otros caracteres y, en última instancia, alterar la aptitud biológica de los genotipos de formas diferentes (Cousens y Fournier-Level, 2018). La aptitud biológica integra varios rasgos del ciclo de vida, tales como dormición y germinación de las semillas, emergencia y establecimiento de las plántulas, fenología, tasa de crecimiento, polinización, producción de

biomasa, tamaño y número de semillas y rendimiento por planta. En conjunto, se favorece o reduce la prevalencia de un genotipo dado respecto a otro (Keshtkar *et al.*, 2019).

Las diferencias en aptitud biológica entre dos genotipos pueden surgir de diferencias en el comportamiento en cualquiera de las etapas de su ciclo de vida. Cada uno de estos “componentes de aptitud”, representados por cada una de las etapas del ciclo de vida, pueden contribuir a las diferencias en la aptitud total entre genotipos, es decir, pueden hacer que diferentes genotipos aporten diferentes números de progenie a la siguiente generación (Orr, 2009). Por lo tanto, es posible subdividir en forma arbitraria la aptitud biológica, estimando por separado más de un componente y discutiendo como cada uno de ellos se ve afectado (en ausencia de herbicidas) por la resistencia (Roux *et al.*, 2006; Cousens y Fournier-Level, 2018; Keshtkar *et al.*, 2019). Por ejemplo, estimando la proporción de semillas que se convierte en plantas mediante el estudio de la dormición, germinación y emergencia, estimando la tasa de crecimiento, la biomasa total, el tamaño y número de semillas y finalmente el rendimiento reproductivo de las plantas maduras en ausencia de un agente selectivo.

En algunos casos, se ha demostrado que las mutaciones de resistencia a los herbicidas AHAS pueden alterar la funcionalidad enzimática AHAS, debido a que algunos residuos de aminoácidos han demostrado ser importantes tanto para la unión del herbicida como para el mantenimiento de la actividad catalítica de la enzima (Duggleby *et al.*, 2008; Yu y Powles, 2014). Dependiendo de la especie, distintas mutaciones de resistencia a AHAS estuvieron asociados a reducción (Ashigh y Tardif, 2007; Li *et al.*, 2013; Menegat *et al.*, 2016), incremento (Yu *et al.*, 2003, 2010; Li *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015) o ausencia de modificación (Han *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015; Cross *et al.*, 2015) en la actividad enzimática AHAS.

Sin embargo, la modificación de la actividad enzimática no necesariamente se traduce en efectos pleiotrópicos a nivel de planta entera (Yu y Powles, 2014). Las evaluaciones de la aptitud biológica en especies resistentes a herbicidas AHAS determinaron que los costos de resistencia pueden ser expresados de diferente manera, dependiendo de la mutación específica (Tardif *et al.*, 2006; Ashigh and Tardif 2009; Yu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Yu and Powles 2014), la especie de maleza (Tardif *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013) y las condiciones ecológicas (Purrington and Bergelson 1997; Ashigh and Tardif 2009). Por ejemplo, *Raphanus raphanistrum*, *Lolium rigidum* y *Kochia scoparia* con cinco, cuatro y dos mutaciones AHAS, incluyendo la mutación Trp-574-Leu, no mostraron efectos pleiotrópicos negativos sobre el crecimiento y la competitividad (Légère *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Menegat *et al.*, 2016). En estos casos, es probable que los alelos de resistencia

permanezcan en la población, aún en ambientes sin selección con herbicidas (Yu y Powles, 2014). En cambio, la mutación Trp-574-Leu mostró fuerte 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). Ello demuestra que no existe un comportamiento universal en los costos de resistencia a herbicidas AHAS y, por lo tanto, deben ser evaluados caso por caso.

La dormición y la germinación son caracteres/componentes importantes asociados a la aptitud biológica de una especie (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La dormición se define como la ausencia de protrusión de la radícula, aun cuando las condiciones ambientales son favorables para la germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Baskin y Baskin, 2014). Este mecanismo es utilizado por las plantas para evitar la germinación durante períodos que son solo efímeramente favorables y a su vez, para distribuir su descendencia a lo largo del tiempo y protegerla contra eventos catastróficos impredecibles (Willis *et al.*, 2014). Por lo tanto, mediante mecanismos fisiológicos, morfológicos y anatómicos, la dormición determina el ambiente que experimentan las plántulas luego de la germinación (Donohue *et al.*, 2005a; Willis *et al.*, 2014), y los requerimientos para su ruptura, en diferentes especies, pueden ser muy específicos (Donohue *et al.*, 2010). A pesar de su importancia, un limitado número de estudios evaluaron los costos biológicos asociados con las mutaciones de resistencia a herbicidas AHAS sobre estos estados del ciclo de vida (revisado en Darmency *et al.*, 2017). Una mayor comprensión de las consecuencias de los alelos de resistencia a herbicidas sobre la aptitud biológica es importante para predecir la dinámica evolutiva de la resistencia, y por lo tanto, para desarrollar estrategias de manejo mediante las cuales los costos de aptitud puedan ser manipulados para la selección en contra de los alelos resistentes (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

El género *Raphanus* pertenece a la familia Brassicaceae y comprende dos especies básicas: *Raphanus sativus* L., que engloba todas las formas botánicas cultivadas, y *Raphanus raphanistrum* L., que crece en forma silvestre en diversas regiones del mundo. Ambas especies son diploides, con nueve pares de cromosomas y pueden hibridar entre sí (Snow y Campbell, 2005). *R. sativus* (rábano o rabanito) es una especie herbácea cultivada en todo el mundo por el valor alimenticio de sus raíces engrosadas (Kaneko *et al.*, 2011; Warwick, 2011). El origen del cultivo no ha sido dilucidado por completo, aunque las investigaciones sugieren que fue domesticado independientemente en Eurasia y el este de Asia (Yamagishi y Terachi, 2003; Kaneko *et al.*, 2007; Warwick, 2011). Representaciones encontradas en las paredes de las pirámides de 4000 años de antigüedad sugieren que el rábano fue un cultivo importante en antiguo Egipto aproximadamente en el 2000 a.C. El rábano también fue cultivado en el este de Asia, principalmente en el actual territorio de

China, hace más de 2000 años. Actualmente allí se concentra la mayor diversidad morfológica y de aptitud culinaria de la especie (Snow y Campbell, 2005).

Las poblaciones espontáneas de rábano (nabón) encontradas en Europa, América del Sur, América del Norte y Japón, son consideradas formas asilvestradas o de-domesticadas (ferales) derivadas del biotipo cultivado (Panetsos y Baker, 1967; Snow y Campbell, 2005; Theisen, 2008; Pandolfo *et al.*, 2016). El nabón es una especie invasora muy perjudicial en zonas templadas de Sudamérica incluyendo Brasil, Uruguay, Paraguay, Chile, Argentina, y de Norteamérica incluyendo México y Estados Unidos (Snow y Campbell, 2005; Theisen, 2008; Kaneko *et al.*, 2011; Pandolfo *et al.*, 2013, 2016). En Argentina aparece mencionado en el Almanaque de 1937 del Ministerio de Agricultura, donde es referido como maleza frecuente en trigo y lino (Ibarra, 1937). Existen registros de nabón en al menos 20 provincias (Pandolfo *et al.*, 2018). En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, el nabón se encuentra ampliamente distribuido como maleza habitual de cultivos de cereales, oleaginosas y algunos cultivos forrajeros y hortícolas (Pandolfo *et al.*, 2013, 2016, 2018). Scursoni *et al.*, (2014) determinaron que el nabón es una de las especies de malezas que ha mostrado mayor incremento de su incidencia, en los últimos 35 años.

El nabón crece principalmente en ambientes disturbados, como márgenes de caminos, y en suelos agrícolas (Pandolfo *et al.*, 2018). Presenta un ciclo de vida anual, otoño-inverno-primaveral, con nacimientos concentrados en mayo, y floración y fructificación desde primavera hasta principios del otoño. Si las condiciones son favorables, puede desarrollar un ciclo estival, con nacimientos en primavera y floración en otoño (Marzocca, 1976; Pandolfo *et al.*, 2018). Debido a su auto-incompatibilidad son de reproducción cruzada obligada, y la polinización es facilitada por insectos (Snow y Campbell, 2005; Kaneko *et al.*, 2011).

Su probable antecesor silvestre, *R. raphanistrum* (rabizón o rábano silvestre), es un invasor exitoso y ha ingresado a *ranking* de las peores malezas del mundo. Ha sido informado como maleza problemática en más de 45 cultivos en al menos 65 países (Blackshaw *et al.*, 2002; Snow y Campbell, 2005; Warwick y Francis, 2005; Lamego *et al.*, 2013), y en Australia, el sur de los Estados Unidos y el sur de Brasil es considerada una de las malezas más problemáticas en los cultivos de invierno (Webster y MacDonald, 2001; Snow y Campbell, 2005; Warwick y Francis, 2005; Lamego *et al.*, 2013). La presencia de *R. raphanistrum* en Argentina fue documentada por Marzocca (1976) y Parodi (1964) como una especie adventicia rara, limitada a la región noreste de la provincia de Buenos Aires. Los herbarios Darwinion, FAUBA y UCO registran solo seis ejemplares, uno de ellos colectado en 1929.

Sin embargo, nuestro grupo no ha logrado hallar individuos de la especie, incluso en los lugares mencionados por la bibliografía (Pandolfo *et al.*, 2013).

En distintas regiones del planeta, *R. sativus* y *R. raphanistrum* han desarrollado resistencia a herbicidas, incluyendo a inhibidores AHAS. Se ha demostrado la presencia de *R. raphanistrum* con resistencia a AHAS en Australia (Hashem *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2001), Sudáfrica (Smit y Cairns, 2001) y Brasil (Costa y Rizardi, 2014). La resistencia a AHAS en *R. sativus* fue demostrada en Brasil (Theisen, 2008), Chile (Heap, 2019), y Argentina (Pandolfo *et al.*, 2013, 2016). Pandolfo *et al.* (2016) demostraron la presencia de la mutación Trp-574-Leu en dos poblaciones del sudeste de la provincia de Buenos Aires, que aportó resistencia cruzada a las cinco familias químicas de herbicidas AHAS.

Nuestro grupo de investigación, entre 2008 y 2016, realizó al menos diecisiete viajes de exploración para ubicar especies de interés, principalmente por la región pampeana, incluyendo las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Córdoba. Algunas exploraciones abarcaron Entre Ríos, Tucumán, Salta, Mendoza y Río Negro. Las misiones se realizaron a través de rutas nacionales, provinciales y caminos vecinales (Pandolfo, 2016). En estas misiones se recolectaron 31 accesiones correspondientes a 19 poblaciones de nabón, principalmente en la provincia de Buenos Aires, exceptuando una población en la provincia de La Pampa (Pandolfo, 2016). La caracterización de las poblaciones de *R. sativus* realizada por Pandolfo, (2016) mostró que las poblaciones de nabón colectadas fueron muy similares entre sí, y destacó la presencia de rasgos inherentes a las formas cultivadas, entre ellos raíz engrosada, silicuas globosas y corchosas con poca constricción entre las semillas, que permanecen en la planta por largo tiempo posterior a la madurez, y semillas de gran tamaño y biomasa, que podrían indicar el origen feral de estas poblaciones. La distribución geográfica de las poblaciones utilizadas en la presente tesis se puede observar en la figura I, y mayores detalles de las poblaciones son provistos y discutidos en el Capítulo 2.

Los mecanismos que gobiernan la dormición, germinación y emergencia, los posibles efectos pleiotrópicos de la mutación Trp-574-Leu que podrían interferir en la evolución de las poblaciones susceptibles y resistentes a herbicidas AHAS y en la dinámica de la interferencia de las plantas ferales de *R. sativus* resistentes sobre los cultivos son desconocidos. En función de lo expuesto previamente, se propusieron las siguientes hipótesis y objetivos de trabajo:

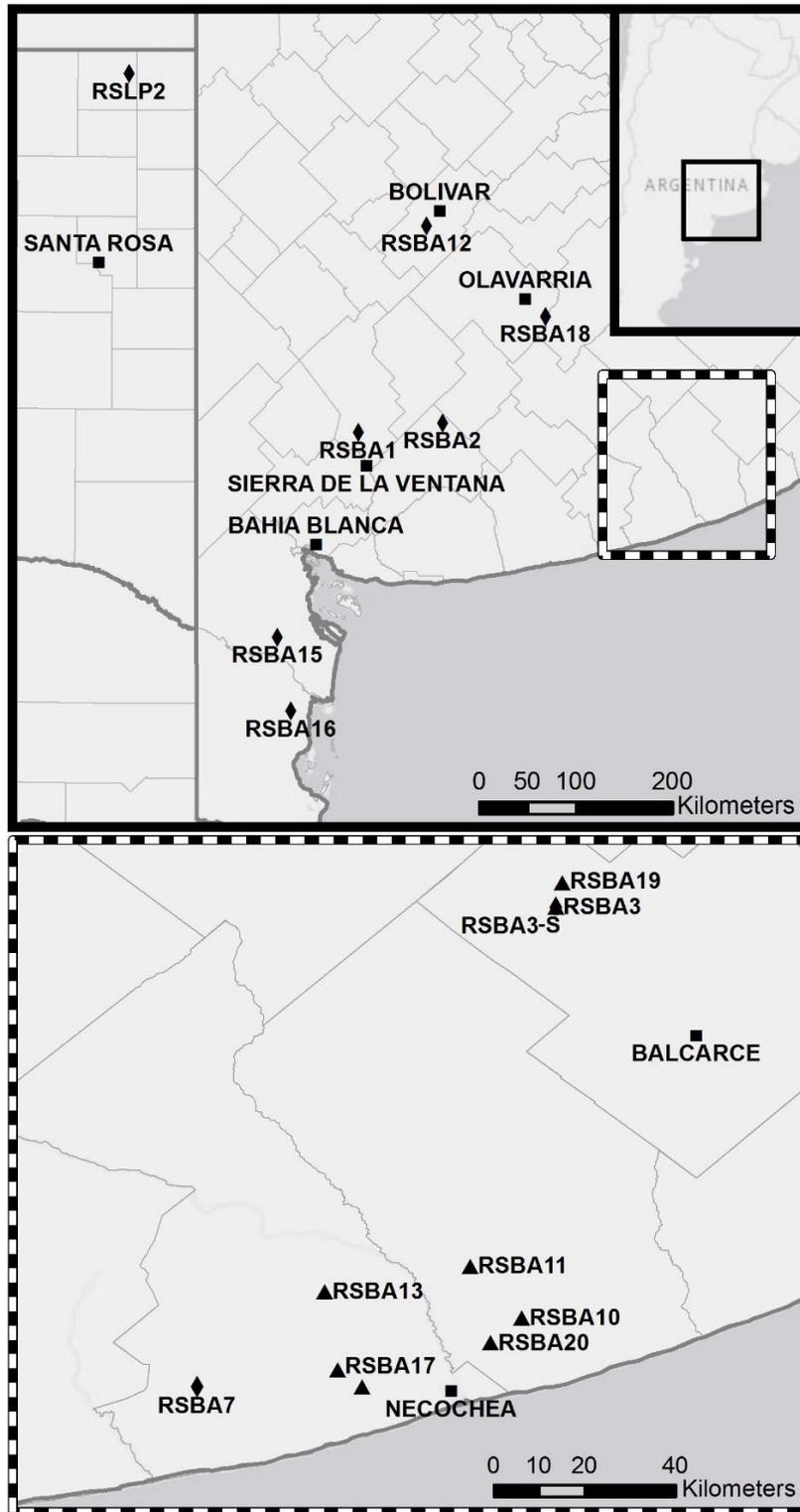


Figura I. Distribución geográfica de las poblaciones de *Raphanus sativus* (nabón) utilizadas en esta tesis. Los símbolos indican la localización de las poblaciones resistentes (▲) y susceptibles (◆) (ver Capítulo 2), y algunas ciudades (■) utilizadas como referencia. El recuadro en línea sólida muestra las poblaciones de la región Pampeana, Argentina, y el recuadro en línea punteada muestra las poblaciones recolectadas en el sudeste de la provincia de Buenos Aires.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

El objetivo de esta tesis fue la caracterización agroecológica de poblaciones naturales de *Raphanus sativus* (nabón) resistentes a herbicidas AHAS.

Objetivos específicos

Hipótesis 1: La germinación de las semillas de poblaciones naturales de *R. sativus* es afectada por las condiciones ambientales (temperatura, luz/oscuridad) y los aspectos anatómicos y/o fisiológicos de las semillas o los tejidos del fruto. Estos requerimientos se reducen durante la post-maduración y/o el almacenamiento en condiciones invernales.

Objetivo 1.1: Evaluar la germinación de las semillas aisladas y dentro de silicuas intactas en condiciones contrastantes de luz, temperatura y tiempos de madurez post-cosecha.

Objetivo 1.2: Estudiar aspectos físicos, químicos y/o fisiológicos de los tejidos del fruto involucrados en la dormición de las semillas, y simular la post-maduración invernal de las silicuas.

Hipótesis 2: La mutación Trp-574-Leu que confiere resistencia a los herbicidas AHAS no impone efectos pleiotrópicos negativos sobre la actividad enzimática AHAS y los caracteres vegetativos y reproductivos de las poblaciones naturales de *R. sativus*.

Objetivo 2.1: Evaluar la actividad de la enzima AHAS y los caracteres reproductivos en poblaciones de *R. sativus* susceptibles y resistentes con la mutación Trp-574-Leu criadas sin interferencia con un cultivo (costo fisiológico).

Objetivo 2.2: Evaluar los caracteres vegetativos y reproductivos en individuos de *R. sativus* con y sin la mutación Trp-574-Leu criados bajo interferencia intra e interespecífica (costo ecológico).

Objetivo 2.3: Cuantificar el efecto de la interferencia de densidades crecientes de *R. sativus* resistente a herbicidas AHAS sobre los componentes del rendimiento y el rendimiento de colza, trigo y girasol.

Hipótesis 3: La mutación Trp-574-Leu que confiere resistencia a los herbicidas AHAS no afecta la germinación y emergencia de plántulas en poblaciones naturales de *R. sativus*.

Objetivo 3: Evaluar la dormición, germinación y emergencia de semillas aisladas y silicuas intactas en individuos de *R. sativus* con y sin la mutación Trp-574-Leu en condiciones contrastantes de luz, temperatura, humedad y profundidad de entierro.

El **capítulo 1** abordará los objetivos 1.1 y 1.2 (hipótesis 1), el **capítulo 2** los el objetivo 2.1 (hipótesis 2), el **capítulo 3** el objetivo 3 (hipótesis 3), el **capítulo 4** el objetivo 2.2 (hipótesis 2) y finalmente el **capítulo 5** el objetivo 2.3.

CAPÍTULO 1

Rol de la luz y el pericarpio sobre la dormición y germinación de las semillas de *Raphanus sativus* (nabón)

INTRODUCCIÓN

La dinámica de germinación puede determinar las condiciones ambientales experimentadas por las plantas por el resto de sus vidas y, por lo tanto, el éxito de una especie en un agroecosistema (Donohue *et al.*, 2005b; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Batlla y Benech-Arnold, 2014). La dinámica de germinación y emergencia puede ser afectada por las condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura, luz/oscuridad, humedad) y los aspectos fisiológicos y anatómicos de las semillas y/o sus coberturas (Baskin y Baskin, 2004, 2014). La temperatura suele ser el principal factor ambiental que afecta la germinación, y su respuesta puede ser influenciada por otros factores ambientales, por ejemplo la exposición a la luz (Donohue *et al.*, 2007; Heschel *et al.*, 2007).

La luz es una de las principales señales ambientales que interviene en la germinación y muchas especies han mostrado respuestas diferenciales a la luz y a la oscuridad (Baskin y Baskin, 2014; Batlla y Benech-Arnold, 2014). Se ha sugerido que el control lumínico sobre la germinación desempeña un rol ecológico importante bajo condiciones de campo, principalmente debido a la posibilidad de sensar/detectar dónde, cuándo o bajo qué condiciones/circunstancias la germinación debería ocurrir (Batlla y Benech-Arnold, 2014). Por ejemplo, las semillas de algunas especies germinan mejor en la oscuridad que en la luz (Malik *et al.*, 2010), sugiriendo que las semillas que permanezcan en la superficie del suelo no germinarán hasta ser enterradas por las operaciones de labranza y/o siembra (Chauhan *et al.*, 2006a; Batlla y Benech-Arnold, 2014). Las semillas de otras especies pueden germinar mejor en condiciones de luz que en oscuridad (Kettenring *et al.*, 2006; Presotto *et al.*, 2014). Este requerimiento lumínico podría prevenir la germinación de las semillas enterradas y promover la germinación de las semillas que están sobre o cerca de la superficie del suelo (Batlla y Benech-Arnold, 2014).

La dormición es la ausencia de la protusión de la radícula incluso cuando las condiciones ambientales (temperatura, luz/oscuridad, humedad y gases) son favorables para la germinación (Baskin y Baskin, 2014) y está determinada por componentes endógenos (mecanismos del embrión) y/o exógenos (es decir, coberturas de las semillas, presencia del fruto) de las semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La dormición de las semillas recientemente maduras se denomina dormición primaria (Baskin y Baskin, 2014). Este mecanismo evolucionó para evitar la germinación durante períodos que son solo

efímeramente favorables y, por lo tanto, aumentar la supervivencia de las plántulas y, finalmente, la madurez y producción de semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Baskin y Baskin, 2014). De acuerdo con el sistema de clasificación de Nikolaeva-Baskin, hay cinco clases de dormición (Baskin y Baskin, 2004, 2014). La dormición morfológica, causada por un embrión subdesarrollado en el momento de la dispersión de las semillas que necesita tiempo para completar el crecimiento dentro de la semilla madura. La dormición física, debido a una o más capas impermeables al agua en la cubierta de la semilla o en el fruto, y la dormición fisiológica, que se debe al bajo potencial de crecimiento o bajo potencial de empuje del embrión. Esta última, es el tipo de dormición más frecuente en condiciones de campo. Por último, la dormición morfo-fisiológica y combinada (física + fisiológica) son provocadas por un embrión subdesarrollado con un componente fisiológico de dormición; y por una cobertura de la semilla o del fruto impermeable al agua con un embrión fisiológicamente dormido, respectivamente (Baskin y Baskin, 2014).

La unidad o estructura de dispersión de algunas especies de Brassicaceae es un fruto seco indehiscente uni o pluriseminado (Cousens *et al.*, 2010; Mamut *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015a, 2017a; Zhou *et al.*, 2015). El pericarpio puede prevenir o retrasar la germinación, conduciendo a una emergencia escalonada o dispersa de plántulas en varias poblaciones de malezas (Chauhan *et al.*, 2006a; Lu *et al.*, 2017a;b). Una posible explicación es que el pericarpio limitaría mecánicamente la expansión del embrión, debido a la falta de crecimiento potencial suficiente para romper la pared del fruto (Mekenian y Willemsen, 1975; Lu *et al.*, 2015b, 2017a; Zhou *et al.*, 2015). Dependiendo de la especie, un período de almacenamiento en seco (post-maduración), la estratificación en frío y/o condiciones de luz u oscuridad podrían aumentar el potencial de crecimiento del embrión, lo suficiente como para que la radícula atravesara la pared del fruto y, en consecuencia, ocurra la germinación de las semillas (Baskin y Baskin, 2014; Lu *et al.*, 2015a, 2017b; Zhou *et al.*, 2015). El pericarpio también podría reducir la tasa de imbibición de las semillas, limitando completar la absorción total de agua requerida para la germinación (Cousens *et al.*, 2010; Baskin y Baskin, 2014; Sperber *et al.*, 2017), y podría contener inhibidores químicos que impidan o dificulten la germinación (Mekenian y Willemsen, 1975).

Raphanus sativus feral (nabón) puede ser encontrado en varias partes del mundo, incluyendo América del Norte, América del Sur, Europa y Japón. Se considera una maleza invernal problemática en las zonas templadas de Sudamérica (Panetsos y Baker, 1967; Snow y Campbell, 2005; Theisen, 2008; Pandolfo *et al.*, 2013). Sus frutos, coloquialmente llamados lomento o más comúnmente "silicua", son largos, cilíndricos, formados con múltiples semillas, esponjosos, secos e indehiscentes (Snow y Campbell, 2005). La estructura de la silicua consiste en una parte estilar muy desarrollada donde se ubican las

semillas, mientras que la parte valvar, común en las Brassicaceae, está completamente abortada (Roth, 1977) (Fig. 1.1). Los mecanismos que regulan la germinación en *Raphanus raphanistrum*, el posible antecesor silvestre, han sido ampliamente estudiados. Las semillas de *R. raphanistrum* recién cosechadas presentaron dormición primaria que fue reducida luego del almacenamiento en seco bajo condiciones de laboratorio (Mekenian y Willemsen, 1975; Malik *et al.*, 2010). La luz, que inhibió parcialmente la germinación de sus semillas (Malik *et al.*, 2010), tuvo un efecto mayor a bajas temperaturas (Mekenian y Willemsen, 1975). Además, una combinación de resistencia mecánica a la expansión del embrión y la presencia de inhibidores químicos no lixiviables asociados al pericarpio parece ser responsable de los bajos porcentajes de germinación en las semillas ubicadas dentro de las silicuas en esta especie (Mekenian y Willemsen, 1975; Cheam, 1986). Sin embargo, experimentos posteriores realizados por Cousens *et al.*, (2010) concluyeron que la cubierta de la semilla era más importante que la presencia del pericarpio en la dormición del rábano silvestre.

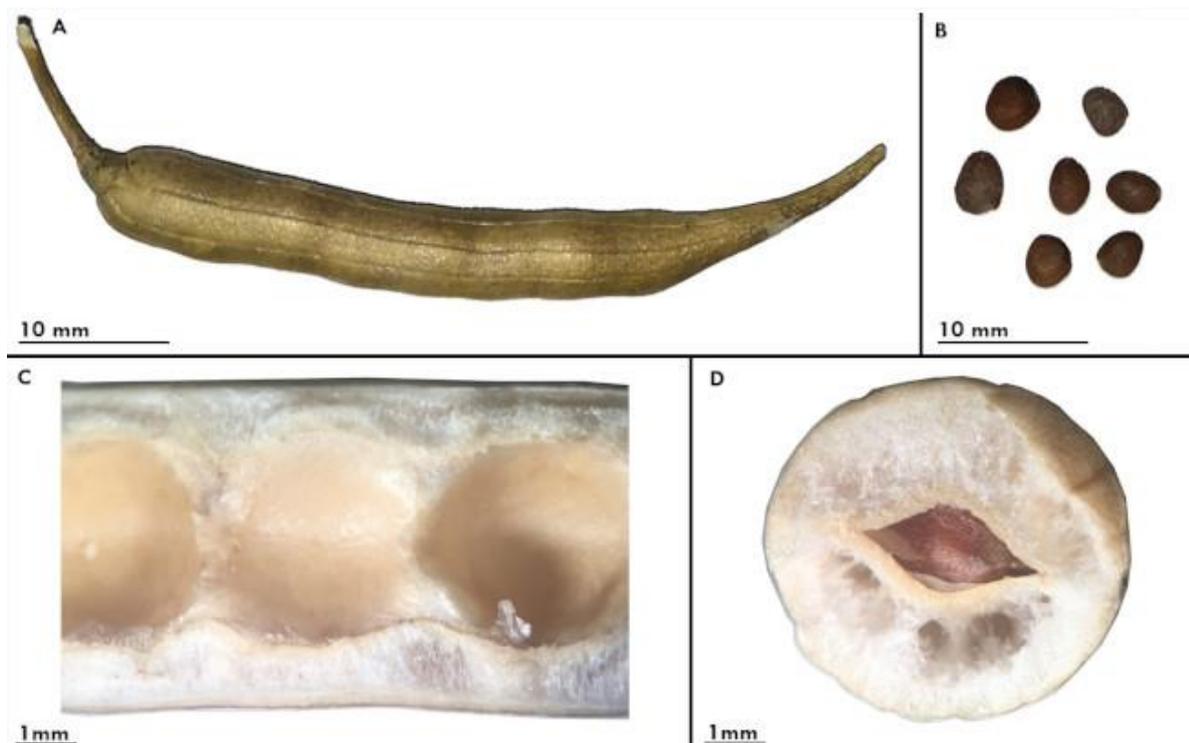


Figura 1.1. Silicuas y semillas de *Raphanus sativus* (nabón). Silicua entera (A), semillas aisladas (B), y corte longitudinal (C) y transversal (D) del pericarpio.

Basados en nuestras observaciones y en estudios recientes realizados en otras especies de Brassicaceae con frutos indehiscentes (Cousens *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2015a; Zhou *et al.*, 2015), se hipotetizó que la germinación de las semillas de nabón es afectada por las condiciones ambientales (temperatura, luz/oscuridad) y los aspectos anatómicos y/o

fisiológicos de las semillas o los tejidos del fruto, y que estos requerimiento se reducen durante las post-maduración y/o el almacenamiento en condiciones invernales. Para probar esta hipótesis sobre la germinación en *R. sativus* feral, se realizaron estudios para: (1) evaluar la germinación de las semillas aisladas y dentro de silicuas intactas en condiciones contrastantes de luz, temperatura y tiempos de madurez post-cosecha y (2) estudiar aspectos físicos, químicos y/o fisiológicos de los tejidos del fruto involucrados en la dormición de las semillas, y simular la post-maduración invernal de las silicuas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron silicuas recientemente maduras de al menos 20 individuos en tres poblaciones naturales de nabón en el sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina. La población RSBA2 se recolectó en una línea de alambrado cerca de Coronel Pringles (37° 49' S, 61° 05' O), la subpoblación RSBA3-S en el borde de una parcela sembrada con colza-canola cerca de Balcarce (37° 35' S, 58° 31' O) y la población RSBA16 en un campo sembrado con girasol cerca de Villalonga (39° 55' S, 62° 30' O). Las tres poblaciones son susceptibles a herbicidas AHAS (Pandolfo *et al.*, 2016; Tabla 2.1, Capítulo 2). Con la finalidad de incrementar la cantidad de semillas y minimizar los efectos maternos y ambientales, al menos 30 plántulas de cada población se reprodujeron para producir una nueva generación en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional de Sur, Bahía Blanca, Argentina (38° 41' 38" S, 62° 14' 53" O). La contaminación por polen se previno encerrando a cada grupo de plantas en carpas construidas con una malla antiáfido. La polinización cruzada fue realizada mediante el agregado de núcleos de abejas (*Apis mellifera*). Al finalizar la estación de crecimiento, las silicuas maduras se recolectaron, y se extrajo semillas de una porción de las silicuas cosechadas en forma manual con ayuda de un mortero. Tanto las semillas aisladas como las silicuas intactas se almacenaron en bolsas de papel madera a temperatura ambiente, con menos de 10% de humedad hasta el comienzo de los experimentos.

Experimentos preliminares no mostraron diferencias en la germinación entre las poblaciones (Anexo, Figura 1). En consecuencia, generalmente se utilizó una la subpoblación (RSBA3-S) para los experimentos, dependiendo de la disponibilidad de semillas/silicuas. En función del experimento a realizar, se utilizaron cuatro estados de semillas: (i) semillas cuidadosamente extraídas de las silicuas (semillas aisladas; exp. 1, 2 y 4), (ii) semillas dentro de segmentos transversales de las silicuas fracturadas manualmente en secciones de una o dos semillas (semillas dentro de silicuas quebradas; exp. 4), (iii) semillas que permanecieron sobre porciones del pericarpio cuidadosamente abierto de manera longitudinal (semillas con pericarpio desprendido; exp. 3) y (iv) silicuas intactas (semillas dentro de silicuas intactas; exp. 1, 2, 3, 4, 5 y 6).

Experimento 1: Efecto del almacenamiento en seco sobre la germinación de semillas aisladas y semillas dentro de las silicuas

Se realizó un experimento para evaluar dormición, respuesta a luz y oscuridad, efecto del pericarpio sobre la germinación de las semillas, y finalmente si estos efectos se modifican durante el almacenamiento en seco (post-maduración). Para ello, se incubaron semillas

aisladas y silicuas intactas almacenadas en condiciones de laboratorio por 0 (hasta dos días después de la cosecha), 2, 6, 12 y 30 meses, bajo tres regímenes de temperaturas alternos; 14/4, 21/9 y 28/14 °C en condiciones de luz/oscuridad (12/12 h) o en oscuridad constante durante 15 días. Para cada combinación de tratamiento [cinco períodos de almacenamiento x tres regímenes de temperatura x dos regímenes de luz x dos tratamientos de pericarpio (es decir, semillas aisladas y silicuas intactas)], se incubaron cuatro réplicas de treinta semillas aisladas o cinco silicuas intactas sobre dos capas de papel de filtro humedecido con 10 ml de agua destilada en cajas de Petri de 9 cm de diámetro. Los regímenes de temperatura utilizados en este estudio representan la temperatura promedio en invierno, otoño-primavera y verano en el sur de la provincia de Buenos Aires. La luz fue proporcionada por lámparas fluorescentes (Philips TL-D 36w/54 765; espectro 380-690 nm) ($60 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), y la oscuridad constante fue lograda al envolver las cajas de Petri con doble capa de papel aluminio. La germinación en la condición de luz se evaluó periódicamente (a intervalos de 2 – 3 días) durante 15 días y las semillas germinadas se removieron en cada recuento. En la condición de oscuridad, las semillas germinadas se contaron únicamente al finalizar el experimento, después de 15 días, con la finalidad de no exponer las semillas/silicuas a la luz. Al final del experimento, se realizó la apertura de las silicuas y se contaron las semillas germinadas y no germinadas. Una semilla fue considerada germinada cuando había emergido la radícula. A las semillas no germinadas se les realizó una prueba de viabilidad utilizando una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1% (p/v). La prueba de tetrazolio en las semillas no germinadas mostró 99% o más de semillas viables. Por lo tanto, las semillas no germinadas se consideraron vivas. A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos de germinación se realizaron utilizando estos métodos. El experimento se realizó en un diseño completamente aleatorizado.

Experimento 2: Efecto de la estratificación en frío sobre la germinación de las semillas dentro de las silicuas

La finalidad de este experimento fue determinar si la estratificación en frío promueve la germinación de las semillas dentro de las silicuas intactas. Cuatro réplicas, cada una de cinco silicuas intactas recién cosechadas (hasta dos días después de la cosecha) y con seis meses de almacenamiento en seco, se estratificaron sobre dos capas de papel de filtro humedecido a 5 °C, en oscuridad constante durante 0, 2, 4, 8 y 12 semanas. Luego de la estratificación, las silicuas intactas se colocaron en oscuridad constante o en luz/oscuridad (12/12 h) a 21/9 °C durante 15 días como se describió para el experimento previo. Al final del experimento, se realizó, en forma manual, la apertura de las silicuas, se contaron las

semillas germinadas y no germinadas y se siguió el procedimiento que se describió para el experimento anterior. El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado.

Experimento 3: Efecto de inhibidores químicos asociados con el pericarpio

El objetivo de este experimento fue examinar un posible rol químico del pericarpio en la germinación de las semillas de nabón. Las semillas de cinco silicuas (29.8 ± 1.2 semillas por réplica) recién cosechadas de las poblaciones RSBA2, RSBA3-S y RSBA16 se incubaron sobre sus respectivos pericarpios, cuidadosamente abiertos o desprendidos en cada caja de Petri. Se utilizaron cinco silicuas intactas y treinta semillas aisladas en cada réplica como control. Las cajas de Petri se incubaron en condiciones de oscuridad a (12/12 h) 21/9 °C durante 15 días, como se describió previamente. Las semillas germinadas y no germinadas fueron contadas al final del experimento para no exponerlas a la luz. El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones.

Experimento 4: Experimento de imbibición

Con la finalidad de evaluar si el pericarpio modifica la tasa de imbibición y/o el contenido final de agua absorbido por las semillas, se estudió la dinámica de imbibición de las semillas aisladas o dentro de silicuas, quebradas e intactas, en dos momentos post-cosecha: a un mes y un año de cosechadas. Para ello, semillas aisladas, silicuas intactas y silicuas quebradas fueron incubadas a: 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días de imbibición. Para cada tiempo de imbibición, 40 silicuas intactas, 120 semillas aisladas y 120 secciones de silicuas quebradas fueron colocadas sobre dos capas de papel de filtro en cuatro bandejas plásticas (20 x 15 cm) con 45 ml de agua destilada. Las bandejas se envolvieron con bolsas de polietileno y se colocaron en una cámara de crecimiento a 5 °C para evitar la germinación. En cada momento de imbibición, se separaron al menos 120 semillas de cada tratamiento. Las semillas aisladas, las semillas extraídas de las silicuas quebradas e intactas y las silicuas intactas se pesaron inmediatamente y luego se secaron en estufa a 60 °C hasta peso constante para la evaluación del peso seco. El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones.

Experimento 5: Experimento de deshidratación

Con la finalidad de evaluar si el pericarpio modifica la pérdida de humedad de las semillas, se monitoreó la deshidratación de semillas aisladas y silicuas intactas completamente embebidas con agua destilada, luego de 14 días de imbibición a 5 °C en las mismas condiciones mencionadas para el experimento previo, dos meses luego de la cosecha de los frutos. Una muestra de semillas fue extraída de las silicuas. Estas semillas aisladas y las silicuas intactas embebidas fueron colocadas sobre papel de filtro seco en una cámara

ajustada a temperatura constante de 22 °C, con una humedad relativa entre 47 – 60%. Durante las primeras 16 h de experimento, se extrajeron muestras de semillas cada 2 horas desde las silicuas restantes; posteriormente, la extracción y pesaje de las semillas se realizó cada 8 horas hasta finalizar el experimento, cuando se alcanzó un peso de semillas constante (64 horas). En cada momento de pesaje, las semillas aisladas al inicio de la fase de secado fueron pesadas y colocadas nuevamente en el menor tiempo posible en la cámara de crecimiento bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Cada réplica fue pesada inmediatamente después de la extracción. Las semillas extraídas fueron secadas en estufa a 60 °C, hasta lograr un peso constante y pesadas nuevamente. Las semillas extraídas de las silicuas al inicio de la prueba se secaron en estufa bajo las mismas condiciones. El experimento se realizó en un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones.

Experimento 6: Morfología del pericarpio

Con la finalidad de evaluar las características anatómicas del pericarpio que posiblemente estén involucradas en la dormición, la sección transversal del pericarpio de dos poblaciones de nabón fue observada bajo un microscopio estereoscópico y un microscopio óptico, seis meses después de la cosecha. Para esto, se siguió el protocolo de Andrade *et al.*, (2015). Las silicuas intactas fueron previamente embebidas, como en los experimentos previos, durante 14 días a 5 °C. Luego de ello, los frutos fueron cortados en mitades tanto de forma transversal como longitudinal, utilizando bisturí, fijados en solución FAA (formaldehído, alcohol etílico, ácido acético), embebidos en parafina y procesados usando técnicas convencionales para el corte (12 µm). Se empleó, tinción con safranina-fast green, y montaje en glicerol-agua (1:1). Sobre muestras adicionales se realizó la reacción de Wiesner para la detección e identificación de lignina. Para ello, se colocaron unas pocas gotas de solución de etanol floroglucinol al 1 % y una gota de HCl al 25 %, y posteriormente se cubrió la sección con un cubreobjetos. Con esta tinción es posible visualizar las estructuras lignificadas, dando así una coloración roja-rosa en los tejidos lignificados. Las observaciones fueron realizadas y fotografiadas utilizando un microscopio estereoscópico Nikon SMZ 745T (Nikon Corp., Tokio, Japón) y un microscopio óptico Nikon Labophot-2 (Nikon Corp., Tokio, Japón) con una cámara Nikon Coolpix 4500 adjunta y un micrómetro ocular (Nikon Corp., Tokio, Japón). Además, imágenes de rayos X sobre silicuas embebidas por 0 (secas), 1, 4 y 15 días, diez meses después de la cosecha, fueron tomadas en el laboratorio de semillas de la Estación Experimental Agropecuaria de Oliveros, Santa Fe (Argentina), que pertenece al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), para medir posibles cambios a lo largo del tiempo en el espacio entre las semillas y la superficie interna del pericarpio (endocarpio) luego que las semillas se embebieron. Cien silicuas

seleccionadas al azar fueron radiografiadas a 20 kV, 50 mA, por 1 segundo a 60 cm de distancia, colocadas sobre dos capas de papel de filtro humedecido con agua destilada en cuatro bandejas plásticas idénticas a las utilizadas para los experimentos descritos anteriormente (exp. 4). Las bandejas plásticas fueron cubiertas con bolsas de polietileno para evitar la evaporación del agua y colocadas en una cámara de crecimiento a 5 °C para prevenir la germinación de las semillas. Antes de cada una de las siguientes exposiciones a rayos X, el agua fue drenada y las silicuas fueron secadas con papel absorbente. Después de que las silicuas fueron radiografías (expuestas a rayos X) se añadió agua nuevamente. Las imágenes de rayos X se fotografiaron con la cámara Nikon Coolpix 4500 (Nikon Corp., Tokio, Japón) y fueron comparadas para identificar los cambios en el espacio entre las semillas y la capa interior del pericarpio.

Análisis estadísticos

Los datos de germinación se analizaron utilizando modelos mixtos lineales generalizados (GLMM) basados en la estimación de máxima verosimilitud restringida (REML) con PROC GLIMMIX (SAS University Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.). Los GLMM fueron elegidos debido a que son la herramienta recomendada para analizar datos sin distribución normal y con efectos aleatorios (Bolker *et al.*, 2009). En experimentos de germinación sin efectos aleatorios, los datos fueron analizados de la misma manera debido a la distribución no-normal de los datos de germinación. Se ajustó un modelo de distribución binomial con la función de enlace *logit* y la germinación como variable de respuesta (semilla germinada y semilla no germinada). Para el experimento "*Efecto del almacenamiento en seco sobre la germinación de semillas aisladas y semillas dentro de las silicuas*" (exp. 1), el modelo incluyó cuatro efectos fijos: la temperatura, la luz, el pericarpio (semillas aisladas y silicuas intactas) y el tiempo de almacenamiento, y todas las interacciones. Para el experimento "efecto de la estratificación en frío sobre la germinación de las semillas dentro de las silicuas" (exp. 2), el modelo incluyó tres efectos fijos: el tiempo de almacenamiento (0 o 6 meses), el tiempo de estratificación en frío (0, 2, 4, 8 o 12 semanas) y la luz, y todas las interacciones. Para el experimento "efecto de inhibidores químicos asociados con el pericarpio" (exp. 3), el modelo incluyó el tratamiento (las semillas aisladas, las silicuas intactas y las semillas extraídas de las silicuas con los pericarpios desprendidos) como efectos fijos y las poblaciones (RSBA2, RSBA3-S y RSBA16) y la interacción entre tratamiento y población como efectos aleatorios. Este modelo estadístico nos permitió evaluar un posible rol químico del pericarpio en la germinación de las semillas, independientemente de las poblaciones.

Para el experimento de imbibición (exp. 4), el contenido de agua (% en base de peso seco) de las semillas aisladas, las semillas dentro de las silicuas quebradas, las semillas dentro de las silicuas intactas y las silicuas intactas se calcularon como: contenido de agua = $[100 \times (\text{peso húmedo} - \text{peso seco}) / \text{peso en seco}]$ luego de la imbibición. Para evaluar las diferencias en % en el contenido de agua entre los cuatro tratamientos en cada momento, se utilizó un modelo lineal mixto basado en la estimación de máxima verosimilitud restringida (REML) con PROC MIXED en el software SAS. Previo al análisis, los datos fueron transformados logarítmicamente para mejorar la normalidad y la homogeneidad de las varianzas. Sin embargo, los datos no transformados son mostrados en la Figura 1.5. Para cada tiempo de imbibición (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días), el tratamiento (semillas aisladas, semillas dentro de silicuas intactas, semillas dentro de silicuas quebradas y silicuas intactas) fue considerado como efecto fijo, y el tiempo de madurez posterior a la cosecha (un mes y un año) y la interacción entre tratamiento y tiempo de madurez fueron considerados aleatorios. Este modelo estadístico nos permitió evaluar si la imbibición de las semillas era modificada por el pericarpio, independientemente del tiempo de almacenaje. La prueba HSD de Tukey se realizó para determinar diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos. Se presentaron los análisis estadísticos para el punto de observación final (día 12).

En el experimento de deshidratación (exp. 5), el contenido de agua (% sobre base seca) de las semillas extraídas de las silicuas al inicio del experimento (tiempo cero de imbibición) y las semillas extraídas de las silicuas en cada momento de muestreo se calculó como el experimento previo. Un modelo de regresión no lineal basado en una fase de meseta seguida de una fase de decaimiento exponencial fue ajustado a la relación entre el porcentaje de contenido de agua en base seca y la duración del período de deshidratación en las semillas extraídas de las silicuas y las semillas restantes dentro de las silicuas utilizando el software Prism (Graphpad Prism v.6.0; GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.). El modelo utilizado fue **[Ecuación 1]**:

$$Y = IF(x < a, b), IF(x > a, c + (b - c)^{-k(x-a)}) \text{ [Ecuación 1];}$$

donde Y es el porcentaje de contenido de agua en base seca, X es el tiempo de secado, a es el momento en que comienza la deshidratación, b es el valor promedio de Y hasta el tiempo a , c es el valor de Y a tiempo infinito y k es una tasa constante, expresada en unidades recíprocas a las unidades de tiempo del eje X .

Se realizó el test F de suma de cuadrados adicionales para comparar el ajuste de una curva única para todos los conjuntos de datos (modelo global, tanto las semillas que permanecen en las silicuas como las semillas extraídas de las silicuas compartieron los mismos

parámetros estimados) con los ajustes de curvas separadas para cada conjunto de datos, a un $P \leq 0,05$. Esto prueba si existe evidencia de que los tratamientos hicieron algo para cambiar las curvas. Además, también se utilizó la prueba F de suma de cuadrados para comparar el ajuste independiente de X_0 (X_0 para cada conjunto de datos) con un ajuste global de X_0 (X_0 compartido entre todos los conjuntos de datos) para observar si ese parámetro difiere entre los conjuntos de datos.

RESULTADOS

Experimento 1: Efecto del almacenamiento en seco sobre la germinación de semillas aisladas y semillas dentro de las silicuas

La germinación durante el almacenamiento en seco tuvo efectos significativos del pericarpio, la luz, la temperatura y la interacción entre luz y pericarpio (Tabla 1.1). Sin embargo, el efecto del tiempo del almacenamiento en seco, la interacción cuádruple, las interacciones triples y el resto de las interacciones dobles, no fueron significativas (Tabla 1.1). La exposición a la luz redujo significativamente la germinación de las semillas, tanto dentro de las silicuas como fuera de ellas, bajo los tres regímenes de temperaturas durante todo el período estudiado. La presencia del pericarpio redujo la germinación de las semillas en la oscuridad durante toda la poscosecha; sin embargo, ello fue menos evidente cuando la evaluación se realizó con exposición a la luz. En general, la germinación, de las semillas aisladas y de las semillas dentro de las silicuas intactas, incrementó con el aumento de la temperatura, tanto en condiciones de luz como de oscuridad (Fig. 1.2).

La condición de temperatura óptima para la germinación fue 28/14 °C, en todos los tratamientos, durante todo el período de evaluación poscosecha. Inmediatamente luego de la cosecha, la germinación de las semillas dentro de las silicuas intactas osciló entre 0 a 5 % y entre 1 a 14 %, para luz y oscuridad, respectivamente. La germinación en las semillas aisladas fluctuó entre 0 a 9 % y 88 a 99 %, para los tres regímenes de temperatura bajo condiciones luz y oscuridad, respectivamente (Fig. 1.2). Después de dos meses de almacenamiento en seco y hasta el final del experimento (30 meses), los porcentajes de germinación acumulada más altos obtenidos a partir de las semillas que permanecieron dentro de las silicuas intactas a la temperatura óptima fueron de 36 % (con luz) y 59 % (oscuridad), y a partir de semillas aisladas fueron de 55 % (con luz) y 100 % (oscuridad) (Fig. 1.2).

Experimento 2: Efecto de la estratificación en frío sobre la germinación de las semillas dentro de las silicuas.

La germinación no fue afectada por la duración del almacenamiento ($F_{1,60} = 1,46$; $P = 0,23$) ni por las interacciones entre almacenamiento y luz ($F_{1,60} = 0,48$; $P = 0,49$), duración del almacenamiento y tiempo de estratificación en frío ($F_{4,60} = 1,24$; $P = 0,30$) ni por la interacción entre duración del almacenamiento, luz y tiempo de estratificación en frío ($F_{4,60} = 1,07$; $P = 0,38$). Debido a que el tiempo de almacenamiento en seco no afectó la germinación, los datos de los dos tiempos pos-cosecha (0 y 6 meses) fueron agrupados (Fig. 1.3). La germinación fue afectada por el tratamiento de exposición a la luz ($F_{1,60} = 205,07$; $P < 0,0001$) y tiempo de estratificación en frío ($F_{4,60} = 3,49$; $P = 0,0126$), aunque no

por la interacción entre el tiempo de estratificación en frío y la luz ($F_{4,60} = 1.75$; $P = 0.15$) (Fig. 1.3). Dependiendo del tratamiento, la germinación de las semillas dentro de las silicuas en condiciones de luz fue entre 79 a 96 % menor que en condiciones de oscuridad. Las semillas dentro de las silicuas mostraron un máximo de germinación entre 10 y 51 % en condiciones de luz/oscuridad y oscuridad, respectivamente, independientemente del tiempo de estratificación en frío y del tiempo de almacenamiento en seco (Fig. 1.3). La estratificación en frío a 5 °C hasta 12 semanas no incrementó la germinación de las semillas dentro de las silicuas.

Tabla 1.1. Análisis de un modelo binomial para la germinación (dos categorías = germinado y no germinado) desde semillas aisladas y dentro de las silicuas (efecto pericarpio), a tres temperaturas alternas (4/14, 9/21 y 14/28 °C), bajo dos condiciones de luz (luz/oscuridad y oscuridad constante) y cinco tiempos de almacenamiento en seco en condiciones de laboratorio (0, 2, 6, 12 y 30 meses), y todas sus interacciones en *Raphanus sativus* (nabón). Los efectos significativos ($P \leq 0,05$) están indicados en negrita. *Numerador/denominador de los grados de libertad de cada efecto.

Efecto	g.l.*	F	P
Temperatura (Te)	2/180	19,42	<0,0001
Pericarpio (P)	1/180	36,08	<0,0001
Luz (L)	1/180	73,50	<0,0001
Tiempo (Ti)	4/180	0,70	0,59
Te x P	2/180	0,18	0,84
Te x L	2/180	0,56	0,57
P x L	1/180	13,98	0,0002
Te x Ti	8/180	1,08	0,38
P x Ti	4/180	1,50	0,20
L x Ti	4/180	0,31	0,87
Te x P x L	2/180	1,21	0,30
Te x P x Ti	8/180	1,20	0,30
Te x L x Ti	8/180	0,51	0,85
P x L x Ti	4/180	0,04	0,99
Te x P x L x Ti	8/180	1,44	0,18

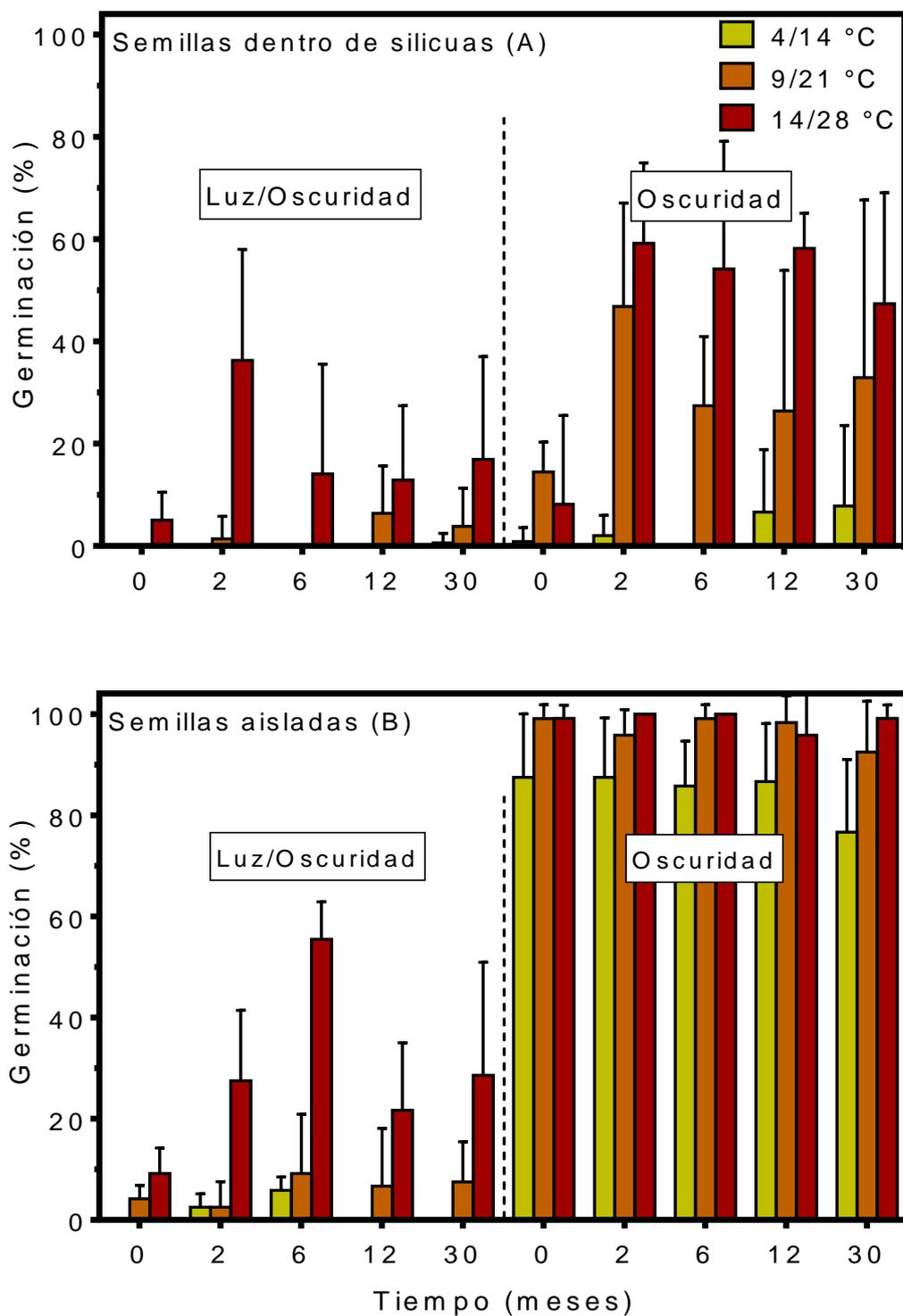


Figura 1.2. Germinación acumulada (media \pm 95 % de intervalo de confianza) de semillas dentro de silicuas intactas (A) y las semillas aisladas (B) de *Raphanus sativus* (nabón) incubadas en condiciones de luz/oscuridad (12/12 h) y oscuridad constante, a tres temperaturas alternas (4/14, 9/21 y 14/28 °C) y cinco momentos de almacenamiento en seco (0, 2, 6, 12 y 30 meses).

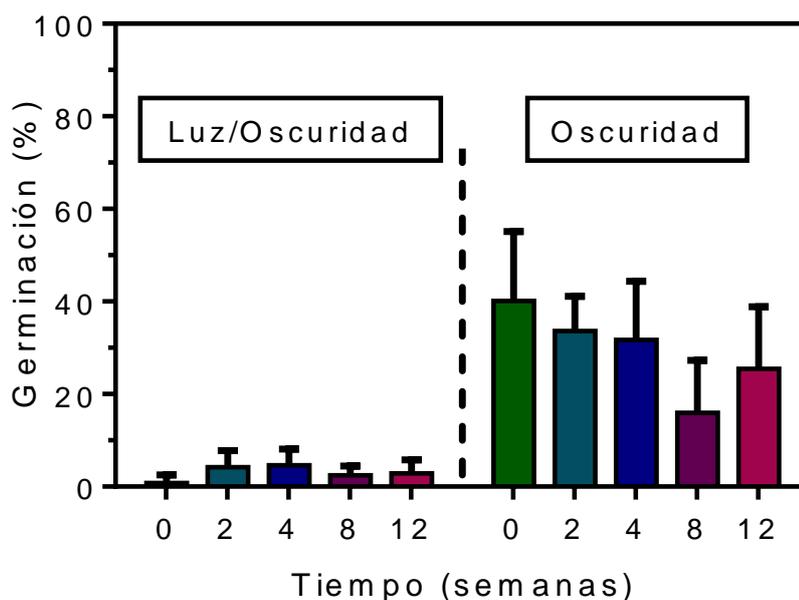


Figura 1.3. Efecto de 0, 2, 4, 8, y 12 semanas de estratificación en frío sobre la germinación de semillas dentro de las silicuas intactas de *Raphanus sativus* (nabón) incubadas a (12/12 h) 21/9 °C en condiciones de oscuridad y luz/oscuridad (media \pm 95 % de intervalo de confianza).

Experimento 3: Efecto de inhibidores químicos asociados con el pericarpio

No se encontraron diferencias significativas entre poblaciones en la germinación de las semillas aisladas, las semillas incubadas dentro de silicuas intactas y las incubadas en presencia de los pericarpios desprendidos ($Z = 0,74$; $P = 0,23$). Por lo tanto, los datos de las tres poblaciones fueron agrupados (Fig. 1.4). No se encontró interacción entre tratamiento (semillas aisladas, semillas dentro de silicuas intactas y semillas incubadas con los pericarpios desprendidos) y población ($Z < 0,01$; $P > 0,99$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la germinación entre las semillas aisladas y las semillas incubadas con los pericarpios desprendidos. Sin embargo, las semillas dentro de las silicuas intactas mostraron 85 % menor germinación ($F_{2,4} = 226,31$; $P < 0,0001$) que las semillas aisladas y las semillas incubadas en presencia de los pericarpios desprendidos (Fig. 1.4).

Experimento 4: Experimento de imbibición

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de imbibición y la absorción final de agua en las semillas aisladas, las semillas dentro de las silicuas quebradas e intactas y las silicuas intactas entre las semillas/silicuas de un mes y un año de almacenamiento en seco en condiciones de laboratorio ($Z < 0,01$; $P > 0,99$), por lo tanto, los datos de los dos momentos pos-cosecha fueron agrupados (Fig. 1.5). Al finalizar el experimento (día 12), el

contenido final de agua difirió entre los tratamientos ($F_{3,3} = 559,59$; $P < 0,0001$) (Fig. 1.5), y no se encontró interacción entre tratamiento y tiempo de almacenamiento ($Z = 0,24$; $P = 0,41$). Las silicuas presentaron una gran capacidad para absorber agua, y su peso se duplicó en los primeros dos días de hidratación. Después de 10 días de imbibición, las silicuas absorbieron más del doble de su peso en agua (Fig. 1.5). Al final del experimento, el 82 % del agua total absorbida por la silicua (pericarpio + semillas) estuvo retenida en el pericarpio. Las semillas aisladas absorbieron agua rápidamente durante el primer día, y se embebieron completamente después de dos días. Las semillas dentro de silicuas intactas mostraron menor tasa de imbibición y menor absorción final de agua que las semillas que estaban separadas del pericarpio (semillas aisladas) (Fig. 1.5). Las semillas ubicadas dentro de las silicuas quebradas mostraron un nivel en la absorción final de agua que fue intermedio entre las semillas aisladas y las semillas dentro de las silicuas intactas. Sin embargo, la tasa de imbibición fue similar a las semillas dentro de las silicuas intactas (Fig. 1.5). Después de dos días de imbibición, cuando las semillas aisladas estaban completamente embebidas, las semillas dentro de las silicuas intactas y quebradas mostraron 72 y 64 % menos agua que aquellas, respectivamente (Fig. 1.5). Después de 12 días de imbibición, las semillas dentro de las silicuas intactas y quebradas mostraron 25 y 11 % menos agua que las semillas aisladas, respectivamente (Fig. 1.5).

Experimento 5: Experimento de deshidratación

Las semillas aisladas se secaron más rápidamente que las semillas que permanecieron dentro de las silicuas (Fig. 1.6). El valor X_0 para las semillas que permanecieron dentro de las silicuas ($9,14 \pm 0,54$ horas) fue significativamente más alto ($F = 227,3$, $P > 0,0001$) que el de las semillas extraídas de las silicuas al inicio del experimento (muy cerca de cero). Es decir, el pericarpio retrasó el inicio del secado de las semillas por más de 9 horas (Fig. 1.6). Durante la deshidratación, cuando comenzó la desecación de las semillas dentro de las silicuas, las semillas aisladas mostraban 70 % menos de contenido de agua. Las semillas aisladas y las semillas que permanecieron dentro de las silicuas, retornaron a su peso inicial después de 24 y 48 horas, respectivamente (Fig. 1.6).

Experimento 6: Morfología anatómica

Las secciones transversales del pericarpio de las silicuas de nabón mostraron que las semillas están encerradas en un fruto unilocular sin tabique o zonas de dehiscencia (Fig. 1.1 y 1.7). La estructura general del pericarpio consistió en tres capas: epi o exocarpio, mesocarpio y endocarpio (Fig. 1.7). El epicarpio consistió en una sola capa de pequeñas células epidérmicas rectangulares estrechamente unidas. El mesocarpio consistió de células parenquimáticas grandes formadas por paredes celulares primarias (teñidas de azul

verdoso) y/o paredes celulares secundarias gruesas y lignificadas (teñidas de rojo o marrón oscuro). Además, se pudo observar espacios intercelulares con depósitos teñidos con safranina, y a mayores aumentos se observaron claramente punteaduras simples en las áreas teñidas de rojo o marrón oscuro. Las células del mesocarpio fueron más grandes que las del epicarpio y endocarpio, y estas células junto con grandes áreas vacías observadas en los cortes transversales y longitudinales dieron a la silicua una apariencia esponjosa (Fig. 1.1 y 1.7). En la parte externa del mesocarpio/epicarpio se observaron haces vasculares débiles con poco o ningún tejido de sostén por encima del floema (esclerenquima). El endocarpio consistió de varias capas de pequeñas células lignificadas rígidas que formaron una banda lignificada continua que encerró completamente a las semillas (Fig. 1.7). A su vez, se detectaron dos posibles zonas de ruptura formadas por células parenquimáticas poco lignificadas (Fig. 1.7). Estas zonas fueron estructuralmente más débiles que el sector lignificado (teñido de rojo o marrón oscuro) que delimitó el lóculo de la silicua. La reacción de Wiesner (prueba específica para la presencia de lignina) mostró la presencia de lignina en los tejidos teñidos de rojo o marrón oscuro en el experimento de safranina/fast-green (imagen no publicada).

Las imágenes de rayos X mostraron aumento en el tamaño de las semillas dentro de las silicuas luego de la imbibición. Se observó un claro espacio entre las semillas y la capa más interna del pericarpio (endocarpio) en las silicuas secas; sin embargo, este espacio no se observó en las silicuas embebidas (15 días) (Figura 1.8).

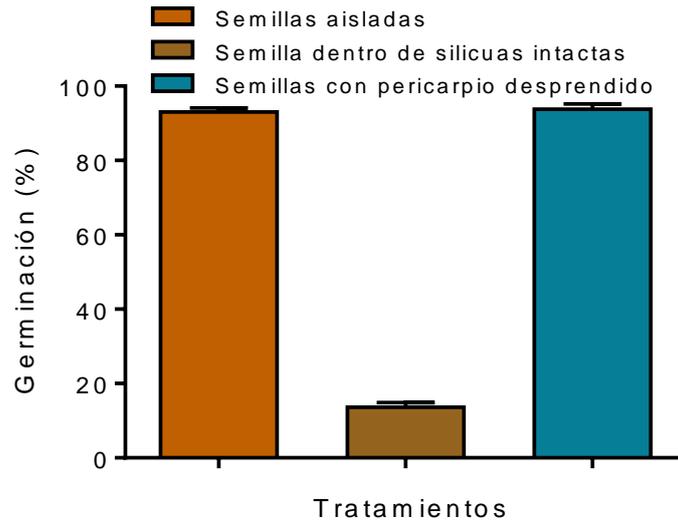


Figura 1.4. Efecto de los pericarpios desprendidos sobre la germinación de las semillas de *Raphanus sativus* (nabón) incubados a (12/12 h) 21/9 °C en oscuridad constante (medias \pm 95 % de intervalo de confianza).

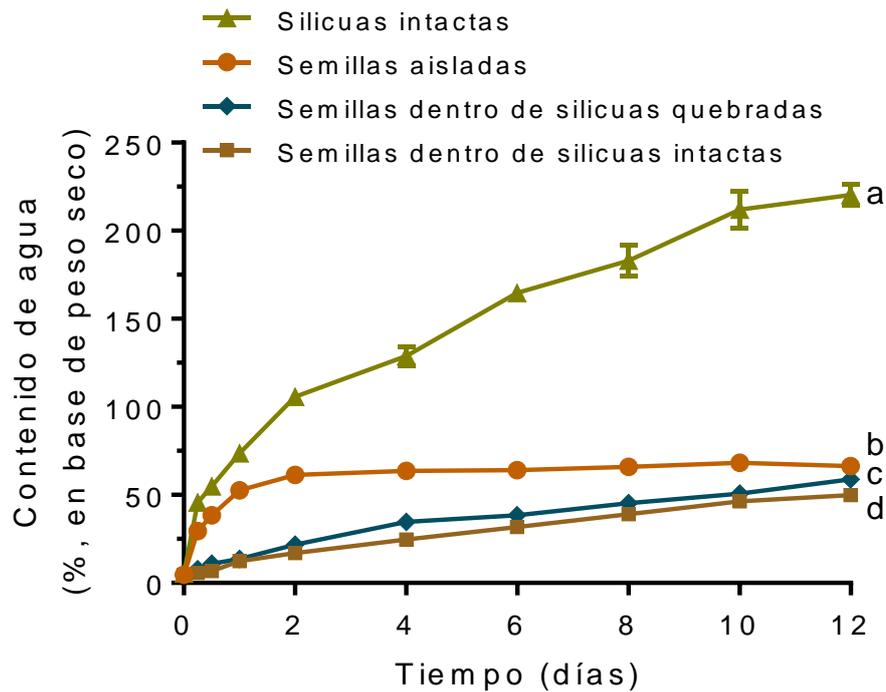


Figura 1.5. Imbibición de semillas medida por incremento en peso en *Raphanus sativus* (nabón). Resultados para semillas aisladas, semillas dentro de silicuas intactas y quebradas y silicuas intactas para diez momentos de imbibición. Los valores son medias y las barras verticales representan ± 1 ES. Letras distintas indicas diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

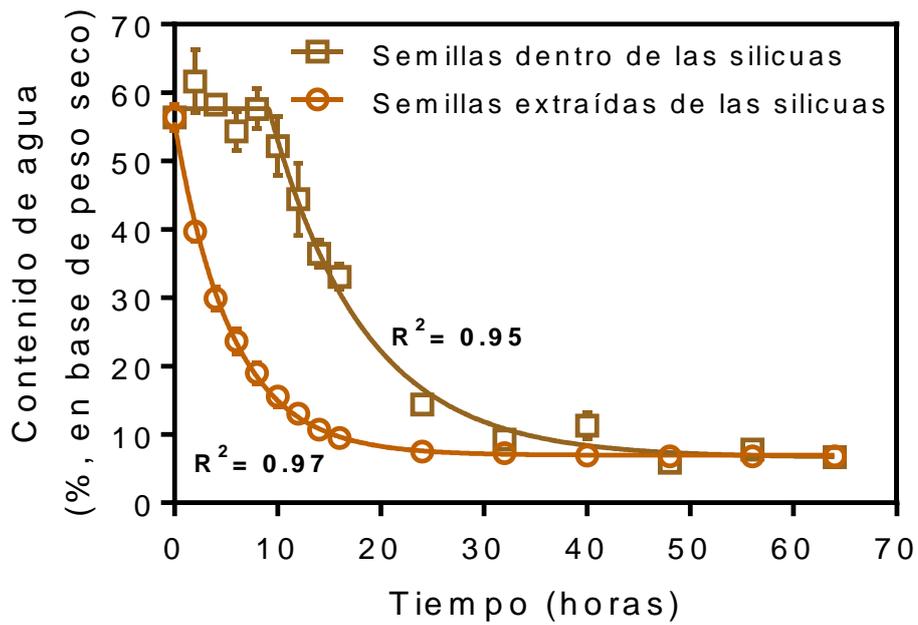


Figura 1.6. Contenido de agua (% , en base de peso seco) de las semillas de *Raphanus sativus* (nabón) aisladas y las dispuestas dentro de las silicuas en una atmósfera de 22 °C y 47/60 % de humedad relativa. Las líneas representan un modelo de regresión no lineal basado en una fase de meseta seguida de una fase de decaimiento exponencial. Los datos ajustan al modelo $y = si(x < a, b), si(x > a, c + (b - c)^{-(k(x - a))})$, con el tiempo x en horas: Círculos ($a = 1,20e^{-11}$, $b = 55,71$, $c = 6,96$, $k = 0,18$); cuadrados ($a = 9,14$, $b = 57,65$, $c = 6,60$, $k = 0,11$). El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas ($P < 0,0001$) entre ambos modelos.

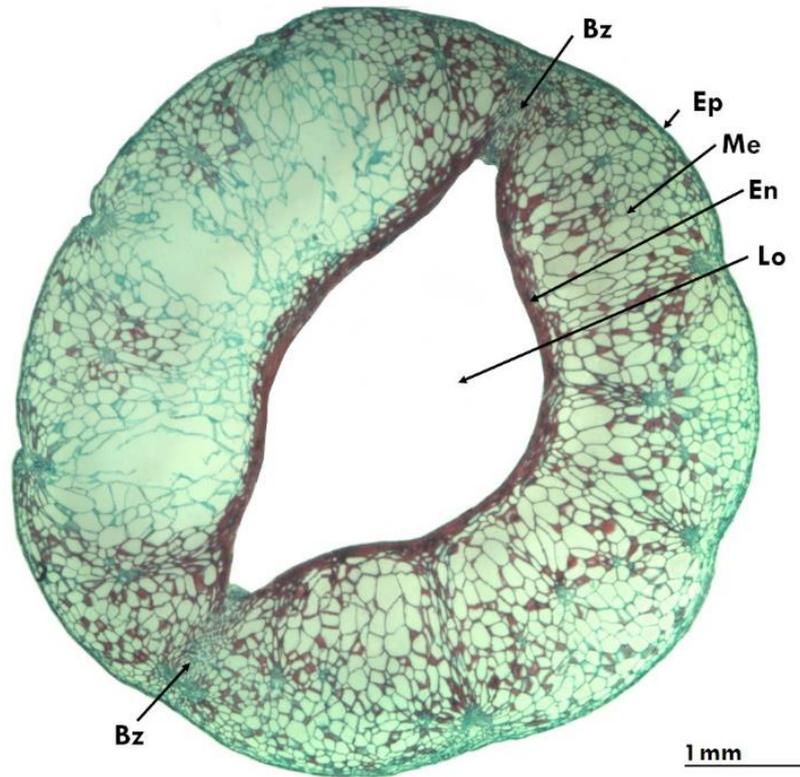


Figura 1.7. Sección transversal del pericarpio de *Raphanus sativus* (nabón). Las células se tiñeron con safranina y fast-green. Los tejidos con paredes primarias o secundarias no lignificadas están teñidos de color azul verdoso y los tejidos con paredes secundarias lignificadas están teñidos de color rojo o marrón oscuro. Ep, epicarpio; Me, mesocarp; En, endocarpio; Lo, lóculo; Bz, posibles zonas de ruptura.

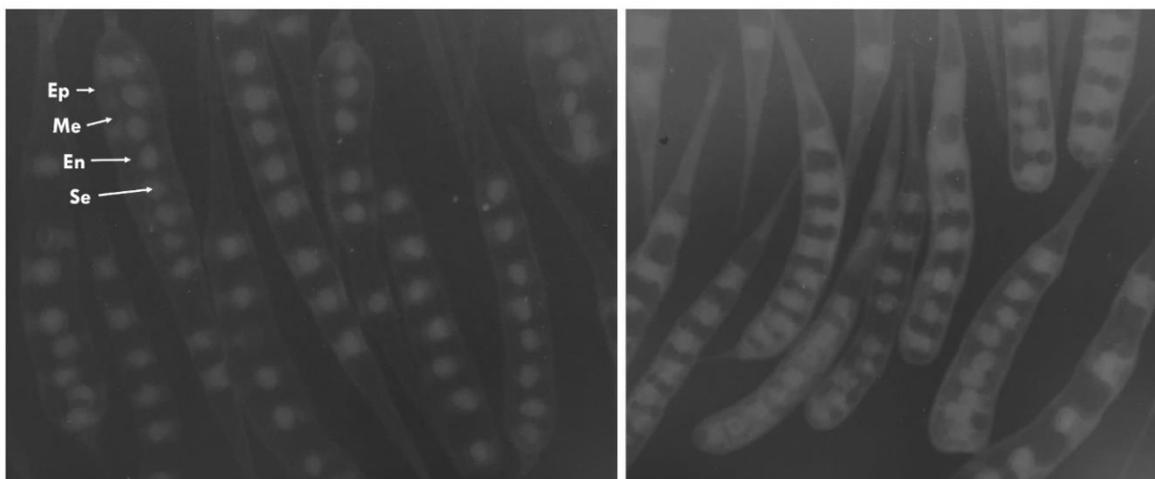


Figura 1.8. Imágenes de rayos X de silicuas de *Raphanus sativus* (nabón) tomadas pre- (izquierda) y post- (15 días, derecha) imbibición. Ep, epicarpio; Me, mesocarpio; En, endocarpio; Se, semilla.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio revelaron que, cuando se separaron del pericarpio, las semillas recién cosechadas de nabón no mostraron dormición primaria, al menos en el rango térmico explorado. A pesar de ello, la germinación se redujo significativamente por la exposición a la luz y/o la presencia del pericarpio (Fig. 1.2). El almacenamiento en seco, hasta 30 meses pos-cosecha, y la estratificación en frío fueron totalmente ineficientes para romper la dormición impuesta por el pericarpio (Fig. 1.2 y 1.3). El pericarpio no impidió la imbibición de las semillas, pero las semillas dentro de las silicuas quebradas e intactas absorbieron 11 y 25 % menos de agua que las semillas aisladas, respectivamente, después de 12 días de experimento (Fig. 1.5). En total, las silicuas absorbieron más del doble de su peso en agua, pero el 82 % de ese agua estuvo retenida en el pericarpio. En consecuencia, las semillas dentro de las silicuas retrasaron el secado entre 9 y 24 horas respecto a las semillas aisladas (Fig. 1.6). Las secciones transversales del pericarpio mostraron varias capas de pequeñas células fuertemente lignificadas en el endocarpio (Fig. 1.7), y las imágenes de rayos X revelaron la falta de espacio entre las semillas parcialmente embebidas y la capa más interna del pericarpio (endocarpio) (Fig. 1.8). En consecuencia, la restricción mecánica a la absorción total de agua o a la expansión del embrión asociada a un endocarpio lignificado es posiblemente la causa de la menor germinación en las semillas dentro de las silicuas en *R. sativus*.

La exposición a la luz redujo en gran medida la germinación en las semillas de nabón y esta sensibilidad persistió incluso después de 30 meses de almacenamiento en seco en condiciones de laboratorio. En consecuencia, las semillas ubicadas sobre la superficie del suelo podrían mantenerse sin germinar hasta que sean enterradas (Chauhan *et al.*, 2006a). Este efecto inhibitorio de la luz sobre la germinación del nabón, denominado fotoinhibición de la germinación (Pons, 2000), sería una estrategia exitosa para reducir la mortandad de plántulas debido a las condiciones extremadamente secas que es probable que ocurran en la superficie del suelo (Pons, 2000; Batlla y Benech-Arnold, 2014; Carta *et al.*, 2017). Por otro lado, cualquier mecanismo que incremente el entierro de las semillas resultará en un aumento de la germinación y emergencia de las plántulas, y posiblemente, en la sincronización de la germinación y en plántulas fácilmente controlables (Lu *et al.*, 2015a; Zhou *et al.*, 2015). También encontramos que la germinación incrementó con incrementos en las temperaturas y las diferencias fueron más evidentes entre rangos extremos de temperatura (4/14 °C vs. 14/28 °C). Este resultado podría indicar que las bajas temperaturas (4/14°C) inducen dormición secundaria (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

El pericarpio juega un rol fundamental en la dormición de las semillas de nabón, al igual en muchas especies de Brassicaceae (Cousens *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2015a, 2017b; Zhou *et al.*, 2015; Sperber *et al.*, 2017), y otras familias (Presotto *et al.*, 2014; Puglia *et al.*, 2015). En algunas de estas especies, se sugirió que el almacenamiento en seco y/o la estratificación en frío podrían romper la dormición (Baskin y Baskin, 2014). En nabón, las semillas dentro de las silicuas mostraron menor germinación que las semillas aisladas incluso después de 30 meses de almacenamiento seco bajo condiciones de laboratorio, sugiriendo que este método no es efectivo para romper la dormición impuesta por el pericarpio. La estratificación en frío tampoco fue efectiva para promover la germinación de semillas dentro de las silicuas; es más, este método mostró reducción en la germinación de las semillas. Un resultado similar se encontró en la especie Brassicaceae *Lachnoloma lehmannii* (Mamut *et al.*, 2014). Es posible que la estratificación en frío induzca la dormición secundaria en nabón (Baskin y Baskin, 2014).

La germinación de las semillas de nabón incubadas en presencia de los pericarpios desprendidos no fue inhibida, sugiriendo que el pericarpio no limitó la germinación por medio de compuestos químicos inhibidores. Ello también se observó en *Sterigmostemum fuhaiense*, *Chorispora sibirica* y *Tauscheria lasiocarpa* (Lu *et al.*, 2015a). Si bien el pericarpio no impidió la imbibición de las semillas; redujo el intercambio hídrico, disminuyendo la tasa de imbibición y la cantidad final de agua absorbida. La baja tasa de absorción de agua podría proteger a las semillas de daños por imbibición, que ha sido demostrado que reduce la viabilidad de las semillas, especialmente si el proceso de imbibición es rápido (Hu *et al.*, 2009). Resultados similares fueron encontrados en *R. raphanistrum* (Cousens *et al.*, 2010) y *Lachnoloma lehmannii* (Mamut *et al.*, 2014). El pericarpio de nabón mostró gran capacidad de absorción de agua y, en consecuencia, redujo la tasa de secado de las semillas dentro de las silicuas. Consecuentemente, el pericarpio puede proporcionar un ambiente interno que mantenga a las semillas húmedas después de un período de lluvia moderada que provoca la imbibición de las semillas, extendiendo el período efectivo durante el cual puede ocurrir la germinación o permitiendo que una semilla germinada sobreviva hasta el próximo evento de lluvia mediante la reducción de la desecación durante cortos periodos de sequía (Cousens *et al.*, 2010).

El desenlace de la germinación depende del equilibrio de fuerzas entre el potencial de crecimiento del embrión y la disminución de las restricciones impuestas por las cubiertas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Steinbrecher y Leubner-Metzger, 2017). Las capas de células fuertemente lignificadas en el endocarpio de nabón podrían causar la restricción mecánica a la expansión del embrión. Este Capítulo mostró que la germinación de las semillas dentro de las silicuas se incrementó con el aumento de las temperaturas

(Fig. 1.2), y ello podría estar asociado a un mayor potencial de crecimiento del embrión, o también a un incremento en la actividad fúngica que provoca la degradación del pericarpio (Sperber *et al.*, 2017). Se requieren estudios futuros para confirmar estos mecanismos. El hecho que, dentro de las silicuas, la germinación fluctúe entre los diferentes momentos de la poscosecha, podría estar afectado por la morfología de la silicua. Las silicuas de nabón son multiseminadas (Roth, 1977), de manera que si una sola semilla dentro de una silicua intacta tiene suficiente crecimiento potencial para superar la resistencia mecánica impuesta por el pericarpio, facilitaría la germinación de las semillas vecinas, debido al debilitamiento de la zona de ruptura y, por lo tanto, la reducción de resistencia mecánica.

Las capas altamente lignificadas en el endocarpio también podrían ser responsables de la menor absorción final de agua de las semillas dentro de las silicuas (Sperber *et al.*, 2017). Al comparar la tasa de imbibición y el contenido final de agua en las semillas aisladas, las semillas dentro de las silicuas quebradas y las semillas dentro de las silicuas intactas, se observó que, aunque las silicuas quebradas presentaron libre pasaje al agua, la tasa de imbibición fue similar a las silicuas intactas, y en ambos casos fue menor que en las semillas aisladas. Estos resultados revelan que las capas lignificadas del endocarpio ejercen restricción mecánica que probablemente evitaría la imbibición total de agua necesaria para la emergencia de la radícula, debido a la falta de espacio entre la semilla y el endocarpio y la ausencia de expansión del endocarpio (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Sperber *et al.*, 2017). Se ha encontrado que el pericarpio impide mecánicamente la germinación en otras especies de Brassicaceae con frutos indehiscentes permeables al agua (Cousens *et al.*, 2010; Mamut *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015a; Zhou *et al.*, 2015; Sperber *et al.*, 2017).

Las semillas aisladas de nabón recién cosechadas germinaron a un amplio rango de temperaturas en condiciones de oscuridad, sugiriendo que el embrión estaba completamente desarrollado al momento de la cosecha. En consecuencia, la dormición morfológica y morfo-fisiológica en esta especie puede ser descartada (Baskin y Baskin, 2004, 2014). Además, el pericarpio de nabón es permeable al agua, sugiriendo ausencia de dormición física o combinada (física + fisiológica). Por lo tanto, es posible concluir que la dormición fisiológica impuesta por el pericarpio sería responsable de la dormición en nabón, que es consistente con el tipo de dormición encontrada en otras especies de Brassicaceae con frutos indehiscentes (Baskin y Baskin, 2004; Cousens *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2015a, 2017b; Zhou *et al.*, 2015). La restricción mecánica del endocarpio a la expansión del embrión y/o a la absorción total de agua por parte de las semillas en su interior, parece ser responsable de los efectos inhibidores del pericarpio sobre la germinación en las poblaciones de nabón.

De acuerdo a estos resultados, la exposición a la luz y la presencia del pericarpio podrían afectar la dinámica de germinación y, por lo tanto, de emergencia de plántulas en las poblaciones de nabón. Los requerimientos de oscuridad para la germinación podrían resultar en la formación de un banco de semillas superficial, y las semillas podrían eventualmente germinar cuando son incorporadas en el suelo (Carta *et al.*, 2017). El pericarpio tendría el potencial de distribuir la germinación de una cohorte durante un período de tiempo prolongado (Lu *et al.*, 2015a) y/o de retrasar la emergencia de las plántulas hasta la siguiente o subsiguiente estación de crecimiento después de la maduración de las semillas, resultando en la formación de un banco de semillas persistente en el suelo (Lu *et al.*, 2017a; b). Además, la germinación ocurriría cuando el contenido de agua del embrión fuera adecuado para soportar los eventos bioquímicos que conducen a la expansión celular, por lo tanto, el contenido de agua disponible en el suelo condicionaría el momento de la emergencia, y la falta de humedad puede ser el control principal de la germinación en condiciones de sequía (Chauhan y Johnson, 2010). Por lo tanto, el pericarpio conferiría ventajas ecológicas significativas a las poblaciones de nabón en condiciones de campo, favoreciendo la conservación de las semillas en ambientes donde la lluvia fluctuante conduce a ciclos de hidratación y deshidratación y/o en ambientes donde la lluvia fluctúa año a año (Hu *et al.*, 2009). Estos escenarios son comunes en el sur de la provincia de Buenos Aires, donde la precipitación promedio anual varía de 370 mm en el oeste (Villalonga) a 920 mm en el este (Balcarce) pero con una alta variabilidad entre estaciones y años, con valores anuales desde 200 hasta 750 mm y 470 hasta 1250 mm para el oeste y el este, respectivamente (Servicio Meteorológico Nacional, <https://www.smn.gov.ar>).

Sin embargo, la emergencia de plántulas de nabón podría ser más rápida con una mayor disponibilidad de agua, si el agua adicional acelera la degradación de las silicuas y/o ablanda las capas duras lignificadas del endocarpio, haciendo al pericarpio menos restrictivo a la germinación (Cousens *et al.*, 2010; Mamut *et al.*, 2014). Por ejemplo, los frutos indehiscentes de *Diptychocarpus strictus* comenzaron a ablandarse y las semillas a germinar en condiciones de campo en la segunda primavera después de la dispersión, pero el debilitamiento del pericarpio y la germinación continuaron durante al menos otros dos años (Lu *et al.*, 2015b). La reducción en la resistencia mecánica del pericarpio y la consecuente germinación de las semillas también podría ocurrir debido a la degradación de los pericarpios por la actividad fúngica (Sperber *et al.*, 2017). Lo mismo sucedería ante cualquier agente (antrópico y/o natural) que incremente la ruptura de los silicuas, por ejemplo, labores de labranza y siembra, el sistema de trilla de las cosechadoras, el paso de vehículos, animales y/o agrietamiento del suelo (Chauhan *et al.*, 2006a; Chauhan y Johnson, 2010; Reeves *et al.*, 1981).

En Argentina, el sistema de labranza cero incrementó a partir de 1982, y tres décadas después supera el 90 % del área agrícola (www.aapresid.org.ar). Durante ese período, el nabón es una de las malezas que ha mostrado los mayores incrementos en su incidencia en el sudeste de Buenos Aires (Scursoni *et al.*, 2014). La proliferación de las poblaciones nabón bajo el sistema labranza cero podría estar relacionado a que las semillas permanecen dentro de las silicuas sin germinar sobre la superficie del suelo hasta su posterior descomposición y/o entierro luego de la siembra, o hasta que las condiciones ambientales favorezcan la descomposición/degradación de las silicuas y la posterior germinación. De acuerdo a nuestros resultados, una proporción de semillas aisladas y/o semillas dentro de las silicuas sobre la superficie del suelo germinarían desde el momento de su dispersión (verano - principios de otoño) hasta fines del otoño, y nuevamente en primavera con los incrementos en las temperaturas, siempre y cuando las condiciones hídricas lo permitan. Sin embargo, solo una pequeña proporción de las semillas aisladas en la superficie del suelo (en condiciones de luz) y de las semillas dentro de las silicuas podrían germinar durante el invierno (4/14 °C). Futuros experimentos deben ser realizados para comprobar nuestras inferencias.

Nuestros resultados revelaron que las semillas aisladas recién cosechadas de nabón no tienen dormición primaria, pero que la germinación fue parcialmente inhibida por la exposición a la luz y/o la presencia del pericarpio. El pericarpio impuso dormición fisiológica por restricción mecánica del endocarpio a la expansión del embrión y/o a la completa absorción de agua por las semillas dentro de las silicuas, que es consistente con el tipo de dormición encontrado en otras especies de Brassicaceae con frutos indehiscentes. Los requerimientos de oscuridad y la restricción mecánica del pericarpio tendrían el potencial de distribuir o escalonar la germinación durante un período más prolongado. Sin embargo, el almacenamiento en seco hasta 30 meses pos-cosecha y el almacenamiento en condiciones invernales fueron totalmente ineficientes para romper la dormición impuesta por el pericarpio. Esto nos conduce a aceptar parcialmente la hipótesis planteada.

CAPÍTULO 2

Detección y costo de aptitud de la mutación Trp-574-Leu en poblaciones ferales de *Raphanus sativus* (nabón).

INTRODUCCIÓN

El uso intensivo, generalizado y sostenido de herbicidas AHAS en los sistemas agrícolas de todo el mundo junto al incremento en la adopción de los sistemas labranza cero y la reducción en las rotaciones de cultivos resultaron en la rápida evolución de poblaciones de malezas resistentes a estos herbicidas en al menos 162 especies (Kraehmer *et al.*, 2014; Yu y Powles, 2014; Heap, 2019): Ello fue debido, principalmente, a la selección de mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima AHAS que resultan en una enzima insensible a estos herbicidas (McCourt *et al.*, 2006; Powles y Yu, 2010; Yu y Powles, 2014). Se han identificado 29 sustituciones de aminoácidos en ocho posiciones del gen AHAS que confieren resistencia a estos herbicidas, sobresaliendo la sustitución Trp-574-Leu como la más comúnmente identificada en condiciones de campo (Powles y Yu, 2010; Yu y Powles, 2014; Heap, 2019).

Las mutaciones que confieren resistencia a herbicidas, por ejemplo a herbicidas AHAS, pueden estar asociadas a efectos pleiotrópicos negativos sobre la aptitud de los individuos en ambientes sin aplicación de herbicidas (Vila-Aiub *et al.*, 2009; Powles y Yu, 2010; Yu y Powles, 2014). Se ha demostrado que las mutaciones en el sitio de unión de los herbicidas pueden alterar la funcionalidad de la enzima AHAS, debido a que algunos residuos de aminoácidos (por ejemplo Phe-206, Arg-377 y Trp-574) son importantes tanto para la unión del herbicida como para el mantenimiento de su actividad catalítica, por lo tanto su conservación es necesaria y un costo de resistencia es esperado (Duggleby *et al.*, 2008; Yu y Powles, 2014). Dependiendo de la especie, distintas mutaciones de resistencia a AHAS estuvieron asociados con reducción (Ashigh y Tardif, 2007; Li *et al.*, 2013; Menegat *et al.*, 2016), incremento (Yu *et al.*, 2003, 2010; Li *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015) o ausencia de modificación (Han *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015; Cross *et al.*, 2015) en la actividad de la enzima AHAS.

Sin embargo, la modificación de la funcionalidad de la enzima AHAS no necesariamente se traduce en efectos pleiotrópicos a nivel de toda la planta (Yu y Powles, 2014). Por ejemplo, *Lolium rigidum*, *Raphanus raphanistrum* L. y *Kochia scoparia* con cinco, cuatro y dos mutaciones de resistencia a AHAS, respectivamente, no mostraron efectos significativos sobre el crecimiento y la competitividad (Yu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Yu y Powles, 2014). En estos casos, es probable que los alelos de resistencia permanezcan en la población, aún

en ambientes sin selección con herbicidas, y múltiples mutaciones pueden acumularse en la misma planta (Yu y Powles, 2014). Contrariamente, *Amaranthus powellii* con la mutación de resistencia a AHAS Trp-574-Leu mostró fuertes efectos pleiotrópicos sobre la morfología y anatomía de la planta, que resultaron en reducciones significativas en el crecimiento y la producción de semillas (Tardif *et al.*, 2006). Una mayor comprensión de las consecuencias sobre la aptitud biológica de los alelos de resistencia a herbicidas es importante para predecir la dinámica evolutiva de la resistencia, y por lo tanto, para desarrollar estrategias de manejo mediante las cuales los costos de aptitud puedan ser manipulados para la selección en contra de los alelos resistentes (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

Raphanus sativus feral (nabón) es una maleza problemática en zonas templadas de América (Marzocca, 1976; Snow y Campbell, 2005; Kaneko *et al.*, 2011), que ha desarrollado resistencia a herbicidas AHAS en Brasil, Chile y Argentina (Theisen, 2008; Pandolfo *et al.*, 2013, 2016; Heap, 2019). En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, un área principalmente agrícola (>60 %) sembrada mayormente (>90 %) bajo el sistema de labranza cero y altamente dependiente de los herbicidas, el nabón es una de las especies de maleza con mayor incremento en incidencia desde 1982 (Scursoni *et al.*, 2014), y Pandolfo *et al.*, (2016) demostraron la presencia de la mutación Trp-574-Leu en dos poblaciones de nabón resistente a herbicidas AHAS.

Se desconoce si la mutación Trp-574-Leu, que causa resistencia a las cinco familias químicas de herbicidas inhibidores de AHAS, presenta efectos pleiotrópicos negativos sobre la actividad de la enzima AHAS y los caracteres reproductivos de nabón. La comparación de múltiples poblaciones susceptibles y resistentes es uno de los métodos utilizados para reducir el efecto de las diferencias en el fondo genético, y además nos permite evaluar la importancia de los diferentes fondos genéticos sobre la aptitud de los genes de resistencia (Vila-Aiub *et al.*, 2011; Keshtkar *et al.*, 2019).

Se hipotetizó que la mutación Trp-574-Leu que confiere resistencia a los herbicidas AHAS no impone efectos pleiotrópicos negativos sobre la actividad enzimática AHAS y los caracteres reproductivos de las poblaciones naturales de *R. sativus*. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron (1) determinar y confirmar si diversas poblaciones de la región Pampeana Argentina son resistentes a los herbicidas inhibidores de AHAS, y (2) evaluar la actividad de la enzima AHAS y los caracteres reproductivos en poblaciones de *R. sativus* susceptibles y resistentes con la mutación Trp-574-Leu criadas sin interferencia con cultivos (costo fisiológico).

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se colectaron silicuas maduras de 17 poblaciones de nabón en la región pampeana Argentina (Fig. I). Dos poblaciones resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS, RSBA10 y RSBA3, y las poblaciones susceptibles RSBA3-S, RSBA1 y RSBA2 fueron previamente caracterizadas por Pandolfo *et al.*, (2016). RSBA1 y RSBA2 fueron recolectadas en áreas sin ninguna aplicación de herbicidas y RSBA15 se recolectó en un campo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Hilario Ascasubi, Hilario Ascasubi, Buenos Aires, Argentina. Las dos poblaciones resistentes fueron recolectadas en campos agrícolas cultivados bajo el sistema de labranza cero en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Pandolfo *et al.*, 2013, 2016). Las semillas fueron separadas de las silicuas manualmente o utilizando un mortero, con mínimo daño físico y posteriormente limpiadas y almacenadas bajo condiciones de laboratorio hasta el comienzo de los experimentos.

Screening de la resistencia

La respuesta de las poblaciones de nabón RSLP2, RSBA7, RSBA11, RSBA12, RSBA13, RSBA14, RSBA15, RSBA16, RSBA17, RSBA18, RSBA19 y RSBA20 a metsulfuron-metil fue evaluada en 2015 y 2016. Las poblaciones RSBA10 y RSBA3 fueron utilizadas como controles resistentes, y las poblaciones RSBA1, RSBA2 y RSBA3-S fueron consideradas controles susceptibles. Al menos 200 plántulas por población fueron establecidas en bandejas plásticas (28 x 55 cm) de 200 celdas rellenas con sustrato comercial (Grow Mix® Terrafertil), criadas en invernáculo con luz natural, riego automático diario y a temperatura de 20 – 25 °C, y fertilizadas con un fertilizante líquido grado 5-3-3 (Chase LI 533) y urea a razón de 8 L ha⁻¹ y 50 kg ha⁻¹, respectivamente. La aplicación del herbicida metsulfuron-metil a doble dosis comercial (2X, X = 6 g i.a ha⁻¹) se realizó en el estado 1.3 – 1.4 (Madafoglio *et al.*, 1999) utilizando un equipo portátil de CO₂ a presión constante (50 kg cm⁻²), provisto de una pastillas de abanico plano (TeeJet® 8001 EVB). Se trabajó a una velocidad de 1,45 km h⁻¹ y caudal de 200 L ha⁻¹ siguiendo los métodos de Pandolfo *et al.*, (2016). Las plantas sobrevivientes fueron evaluadas 35 días luego de la aplicación del herbicida, y se clasificaron como sobrevivientes a la aplicación del herbicida si el ápice de crecimiento permanecía vivo (Walsh *et al.*, 2004). Los experimentos se organizaron en un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones.

Base molecular de la resistencia

Un marcador CAPS fue utilizado para detectar la presencia de la mutación Trp-574-Leu en plantas individuales sobrevivientes a la aplicación de doble dosis comercial de metsulfuron-metil siguiendo los procedimientos de Pandolfo *et al.*, (2016). Se evaluaron tres plantas por población para RSBA13, RSBA14 y RSBA17 y dos para RSBA11. La población susceptible RSBA1 se incluyó como control negativo y la población resistente RSBA10 se utilizó como control positivo.

El ADN genómico fue extraído de hojas jóvenes de plantas individuales sobrevivientes a la aplicación de metsulfuron-metil usando el método rápido CTAB (Doyle y Doyle, 1987), y cuantificado utilizando un espectrofotómetro, leyendo absorbancia a longitudes de onda de 260 (A260) y 280 nm (A280). Para determinar la calidad de ADN se utilizó la relación A260/A280, y la concentración de ADN se calculó utilizando la siguiente fórmula: [ADN] = A260 x factor de dilución x 50 ng/μL.

Los primers WA574F y WA653R (Yu *et al.*, 2012) fueron usados para amplificar el fragmento del gen de la enzima AHAS que contiene a la posición 574. La amplificación por PCR se realizó a 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 1 min a 72 °C y 10 min a 72 °C para la terminación. Se utilizaron 60 ng de ADN genómico en 30 μl de reacción de PCR con 10 x buffer PCR Gibco, 2.5 mM MgCl₂, 125 μM de cada dNTP, 5.5 pmol de cada primer, 1 U Taq ADN polimerasa, y agua ultra pura para alcanzar el volumen final. Una alícuota de 6 μL del producto de la PCR de cada muestra fue evaluada en gel de agarosa al 1 % para detectar la presencia de la banda de 504 pb.

Los productos de la amplificación (banda de 504 pb) fueron digeridos con la enzima de restricción *MfeI* para la detección de la mutación Trp-574-Leu. La digestión se llevó a cabo en un volumen de 30 μL y se incubó por 3 h a 37 °C. Los productos de la digestión (bandas) fueron analizados en geles de agarosa al 2 % a 80 v por 1,5 h, teñidos con bromuro de etidio, y fotografiados bajo luz UV-C (254 nm). La lectura de los fragmentos de ADN fue visual, asumiendo que cada banda representaba un locus simple con alelos dominantes.

Actividad de la enzima AHAS in vitro

La actividad de la enzima AHAS *in vitro* fue evaluada en el tejido foliar de una población susceptible (RSBA2) y una resistente (RSBA10) de nabón siguiendo los procedimientos descriptos por Yu *et al.*, (2003) con controles negativos para cada dosis de acuerdo a Yu *et al.*, (2010) con modificaciones. Este experimento se realizó en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR, UNR, CONICET). El tejido foliar (sin incluir el pecíolo) de al menos 10 plántulas (estado de 2–3 hojas) en cada extracción fue molido con

un mortero en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, que posteriormente fue suspendido en 5 ml g⁻¹ de peso fresco de buffer formado por 100 mM HEPES [N-(2-hidroxiethyl)-piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico)], pH 7,5, 200 mM piruvato de sodio, 20 mM MgCl₂, 2 mM tiamina pirofosfato (TPP), y 40 μM flavina adenina dinucleótido (FAD). Se agregó polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble en una relación 6:1 de tejido:PVPP insoluble. El homogeneizado fue filtrado a través de cuatro capas de gasa, centrifugado a 21.000 g por 15 min a 4 °C, e inmediatamente se utilizó para los experimentos de actividad enzimática.

Las soluciones compuestas por extracto crudo (300 μl) y el mismo volumen de agua destilada o diferentes concentraciones de herbicida (0,01 – 100.000 μM de imazetapir o 0,1 nM – 1.000 μM de metsulfuron-metil) fueron incubadas a 37 °C por 60 min. Se utilizó el herbicida sulfonilurea metsulfuron-metil (Nufarm, 60 % w/w i.a.) y el herbicida imidazolinona imazetapir (Pivot, 10 % w/v i.a.), y los controles negativos fueron realizados con extracto desnaturalizado.

El contenido del tubo de reacción fue dividido en dos alíquotas de 250 μL. En una de las alíquotas, la reacción fue frenada mediante el agregado de 100 μL de H₂SO₄ 5 N e incubada a 60 °C por 15 min con la finalidad de convertir el acetolactato en acetoína. Las enzimas formadoras de acetoína en los tejidos foliares pueden interferir con el experimento (Forlani *et al.*, 1999), por lo tanto la contribución de la formación directa de acetoína por la actividad de enzimas no-AHAS se determinó al utilizar NaOH 2.5 N para terminar la reacción, en lugar de H₂SO₄ en la segunda alíquota. La acetoína fue cuantificada utilizando un método colorimétrico (Westerfeldt, 1945) donde el color fue desarrollado mediante el agregado de 650 μL de 0.25% (p/v) de creatina y 2.5 % (p/v) de α-naftol preparado en NaOH 2.5 M inmediatamente antes de usar. Las muestras fueron agitadas e incubadas a 60 °C por 15 min, se dejaron enfriar y luego centrifugadas a 25 °C por 5 min (11.000 g). La absorbancia fue medida espectrofotométricamente a 530 nm y se calculó la actividad de la enzima AHAS como la media de tres repeticiones independientes (extractos independientes), que se expresó como μM de acetoína h⁻¹ g⁻¹ de peso fresco.

Evaluación de los rasgos de aptitud reproductiva

Se realizaron dos experimentos en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina (38° 41' 38" S, 62° 14' 53" O) con la finalidad de evaluar los caracteres reproductivos de las poblaciones resistentes (R) y susceptibles (S) de nabón. El suelo era de textura arenosa-franca con buen drenaje, 1,1 % de materia orgánica y pH 7,7. El biotipo R estuvo representado por dos poblaciones resistentes a herbicidas AHAS con la mutación Trp-574-Leu (RSBA3 y RSBA10),

previamente caracterizadas por Pandolfo *et al.*, (2016). Cuatro poblaciones susceptibles a herbicidas AHAS (RSBA2, RSBA3-S, RSBA15 y RSBA16) obtenidas de una amplia gama de condiciones ambientales (Fig. I) representaron al biotipo S. La comparación de múltiples poblaciones R y S nos permitió reducir el efecto de las diferencias en el origen genético (Vila-Aiub *et al.*, 2011). Los experimentos fueron realizados en dos estaciones de crecimiento, entre Mayo de 2016 – Diciembre de 2016 (invierno) y Agosto de 2016 – Enero de 2017 (primavera) para simular la dinámica de crecimiento de nabón, que se considera una especie facultativa (Snow y Campbell, 2005), ya que dos cohortes son observadas comúnmente en el agroecosistema.

Al menos 250 plántulas de cada una de las seis poblaciones fueron establecidas en bandejas multi-celda rellenas con sustrato comercial (Grow Mix®Terrafertil), criadas en invernáculo con fotoperiodo natural, riego diario, a temperatura de 20 – 25 °C, y fertilizadas con un fertilizante líquido (Chase LI, grade 5-3-3) a dosis comercial (8 L ha⁻¹). En el estado de crecimiento 1.3 – 1.4 (Madafiglio *et al.*, 1999), cuando las plántulas tenían 3-4 hojas, 200 plántulas de tamaño similar de cada población fueron trasplantadas en el campo experimental en bloques, cada uno compuesto por seis unidades experimentales (una población por cada unidad experimental). Las unidades experimentales consistieron de 5 hileras espaciadas a 1 m, con 10 plantas por hilera a intervalos de 0.3 m. Las plantas fueron regadas mediante riego por goteo y fertilizadas con 50 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico al trasplante y 120 kg ha⁻¹ urea en el estado de roseta, para el óptimo crecimiento de las plantas. Se realizó desmalezado manual para evitar la interferencia interespecífica. Se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizados, con cuatro repeticiones, y los experimentos se realizaron de la misma manera en ambas estaciones de crecimiento (invierno y primavera).

Al finalizar cada estación de crecimiento, se midió altura de planta y número de ramas primarias en tres plantas sucesivas en el medio de la hilera central de cada unidad experimental. Las silicuas de estas tres plantas fueron cosechadas manualmente, secadas en condiciones de laboratorio, y posteriormente contadas y trilladas (se separó las semillas de las silicuas) manualmente o utilizando un mortero, con mínimo daño. Las semillas fueron limpiadas y pesadas para obtener el rendimiento por planta. El peso unitario de las semillas fue estimado al promediar el peso de cuatro réplicas de 100 semillas. El número de semillas por planta se estimó dividiendo el rendimiento por planta dividido el peso de las semillas para cada planta. El número de semillas por silicua se estimó dividiendo el número total de semillas por planta dividido el número de silicuas por planta. Los datos de las tres plantas de cada unidad experimental fueron promediados para el análisis estadístico.

Análisis estadístico

La concentración de herbicida que causa 50 % de inhibición de la actividad de la enzima AHAS (I_{50}) fue estimada utilizando un modelo de regresión log-logístico no lineal. La bondad del ajuste de los datos fue evaluada utilizando la prueba F de falta de ajuste a un nivel de significancia de 0,05 (Seefeldt *et al.*, 2005). Los datos de dosis-respuesta se ajustaron al modelo de regresión log-logístico no lineal con tres parámetros **[Ecuación 2]**:

$$Y = d / \{1 + \exp[b(\log(x) - \log(e))]\} \text{ [Ecuación 2];}$$

donde e es I_{50} , d el límite superior de la respuesta y b la inclinación de la curva de dosis-respuesta alrededor de e . El valor límite inferior se fijó en 0 (tres parámetros), asumiendo la inhibición completa de la actividad de la enzima AHAS a altas concentraciones de herbicida (Ritz, 2010).

La actividad AHAS extraíble y las múltiples curvas de dosis-respuesta fueron comparadas entre poblaciones susceptible y resistente utilizando la prueba t de Student. Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete *drc* del software estadístico R 3.3.1 (Ritz *et al.*, 2015). Se utilizaron los valores de I_{50} para calcular el factor de resistencia (FR), definido como la relación entre I_{50} de las poblaciones resistente y susceptible (I_{50R}/I_{50S}).

Para investigar las diferencias en altura de planta, número de ramas, silicuas por planta, semillas por silicua, semillas por planta, peso de las semillas y rendimiento por planta entre biotipos susceptibles y resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS 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 (invierno y primavera) y los biotipos (R y S) se consideraron efectos fijos, y los bloques dentro de cada estación de crecimiento (invierno y primavera), población (RSBA2, RSBA3, RSBA3-S, RSBA10, RSBA15 y RSBA16) dentro de biotipo (R y S) y la interacción entre estación de crecimiento y población fueron considerados efectos aleatorios.

RESULTADOS

Screening de la resistencia

Ocho poblaciones mostraron individuos sobrevivientes a la aplicación de doble dosis comercial de metsulfuron-metil (Tabla 2.1). Todas estas poblaciones se limitaron a tres partidos (Necochea, Lobería y Balcarce) en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Fig. 1). La subpoblación susceptible RSBA3-S se encontró en el margen del lote en el mismo campo donde se encontró la subpoblación resistente RSBA3. RSBA15 se recolectó en un campo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Hilario Ascasubi, Hilario Ascasubi, Buenos Aires, Argentina. La población susceptible RSBA7 se colectó a menos de 50 km de las poblaciones resistentes, mientras que las demás poblaciones susceptibles se encontraron a más de 200 km de las poblaciones resistentes (Fig. 1). El tamaño de las poblaciones fue altamente variable tanto para las poblaciones susceptibles como las resistentes (Tabla 2.1).

Base molecular de la resistencia

La digestión de los productos de PCR con la enzima de restricción *MfeI* reveló que los individuos susceptibles tenían el alelo de tipo silvestre representado por el fragmento no digerido de 504 pb, y todos los individuos resistentes evaluados mostraron el alelo mutante representado por los fragmentos digeridos de 291 y 213 pb, indicando la presencia de la mutación Trp-574-Leu.

Actividad de la enzima AHAS in vitro

En ausencia de herbicidas AHAS, la actividad de la enzima AHAS en el biotipo susceptible ($731,6 \mu\text{M acetoína h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) fue 3,2-veces más alta ($t = 5,79$, $P = 0,0044$) que la del biotipo resistente ($226,4 \mu\text{M acetoína h}^{-1} \text{ g}^{-1}$).

El efecto de los herbicidas sobre la actividad de la enzima AHAS fue determinado para los biotipos resistente y susceptible utilizando los herbicidas metsulfuron-metil (SU) e imazetapir (IMI). Los valores de I_{50} del biotipo susceptible fueron de $1,01 \pm 0,29 \mu\text{M}$ y $2,76 \pm 0,77 \text{ nM}$ para imazetapir y metsulfuron-metil, mientras que los valores de I_{50} del biotipo resistente fueron $9199 \pm 1676 \mu\text{M}$ y $26655 \pm 8684 \text{ nM}$ para imazetapir y metsulfuron-metil, respectivamente (Fig. 2.1). Basados en la relación I_{50R} / I_{50S} , el biotipo con la mutación Trp-574-Leu fue 9663 y 9106 veces más resistente a metsulfuron-metil e imazetapir que el susceptible, respectivamente (Fig. 2.1).

Tabla 2.1. Caracterización agroecológica de las poblaciones de *Raphanus sativus* (nabón) utilizadas en el presente estudio.

Código de referencia	Fecha de recolección	Hábitat	Tamaño de población	Nivel de resistencia*
RSLP2	Ene-13	Banquina de ruta.	>100	0,0
RSBA1	Nov-08	Borde de lote de canola.	>10.000	0,0
RSBA2	Nov-08	Banquina de ruta.	>100.000	0,0
RSBA3	Nov-08	Dentro de lote de canola.	10-50	81,1 ± 5,1
RSBA3-S ¹	Nov-08	Borde de lote de canola.	>1.000	0,0
RSBA7	Dic-09	Banquina de ruta 228 km 43.	1-10	0,0
RSBA10	Abr-11	Dentro de lote de girasol.	>10.000	94,3 ± 2,0
RSBA11	Dic-11	Banquina de ruta.	>100	0,5 ± 0,3
RSBA12	Feb-12	Borde de lote de maíz.	>1.000	0,0
RSBA13	Mar-14	Borde de lote agrícola.	50-100	89,5 ± 3,6
RSBA14	Dic-14	Borde de lote de cebada.	1-10	65,2 ± 4,6
RSBA15 ³	Mar-15	INTA Estación experimental	>10.000	0,0
RSBA16	May-15	Dentro de lote de girasol.	n.d.	0,0
RSBA17	Nov-15	Dentro de lote de cebada.	>10.000	90,5 ± 6,2
RSBA18	Abr-16	Borde de lote de soja.	500-1.000	0,0
RSBA19	Abr-16	Dentro de lote de cebada.	>1.000	94,9 ± 1,1
RSBA20	Abr-16	Dentro de lote de soja.	10-50	92,9 ± 0,8

*Porcentaje de plantas resistentes a metsulfuron-metil (Screening de la resistencia).

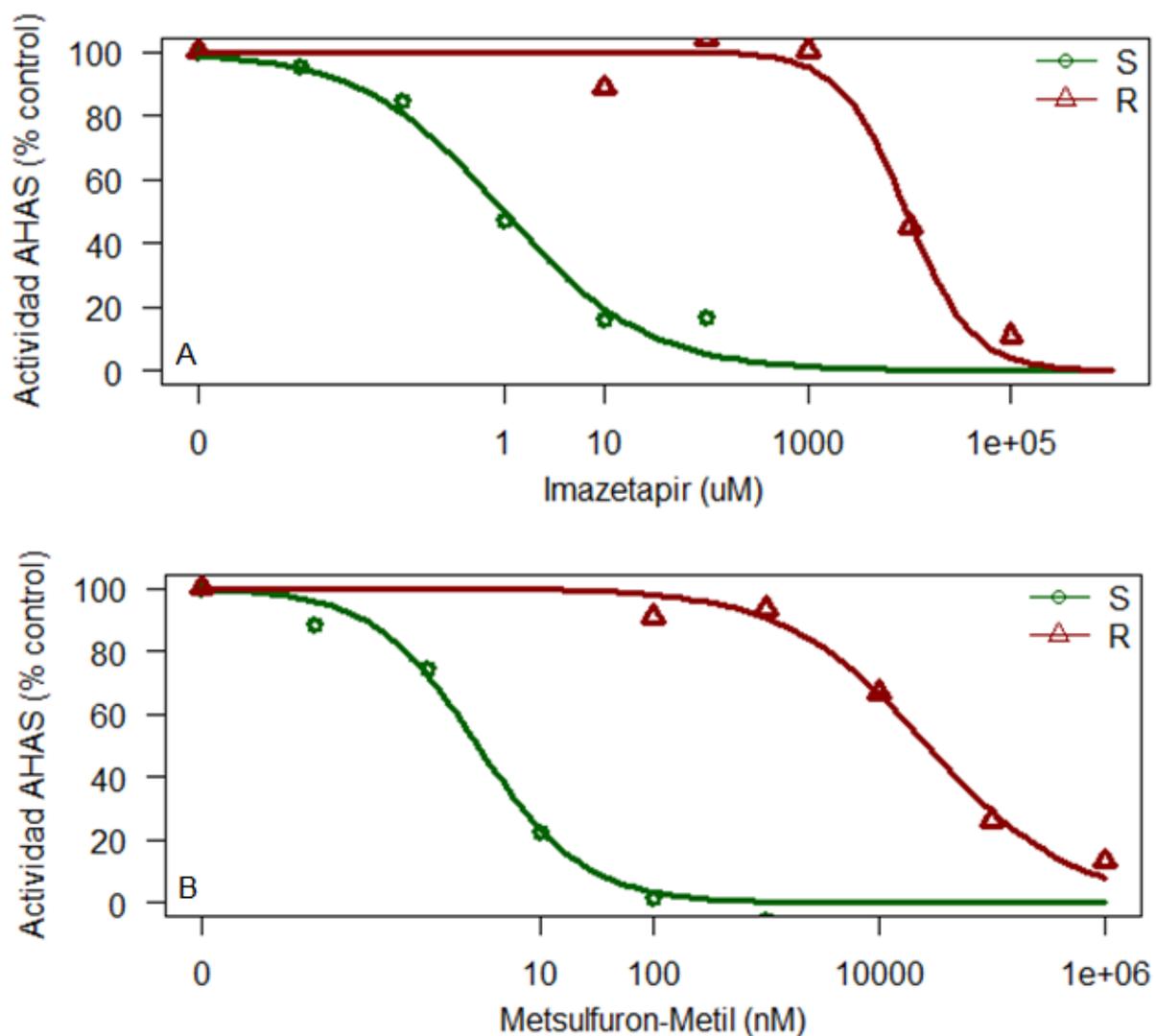


Figura 2.1. Inhibición de la actividad de la enzima AHAS *in vitro* debido a la aplicación de herbicidas inhibidores de AHAS (A, imazetapir; B, metsulfuron-metil) en las poblaciones de *Raphanus sativus* (nabón) resistente (R-RSBA10, Trp-574-Leu) y susceptible (S-RSBA2, tipo silvestre). La actividad de la enzima AHAS se expresó como porcentaje de la actividad AHAS en ausencia de los herbicidas. Cien por ciento de actividad AHAS fue $584,0 \pm 64,4$ y $180,4 \pm 26,5 \mu\text{M}$ de acetoína $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ para S y R, respectivamente (A), y $879,2 \pm 327,0$ y $272,4 \pm 36,3 \mu\text{M}$ acetoína $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ para S y R, respectivamente (B). Los símbolos indican la media de tres réplicas.

Evaluación de los rasgos de aptitud reproductiva

Durante la estación primaveral, la altura de las plantas de nabón fue 48 % menor que la observada en el invierno. También, durante la primavera el nabón produjo 53 % menos silicuas por planta, 55 % menos semillas por planta, 19 % menor peso de semillas y 62 % menos rendimiento por planta. No se encontraron diferencias significativas en el número de semillas por silicua entre ambas estaciones de crecimiento (Tabla 2.2). Tampoco se encontró interacción entre estación de crecimiento y población en altura de planta, silicuas por planta, semillas por silicua, semillas por planta, peso de semillas y rendimiento por planta. Por lo tanto, para estos parámetros, los datos de las dos estaciones de crecimiento fueron agrupados (Tabla 2.2). Dado que existió interacción significativa entre estación de crecimiento y población en el número de ramas, los datos de las estaciones de crecimiento fueron evaluados por separado (Tabla 2.2).

No se encontraron diferencias significativas en altura de planta, número de ramas, semillas por silicua y peso de semillas entre biotipos resistente y susceptible (Tabla 2.2). Sin embargo, el biotipo resistente mostró 17 a 24 % menos silicuas por planta, 22 a 39 % menos semillas por planta, y 21 a 47 % menos rendimiento por planta respecto al biotipo susceptible (Tabla 2.2, Figura 2.2). Además, la subpoblación resistente RSBA3 mostró 24 % menos silicuas por planta, 31 % menos semillas por planta y 39 % menos rendimiento por planta que su contraparte susceptible RSBA3-S (Tabla 2.1; Fig. 2.2).

Tabla 2.2. Tabla de máxima verosimilitud restringida (REML) para rasgos de aptitud biológica de *Raphanus sativus* (nabón) resistente y susceptible a herbicidas inhibidores de AHAS. Los efectos significativos ($P \leq 0,05$) están indicados en negrita.

*Numerador/denominador de los grados de libertad correspondientes a todas las variables estudiadas.

Efecto	g.l.*	Altura de planta		Número de ramas (invierno)		Número de ramas (primavera)		Número de silicuas por planta		Número de semillas por silicua		Número de semillas por planta		Peso de semillas		Rendimiento	
		F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Fijo																	
Estación de crecimiento	1/5	295,21	<,0001	-	-	-	-	42,51	0,0013	0,96	0,3732	48,16	0,0010	19,10	0,0072	78,34	0,0003
Biotipo	1/4	0,18	0,6945	0,41	0,5558	0,05	0,8359	8,01	0,0473	3,22	0,1472	15,73	0,0166	2,35	0,2002	16,97	0,0146
Aleatorio		Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P
Bloque (estación de crecimiento)		0,84	0,2013	0,25	0,4006	0,89	0,1870	0,95	0,1702	0	.	0,71	0,2383	0,77	0,2217	0,65	0,2579
Población (biotipo)		0	.	0,98	0,1631	1,23	0,1089	0	.	0,80	0,2130	0	.	0,99	0,1612	0,34	0,3677
Estación de crecimiento*población		1,19	0,1174	-	-	-	-	0	.	0	.	0,41	0,3415	0,51	0,3061	0,26	0,3978
Residuos		3,87	<,0001	2,74	0,0031	2,74	0,0031	4,42	<,0001	4,53	<,0001	3,87	<,0001	3,87	<,0001	3,87	<,0001

Un modelo lineal mixto fue llevado a cabo para siete rasgos de aptitud, en seis poblaciones de *Raphanus sativus* (nabón) dentro de dos biotipos (susceptible y resistente), con cuatro y dos poblaciones dentro de los biotipos susceptible y resistente, respectivamente. Los datos están basados en dos estaciones de crecimiento, excepto la variable 'número de ramas' que mostró interacción entre estación de crecimiento y población, por lo tanto se muestran los resultados para cada estación de crecimiento (invierno y primavera).

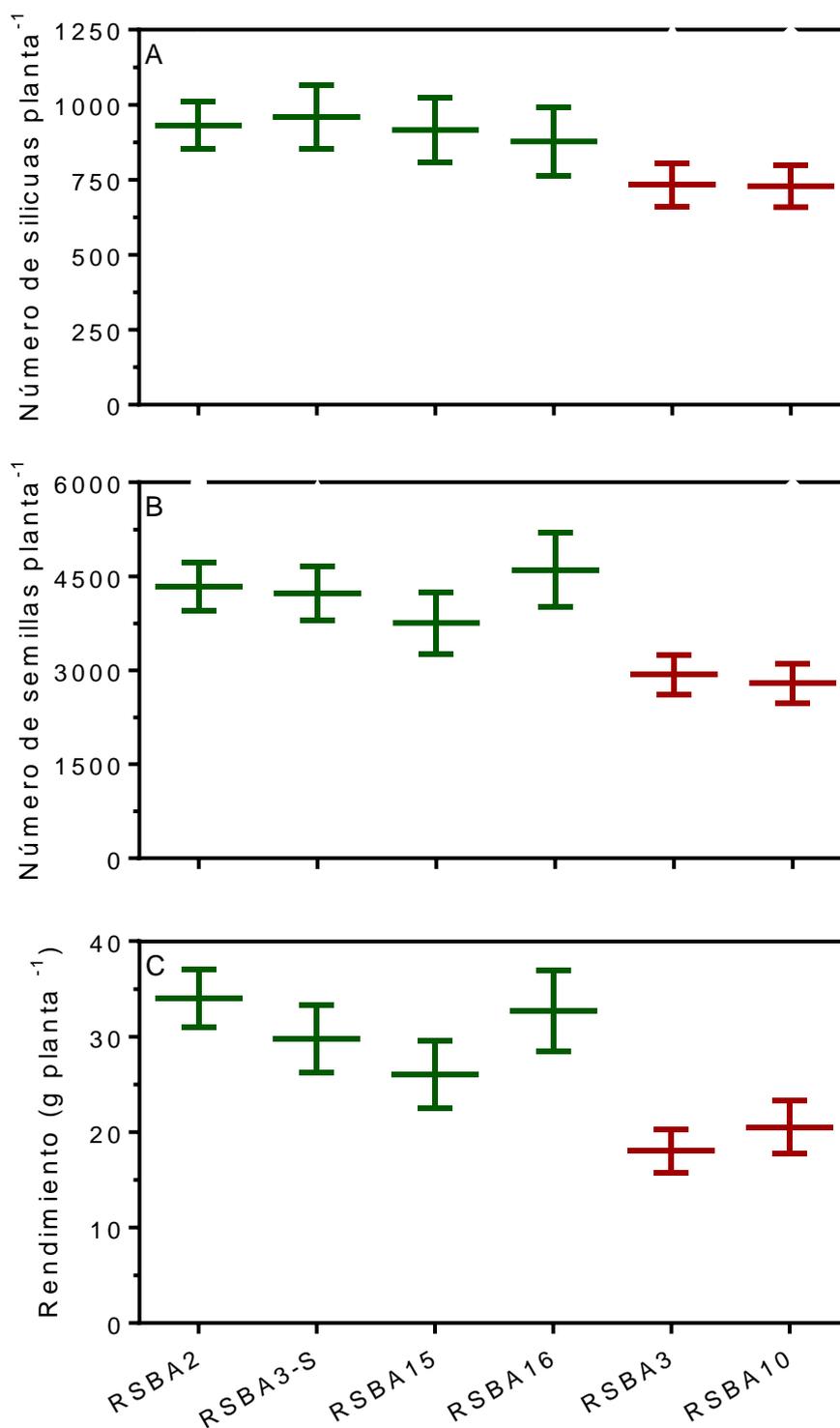


Figura 2.2. Silicuas (A), semillas (B) y rendimiento por planta (C) de seis poblaciones de *Raphanus sativus* (nabón) divididas en dos biotipos, susceptible (RSBA2, RSBA3-S, RSBA15 y RSBA16) y resistente (RSBA3 y RSBA10) a herbicidas AHAS con la mutación Trp-574-Leu. Los datos son promedio de dos estaciones de crecimiento y la línea horizontal y vertical indica la media \pm 1 ES.

DISCUSIÓN

Ocho de las 17 poblaciones de nabón evaluadas, del sudeste de Buenos Aires, mostraron diferentes niveles de resistencia al herbicida metsulfuron-metil (Figura I, Tabla 2.1). Un marcador CAPS confirmó la mutación Trp-574-Leu responsable de la resistencia a los herbicidas AHAS en todos los individuos resistentes evaluados, en concordancia con Pandolfo *et al.*, (2016) (RSBA3 y RSBA10). La mutación Trp-574-Leu produjo una enzima >9.000-veces más resistente que la silvestre; pero mostró efectos pleiotrópicos negativos sobre la actividad de la enzima AHAS, en ausencia de selección por herbicida. Es posible que esta haya sido la causa del costo encontrado sobre la aptitud reproductiva del nabón resistente, bajo las condiciones de estudio.

En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, más del 90 % del área agrícola se siembra bajo sistemas de labranza cero principalmente con trigo, cebada, maíz, girasol y soja (Scursoni *et al.*, 2014). En este área, la aplicación de herbicidas hormonales disminuyó a favor de la adopción masiva de herbicidas residuales como el metsulfuron-metil, una sulfonilurea aplicada comúnmente durante el barbecho en mezclas con glifosato, y el herbicida más aplicado para controlar malezas latifoliadas en los estadios iniciales de trigo y cebada (Scursoni *et al.*, 2014). Otros herbicidas residuales inhibidores de la enzima AHAS son ampliamente utilizados en soja (imazaquin, imazethapyr y chlorimuron) y maíz (nicosulfuron, primisulfuron) (Leguizamón, 2009). El uso intensivo y generalizado de estos herbicidas proviene también de la disponibilidad de cultivos con resistencia genética a herbicidas imidazolinonas, como maíz, girasol y colza, con la tecnología Clearfield® (Beckie, 2006). En girasol, los cultivares resistentes a imidazolinonas (Clearfield® y Clearfield Plus®) representan más del 60 % del área sembrada (ASAGIR 2017, <http://www.asagir.org.ar/>). Además, las rotaciones de cultivos con pasturas se han reducido ampliamente en este área, conduciendo al incremento de campos continuamente cultivados y al monocultivo, con el consecuente uso de los mismos herbicidas. Es posible que la intensa presión de selección, causada por el uso masivo de herbicidas sulfonilureas e imidazolinonas, haya resultado en la selección de plantas de *Amaranthus palmeri*, *Hirschfeldia incana*, *Lolium multiflorum* y *R. sativus* (nabón) resistentes a herbicidas AHAS (AAPRESID 2017, <http://www.aapresid.org.ar/rem/mapas-rem/>), esta última con la sustitución de aminoácidos Trp-574-Leu (Pandolfo *et al.*, 2016). Los mecanismos de resistencia a herbicidas AHAS en *Amaranthus palmeri*, *Hirschfeldia incana* y *Lolium multiflorum* de Argentina son hasta el momento desconocidos.

Las nuevas seis poblaciones de nabón con resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS debido a la mutación Trp-574-Leu fueron encontradas en campos cercanos a aquellos

informados por Pandolfo *et al.*, (2016). Las poblaciones RSBA11, RSBA13, RSBA14, RSBA17 y RSBA20 se encontraron a menos de 40 km de la población RSBA10, y la población RSBA19 se encontró en un campo muy cercano (< 5 km) a la población RSBA3 (Fig. I).

El nabón es una especie auto-incompatible de polinización cruzada obligada, generalmente polinizada por insectos (Snow y Campbell, 2005), y los alelos de resistencia a herbicidas AHAS son dominantes (Yu y Powles, 2014), por lo tanto, el flujo de genes entre poblaciones cercanas podría facilitar la propagación de nabón resistente a herbicidas AHAS (Neve *et al.*, 2014). En este área, las labores de siembra y cosecha se realizan mayormente con maquinaria contratada; en consecuencia, la utilización de los mismos equipos agrícolas en diferentes campos de la misma zona, podría haber facilitado la dispersión de las semillas de nabón resistente en los campos cercanos (Beckie, 2006). Adicionalmente, no se puede descartar la selección de la mutación Trp-574-Leu en diferentes poblaciones de nabón al mismo tiempo, como resultado de eventos convergentes e independientes. Por otro lado, la baja proporción de plantas resistentes a AHAS en la población de nabón RSBA11, ubicada en una banquina de ruta, podría atribuirse a la ausencia de selección por herbicidas, a un reciente evento de mutación y/o a un reciente flujo de genes desde plantas resistentes cercanas.

La inhibición de la actividad AHAS *in vitro* en el biotipo susceptible en respuesta a metsulfuron-metil e imazetapir fue >9000-veces más alta que en el biotipo resistente con la mutación Trp-574-Leu, lo que probablemente indica que la resistencia se debería a una reducida sensibilidad de la enzima AHAS a ambos herbicidas. Este valor no puede ser tomado como la concentración de herbicidas que inhibe la actividad AHAS *in vivo*, debido a que se desconoce la absorción, translocación y/o metabolismo del herbicida en la planta. Estos resultados son consistentes con los observados por Pandolfo *et al.*, (2016) para la misma población y herbicidas a nivel de planta entera, aunque los valores de factor de resistencia no son comparables debido a que no siempre están correlacionados (Ashigh y Tardif, 2007).

McCourt *et al.*, (2006) encontró que la mutación Trp-574-Leu en el gen que codifica para AHAS modifica la conformación del sitio de unión de los herbicidas, resultando en la pérdida de varias interacciones que conduce a una enzima altamente resistente a las cinco familias químicas de herbicidas AHAS. La mutación Trp-574-Leu fue encontrada responsable de la resistencia a AHAS en al menos 36 especies (Heap, 2019), y ellas mostraron niveles variables de resistencia *in vitro*. Massa *et al.*, (2011), Yu *et al.*, (2010) y Cross *et al.*, (2015) informaron niveles de resistencia > 8333, > 1333 y 10 para *Apera spica-venti*, *Lolium*

rigidum, y *Poa annua*, respectivamente, en respuesta a diferentes sulfonilureas, y Chen *et al.*, (2015) mostró un nivel de resistencia de 268 para *Amaranthus retroflexus* en respuesta a la imidazolinona imazetapir.

De las 36 especies resistentes a herbicidas AHAS debido a la mutación Trp-574-Leu (Heap, 2019), solo en unas pocas especies se han evaluado los efectos pleiotrópicos asociados (Vila-Aiub *et al.*, 2009). Los herbicidas AHAS no se unen al sitio activo sino cerca de él, inhibiendo la actividad de la enzima AHAS al bloquear el canal de acceso del sustrato al sitio activo (Duggleby *et al.*, 2008). Aunque las mutaciones en el sitio de acción de los herbicidas que confieren resistencia pueden no afectar la actividad de la enzima AHAS, la mutación Trp-574-Leu podría estar involucrada no solo en la unión herbicida-enzima, sino también en el mantenimiento de la actividad catalítica de la enzima, de manera que su conservación sería necesaria y costo de resistencia podría ser de otra manera esperado (Yu y Powles, 2014). En este estudio encontramos significativamente menor actividad AHAS *in vitro* en el biotipo resistente comprado con el susceptible. Esta información concuerda con resultados encontradas en el pariente silvestre *R. raphanistrum* (Li *et al.*, 2013), aunque en algunas especies los datos han sido opuestos (Yu *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015; Cross *et al.*, 2015), lo que lleva a la conclusión de que hay una interacción especie específica de esta mutación, mecanismo que aún no ha sido dilucidado (Yu y Powles, 2014).

La mutación Trp-574-Leu puede causar incremento, reducción o no modificar la actividad de la enzima AHAS en diferentes especies. La enzima AHAS está compuesta por una subunidad catalítica y una subunidad regulatoria, y esta última sin actividad AHAS en sí misma, estimula la actividad en la subunidad catalítica y confiere sensibilidad a la inhibición por retroalimentación de los aminoácidos de cadena ramificada (Duggleby *et al.*, 2008; Yu y Powles, 2014). Sin embargo, se desconocen los mecanismos reguladores de la funcionalidad de la enzima AHAS y como estos pueden variar para la misma mutación en diferentes especies de plantas (Yu y Powles, 2014). Además, se ha observado dificultad en aislar y mantener la actividad AHAS en plantas susceptibles y resistentes para muchas substituciones de aminoácidos que confieren resistencia (Yu *et al.*, 2010). Esto podría explicar la falta de diferencias en la actividad enzimática AHAS entre biotipos resistentes y susceptibles en varios experimentos.

La menor producción de aminoácidos de cadena ramificada debido a la menor actividad de la enzima AHAS en las plantas resistentes 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. La correlación entre la reducción en la actividad AHAS y los efectos pleiotrópicos a nivel de planta entera ha sido difícil de demostrar (Vila-

Aiub *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros resultados mostraron una asociación entre la menor actividad AHAS *in vitro* y el costo en la aptitud reproductiva. En este estudio, no encontramos diferencias en altura de planta, número de ramas, semillas por silicua y peso de las semillas entre biotipos resistentes y susceptibles de nabón. Sin embargo, el biotipo susceptible mostró mayor número de silicuas por planta que el biotipo resistente, lo que resultó en mayor número de semillas y rendimiento por planta en el biotipo susceptible comparado con el resistente. Un resultado similar fue encontrado en *Amaranthus powellii* con la mutación Trp-574-Leu (Tardif *et al.*, 2006).

La comparación de múltiples poblaciones resistentes y susceptibles fue la estrategia para abordar el efecto variable de los fondos genéticos sobre el costo de resistencia, pero debido a que solo se utilizaron dos poblaciones resistentes (Pandolfo *et al.*, 2016), estos resultados no deberían generalizarse. Por otro lado, no se encontraron efectos significativos de población dentro de biotipo (resistente y susceptible) (Tabla 2.2) para ningún rasgo, esto indicaría reducida variabilidad entre poblaciones dentro de cada biotipo (resistente y susceptible). La subpoblación resistente RSBA3 mostró significativamente menos aptitud que su contraparte RSBA3-S (Fig. 2.2). Esta última subpoblación se recolectó en el mismo campo que la subpoblación resistente RSBA3, sobre un borde del mismo lote sin aplicaciones de herbicidas, de tal forma que se podría asumir que ambas poblaciones tienen antecedentes genéticos similares (Vila-aiub *et al.*, 2015; Keshtkar *et al.*, 2019). Sin embargo, la posibilidad de que los efectos pleiotrópicos observados no sean causados por la mutación y solo sean correlacionados con ella, no puede ser completamente descartada.

El destino de una mutación adaptativa, por ejemplo la mutación Trp-574-Leu, podría depender principalmente de su frecuencia inicial en la población (Paris *et al.*, 2008). Sin embargo, su trayectoria evolutiva depende de un equilibrio entre el sistema reproductivo, la dominancia del alelo de resistencia, el costo de resistencia y las prácticas de manejo de los herbicidas (Roux y Reboud, 2007; Roux *et al.*, 2008). *R. sativus* es una especie autoincompatible de polinización cruzada obligada (Snow y Campbell, 2005) y el alelo de resistencia es dominante (Yu y Powles, 2014), dos características que incrementarían la frecuencia del alelo resistente en la población. Sin embargo, nuestro estudio en ausencia de interferencia interespecífica sugiere que la mutación Trp-574-Leu impone efectos pleiotrópicos negativos sobre los caracteres reproductivos de nabón, lo que podría actuar como contrabalance en la evolución de la resistencia (Roux *et al.*, 2008).

En especies de polinización cruzada, como el nabón, la presión de selección con herbicidas favorece la formación de homocigotas resistentes (Roux *et al.*, 2008). En concordancia con ello, las poblaciones con altos niveles de resistencia a metsulfuron-metil se hallaron en

áreas con alta presión de selección (RSBA3, RSBA10, RSBA13, RSBA14, RSBA17, RSBA19 y RSBA20). El costo biológico de la mutación que confiere resistencia encontrado en este estudio podría ocasionar la reducción de la frecuencia de los alelos resistentes en los ambientes sin presión de selección por herbicidas. En concordancia con lo expuesto previamente, las poblaciones con nulo o bajos niveles de resistencia se hallaron en ambientes sin selección por herbicidas como banquinas y bordes de los campos (RSLP2, RSBA1, RSBA2, RSBA3-S, RSBA7, RSBA11, RSBA12, y RSBA18).

El flujo de genes entre poblaciones resistentes y susceptibles podría modificar la dinámica de los alelos resistentes (Roux *et al.*, 2008). El flujo de genes desde las poblaciones con nulo/bajos niveles de resistencia, podría actuar como refugio, retrasando la evolución de la resistencia en poblaciones con altos niveles de selección por herbicidas. Sin embargo, cuando el flujo de genes ocurre en la dirección opuesta, resulta en incrementos en la frecuencia de resistencia en hábitats sin selección (Roux *et al.*, 2008). Este flujo de genes será mayor cuando las poblaciones se encuentren más cerca y desde poblaciones más grandes a más pequeñas (Roux y Reboud, 2007).

Bajo las condiciones de estudio, la mutación Trp-574-Leu que aporta resistencia genética a herbicidas AHAS causó efectos pleiotrópicos negativos sobre la actividad de la enzima AHAS y los caracteres reproductivos del nabón, rechazando la hipótesis planteada. Este costo en la aptitud podría reducir la frecuencia de los alelos resistentes en ambientes sin selección por herbicidas.

CAPÍTULO 3

Aptitud biológica de una población feral de *Raphanus sativus* (nabón) resistente a herbicidas AHAS: dormición, germinación y emergencia

INTRODUCCIÓN

El uso continuo y generalizado de herbicidas en los campos cultivados ha generado diferentes mecanismos de adaptación que le permitieron a las poblaciones de malezas, de al menos 258 especies, soportar las aplicaciones de herbicidas (Gressel, 2009; Heap, 2019). Los cambios evolutivos que confieren adaptación a un nuevo ambiente, por ejemplo la resistencia a herbicidas, pueden traer aparejados efectos pleiotrópicos negativos, también llamados costos de resistencia, sobre la aptitud de las poblaciones en ausencia del agente de selección (es decir, en el ambiente original). Estos costos pueden manifestarse en determinados estados del ciclo de vida y/o condiciones ambientales (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

La dormición y germinación de las semillas son atributos/procesos claves en el ciclo de vida de las plantas, que contribuyen al desarrollo de patrones de emergencia escalonados o dispersos y al crecimiento de las poblaciones (Baskin y Baskin, 2014), y solo 7–10 % de los estudios de aptitud evaluaron el costo biológico sobre estos eventos del ciclo de vida (Vila-Aiub *et al.*, 2009; Darmency *et al.*, 2017). Dependiendo de la especie, distintos genes/alelos de resistencia estuvieron asociados con retraso (Délye *et al.*, 2013; Van Etten *et al.*, 2016; Keshtkar *et al.*, 2017), aceleración (Dyer *et al.*, 1993; Eberlein *et al.*, 1999; Délye *et al.*, 2013), incremento (Ashigh y Tardif, 2011), reducción (Vila-Aiub *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2010) o ausencia de efecto (Délye *et al.*, 2013; Darmency *et al.*, 2015) sobre la germinación de las semillas y/o la emergencia de las plántulas. La modificación de la dormición, germinación y/o emergencia podría afectar las estrategias de manejo utilizadas para prevenir y/o controlar la evolución de las poblaciones de malezas resistentes a herbicidas (Darmency *et al.*, 2017).

El momento de germinación y emergencia puede tener grandes consecuencias sobre la aptitud de las plantas anuales, y en consecuencia, determinar el subsecuente comportamiento y el éxito o fracaso de una especie en un agroecosistema (Darmency *et al.*, 2017), y su expresión esta modulada por los factores ambientales (es decir, temperatura, humedad, luz/oscuridad, profundidad) y los aspectos fisiológicos de las semillas y/o sus coberturas (Baskin y Baskin, 2014). La temperatura es el principal factor ambiental que regula la dormición y germinación, y su efecto puede estar influenciado por el contenido de humedad del suelo, y por ende, por el momento y la cantidad de las precipitaciones (Footitt *et al.*, 2013). La luz es otro de los factores principales que puede afectar la dormición y

germinación en varias especies de malezas. Se ha sugerido que el control lumínico de la germinación desempeña un rol ecológico clave en condiciones de campo al determinar el lugar donde la germinación debería ocurrir (Batlla y Benech-Arnold, 2014) y su efecto puede interactuar con la temperatura causando variación en su respuesta (Heschel *et al.*, 2007). Finalmente, el sistema y la profundidad de labranza tienen efectos sobre la distribución vertical de las semillas y/o frutos en el suelo, y sus efectos sobre la emergencia de las plántulas es altamente dependiente de la especie de maleza en cuestión (Chauhan *et al.*, 2006b; Chauhan y Johnson, 2010).

Los herbicidas inhibidores de la enzima AHAS/ALS son ampliamente utilizados en los sistemas agrícolas de todo el mundo. El uso repetido y prolongado de estos herbicidas sumado al incremento en la adopción de los sistemas de labranza cero y las reducciones en las rotaciones de cultivos resultó en la evolución de la resistencia a herbicidas AHAS en al menos 162 especies de malezas en todo el mundo, principalmente debido a mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima AHAS (Tranel y Wright, 2002; Powles y Yu, 2010; Kraehmer *et al.*, 2014; Yu y Powles, 2014; Darmency *et al.*, 2017; Heap, 2019). Hasta el momento, se han identificado 29 sustituciones de aminoácidos que aportan resistencia a herbicidas AHAS, entre ellas se destaca la sustitución Trp-574-Leu como la mutación más comúnmente identificada en condiciones de campo (Yu y Powles, 2014; Heap, 2019).

Raphanus sativus feral (nabón) es una maleza invasora, problemática en zonas templadas de América, y poblaciones resistentes a herbicidas AHAS han sido informadas en Brasil, Chile y Argentina (Snow y Campbell, 2005; Theisen, 2008; Pandolfo *et al.*, 2016, 2018; Heap, 2019). En Argentina, las poblaciones de nabón resistentes a herbicidas AHAS cubren la mitad sur de la provincia de Buenos Aires (AAPRESID 2017, www.aapresid.org.ar/rem/mapas-rem/) y Pandolfo *et al.*, (2016) detectaron a la mutación Trp-574-Leu en dos de estas poblaciones. La falta de información de los efectos pleiotrópicos de la mutación Trp-574-Leu sobre la dormición, germinación y emergencia de nabón limita el desarrollo y la implementación de estrategias de manejo de las poblaciones resistentes (Darmency *et al.*, 2017; Cousens y Fournier-Level, 2018). Una mayor comprensión de los efectos de la resistencia a herbicidas sobre estos estados del ciclo de vida es esencial para predecir la evolución de la resistencia y también para desarrollar estrategias de manejo en contra de las poblaciones resistentes (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

La selección de individuos resistentes y susceptibles con similar fondo genético es crucial para la cuantificación de los posibles costos asociados con los genes/alelos de resistencia (Vila-Aiub *et al.*, 2009, 2011; Darmency *et al.*, 2017). Existe una diversa variedad de métodos para controlar los fondos genéticos (revisados en Vila-Aiub *et al.*, 2011), sin

embargo, cuando el objetivo de los estudios de aptitud es detectar diferencias entre individuos resistentes y susceptibles para desarrollar estrategias o programas de manejo de malezas basados en la resistencia, puede ser más apropiado, útil y rápido la selección de individuos resistentes y susceptibles homocigotas a partir de una única población (Keshtkar *et al.*, 2019).

Se hipotetizó que la mutación Trp-574-Leu que confiere resistencia a los herbicidas AHAS no afecta la germinación y emergencia de plántulas en poblaciones naturales de *R. sativus*. El objetivo del presente capítulo fue evaluar y la dormición, germinación y emergencia de semillas aisladas y silicuas intactas en individuos de *R. sativus* con y sin la mutación Trp-574-Leu provenientes de la misma población; y debido a que la expresión y magnitud de los costos de aptitud asociados con los alelos de resistencia pueden ser influenciados por los factores ambientales (Vila-Aiub *et al.*, 2009), los experimentos fueron realizados bajo condiciones contrastantes de temperatura, luz, agua y profundidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó una población de nabón colectada en la primavera de 2008 en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, cercano a la localidad de Balcarce (37° 35' 25" S 58° 31' 59" O) (Pandolfo *et al.*, 2013), previamente caracterizada por Pandolfo *et al.*, (2016). Individuos resistentes a herbicidas AHAS con la mutación Trp-574-Leu fueron colectados en un lote de colza resistente a imidazolinonas (Clearfield® o CL) sobrevivientes a la aplicación de imazetapir (RSBA3), y sus contrapartes susceptibles se colectaron en el margen del lote del mismo campo (sobre un borde sin aplicaciones de herbicidas) donde se encontraron los individuos resistentes (RSBA3-S) (Pandolfo *et al.*, 2013). El nabón es una especie de polinización cruzada obligada, mayormente polinizada por insectos, por lo tanto, se puede asumir que la variación genética entre RSBA3 y RSBA3-S es relativamente baja (Vila-Aiub *et al.*, 2011; Keshtkar *et al.*, 2019).

Generación de biotipos y control del efecto ambiental

Se generó una subpoblación homocigota con la mutación Trp-574-Leu (RSBA3-R) a partir de RSBA3 al seleccionar 15 plantas homocigotas resistentes utilizando un marcador CAPS específico y siguiendo los procedimientos descritos por Pandolfo *et al.*, (2016). Con la finalidad de incrementar la cantidad de semillas y minimizar los efectos maternos y ambientales, al menos 15 plántulas de cada biotipo (resistente y susceptible) se utilizaron para producir una nueva generación en el mismo ambiente (campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Argentina, 38° 41' 38" S, 62° 14' 53" O). Con la finalidad de prevenir la contaminación por polen de los biotipos, cada uno de ellos se aisló en carpas individuales construidas con una malla antiáfido; dentro de las mismas, la polinización cruzada fue realizada mediante el agregado de núcleos de abejas (*Apis mellifera*). Al finalizar la estación de crecimiento, las silicuas maduras se recolectaron, y las semillas de una porción de estas silicuas fueron extraídas manualmente o utilizando un mortero. Tanto las semillas separadas como las silicuas intactas se almacenaron en bolsas de papel madera a temperatura ambiente hasta el comienzo de los experimentos.

La subpoblación RSBA3-R se consideró el biotipo resistente (R), mientras que la RSBA3-S se consideró como biotipo susceptible (S).

Efectos del almacenamiento en seco, la temperatura y la luz sobre la germinación

Con la finalidad de evaluar si la dormición y la germinación pueden ser afectadas por la mutación Trp-574-Leu, se examinó la germinación de semillas aisladas y semillas dentro de

silicuas intactas (silicuas intactas) de los biotipos resistente y susceptible almacenadas en condiciones de laboratorio por 0 (recién cosechados), 2, 6 y 12 meses, a tres regímenes de temperatura alternos (14/4, 21/9 y 28/14 °C) en condiciones de luz/oscuridad (12/12 h) o en oscuridad constante durante 15 días siguiendo los procedimientos del Capítulo 1. Al finalizar el experimento, se calculó la proporción de semillas germinadas como una relación entre el total de semillas germinadas al finalizar el experimento (15 días) y el total de semillas viables. El experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar.

Efecto de la profundidad sobre la emergencia de las plántulas

Con la finalidad de evaluar el efecto de la mutación Trp-574-Leu sobre la emergencia de las plántulas de nabón a partir de profundidades crecientes, se sembraron semillas aisladas y silicuas intactas de los biotipos resistente y susceptible a 0, 1, 4, 8, 12 y 16 cm de profundidad de suelo dos meses después de la cosecha de los frutos. Para ello, se sembraron seis réplicas de veinticinco semillas aisladas o cinco silicuas intactas por cada biotipo y profundidad en macetas plásticas (18 cm de diámetro y 24 cm de alto) rellenas con un suelo arenoso-franco con 1,1 % de materia orgánica y pH 7,7 (suelo típico en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires). Las macetas se colocaron en un invernáculo a 20 – 25 °C en condiciones de luz natural y se mantuvieron húmedas mediante riego automático diario. Las plántulas emergidas fueron contadas y removidas periódicamente (a intervalos de 3–4 días) durante 85 días. Para cada tratamiento, la proporción de plántulas emergidas se calculó como la relación entre el total de plántulas emergidas al finalizar el experimento y el total de semillas sembradas. Para determinar el porcentaje de emergencia a partir de silicuas intactas, se trillaron seis réplicas de diez silicuas de cada biotipo, se contaron sus semillas y se promediaron para usarlas como control. El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado.

Patrón de emergencia de plántulas

Se realizó un experimento en macetas a la intemperie para investigar el efecto de la mutación Trp-574-Leu sobre el patrón de emergencia de las plántulas a partir de semillas aisladas y silicuas intactas, a temperatura ambiente, bajo dos condiciones hídricas contrastantes (con y sin riego). El 6 de febrero de 2018 (un mes luego de la cosecha) se sembraron 50 semillas aisladas o 10 silicuas intactas de los biotipos resistente y susceptible a 0,5 cm de profundidad en macetas plásticas de 10 litros rellenas con el mismo suelo utilizado para el experimento anterior. Se establecieron seis macetas por tratamiento [dos tratamientos de pericarpio x dos biotipos x dos condiciones hídricas (regado y sin riego)]. En el tratamiento con riego, el suelo se regó hasta capacidad de campo cada 3 – 4 días a través de todo el experimento, mientras que en el tratamiento sin riego el agua fue provista

mediante las precipitaciones. La emergencia de las plántulas se monitoreó a intervalos de 7 días desde el inicio del experimento hasta el 6 de febrero de 2019 (un año). Los datos de las temperaturas mínimas y máximas y de las precipitaciones se obtuvieron de una estación meteorológica (Davis Vantage Pro 2) ubicada en el CCT-Bahía Blanca (CERZOS-CONICET) (38° 39' 60" S, 62° 13' 58" W) (Figura 3.1). Para cada tratamiento, la proporción de plántulas emergidas se calculó como se indicó para el experimento anterior. El experimento se realizó con un diseño completamente aleatorizado.

Análisis estadístico

Los datos de germinación y emergencia se analizaron usando modelos lineales generalizados (GLM) basados en la estimación de máxima verosimilitud restringida (REML) con PROC GLIMMIX (SAS University Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para el experimento '*Efecto del almacenamiento en seco, la temperatura y la luz sobre la germinación*', se ajustó un modelo binomial con función de enlace *logit* y la germinación como variable de respuesta (semilla germinada y semilla no germinada). El modelo incluyó cinco efectos fijos: luz, tiempo de almacenamiento en seco, temperatura, pericarpio (semillas aisladas y silicuas intactas) y biotipo (R y S), y todas sus interacciones.

Debido a la distribución no-normal de los datos de proporción de la emergencia, se ajustaron dos modelos usando la distribución Beta (Bolker *et al.*, 2009). Para el experimento '*Efecto de la profundidad sobre la emergencia de las plántulas*', el modelo incluyó tres efectos fijos: pericarpio, profundidad y biotipo, y todas sus interacciones. Para el experimento '*Patrón de emergencia de plántulas*', se evaluaron los datos de emergencia en cinco momentos posteriores al comienzo del experimento (1, 3, 6, 9 y 12 meses) y para cada uno de ellos el modelo incluyó tres efectos fijos: condición hídrica (con o sin riego), pericarpio y biotipo, y todas sus interacciones. Se compararon las medias mediante el test de Tukey-Kramer para determinar diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre biotipos (R y S) en cada tratamiento.

RESULTADOS

Efectos del almacenamiento en seco, la temperatura y la luz sobre la germinación

El análisis de la germinación durante el almacenamiento en seco reveló efectos significativos de luz, pericarpio, temperatura, biotipo y de la interacción luz por pericarpio (Tabla 3.1). Sin embargo, el efecto tiempo de almacenamiento, la interacción quintuple, las interacciones cuádruples, las interacciones triples y el resto de las interacciones dobles no fueron significativas (Tabla 3.1). En condiciones de luz, el biotipo resistente mostró mayor germinación de semillas, tanto aisladas como dentro de las silicuas, que el biotipo susceptible, a través de todo el experimento (Fig. 3.1A y 3.2A). Sin embargo, estas diferencias entre biotipos no se detectaron a bajas temperaturas (4/14 °C), ni en la germinación de las semillas, tanto aisladas como dentro de las silicuas, en condiciones de oscuridad constante (Fig. 3.1 y 3.2).

Efecto de la profundidad sobre la emergencia de las plántulas

El análisis de la emergencia final de las plántulas reveló efectos significativos en la interacción triple ($F_{5;120} = 2.58$; $P = 0.0299$), por lo tanto, las diferencias en la emergencia entre los biotipos resistente y susceptible se compararon para cada profundidad y tratamiento de pericarpio. El biotipo S mostró 44 % menor germinación que el R (14 vs. 25 %, respectivamente) en las semillas aisladas colocadas sobre la superficie del suelo ($F_{1;10} = 8.73$; $P = 0.0144$) (Fig. 3.3A), y menos del 1 % de las semillas dentro de las silicuas germinaron sobre la superficie del suelo en ambos biotipos (Fig. 3.3A). La emergencia de plántulas se redujo considerablemente al aumentar la profundidad, y la emergencia desde semillas aisladas fue mayor que desde las silicuas intactas para ambos biotipos en todas las profundidades evaluadas (Fig. 3.3), excepto a 16 cm donde la emergencia fue menor al 1% en todos los tratamientos (Fig. 3.3). No se encontraron diferencias significativas entre biotipos en la emergencia de plántulas hasta 16 cm de profundidad, excepto cuando las semillas aisladas se enterraron a 4 cm donde el biotipo resistente mostró 11 % (86 vs. 96 %) menor emergencia que el biotipo susceptible ($F_{1;10} = 26.41$; $P = 0.0004$) (Fig. 3.3C).

Tabla 3.1. GLM para la germinación de semillas aisladas y silicuas intactas bajo dos condiciones de luz [luz/oscuridad (12/12 h) y oscuridad constante], tres temperaturas alternas (4/14, 9/21 y 14/28 °C), cuatro momentos de almacenamiento en seco (0, 2, 6, y 12 meses) y dos biotipos (resistente y susceptible) de *Raphanus sativus* (nabón), y todas sus interacciones. Los efectos significativos ($P \leq 0,05$) están indicados en negrita. *Numerador y denominador de los grados de libertad de cada efecto.

Efectos	g.l.*	F	P
Luz (L)	1/288	102,68	<,0001
Pericarpio (P)	1/288	77,57	<,0001
Temperatura (Te)	2/288	31,05	<,0001
Biotipo (B)	1/288	6,70	0,0101
Tiempo (Ti)	3/288	1,93	0,1354
L x P	1/288	23,97	<,0001
L x Te	2/288	1,74	0,1775
L x B	1/288	1,96	0,1629
L x Ti	3/288	0,11	0,9550
P x Te	2/288	1,19	0,3072
P x B	1/288	0,02	0,8842
P x Ti	3/288	1,12	0,3423
Te x B	2/288	0,06	0,9412
Te x Ti	6/288	1,31	0,2542
B x Ti	3/288	0,10	0,9611
L x P x Te	2/288	0,80	0,4515
L x P x B	1/288	0,00	0,9502
L x P x Ti	3/288	0,30	0,8249
L x Te x B	2/288	0,26	0,7675
L x Te x Ti	6/288	1,14	0,3364
L x B x Ti	3/288	0,35	0,7884
P x Te x B	2/288	0,26	0,7733
P x Te x Ti	6/288	0,18	0,9833
P x B x Ti	3/288	0,56	0,6444
Te x B x Ti	6/288	0,14	0,9901
L x P x Te x B	2/288	1,36	0,2580
L x P x Te x Ti	6/288	0,35	0,9076
L x P x B x Ti	3/288	0,09	0,9644
L x Te x B x Ti	6/288	0,17	0,9839
P x Te x B x Ti	6/288	0,47	0,8270
L x P x Te x B x Ti	6/288	0,89	0,5003

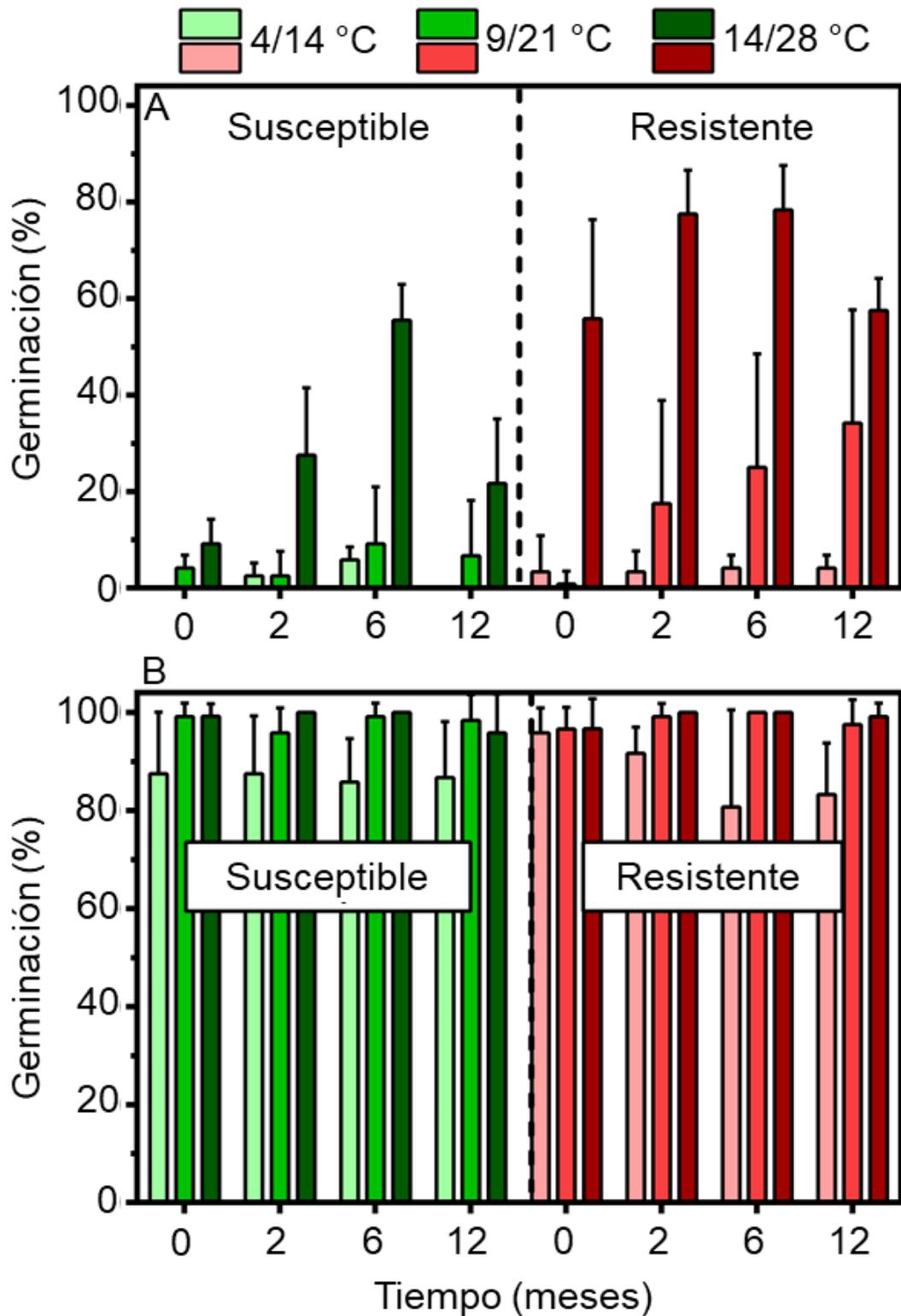


Figura 3.1. Germinación acumulada (media \pm 95 % de intervalo de confianza) de semillas aisladas de dos biotipos (resistente y susceptible) de *Raphanus sativus* (nabón) incubadas en condiciones de (A) luz/oscuridad (12/12 h) y (B) oscuridad constante, a tres temperaturas alternas (4/14, 9/21 y 14/28 °C) y cuatro momentos de almacenamiento en seco (0, 2, 6, y 12 meses).

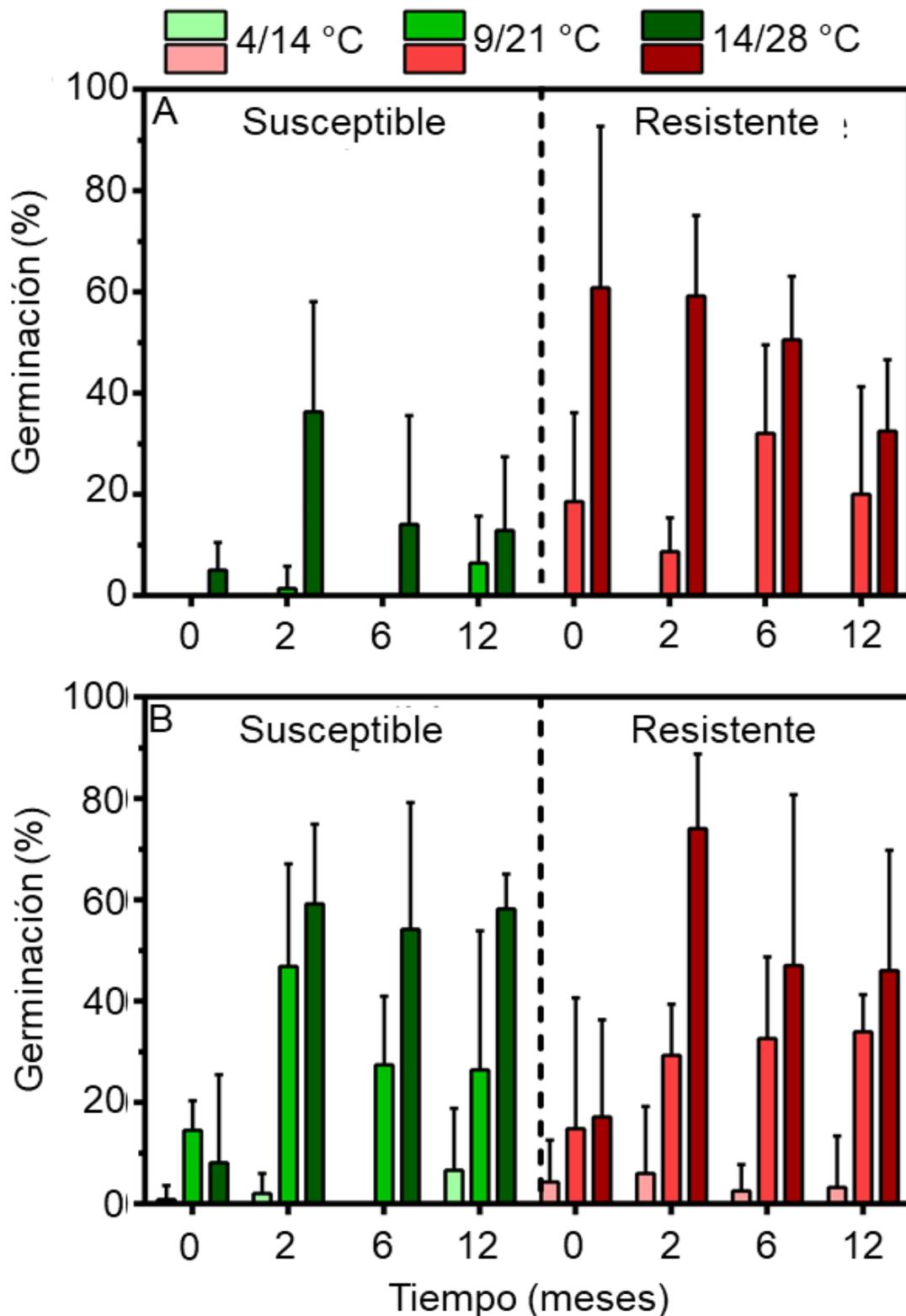


Figura 3.2. Germinación acumulada (media \pm 95 % de intervalo de confianza) de semillas dentro de silicuas intactas de dos biotipos (resistente y susceptible) de *Raphanus sativus* (nabón) incubadas en condiciones de (A) luz/oscuridad (12/12 h) y (B) oscuridad constante, a tres temperaturas alternas (4/14, 9/21 y 14/28 °C) y cuatro momentos de almacenamiento en seco (0, 2, 6, y 12 meses).

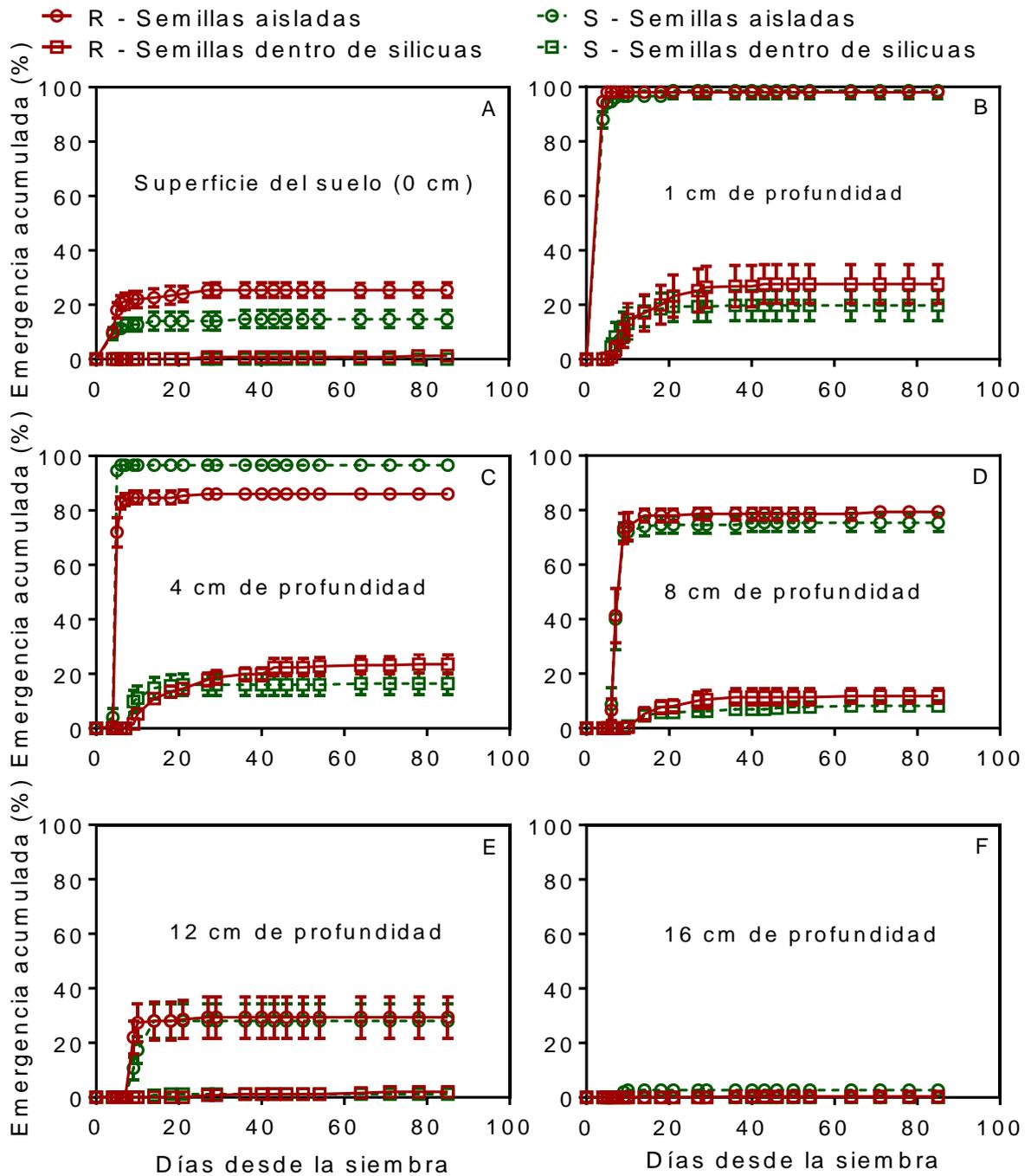


Figura 3.3. Dinámica de emergencia acumulada de plántulas de dos biotipos [resistente (R) y susceptible (S)] de *Raphanus sativus* (nabón) a partir de semillas aisladas y semillas dentro de silicuas intactas enterradas a 0 (A), 1 (B), 4 (C), 8 (D), 12 (E) y 16 (F) cm de profundidad de suelo. Las barras verticales indican los valores medios ± 1 SE.

Patrón de emergencia de plántulas

La precipitación anual fue de 592 mm, repartidas de la siguiente manera: aproximadamente 25 % en otoño (152 mm), 11 % en invierno (65 mm), 39 % en primavera (229 mm) y el 25 % restante en verano, dividido con 89 mm entre 6 de febrero y 20 de marzo de 2018, y 58 mm entre 21 de diciembre de 2018 y 6 de febrero de 2019, respectivamente (Fig. 3.4).

El análisis de la emergencia de plántulas reveló efectos significativos en las interacciones entre condición hídrica y pericarpio y entre condición hídrica y biotipo durante todo el período de estudio, por lo tanto, la emergencia de plántulas desde semillas aisladas y silicuas intactas fue comparada entre los biotipos R y S para cada momento y condición hídrica (Tabla 3.2). En estos nuevos análisis, no se encontró efecto en la interacción entre biotipo y pericarpio para ningún momento y condición hídrica (Tabla 3.2). La presencia del pericarpio redujo fuertemente la emergencia de plántulas en ambas condiciones hídricas y biotipos (Tabla 3.2 y Fig. 3.5). El riego incrementó la emergencia final de plántulas cuando las semillas estuvieron dentro de las silicuas intactas, mientras que no afectó la emergencia final a partir de semillas aisladas (Fig. 3.5).

Bajo condiciones de riego, emergieron aproximadamente el 90 % de las plántulas desde semillas aisladas y tan solo entre 40 – 45 % a partir de silicuas intactas durante el primer mes de experimento sin diferencias significativas entre biotipos (Fig. 3.5A). La emergencia de plántulas a partir de silicuas intactas superó 50 % en los primeros tres meses de experimento (hasta principios de mayo) y aumentó 25 % adicional entre fines de invierno y primavera sin diferencias entre biotipos (Fig. 3.5A). Al finalizar el experimento, más de 90 % de plántulas a partir de semillas aisladas y 75 % desde silicuas intactas habían emergido sin diferencias entre biotipos (Fig. 3.5A).

Bajo condiciones de secano, el biotipo R mostró 13 % (76 vs. 87 %) y 76 % (4 vs. 17 %) menor emergencia que el biotipo S a partir de semillas aisladas y silicuas intactas, respectivamente, durante el primer mes del experimento (Fig. 3.5B). En los tratamientos de semillas aisladas, el biotipo R mostró 6 % de emergencia adicional en septiembre (primavera) (Fig. 3.5B). En los tratamientos de silicuas intactas, los biotipos R y S mostraron emergencia de 16 y 20 % de plántulas entre mediados de marzo y mediado de junio, y 28 y 20 % entre principios de agosto y finales de octubre, respectivamente (Fig. 3B). Al finalizar el experimento, el biotipo R mostró 7 % (85 vs. 91 %) y 15 % (50 vs. 59 %) menor emergencia de plántulas a partir de semillas aisladas y silicuas intactas, respectivamente, respecto al biotipo S (Tabla 3.2 y Fig. 3.5).

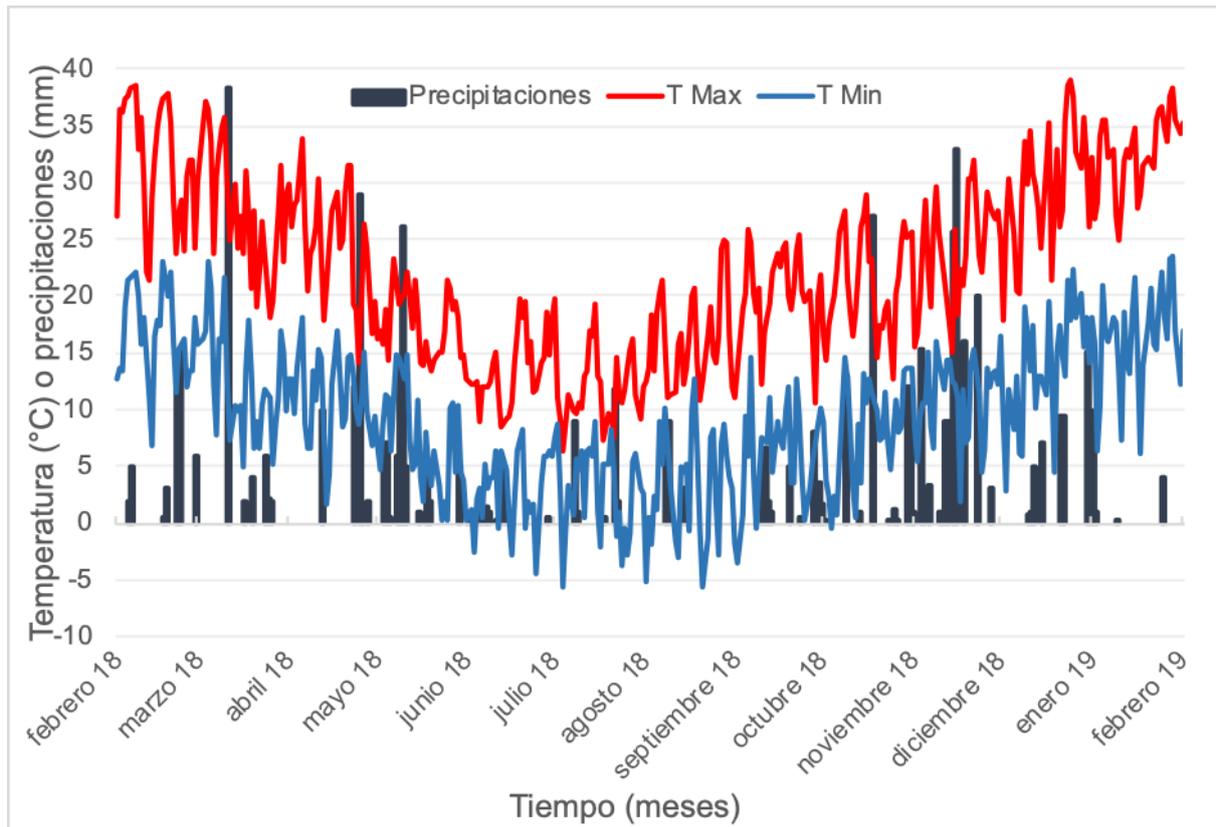


Figura. 3.4. Temperaturas mínimas y máximas del aire (°C) y precipitaciones (mm) diarias del área donde se desarrolló el experimento desde febrero de 2018 hasta febrero de 2019.

Tabla 3.2. ANOVA para la emergencia de plántulas en condiciones de campo bajo dos condiciones hídricas (con y sin riego), a partir de semillas aisladas y semillas dentro de silicuas intactas (pericarpio), dos biotipos (resistente y susceptible) de *Raphanus sativus* (nabón) y su interacción. Los efectos se evaluaron en cinco momentos desde el inicio hasta el final del experimento (1, 3, 6, 9 y 12 meses), y los efectos significativos ($P \leq 0,05$) están indicados en negrita. *Numerador, denominador de los grados de libertad de cada efecto.

Efectos	g.l.*	1-mes		3-meses		6- meses		9- meses		12-meses	
		F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Con riego											
Biotipo (B)	1/20	3,89	0,06	0,94	0,34	0,50	0,49	3,50	0,08	1,25	0,28
Pericarpio (P)	1/20	234,77	<0,0001	127,82	<0,0001	101,44	<0,0001	73,91	<0,0001	35,86	<0,0001
B x P	1/20	0,32	0,58	0,54	0,47	1,14	0,30	0,05	0,83	0,18	0,68
Sin riego											
Biotipo (B)	1/20	15,93	0,0008	23,16	0,0001	17,44	0,0005	6,20	0,0217	6,19	0,0218
Pericarpio (P)	1/20	199,51	<0,0001	121,31	<0,0001	92,44	<0,0001	38,12	<0,0001	38,18	<0,0001
B x P	1/20	0,33	0,57	0,88	0,36	1,58	0,22	1,17	0,29	1,34	0,26

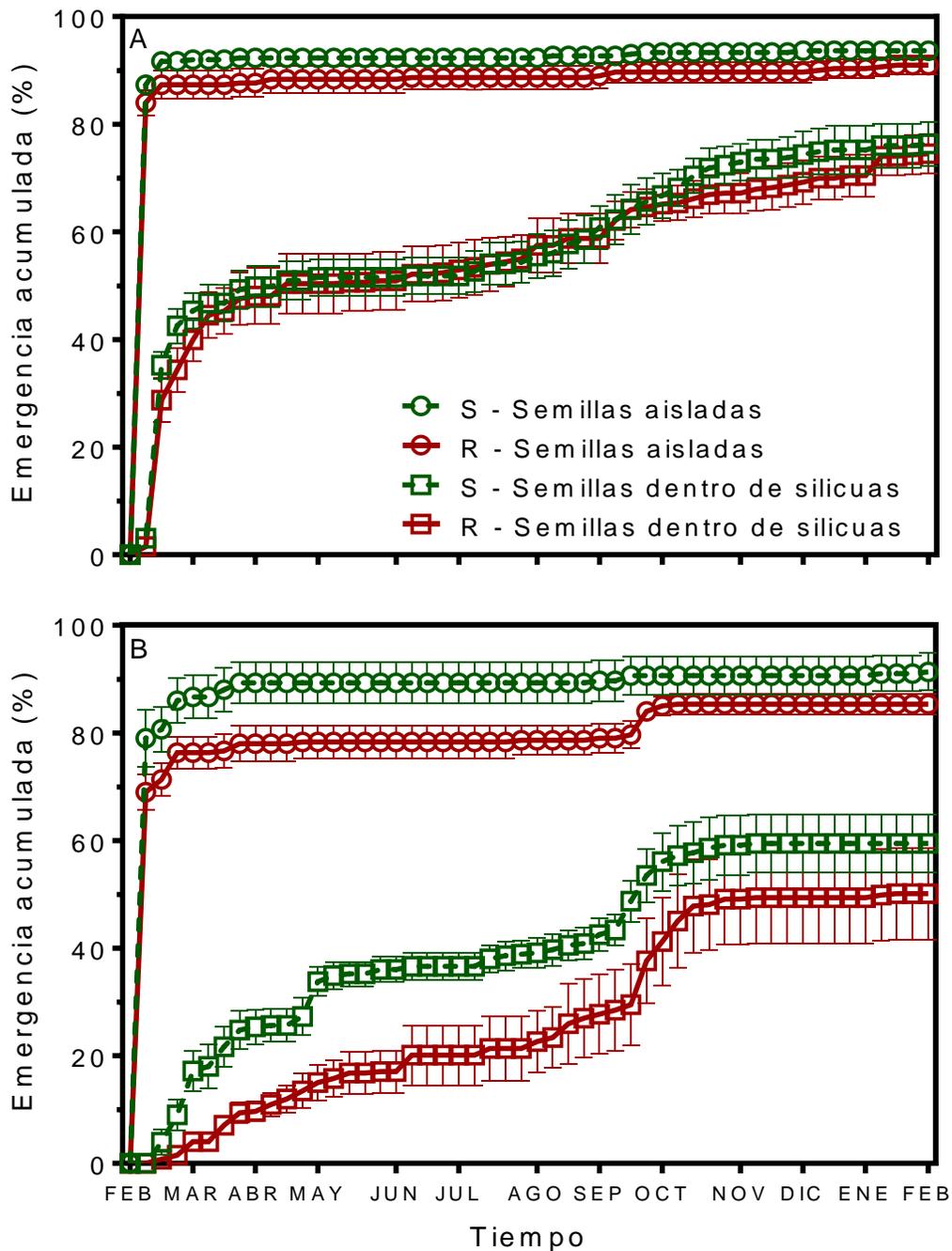


Figura 3.5. Dinámica de emergencia acumulada de plántulas de dos biotipos (resistente y susceptible) de *Raphanus sativus* (nabón) a partir de semillas aisladas y semillas dentro de silicuas intactas enterradas a 0,5 cm de profundidad bajo dos condiciones hídricas [con (A) y sin (B) riego], durante un año (6 de febrero de 2018 a 6 de febrero de 2019). Las barras verticales indican los valores medios ± 1 SE.

DISCUSIÓN

Los resultados revelaron diferencias significativas en la germinación y emergencia entre individuos resistentes y susceptibles de nabón provenientes de la misma población, y estos efectos parecen modificarse con el ambiente. El biotipo resistente mostró mayor germinación en semillas y silicuas expuestas a la luz a temperaturas medias y altas (Fig. 3.1 y 3.2) y mayor germinación de semillas colocadas sobre la superficie del suelo respecto al biotipo susceptible (Fig. 3.3 A). Por el contrario, no se encontraron mayores diferencias entre biotipos en la germinación en condiciones de oscuridad (Fig. 3.1 y 3.2), ni en la emergencia a partir de semillas y silicuas enterradas (Fig. 3.3). En condiciones de secano, el biotipo resistente mostró retraso y reducción final en la emergencia de plántulas (Fig. 3.5 B), pero estas diferencias no fueron detectadas en el ambiente con alta disponibilidad hídrica (Fig. 3.5 A).

En el Capítulo 1 se demostró que las semillas de nabón no poseen dormición primaria, pero que la germinación se redujo por la presencia del pericarpio y la exposición a la luz, especialmente a bajas temperaturas, como también se observó en el presente capítulo. La exposición a la luz mostró efectos diferenciales entre biotipos. La luz redujo mayormente la germinación de las semillas, tanto aisladas como dentro de las silicuas, en el biotipo susceptible respecto al resistente a temperaturas medias y altas (Fig. 3.1 y 3.2). Análogamente, la germinación de las semillas aisladas colocadas sobre la superficie del suelo fue mayor en el biotipo resistente comparado con el susceptible (Fig. 3.3A). Ello podría resultar en mayor germinación en el biotipo resistente respecto al susceptible bajo exposición a la luz, “escenario que podría asemejarse a labranza cero”, ampliamente utilizados en Argentina (>90 % de la superficie), en aquellas condiciones en que las semillas de nabón quedan expuestas sobre la superficie del suelo (por ejemplo, luego de la escarificación de las silicuas por el sistema de trilla de las cosechadoras). De ser así, podría representar en una ventaja para el biotipo resistente en ambientes húmedos que permiten el establecimiento de las plántulas, pero en una desventaja en ambientes secos donde las plántulas pueden morir debido a las condiciones de extrema sequía que es probable que ocurran sobre la superficie del suelo (Batlla y Benech-Arnold, 2014). Las semillas de nabón dentro de las silicuas intactas colocadas sobre la superficie del suelo germinaron menos de 2% en ambos biotipos al menos hasta 5 meses posteriores al inicio del experimento (datos no mostrados), sugiriendo la ausencia de imbibición de las semillas o el posible desarrollo de dormición secundaria (Baskin y Baskin, 2014).

La emergencia de las semillas es el resultado de los procesos de germinación y elongación del hipocótilo (Forcella *et al.*, 2000). En nabón, la emergencia se redujo al incrementar la

profundidad de siembra y este efecto fue mayor cuando las semillas estuvieron dentro de las silicuas intactas (Fig. 3.3). Sin embargo, la germinación en condiciones de oscuridad y la emergencia a partir de semillas aisladas y silicuas intactas enterradas hasta 16 cm no mostraron efectos diferenciales entre los biotipos, excepto en las semillas aisladas enterradas a 4 cm (Fig. 3.1, 3.2 y 3.3). Este último resultado debe ser considerado cuidadosamente debido a que la germinación supero el 85 % en ambos biotipos. La condición de oscuridad generada por entierro hasta 12 cm y la liberación de las semillas de las silicuas provocadas por la ruptura del pericarpio durante las labores de siembra o labranza (Chauhan *et al.*, 2006a; Reeves *et al.*, 1981), “escenario que podría asemejarse a labranza convencional”, promoverían la germinación del nabón (Fig. 1.2, 3.2 y 3.2), y bajo estas condiciones, no habría diferencias en la emergencia entre los individuos susceptibles y resistentes dentro de una población. En consecuencia, sería interesante evaluar la dinámica de emergencia en condiciones de campo bajo sistemas de labranza contrastantes (labranza cero y labranza convencional) para comprobar nuestras inferencias.

La emergencia de plántulas en la intemperie a partir de semillas aisladas ocurrió principalmente al inicio del experimento en ambas condiciones hídricas y biotipos, en concordancia con resultados previos que evidenciaron la ausencia de dormición primaria en las semillas de nabón (Fig. 1.2, 3.1B y 3.5). Por otro lado, la presencia del pericarpio redujo y prolongó la emergencia en ambas condiciones hídricas y biotipos (Fig. 3.5), como fue sugerido en la discusión del Capítulo 1. La emergencia de plántulas a partir de silicuas intactas estuvo principalmente concentrada en otoño y primavera en ambas condiciones hídricas y biotipos (Fig. 3.5); sin embargo, la menor disponibilidad hídrica asociada a la ausencia de riego prolongó y redujo la emergencia de plántulas (Fig. 3.4). La elevada humedad podría haber reducido la resistencia mecánica impuesta por el pericarpio mediante el ablandamiento por el agua y/o la degradación fúngica de los tejidos del fruto (Sperber *et al.*, 2017; Steinbrecher y Leubner-Metzger, 2017).

El patrón de emergencia de plántulas fue similar entre individuos resistentes y susceptibles en el ambiente con alta disponibilidad hídrica (Fig. 3.5A). Sin embargo, el biotipo resistente mostró retraso y reducción en la emergencia final de plántulas respecto al susceptible en seco (Fig. 3.5B). Se ha sugerido que la selección de cohortes de germinación tardía está asociada a la resistencia a herbicidas (Ghersa *et al.*, 1994; Owen *et al.*, 2011; Délye *et al.*, 2013; Darmency *et al.*, 2017), y aunque las bases genéticas o fisiológicas de esta emergencia tardía son desconocidas, podría estar vinculada al incremento o desarrollo de dormición secundaria (Baskin y Baskin, 2014; Darmency *et al.*, 2017).

Cuando las semillas estuvieron dentro de las silicuas intactas, alrededor del 25 % en ambos biotipos en los ambientes de alta disponibilidad hídrica, y aproximadamente 40 y 50 % en el biotipo susceptible y resistente en seco, respectivamente, permanecieron en el banco de semillas del suelo sin germinar o muertas después de un año (Fig. 3.5). Por lo tanto, sería interesante realizar experimentos para evaluar la duración del banco de semillas y si existen efectos diferenciales entre los biotipos con la finalidad de contribuir al manejo de las poblaciones resistentes.

La comparación entre individuos homocigotas con la mutación de resistencia a AHAS Trp-574-Leu e individuos homocigotas tipo silvestre provenientes de una única población fue la estrategia utilizada para reducir el efecto del fondo genético. Debido a que la subpoblación de individuos susceptibles era mucho más grande que la de individuos resistentes (Capítulo 2, Tabla 2.1), estos últimos podrían contener una menor proporción de la variabilidad genética que los susceptibles, por lo tanto los efectos observados en este estudio podrían estar influenciados por una pérdida de diversidad genética. Sin embargo, en especies de polinización cruzada obligada se podría asumir que el fondo genético entre los individuos resistentes y susceptibles dentro de una población es similar (Vila-Aiub *et al.*, 2011; Vila-aiub *et al.*, 2015), y solo cinco-diez plantas son suficientes para hacer una muestra representativa en estas circunstancias (Burgos *et al.*, 2013). Por otro lado, el tipo de hábitat (agrestal vs. ruderal), al proporcionar un ambiente diferente, puede provocar en las malezas el desarrollo de patrones fenológicos que optimicen la supervivencia dentro de esos ambientes (Barrett, 1983; Gage *et al.*, 2015). En consecuencia, los resultados encontrados en este estudio podrían haber surgido a partir de la selección provocada por las prácticas agrícolas (por ejemplo, interferencia con cultivos, aplicaciones de herbicidas, fertilización, operaciones de siembra y cosecha) independientemente de la evolución de la resistencia a herbicidas (revisado en Darmency *et al.*, 2017).

Además, la alta presión de selección asociada a las aplicaciones de herbicidas podría haber seleccionado para el incremento en la dormición y retraso en la emergencia, y posteriormente, la resistencia a herbicidas AHAS podría haber evolucionado a partir de semillas producidas por las cohortes de emergencia tardía (Mortimer, 1997; Darmency *et al.*, 2017). Sin embargo, se podría esperar la evolución conjunta en el momento de emergencia y la resistencia a herbicidas AHAS si la mutación Trp-574-Leu impone efectos pleiotrópicos directos sobre la dormición (Darmency *et al.*, 2017). Finalmente, la posibilidad de que los efectos pleiotrópicos observados

no sean causados por la mutación Trp-574-Leu, y solo sean correlacionados con ella no puede ser descartada.

La hipótesis inicialmente planteada fue rechazada debido a que los resultados presentados en este estudio revelaron diferencias significativas en la germinación y emergencia entre los individuos resistentes y susceptibles, y los efectos parecen modificarse con el ambiente. El biotipo resistente mostró mayor germinación en las semillas y silicuas expuestas a la luz a temperaturas medias y altas, y mayor germinación en las semillas colocadas sobre la superficie del suelo respecto al biotipo susceptible. Esto podría provocar mayor germinación en el biotipo resistente en los sistemas agrícolas de labranza cero, en aquellas condiciones en que las semillas quedan expuestas sobre la superficie. Sin embargo, este efecto podría estar influenciado por el ambiente de selección (ruderal vs. agrestal). Por otro lado, no se encontraron diferencias entre biotipos en la germinación y emergencia a partir de semillas y silicuas enterradas. En condiciones de secano, el biotipo resistente mostró retraso y reducción final en la emergencia de plántulas, mientras que no habría diferencias entre los biotipos en la emergencia de plántulas en ambientes con alta disponibilidad hídrica. La información obtenida en este estudio junto con la del Capítulo 1 podría ser incorporada en modelos que simulen la emergencia de plántulas y la evolución de la resistencia a herbicidas para diseñar estrategias de manejo para prevenir o retrasar la dispersión/propagación de los alelos resistentes, minimizar las pérdidas de los cultivos y reducir el aporte al banco de semillas, principalmente en el biotipo resistente. Futuros experimentos deberían realizarse sobre una amplia gama de fondos genéticos con la finalidad de generalizar los resultados. También debería evaluarse el comportamiento de las silicuas en la superficie del suelo (labranza cero) y el posible rol de la dormición secundaria.

CAPÍTULO 4

Aptitud biológica de una población feral de *Raphanus sativus* (nabón) resistente a herbicidas AHAS: biología vegetativa y reproductiva

INTRODUCCIÓN

El excesivo y generalizado empleo de herbicidas en los suelos agrícolas ha favorecido la selección de diferentes mecanismos de resistencia. Ellos han posibilitado que las poblaciones de más de 258 especies de malezas puedan soportar aplicaciones comerciales de herbicidas (Heap, 2019). La evolución de la resistencia a herbicidas puede traer aparejado efectos pleiotrópicos negativos, también llamados costos de resistencia, sobre la aptitud de las poblaciones de malezas en ambientes sin presión de selección (Bergelson y Purrington, 1996; Vila-Aiub *et al.*, 2009). La comprensión de los costos biológicos es esencial para predecir la evolución de la resistencia y desarrollar estrategias de manejo en contra de las poblaciones resistentes (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

Los herbicidas inhibidores de AHAS/ALS son ampliamente utilizados en los ambientes agrícolas de todo el mundo. El uso repetido y generalizado de estos herbicidas, sumado al incremento en la superficie de los sistemas de labranza cero y la reducción en las rotaciones de cultivos ha resultado en el desarrollo de resistencia a herbicidas AHAS en al menos 162 especies de malezas (Duggleby *et al.*, 2008; Yu y Powles, 2014; Darmency *et al.*, 2017; Heap, 2019), debido principalmente a mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima AHAS (Powles y Yu, 2010; Yu y Powles, 2014; Heap, 2019). Hasta el momento, se han identificado 29 sustituciones de aminoácidos en ocho posiciones del gen AHAS que confieren resistencia a herbicidas, apareciendo en mayor frecuencia la mutación Trp-574-Leu en condiciones de campo (Yu y Powles, 2014; Heap, 2019). Sin embargo, los costos biológicos asociados a las mutaciones de resistencia a AHAS han sido evaluados en un número limitado de casos.

La expresión de los costos de resistencia a inhibidores AHAS parece ser variable, dependiendo de la mutación específica responsable de la resistencia y la especie de maleza (Vila-Aiub *et al.*, 2009; Vila-aiub *et al.*, 2015). *Raphanus raphanistrum*, *Lolium rigidum* y *Kochia scoparia* con cuatro (Ala-122-Tyr, Pro-197-Ser, Asp-376-Glu y Trp-574-Leu), tres (Asp-376-Glu, Pro-197-Ser y Trp-574-Leu) y dos (Pro-197-Thr y Trp-574-Leu) mutaciones AHAS no mostraron efectos pleiotrópicos negativos sobre la tasa de crecimiento relativa y la capacidad competitiva (Légère

et al., 2013; Li *et al.*, 2013; Menegat *et al.*, 2016). Cuando no conllevan un costo biológico, es probable que los alelos de resistencia permanezcan en la población, aún en ausencia de herbicidas. Ello no sucede si existen costos biológicos. Para el mismo grupo de herbicidas, la mutación Pro-197-Arg redujo la tasa de crecimiento relativa en *Lolium rigidum* (Yu *et al.*, 2010), mientras que la mutación Trp-574-Leu mostró fuerte efectos pleiotrópicos sobre la morfología y anatomía de las hojas en *Amaranthus powellii*, resultando en reducciones significativas en el crecimiento vegetativo y la producción de semillas (Tardif *et al.*, 2006). Los cambios en la tasa de crecimiento relativo usualmente conducen a cambios en el establecimiento de las plantas y en la capacidad de absorción y utilización de los recursos (Grime, 1977). Además, la capacidad de las plantas de reducir el crecimiento de las plantas vecinas (efecto competitivo) o de continuar su crecimiento pese a la presencia de competidores (respuesta competitiva) depende en gran medida de la capacidad de absorción de los recursos (Goldberg, 1990), y el tamaño de planta es el principal rasgo involucrado en la absorción de los mismos. En consecuencia, se espera que las plantas de menor tamaño absorban menos recursos que las plantas más grandes, y en consecuencia, tengan efectos y respuestas competitivas menores (Goldberg, 1990). En estos casos, es probable que los alelos de resistencia reduzcan su frecuencia en ambientes sin presión de selección.

Los costos de resistencia sobre la aptitud de las poblaciones pueden expresarse de manera diferente en función de las interacciones con otros organismos (costos de resistencia ecológicos) (Strauss *et al.*, 2002; Vila-Aiub *et al.*, 2009) y, pueden ser más evidentes cuando las malezas crecen bajo condiciones ambientales estresantes, por ejemplo: predación, enfermedades o competencia por recursos (luz, agua, nutrientes) (Vila-Aiub *et al.*, 2009). Si un alelo de resistencia a herbicidas reduce la capacidad de capturar/absorber los recursos o de utilizar eficientemente los recursos capturados, los costos de aptitud ecológicos deberían ser más evidentes en condiciones de intensa competencia por recursos (Vila-Aiub *et al.*, 2009a). Por ejemplo, las plantas de *Arabidopsis thaliana* con la mutación Pro-197-Ser mostraron 26 a 34 % menor producción de semillas en condiciones de campo bajo estrés nutricional, pero las diferencias fueron despreciables cuando las plantas fueron fertilizadas (Purrington y Bergelson, 1997). Por otro lado, las plantas de *Echinochloa crus-galli* con la mutación Ala-122-Asn (Panozzo *et al.*, 2017) y *Solanum ptychanthum* con la mutación Ala-205-Val (Ashigh y Tardif, 2009) mostraron menor aptitud reproductiva en condiciones óptimas de crecimiento, pero no se diferenciaron de las susceptibles al ser criadas en condiciones de estrés generado por alta competencia o mayor sombreado, respectivamente, demostrando nuevamente que no existe un

comportamiento universal en los costos de resistencia a herbicidas y, por lo tanto, deben ser evaluados caso por caso.

Raphanus sativus feral (nabón) crece naturalmente en varias partes del mundo y es una maleza invasora, problemática en zonas templadas de Sudamérica, donde ha desarrollado resistencia a herbicidas AHAS (Snow y Campbell, 2005; Theisen, 2008; Pandolfo *et al.*, 2013, 2016; Heap, 2019). En Argentina, la dispersión de las poblaciones de nabón resistentes alcanza a la mitad sur de la provincia de Buenos Aires (AAPRESID 2017, www.aapresid.org.ar/rem/mapas-rem/) y Pandolfo *et al.*, (2016) detectaron la mutación Trp-574-Leu responsable de la amplia resistencia a las cinco familias de herbicidas AHAS. Estas plantas mostraron 3,2 veces menor actividad de la enzima AHAS, y en condiciones de campo, 22 a 38 % menor número de semillas y 21 a 47 % menor aptitud reproductiva que las plantas susceptibles, al ser criadas a baja densidad sin interferencia con un cultivo (Capítulo 2). Sin embargo, dichas condiciones raramente ocurren en la naturaleza. Las malezas crecen en parches (interferencia intraespecífica) y en general acompañan y se mimetizan con los cultivos (interferencia interespecífica) (Neve *et al.*, 2009). La falta de información de los efectos pleiotrópicos de la mutación Trp-574-Leu sobre los rasgos vegetativos y reproductivos de nabón en condiciones de interferencia intra e interespecífica limita el desarrollo y la implementación de estrategias de manejo de malezas basadas en el conocimiento de la evolución de la resistencia (Cousens y Fournier-Level, 2018).

La selección de individuos resistentes y susceptibles con similar fondo genético es crucial para la cuantificación de los posibles costos asociados con los genes/alelos de resistencia (Paris *et al.*, 2008; Vila-Aiub *et al.*, 2009, 2011; Darmency *et al.*, 2017). Existe una diversa variedad de métodos para controlar los fondos genéticos (revisados en Vila-Aiub *et al.*, 2011), sin embargo, cuando el objetivo de los estudios de aptitud es detectar diferencias entre individuos resistentes y susceptibles para desarrollar estrategias de manejo de malezas basados en la resistencia, puede ser más apropiado, útil y rápido la selección de individuos resistentes y susceptibles homocigotas a partir de una única población (Pedersen *et al.*, 2007; Keshtkar *et al.*, 2019).

Se hipotetizó que la mutación Trp-574-Leu que confiere resistencia a los herbicidas AHAS no impone efectos pleiotrópicos negativos sobre los caracteres vegetativos y reproductivos de las poblaciones naturales de *R. sativus*. El objetivo del presente capítulo fue evaluar la tasa de crecimiento relativa y los caracteres vegetativos y reproductivos en individuos de *R. sativus* con y sin la mutación Trp-574-Leu provenientes de la misma población, criados en condiciones de interferencia intra e interespecífica (costo ecológico).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron las subpoblaciones homocigotas resistente con la mutación Trp-574-Leu (RSBA3-R) y susceptible (RSBA3-S), descritas en el Capítulo 3, obtenidas a partir de una población de nabón colectada en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, cercano a la localidad de Balcarce (37° 35' 25" S 58° 31' 59" O) (Pandolfo *et al.*, 2013) y previamente caracterizada por Pandolfo *et al.*, (2016). Los individuos resistentes a herbicidas AHAS con la mutación Trp-574-Leu fueron colectados en un lote de colza resistente a imidazolinonas (Clearfield® o CL) sobrevivientes a la aplicación de imazetapir (RSBA3), y una subpoblación homocigota con la mutación Trp-574-Leu (RSBA3-R) fue generada a partir de RSBA3 al seleccionar 15 plantas homocigotas resistentes utilizando un marcador CAPS específico, siguiendo los procedimientos descritos por Pandolfo *et al.*, (2016). Sus contrapartes susceptibles se colectaron en el margen del lote del mismo campo donde se encontraron los individuos resistentes (RSBA3-S) (Pandolfo *et al.*, 2013). El nabón es una especie de polinización cruzada obligada, mayormente polinizada por insectos, por lo tanto, se puede asumir que la variación genética entre RSBA3 y RSBA3-S era relativamente baja (Vila-Aiub *et al.*, 2011; Keshtkar *et al.*, 2019). Las semillas utilizadas en el experimento fueron las generadas para el capítulo anterior.

La subpoblación RSBA3-R se consideró el biotipo R, mientras que la RSBA3-S se consideró como biotipo S.

Evaluación de los rasgos de crecimiento vegetativo

Se realizaron tres experimentos en invernáculo para estimar la tasa de crecimiento relativa (RGR) y la respuesta a la interferencia de los individuos R y S. Estos parámetros son ampliamente utilizados para demostrar la expresión de los costos de resistencia a los herbicidas (Vila-Aiub *et al.*, 2005b, 2015; Li *et al.*, 2013). Los experimentos se llevaron a cabo sobre individuos aislados (costo fisiológico) y sobre individuos criados en dos ambientes competitivos, generados por competencia intraespecífica e interespecífica con un cultivar de trigo (costo ecológico). En los tres experimentos, las plántulas fueron criadas en macetas (15 cm de diámetro x 12 cm de altura) rellenas una mezcla 50:50 de tierra comercial para macetas y suelo del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional de Sur (suelo franco-arenoso bien drenado con 1,1 % de materia orgánica y pH 7.7, suelo típico del sudoeste de la provincia de Buenos Aires) en invernáculo a 20 ± 5 °C, y fertilizadas con 6 L ha⁻¹ de fertilizante líquido (Xilonen, grade 10-13-10) y 30 kg ha⁻¹ de urea. Las macetas se reorganizaron

periódicamente para aleatorizar las diferencias ambientales dentro del invernáculo y se distribuyeron espacialmente para evitar la competencia por luz.

a. Evaluación del crecimiento vegetativo sin interferencia

Con la finalidad de evaluar el efecto de la mutación Trp-574-Leu sobre la tasa de crecimiento relativo (RGR), se midió la biomasa seca aérea de las plantas R y S de nabón criadas sin interferencia. Las semillas de los biotipos resistente y susceptible fueron incubadas sobre dos capas de papel de filtro humedecido con 10 ml de agua destilada en cajas de Petri de 9 cm de diámetro a 14/28 °C en condiciones de oscuridad por 48 horas (condiciones óptimas de germinación obtenidas en el Capítulo 1). Al menos 50 plántulas germinadas de tamaño uniforme (< 1 cm) de cada biotipo fueron trasplantadas en macetas individuales (una plántula por maceta). Las plántulas fueron criadas en invernáculo, con luz natural y riego diario automático, y las macetas fueron organizadas en un diseño completamente al azar.

La biomasa seca aérea de 25 plantas de cada biotipo (R y S) para cada fecha fue evaluada 18 y 32 días después del trasplante (DDT). Para ello, las plantas fueron cortadas a nivel de superficie del suelo, colocadas en bolsas de papel, secadas en estufa a 60 °C hasta peso constante y pesadas para evaluar biomasa seca.

b. Evaluación del crecimiento vegetativo bajo interferencia intraespecífica

La capacidad competitiva de los biotipos resistente y susceptible se comparó utilizando un diseño de series de reemplazo (experimento sustitutivo) para inferir cuál de los dos biotipos (R o S) es el más competitivo. Se establecieron cinco combinaciones en proporciones relativas 0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0 (R:S) al trasplantar cuatro plántulas de tamaño uniforme (< 1 cm), germinadas como se indicó previamente, por maceta. Las plántulas de nabón fueron trasplantadas en un patrón circular de manera que cada una tenga la misma distancia con las plántulas de al lado, y fueron criadas en invernáculo, con luz natural y riego automático diario. Las macetas se organizaron en un diseño en bloques aleatorizados con seis replicas (macetas).

Las variables: número de hojas de más de 2 cm de largo, ancho y largo de la hoja más larga y biomasa seca aérea fueron evaluadas 35 DDT en los individuos susceptibles y resistentes.

c. Evaluación del crecimiento vegetativo bajo interferencia interespecífica

Para evaluar la respuesta de competencia por recursos limitantes (luz, agua y nutrientes) en individuos resistentes y susceptibles se utilizó un diseño de competencia maleza-cultivo. Las

respuestas competitivas a los recursos ambientales limitantes están relacionadas con la capacidad de una planta para persistir independientemente de la presencia de un competidor (Li *et al.*, 2013; Vila-Aiub *et al.*, 2015). Por lo tanto, la capacidad competitiva de las plantas R y S se evaluó bajo densidades y biomasa creciente de plantas de trigo (*Triticum aestivum*).

Para generar estrés por interferencia interespecífica se establecieron seis densidades del cultivar de trigo ACA 360 (0, 57, 113, 226, 340 y 453 plantas m⁻²) al trasplantar 0, 1, 2, 4, 6, y 8 plántulas germinadas (< 1 cm) en macetas rellenas con la misma mezcla que los experimentos previos. Las plántulas de trigo fueron trasplantadas en un patrón circular, con la finalidad de mantener una distancia similar entre cada planta de trigo y el individuo de nabón en el centro de la maceta. Las plántulas de nabón germinadas fueron trasplantadas en las macetas que contenían trigo, cuando el cultivo estaba en el estado de dos hojas. Las plantas fueron criadas en invernáculo con luz natural y una suplementación lumínica provista por lámpara de bajo consumo, y fueron regadas hasta capacidad de campo cada 4 – 5 días. Las macetas se organizaron en un diseño completamente al azar, y cada tratamiento experimental consistió en seis replicas, con un total de unidades experimentales de 72 macetas (2 biotipos x 6 réplicas x 6 tratamientos).

El ancho y largo de la hoja más larga de las plantas de nabón y la biomasa seca aérea de las plantas de nabón y trigo de cada unidad experimental (maceta) fueron evaluados 33 DDT de las plantas de nabón.

Evaluación de la aptitud biológica en condiciones de campo

Se diseñaron dos experimentos en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, para evaluar la biomasa seca aérea total y los caracteres reproductivos en individuos de nabón resistentes y susceptibles bajo condiciones de interferencia con trigo. Los experimentos fueron realizados en dos estaciones de crecimiento, entre Mayo de 2018 – Diciembre de 2018 (invierno) y Agosto de 2018 – Enero de 2019 (primavera) para simular la dinámica de crecimiento de nabón, que se considera una especie facultativa (Snow y Campbell, 2005), ya que dos cohortes son observadas comúnmente en el agroecosistema. Los cultivares de trigo ACA 360 y KLEIN PROTEO fueron cultivados a mediados de mayo de 2018 (ciclo largo o invernal) y a principios de agosto de 2018 (ciclo corto o primaveral), a densidades ajustadas a 200 y 350 plantas m⁻², respectivamente. Cada experimento estuvo compuesto por 20 unidades experimentales de nueve líneas de siembra espaciadas a 0,2 m y de 1,5 m de largo. Las subpoblaciones de nabón

RSBA3-R y RSBA3-S fueron establecidas en bandejas plásticas multicelda rellenas con sustrato comercial profesional en base de turba (Grow Mix® Terrafertil) y criadas en invernáculo con luz natural, riego automático diario y temperatura de 20 ± 5 °C. En el estado de dos–tres hojas de trigo, plántulas de tamaño similar (en el estado de dos–tres hojas) de los biotipos resistente y susceptible de nabón se trasplantaron al campo experimental entre las plantas de trigo de acuerdo al plan de densidad. Las densidades de maleza fueron 0 (control), 4, y 12 plantas m^{-2} . Los experimentos se fertilizaron con 90 kg ha^{-1} de fosfato diamónico a la siembra y 200 kg ha^{-1} de urea en el estado de cinco hojas del trigo. Las malezas no clasificadas como nabón fueron removidas regularmente en forma manual. Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar con cuatro repeticiones, y ambos experimentos fueron realizados de la misma manera en ambas estaciones de crecimiento.

En el estado de madurez, se midió la altura de planta y el número de ramas primarias sobre cuatro plantas de nabón ubicadas en el centro de cada unidad experimental. Las cuatro plantas fueron cortadas a nivel de superficie, secadas en estufa a 60 °C hasta peso constante y pesadas para evaluar biomasa seca aérea total por planta y por unidad de superficie (metro cuadrado). Las silicuas de cada planta fueron separadas, pesadas, contadas y trilladas manualmente o utilizando un mortero con mínimo daño. Las semillas fueron limpiadas y pesadas para obtener el rendimiento por planta. El peso unitario de las semillas se estimó al promediar el peso de tres réplicas de 100 semillas para cada planta. El número de semillas por planta se estimó al dividir el rendimiento por planta por el peso de las semillas de cada planta. El número de semillas por silicua se estimó al dividir el número de semillas por planta por el número de silicuas por planta. La partición de la biomasa seca aérea (tallos/ramas, frutos y semillas) se realizó de acuerdo a Poorter y Nagel (2000).

Al mismo tiempo, en el estado de madurez del trigo, se midió la altura de planta sobre tres réplicas de cinco plantas linderas y posteriormente se cosecharon manualmente las espigas en tres muestreos de 0,5 m de largo, ubicados en las tres líneas centrales de cada unidad experimental y se secaron en estufa a 60 °C hasta peso constante para homogeneizar los tratamientos. En cada réplica (tres por cada unidad experimental) se evaluó número de espigas m^{-2} , número de espiguillas por espiga, número de granos por espiguilla, peso de los granos y rendimiento. Las espiguillas por espiga y los granos por espiguilla se obtuvieron al promediar los valores de cinco espigas, y el peso unitario de los granos al promediar el peso de cuatro réplicas de 100 granos. El rendimiento fue obtenido al trillar manualmente las espigas, y limpiar y pesar las semillas de cada réplica. El peso de los granos y el rendimiento de trigo fueron

estandarizados a 13,5 % de humedad. Los datos de trigo y de nabón de cada unidad experimental se promediaron para el análisis estadístico.

Análisis estadísticos

En el experimento “*Evaluación del crecimiento vegetativo sin interferencia*”, para cada biotipo (R y S) se estimó la RGR utilizando la fórmula propuesta por Hoffmann y Poorter, (2002) **[Ecuación 3]**. La varianza (V) de RGR fue calculada utilizando la biomasa seca aérea transformada con logaritmo natural (*ln*) para los diferentes momentos de cosecha (18 y 32 DDT) de acuerdo a Venus y Causton, (1979) **[Ecuación 4]**. La fórmula utilizada para estimar la RGR fue:

$$RGR = \frac{(\overline{\ln W2} - \overline{\ln W1})}{(t2 - t1)} \quad \text{[Ecuación 3]}$$

La fórmula utilizada para estimar la varianza de RGR fue:

$$V(RGR) = \frac{v(\overline{\ln W2}) + v(\overline{\ln W1})}{(t2 - t1)^2} \quad \text{[Ecuación 4]}$$

donde, $\overline{\ln W1}$ y $\overline{\ln W2}$ fueron las medias de la biomasa seca aérea transformadas con *ln* en los momentos de cosecha t_1 (18 DDT) y t_2 (32 DDT), y $V(\overline{\ln W1})$ y $V(\overline{\ln W2})$ las varianzas de la biomasa seca aérea transformadas con *ln* en los momentos de cosecha t_1 y t_2 . Los grados de libertad asociados con RGR y sus componentes fueron $n - 2$, donde n es el número total de plantas utilizadas en los dos momentos de cosecha.

La diferencia en las estimaciones de RGR entre biotipos fue evaluada utilizando la prueba *t* de Student con PROC TTEST en SAS. Además, las diferencias en biomasa seca aérea entre los biotipos (R y S) fueron evaluadas utilizando ANOVA con PROC GLM. El modelo incluyó dos efectos fijos: tiempo de muestreo y biotipo (R y S), y su interacción. Previo al análisis, los datos fueron transformados logarítmicamente para mejorar la normalidad y la homogeneidad de las varianzas.

En el experimento “*Evaluación del crecimiento vegetativo bajo interferencia intraespecífica*”, se calculó el coeficiente de amontonamiento relativo (RCC) para los valores de número de hojas, ancho y largo foliar, y biomasa seca aérea de acuerdo a la ecuación propuesta por Novak *et al.*, (1993) **[Ecuación 5]**.

$$RCC = ((M_S^{3:1} / M_R^{3:1}) + (M_S^{2:2} / M_R^{2:2}) + (M_S^{1:3} / M_R^{1:3}) / 3) / (M_S^{4:0} / M_R^{4:0}) \quad \text{[Ecuación 5]}$$

donde M_S n:n y M_R n:n fueron el número de hojas, ancho y largo foliar o las biomazas seca aéreas por planta para el biotipo susceptible y resistente a las densidades n:n, respectivamente. Un valor de RCC de 1 indica que los dos biotipos tienen igual competitividad. Valores de RCC > 1 indican mayor competitividad de S y valores de RCC < 1 indican mayor competitividad de R. Los valores de RCC fueron comparados a 1 usando una prueba *t* de Student ($P \leq 0,05$) en PROC TTEST.

Por otro lado, para estudiar la complementariedad de recursos se calculó el rendimiento relativo total (RYT) para los valores de biomasa seca aérea de acuerdo a la ecuación propuesta por de Witt y Van der Bergh, (1965) siguiendo los métodos de Dai *et al.*, (2014) **[Ecuación 6]**.

$$RYT = [P_{bio} (S_{mix}/S_{mono})] + [(1 - P_{bio}) (R_{mix}/R_{mono})] \text{ [Ecuación 6]}$$

donde P_{bio} es la proporción de los biotipos respectivos cuando crecieron juntos; S_{mix} y R_{mix} , respectivamente, son la biomasa seca aérea por planta de los biotipos susceptible y resistente cuando crecieron juntos; y S_{mono} y R_{mono} , respectivamente, son la biomasa seca aérea de los biotipos susceptible y resistente en monocultivo. Valores de RYT=1 indica que los mismos recursos están siendo utilizados por S y R, RYT<1 indica antagonismo entre S y R (pérdida general de recursos) y RYT>1 indica competencia incompleta debido a mayor oferta que demanda de recursos o que los biotipos tienen diferente demanda de recursos. RYT fue calculado con los tratamientos (R/S) 4:0, 2:2 y 0:4. Los valores de RYT fueron comparados a 1 usando una prueba *t* de Student ($P \leq 0,05$) en PROC TTEST.

Además, se compararon los valores de número de hojas, ancho y largo foliar y biomasa seca aérea de los tratamientos 4:0 y 0:4 para determinar si existen diferencias significativas entre biotipos utilizando PROC GLM.

En el experimento “*Evaluación del crecimiento vegetativo bajo interferencia interespecífica*”, los datos de largo y ancho foliar y de biomasa seca aérea de las plantas de nabón en interferencia con trigo se expresaron como porcentaje del rasgo en ausencia de interferencia y se analizaron siguiendo los métodos de Li *et al.*, (2013) y Vila-Aiub *et al.*, (2015). La respuesta de los biotipos a la interferencia se analizó utilizando un modelo hiperbólico no-lineal, que describe la respuesta de las plantas de nabón al incremento de la biomasa de trigo (Weiner, 1982) **[Ecuación 7]:**

$$Y = \frac{a}{1+bx} \text{ [Ecuación 7]}$$

donde, Y representa el carácter de aptitud biológica (biomasa seca aérea, largo y ancho foliar) de la maleza a diferentes biomásas de cultivo (x), a el carácter de aptitud de la maleza en ausencia de cultivo ($x = 0$), y b la pendiente de la regresión.

Las pendientes de la regresión (parámetro b) fueron comparadas utilizando la prueba t de *Student* con PROC TTEST para determinar la respuesta de las plantas de nabón (R y S) al incremento en la biomasa total (es decir, por unidad tamaño de planta) de trigo. El modelo hiperbólico se ajustó después de transformar los datos por logaritmo ($y = \log [x]$) para cumplir con los supuestos del análisis de regresión.

En el experimento “*Evaluación de la aptitud biológica en condiciones de campo*”, las diferencias en biomasa seca aérea total por planta y por unidad de superficie (m^{-2}), altura de planta, número de ramas primarias, número de silicuas por planta, semillas por silicua, número de semillas por planta, peso de las semillas, rendimiento por planta y partición de la biomasa seca (tallos y ramas, frutos y semillas) entre los biotipos R y S de nabón, criados a dos densidades y en dos estaciones de crecimiento, en condiciones de interferencia con trigo fueron evaluadas utilizando ANOVA con PROC GLM en SAS. El modelo incluyó estación de crecimiento (ciclo largo y ciclo corto), biotipo (R y S), densidad (4 y 12 plantas m^{-2}) y todas sus interacciones. La asignación de recursos al sistema reproductivo para R y S se evaluó a partir del cálculo de fracciones de la biomasa seca aérea propuesto por Poorter y Nagel (2000). Además, se utilizó ANOVA para evaluar el efecto de la interferencia de dos densidades de nabón resistente y susceptible sobre el rendimiento de trigo. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Fisher ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

Evaluación del crecimiento vegetativo sin interferencia

No se encontró interacción entre tiempo de muestreo y biotipo ($F_{1;96} = 0,29$; $P = 0,59$). A los 18 y 32 días después del trasplante, la biomasa seca aérea de las plantas de nabón resistente a herbicidas AHAS ($295,02 \pm 15,35$ mg planta⁻¹ y $1672,55 \pm 144,65$ mg planta⁻¹, respectivamente) no mostró diferencias significativas ($F_{1;96} = 3,23$; $P = 0,07$) respecto a sus contraparte susceptibles 18 ($322,37 \pm 17,4$ mg planta⁻¹) y 32 ($1935,36 \pm 143,73$ mg planta⁻¹) días después del trasplante. No se encontraron diferencias significativas ($t = 0,76$; $P = 0,45$) en la RGR entre el biotipo susceptible ($0,1258 \pm 0,0048$ mg mg⁻¹ día⁻¹) y resistente ($0,1206 \pm 0,0047$ mg mg⁻¹ día⁻¹).

Evaluación del crecimiento vegetativo bajo interferencia intraespecífica

En ausencia de interferencia entre biotipos (tratamientos 4:0 y 0:4), no se encontraron diferencias significativas en el número ($F_{1;11} = 0,87$; $P = 0,37$), el ancho ($F_{1;11} = 0,02$; $P = 0,89$) y largo ($F_{1;11} = 3,02$; $P = 0,11$) foliar y la biomasa seca aérea ($F_{1;11} = 0,64$; $P = 0,44$) entre las plantas resistentes y susceptibles (Fig. 4.1).

Cuando las plantas R y S crecieron en condiciones de interferencia intraespecífica, el número ($t = 0,34$; $P = 0,75$; RCC = 0,97), ancho ($t = 2,26$; $P = 0,07$; RCC = 1,15) y largo ($t = 0,38$; $P = 0,72$; RCC = 1,03) foliar en ambos biotipos fueron similares, de acuerdo a la respuesta teórica de dos biotipos con igual competitividad (Fig. 4.1A, B y C). Sin embargo, el RCC calculado para la biomasa seca aérea se desplazó significativamente ($t = 2,96$; $P = 0,0253$) hacia la derecha (RCC = 1,25), indicando una leve ventaja competitiva del biotipo susceptible (Fig. 4.1D). A pesar de ello, el valor de RYT de los biotipos resistente y susceptible para la biomasa seca aérea en el tratamiento 2:2 no fue significativamente diferente de 1 ($t = 0,004$; $P = 0,99$; RYT = 1.0003 ± 0.20), indicando que ambos biotipos compitieron por los mismos recursos limitantes.

Evaluación del crecimiento vegetativo bajo interferencia interespecífica

El modelo hiperbólico explicó las variaciones en la respuesta en el crecimiento vegetativo, evaluado mediante el ancho y largo foliar y la biomasa seca aérea, de las plantas de nabón criadas en condiciones de interferencia con trigo ($R^2 = 0,57 - 0,69$; $P < 0,0001$). El aumento de la densidad de trigo redujo el largo y ancho foliar y la biomasa seca aérea de las plantas de nabón (Fig. 4.2). La respuesta competitiva, evaluada al comparar las pendientes de las regresiones de las variables mencionadas entre las plantas R y S, no mostró diferencias

significativas. Es decir, las reducciones en el ancho y largo foliar y la biomasa seca aérea de las plantas R fueron similares a las mostradas por sus contraparte S (Fig. 4.2).

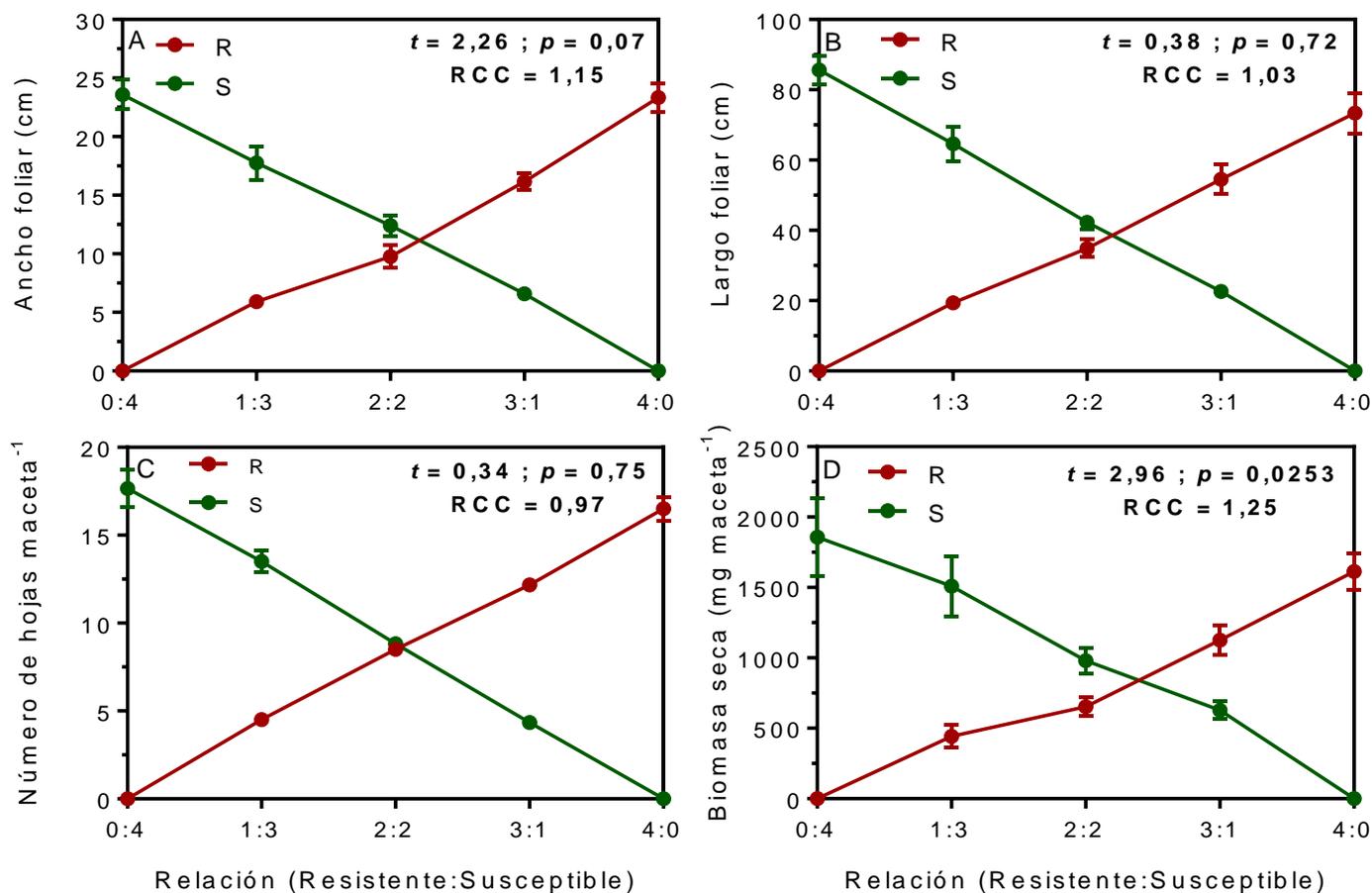


Figura 4.1. Diagrama de series de reemplazo para ancho (A) y largo (B) foliar, número de hojas por planta (C) y biomasa seca aérea por planta (D) de *Raphanus sativus* feral (nabón) resistente (R) y susceptible (S) a herbicidas AHAS, evaluado 35 días después del trasplante. Las barras verticales representan media ($n = 6$) \pm ES. La prueba t y el coeficiente de amontonamiento relativo (RCC) son indicados para cada variable.

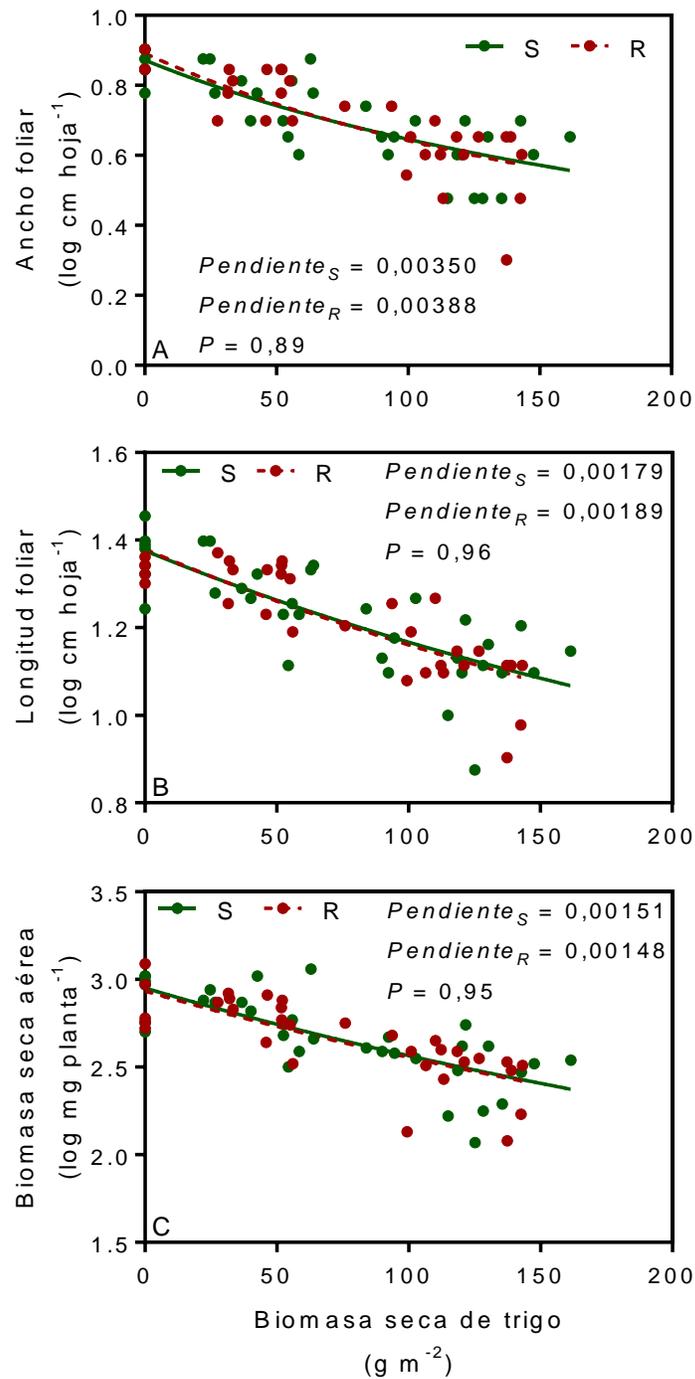


Figura 4.2. Respuesta del ancho (A) y largo (B) foliar y la biomasa seca aérea (C) de las plantas de *Raphanus sativus* (nabón) susceptibles (S) y resistentes (R) a herbicidas AHAS, criadas en condiciones de interferencia generada por incrementos en la biomasa seca aérea del cultivo de trigo.

Evaluación de la aptitud biológica en condiciones de campo

No se encontró interacción entre biotipo y estación de crecimiento, estación de crecimiento y densidad, biotipo y densidad, ni interacción triple para ningún carácter evaluado. Por lo tanto, los datos de ambas estaciones de crecimiento fueron agrupados (Tabla 4.1 y Fig. 4.3). No se encontraron diferencias significativas entre las subpoblaciones de nabón R y S criadas en condiciones de interferencia con trigo en altura de planta, número de ramas y semillas por silicua (Tabla 4.1). Sin embargo, las plantas resistentes mostraron 36 – 46 % menor biomasa seca aérea total, 20 – 48 % menor número de silicuas, 10 – 11 % menor biomasa de semillas, 26 – 47 % menor número de semillas y 36 – 53 % menor rendimiento por planta respecto a sus contraparte susceptibles, en ambas estaciones de crecimiento y densidades de maleza (Tabla 4.1 y Fig. 4.3).

Al evaluar la asignación de recursos a las estructuras reproductivas (es decir, fracción de biomasa de semillas respecto a la biomasa aérea total, o índice de cosecha) en los individuos de nabón, se encontró interacción entre biotipo y densidad ($F_{1;31} = 12,47$; $P = 0,0024$) y biotipo y estación de crecimiento ($F_{1;31} = 5,28$; $P = 0,0337$); por lo tanto, los datos fueron separados por estación de crecimiento y densidad (Fig. 4.4). A la menor densidad (4 plantas m^{-2}), no se encontraron diferencias significativas entre los biotipos en la asignación de recursos a las estructuras reproductivas, tanto en el experimento en ciclo corto ($F_{1;7} = 0,63$; $P = 0,49$) como en el de ciclo largo ($F_{1;7} = 3,06$; $P = 0,18$), indicando que la proporción de biomasa seca destinada a semillas fue similar entre los biotipos. Sin embargo, los individuos resistentes criados a la mayor densidad (12 plantas m^{-2}) mostraron 19 % ($18,8 \pm 0,5$ vs. $15,2 \pm 0,6$ % de biomasa de semillas para S y R, respectivamente) y 9 % ($20,4 \pm 0,6$ vs. $18,5 \pm 0,6$ % de biomasa de semillas para S y R, respectivamente) menor fracción de semillas respecto a la biomasa aérea total que los individuos susceptibles en el experimento ciclo largo ($F_{1;7} = 24,75$; $P = 0,0156$) y ciclo corto ($F_{1;7} = 14,20$; $P = 0,0327$), respectivamente (Fig. 4.4).

En cuanto al cultivo, el rendimiento de trigo se redujo significativamente ($F_{4;39} = 58,41$; $P > 0,0001$) debido a la interferencia de nabón. No se encontraron diferencias significativas entre estaciones de crecimiento ($F_{1;39} = 2,83$; $P = 0,11$), bloque (dentro de cada estación de crecimiento) ($F_{6;39} = 1,97$; $P = 0,11$) y la interacción estación de crecimiento por tratamiento [biotipo S y R a la menor (4 plantas m^{-2}) y mayor (12 plantas m^{-2}) densidad] ($F_{4;39} = 0,98$; $P = 0,44$). El biotipo resistente redujo en menor medida el rendimiento de trigo que su contraparte susceptible a ambas densidades. Las plantas resistentes y susceptibles redujeron el rendimiento de trigo en 38 y 49 % a la menor y 54 y 66 % a la mayor densidad de nabón,

respectivamente (Fig. 4.5). La interferencia de nabón resistente a herbicidas AHAS sobre el cultivo de trigo será explorada y discutida con mayor profundidad en siguiente capítulo (Capítulo 5).

Tabla 4.1. ANOVA para los caracteres de aptitud biológica de dos biotipos de *Raphanus sativus* feral (nabón), resistente y susceptible a herbicidas AHAS, criados en condiciones de interferencia con el cultivo de trigo, evaluados en dos estaciones de crecimiento (ciclo corto y ciclo largo) y a dos densidades de nabón (4 y 12 plantas m⁻²), y sus interacciones. Los efectos significativos ($P \leq 0,05$) están indicados en negrita. *Numerador y denominador de los grados de libertad de cada efecto.

Efectos	Altura		Número de ramas				Biomasa seca total planta ⁻¹				Número de frutos planta ⁻¹				Semillas por fruto				Número de semillas planta ⁻¹				Peso de semillas				Rendimiento (g planta ⁻¹)			
	g.l.*	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P					
Ciclo (C)	1/31	45,36	<0,0001	0,52	0,48	0,25	0,62	1,13	0,30	53,45	<0,0001	20,05	0,0003	84,62	<0,0001	3,16	0,09													
Bloque (ciclo)	6/31	2,49	0,06	0,25	0,95	2,32	0,08	1,11	0,39	0,04	0,99	1,33	0,29	1,19	0,36	2,38	0,07													
Biotipo (B)	1/31	0,24	0,63	1,85	0,19	37,00	<0,0001	16,20	0,0008	1,07	0,31	27,50	<0,0001	19,00	0,0004	51,05	<0,0001													
Densidad (D)	1/31	0,08	0,78	0,55	0,47	14,45	0,0013	10,57	0,0044	0,35	0,56	17,06	0,0006	1,14	0,30	17,19	0,0006													
C x B	1/31	0,25	0,62	2,60	0,12	1,08	0,31	0,44	0,51	2,18	0,16	0,68	0,42	0,90	0,36	0,65	0,43													
C x D	1/31	0,84	0,37	0,28	0,60	0,01	0,92	0,00	0,97	0,66	0,43	0,09	0,77	0,72	0,41	0,01	0,92													
B x D	1/31	0,04	0,84	1,17	0,29	0,00	0,99	1,94	0,18	1,12	0,30	1,01	0,33	0,09	0,77	0,49	0,50													
C x B x D	1/31	0,26	0,62	0,02	0,88	0,18	0,68	0,00	0,96	0,02	0,87	0,19	0,67	1,90	0,18	0,06	0,82													

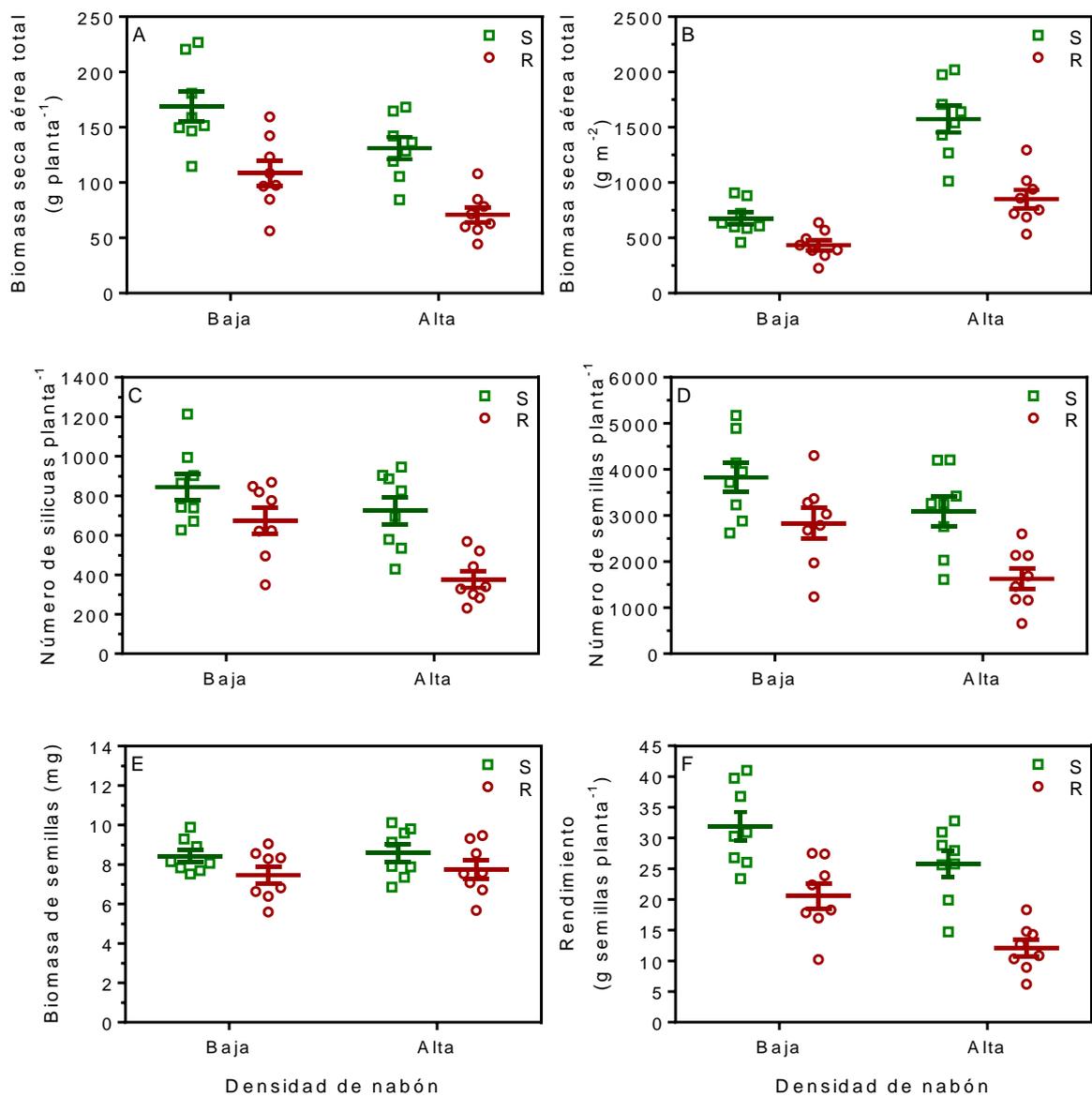


Figura 4.3. Biomasa seca aérea total por planta (A), biomasa seca aérea total (g/m²) (B) número de silicuas por planta (C), número de semillas por planta (D), biomasa de las semillas (E) y rendimiento por planta (F) de plantas de *Raphanus sativus* (nabón) resistentes a herbicidas AHAS con la mutación Trp-574-Leu (R) y sus contraparte susceptible (S), criadas en condiciones de interferencia con el cultivo de trigo a dos densidades de nabón, baja (4 plantas m⁻²) y alta (12 plantas m⁻²). Los datos son promedio de dos estaciones de crecimiento. La línea horizontal y vertical indica la media \pm ES. Cada punto indica la media de cuatro plantas.

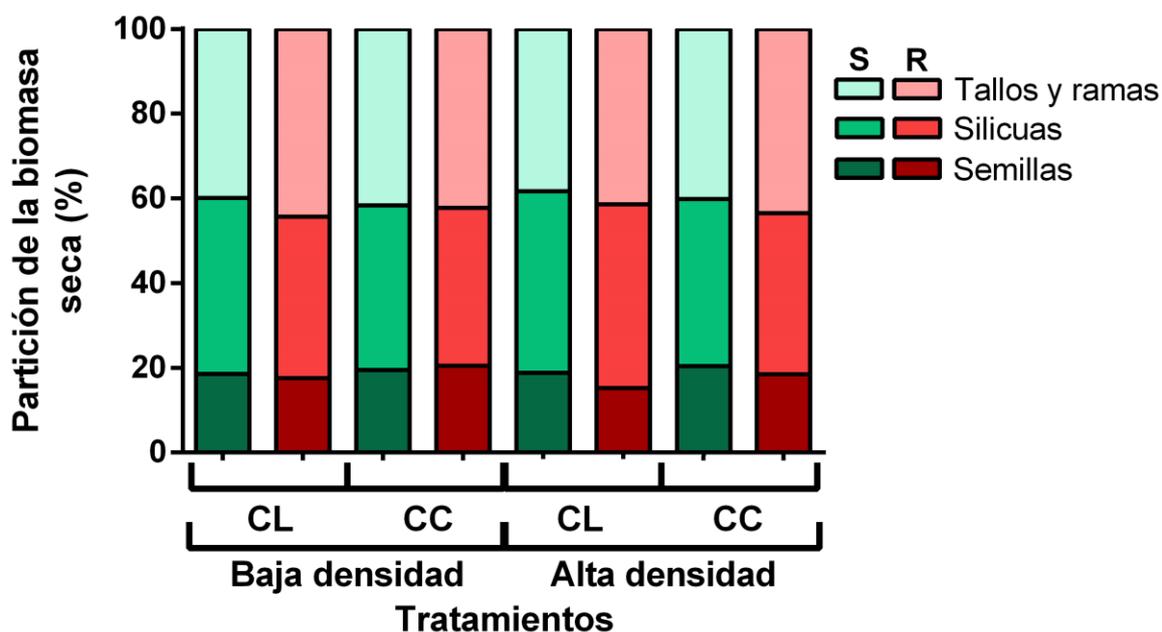


Figura 4.4. Partición de la biomasa seca aérea total (100 %), en tallos y ramas, silicuas y semillas de *Raphanus sativus* (nabón) resistentes a herbicidas AHAS con la mutación Trp-574-Leu (R) y sus contraparte susceptibles (S) criadas en condiciones de interferencia con el cultivo de trigo a dos densidades de nabón, baja (4 plantas m⁻²) y alta (12 plantas m⁻²), y dos estaciones de crecimiento, ciclo largo (CL) y ciclo corto (CC). Los valores son la media de 16 plantas (4 bloques x 4 plantas bloque⁻¹).

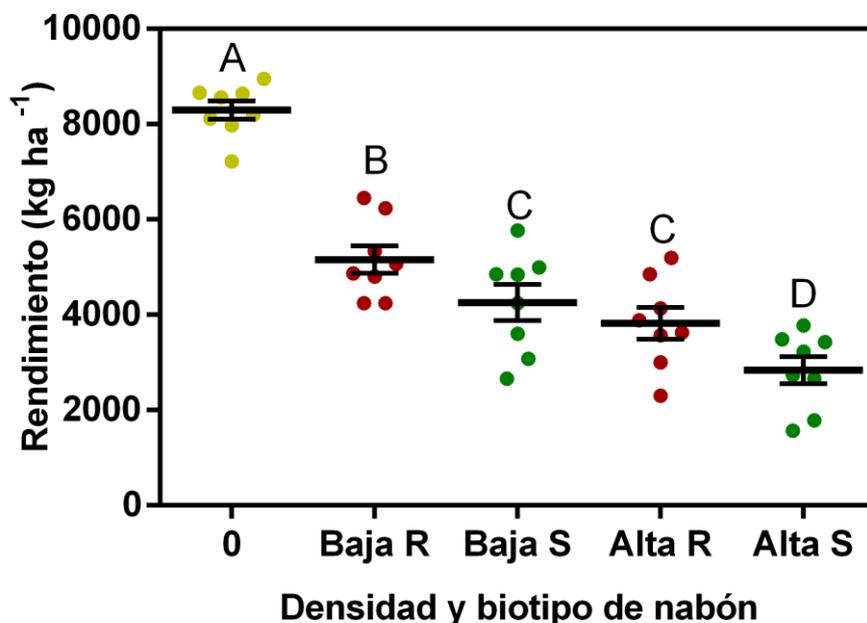


Figura 4.5. Rendimiento de *Triticum aestivum* (trigo) bajo interferencia de dos densidades de *Raphanus sativus* (nabón), baja (4 plantas m⁻²) y alta (12 plantas m⁻²), resistente a herbicidas AHAS con la mutación Trp-574-Leu (R) y su contraparte susceptible (S). Los datos son promedio de dos estaciones de crecimiento. La línea horizontal y vertical indica la media ± ES. Cada punto indica la media de tres repeticiones.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo revelaron similar tasa de crecimiento relativo, tamaño foliar y biomasa seca aérea en la etapa vegetativa entre individuos de nabón susceptibles y resistentes a herbicidas AHAS, criados aislados o en condiciones de interferencia intra e interespecífica (Fig. 4.1 A, B y C, y 4.2). Sin embargo, el coeficiente de amontonamiento relativo, evaluado sobre la biomasa seca aérea, sugirió mayor competitividad del biotipo susceptible respecto al resistente (Fig. 4.1 D), y en condiciones de campo, las plantas resistentes criadas en interferencia con trigo mostraron menor biomasa seca aérea a la madurez y menor aptitud reproductiva respecto a sus contrapartes susceptibles, sugiriendo efectos pleiotrópicos negativos impuestos por la mutación Trp-574-Leu (Fig. 4.3).

La mutación Trp-574-Leu no modificó la tasa de crecimiento vegetativa, el tamaño foliar y la biomasa seca aérea en la etapa vegetativa de plantas de nabón criadas aisladas o en interferencia intra/interespecífica, sugiriendo similar capacidad de absorción de los recursos. Esto resultó en similar respuesta competitiva de los individuos resistentes y susceptibles criados en interferencia con trigo en estado vegetativo, hasta densidades de trigo >450 plantas m^{-2} . La mutación Trp-574-Leu tampoco mostró efectos pleiotrópicos negativos sobre la tasa de crecimiento relativo y la capacidad competitiva de *R. raphanistrum* (Li *et al.*, 2013), *Lolium rigidum* (Yu *et al.*, 2010), *Kochia scoparia* (Légère *et al.*, 2013), *Poa annua* (Cross *et al.*, 2015) y *Ambrosia trifida* (Marion *et al.*, 2017). A pesar de que el cálculo de RYT sugirió que ambos biotipos (R y S) compitieron por los mismos recursos, el cálculo de RCC sugirió mayor capacidad competitiva de los individuos susceptibles, evaluada sobre la biomasa seca aérea en estado vegetativo, respecto a los individuos resistentes, cuando los biotipos (R y S) crecen combinados a una densidad de 226 plantas de nabón m^{-2} . La mutación Trp-574-Leu también mostró menor capacidad competitiva en los individuos resistentes respecto a los susceptibles en *Amaranthus powellii* (Tardif *et al.*, 2006).

Las estimaciones de los costos biológicos de la resistencia a herbicidas realizadas sobre estadios vegetativos y/o en condiciones de crecimiento controladas pueden no revelar los costos ecológicos sobre la aptitud reproductiva en condiciones de campo (Vila-Aiub *et al.*, 2009; Keshtkar *et al.*, 2019). En condiciones de campo, los individuos de nabón con la mutación Trp-574-Leu criados a dos densidades, en condiciones de interferencia con el cultivo de trigo mostraron menor biomasa seca aérea total que los individuos susceptibles provenientes de la misma población (Fig. 4.3). Además, la asignación de los recursos a las estructuras reproductivas entre biotipos resistente y susceptible fue solo levemente afectada a la mayor densidad de malezas, pero no a la menor densidad (Fig. 4.4). Esto resultó en menor número de silicuas y semillas por planta, menor biomasa de semillas y finalmente

menor rendimiento por planta en los individuos resistentes respecto a los susceptibles (Fig. 4.3). En concordancia, los individuos susceptibles produjeron mayores pérdidas de rendimiento sobre el cultivo de trigo en comparación con los resistentes, en ambas densidades de maleza y estaciones de crecimiento (Fig. 4.5). Los costos sobre la biología reproductiva encontrados en este estudio fueron levemente superiores a los encontrados sin interferencia con cultivos (Capítulo 2, Fig. 2.2).

El mecanismo fisiológico responsable del costo biológico encontrado probablemente este asociado a la menor actividad de la enzima AHAS en los individuos resistentes respecto a los susceptibles (Capítulo 2). Por otro lado, la falta de correlación entre los efectos pleiotrópicos encontrados en estado vegetativo y reproductivo, en este y otros estudios (Cross *et al.*, 2015), podría explicar la ausencia de costos de resistencia en varios experimentos donde se encontró costo enzimático, debido a que en la mayoría de ellos solo se evaluó el costo de resistencia sobre la biomasa en estado vegetativo (Younginger *et al.*, 2017). En consecuencia, la menor actividad de la enzima AHAS con la mutación Trp-574-Leu respecto a la enzima silvestre, podría ser limitante en etapas de altos requerimientos o en estados avanzados de la maleza.

Las implicancias ecológicas y evolutivas de una mutación adaptativa, por ejemplo la mutación Trp-574-Leu, depende de múltiples interacciones entre los factores de manejo relacionados con las aplicaciones de herbicidas, los factores biológicos relacionados con la ecología y el ciclo de vida de las malezas, los factores genéticos relacionados con el costo/beneficio biológico de la resistencia y el tamaño poblacional (Neve *et al.*, 2009; Vila-Aiub *et al.*, 2009; Vila-Aiub *et al.*, 2019). El nabón es una especie de polinización cruzada obligada (Snow y Campbell, 2005) y el alelo Trp-574-Leu de resistencia a AHAS es dominante (Yu *et al.*, 2014), dos características que podrían incrementar la frecuencia del alelo resistente en una población. Sin embargo, este estudio y los realizados en el Capítulo 2 mostraron que la mutación de resistencia a AHAS Trp-574-Leu está asociado 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 individuos resistentes, tanto en ambientes ruderales como agrestales, en ausencia de presión de selección. Es decir, en una situación donde la resistencia esté bien establecida, el manejo de las poblaciones resistentes a largo plazo basado en la rotación de cultivos, ausencia de presión de selección por herbicidas AHAS y la utilización de cualquier otra estrategia/herramienta disponible de control ayudaría a reducir la frecuencia de los alelos resistentes.

En especies autoincompatibles de polinización cruzada obligada, como el nabón (Snow y Campbell, 2005), el flujo de genes entre poblaciones resistentes y susceptibles podría

modificar la dinámica de los alelos resistentes (Roux *et al.*, 2008). El flujo de genes desde las poblaciones con nulo o bajos niveles de resistencia podría actuar como refugio, retrasando la evolución de la resistencia en poblaciones con altos niveles de selección y/o disminuyendo más rápido la proporción de alelos resistentes en ausencia de selección por herbicidas. De acuerdo a ello, se destaca la importancia de generar menor presión de selección y mantener las banquinas o bordes de los lotes sin aplicación de herbicidas.

Por otro lado, las semillas de nabón tienen requerimientos de oscuridad para germinar y están encerradas dentro de silicuas indehiscentes que imponen dormición fisiológica (Capítulo 1 y 3), factores que provocan la formación de un banco de semillas persistente que también podría actuar como refugio y provocar retraso tanto en la evolución de la resistencia como en la reducción de las poblaciones resistentes. Para verificar nuestras inferencias, se deberían realizar estudios adicionales que monitoreen las frecuencias de los alelos de resistencia en condiciones de campo durante varios años en ausencia de selección por herbicidas AHAS.

Finalmente, todos estos resultados podrían ser incorporados en modelos de evolución de poblaciones de malezas para explorar las consecuencias de los costos de resistencia sobre la dinámica de la resistencia a inhibidores AHAS e identificar posibles estrategias de manejo para prevenir, retrasar o revertir la evolución de la resistencia.

La comparación entre individuos homocigotas con la mutación AHAS Trp-574-Leu e individuos homocigotas tipo silvestre provenientes de una única población fue la estrategia utilizada para reducir el efecto del fondo genético (Vila-Aiub *et al.*, 2011; Keshtkar *et al.*, 2019). En especies de polinización cruzada obligada se asume que el fondo genético entre los individuos resistentes y susceptibles dentro de una población es similar (Vila-Aiub *et al.*, 2011; Vila-aiub *et al.*, 2015), y solo cinco-diez plantas son suficientes para hacer una muestra representativa en estas circunstancias (Burgos *et al.*, 2013). Sin embargo, estos resultados no deberían generalizarse debido a que se evaluó solo una población. A pesar de ello, no se encontró interacción entre las poblaciones de nabón dentro de cada biotipo (R y S) en la evaluación de los caracteres reproductivos en ambientes sin interferencia interespecífica, sugiriendo similaridad en las poblaciones de nabón de la región pampeana (Tabla 2.2).

Una explicación alternativa podría ser la evolución de los biotipos en diferente tipo de hábitat, agrestal vs. ruderal, al proporcionar un ambiente diferente, podría provocar la selección de caracteres que optimicen la supervivencia dentro de esos ambientes (Barrett, 1983; Neve *et al.*, 2009; Gage *et al.*, 2015). Por lo tanto, los resultados encontrados aquí podrían haber surgido de la selección impuesta por las prácticas agrícolas,

independientemente de la mutación de resistencia a herbicidas (Darmency *et al.*, 2017; Vila-Aiub, 2019; Baucom, 2019). En ambientes ruderales, los estreses bióticos y abióticos son los principales agentes de selección (Koziol *et al.*, 2012), mientras que en ambientes agrestales, artificialmente benignos por una aplicación continua de agroquímicos y fertilizantes y mejor uso del agua, los principales estreses son las aplicaciones de herbicidas y la interferencia con los cultivos (Martínez-Ghersa *et al.*, 2000). Se considera que en ambientes agrestales, caracteres como mayor tasa de crecimiento, floración anticipada y prolongada, mayor partición a estructuras reproductivas y resistencia a herbicidas serán seleccionados positivamente (Neve *et al.*, 2014; Gage *et al.*, 2015; Bourgeois *et al.*, 2019; Vila-Aiub, 2019). En consecuencia, la selección de los individuos resistentes en el ambiente agrestal debería haber favorecido su comportamiento en los ambientes agrícolas en comparación con el biotipo susceptible, seleccionado en un ambiente ruderal (borde del lote, sobre el alambrado) (Pandolfo *et al.*, 2013). Sin embargo, no se detectaron diferencias en la tasa de crecimiento y el inicio y duración de la floración (observación personal del autor) entre individuos resistentes y susceptibles, la asignación de recursos a las estructuras reproductivas no fue fuertemente afectada (a altas densidades favoreció al biotipo susceptible) y la aptitud reproductiva del biotipo resistente, en condiciones de interferencia con trigo, fue sustancialmente menor que la del biotipo susceptible, sugiriendo que si las diferencias encontradas están influenciadas por el ambiente de selección, el costo de resistencia sería aun mayor al encontrado. A pesar de lo expuesto previamente, la posibilidad de que los efectos pleiotrópicos observados no sean causados solamente por la mutación Trp-574-Leu no puede ser completamente descartada. Para confirmar/descartar ello, sería necesario investigar los costos biológicos de la mutación Trp-574-Leu utilizando líneas resistentes y susceptibles isogénicas (Vila-aiub *et al.*, 2015).

Nuestros resultados revelaron que la mutación Trp-574-Leu impone efectos pleiotrópicos negativos sobre los caracteres reproductivos de nabón criados en condiciones de interferencia con el cultivo de trigo, rechazando la hipótesis planteada. 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.

CAPÍTULO 5

Interferencia de *Raphanus sativus* resistente a herbicidas AHAS en colza, trigo y girasol

INTRODUCCIÓN

Las malezas, plantas perjudiciales o indeseables en cierto lugar y período de tiempo que interfieren con la agricultura y los recursos naturales, se consideran la principal limitante biológica para la producción de alimentos en los sistemas productivos de todo el mundo (Oerke, 2006; Varanasi *et al.*, 2016). Estas incrementan los costos de producción y afectan negativamente los rendimientos de los cultivos al competir por recursos esenciales como la luz, los nutrientes y el agua, y/o al liberar sustancias químicas alelopáticas al medio ambiente (en su conjunto denominado interferencia) (Zimdahl, 2007; Cobb y Reade, 2010; Swanton *et al.*, 2015). Las pérdidas de rendimiento de los cultivos ocasionadas por las malezas varían principalmente de acuerdo al momento de emergencia de las mismas (respecto al cultivo), a su densidad y especie (Swanton *et al.*, 2015). Las malezas también incrementan los costos de protección de los cultivos al albergar otras plagas, como insectos y enfermedades, incrementando las oportunidades para que estos organismos persistan en el medioambiente y re-infesten los cultivos en futuras estaciones de crecimiento; aunque también albergan fauna benéfica, por ejemplo insectos polinizadores y enemigos naturales que ayudan al control de plagas. Las malezas pueden interferir con las labores de cosecha al incrementar la humedad y el volumen vegetal que pasa a través del sistema de trilla de las cosechadoras y reducir la calidad de los granos cosechados al contaminarlos con semillas de malezas y materias extrañas, que frecuentemente son difíciles de separar. Finalmente, las malezas reducen las opciones de cultivos y el valor de los campos (Zimdahl, 2007; Cobb y Reade, 2010; Bajwa, 2014; Varanasi *et al.*, 2016). Por estas razones, el control de las mismas es uno de los componentes principales del éxito de la producción de cultivos. En los bordes de los lotes y las banquinas, las malezas son un reservorio de variabilidad vegetal con múltiples funciones (revisado en Marshall y Moonen, 2002).

El control químico de malezas a través de uso de herbicidas es actualmente el método más adoptado y posiblemente el más efectivo para el control de malezas en los sistemas agrícolas de todo el mundo (Bajwa, 2014). En la actualidad, existen 26 modos de acción de herbicidas en el mercado mundial (Heap, 2019), entre ellos se encuentran los herbicidas inhibidores de la enzima AHAS/ALS, ampliamente utilizados para controlar malezas a nivel global (Duggleby *et al.*, 2008). Las aplicaciones continuas y frecuentes de estos herbicidas

resultaron en la evolución de resistencia en al menos 162 especies de malezas (Kraehmer *et al.*, 2014; Yu y Powles, 2014; Heap, 2019).

Raphanus sativus (nabón) es una maleza problemática en zonas templadas de América que ha desarrollado resistencia a herbicidas AHAS en Brasil, Chile y Argentina (Theisen, 2008; Pandolfo *et al.*, 2016). En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, un área principalmente agrícola cultivado mayormente (>90 %) bajo el sistema de labranza cero y donde los herbicidas inhibidores de AHAS son ampliamente utilizados, el nabón es una de las especies de maleza con mayor incremento en los últimos 35 años (Scursoni *et al.*, 2014). En este área, se detectaron varias poblaciones de nabón resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS (Pandolfo *et al.*, 2013, 2016, Tabla 2.1).

El control post-emergente de malezas latifoliadas en cultivos de hoja ancha es dificultoso. Los agricultores y técnicos disponen escasas (por ejemplo, aclonifen) o nulas opciones químicas de herbicidas para el control post-emergente de nabón resistente a herbicidas AHAS en los cultivos de girasol y colza, respectivamente (Pandolfo *et al.*, 2016). Por otro lado, el control post-emergente de nabón resistente a herbicidas AHAS en cereales de invierno (es decir, trigo y cebada) está limitado a herbicidas fenoxiacéticos (2,4-D y MCPA) e inhibidores del fotosistema II (bromoxinil). En consecuencia, se han encontrado extensas poblaciones de nabón resistente a herbicidas AHAS debido a la mutación Trp-574-Leu infestando severamente tanto cultivos de invierno como de verano (Theisen, 2008; Pandolfo *et al.*, 2016; Tabla 2.1).

Hasta el momento, la información disponible sobre el efecto de la interferencia de nabón en los cultivos de invierno y de verano es muy limitada. En un estudio realizado en Brasil, la interferencia de >40 plantas m⁻² de nabón redujo aproximadamente 15 % el rendimiento de soja (Bianchi *et al.*, 2011). Sin embargo, el efecto de la interferencia del pariente silvestre *Raphanus raphanistrum* ha sido ampliamente estudiado. La interferencia de *R. raphanistrum* a altas densidades provocó pérdidas en el rendimiento de trigo y colza de hasta 56 y 90 %, respectivamente (Blackshaw *et al.*, 2002; Hashem y Wilkins, 2002; Eslami *et al.*, 2006). El conocimiento de la interferencia de nabón sobre el rendimiento de los cultivos puede proveer una base para el desarrollo de estrategias efectivas de control.

Los objetivos de este estudio fueron: (1) cuantificar el efecto de la interferencia de densidades crecientes de *R. sativus* resistente a herbicidas AHAS sobre los componentes del rendimiento y el rendimiento de colza, trigo y girasol, y (2) estimar la altura, la biomasa y la producción de silicuas y semillas de varias densidades de nabón criadas sobre los cultivos de colza, trigo y girasol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En estos estudios se utilizaron tres accesiones de nabón correspondientes a dos poblaciones ubicadas en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina RSBA10, RSBA3-R y RSBA3-S (Pandolfo *et al.*, 2016). RSBA10 proviene de un cultivo de girasol resistente a imidazolinonas (Clearfield® o CL) en Pieres (38° 24' S, 58° 35' O). RSBA10 mostraba 95 % de individuos resistentes a herbicidas AHAS debido a la mutación Trp-574-Leu (Tabla 2.1). Las subpoblaciones homocigotas resistente con la mutación Trp-574-Leu (RSBA3-R) y susceptible (RSBA3-S), obtenidas a partir de una población de nabón colectada en cercanías a la localidad de Balcarce (37° 35' 25" S 58° 31' 59" O) (Pandolfo *et al.*, 2013, 2016), fueron descriptas en los Capítulos 3 y 4.

Con la finalidad de incrementar la cantidad de semillas, se reprodujeron al menos 15 plántulas de la población RSBA10 y de las subpoblaciones RSBA3-R y RSBA3-S en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, como se indicó en los capítulos previos. Las silicuas maduras se trillaron en forma manual, con ayuda de un mortero. Las semillas se almacenaron en bolsas de papel madera a temperatura ambiente hasta su posterior utilización. Las subpoblaciones RSBA3-R y RSBA3-S fueron solo utilizadas en los experimentos de trigo para evaluar los costos biológicos asociados a la resistencia a herbicidas AHAS (Capítulo 4).

Campo experimental

Los experimentos de campo para evaluar la interferencia de nabón sobre los cultivos de colza, trigo y girasol se realizaron durante 2016 y 2018 en el campo experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. El sitio posee clima semiárido y templado, con temperatura media anual de 14,9 °C, temperaturas medias del mes más frío (julio) y del mes más caluroso (enero) de 7,6 y 23,0 °C, respectivamente (Servicio Meteorológico Nacional 2019, <https://www.smn.gob.ar/>). El suelo tiene textura arenosa-franca bien drenada con 1,1 % de materia orgánica y pH 7,7 (suelo típico del sudoeste de la provincia de Buenos Aires). Los experimentos fueron regados mediante riego por goteo, complementando las lluvias naturales, de modo de cubrir las necesidades de los cultivos para lograr condiciones aceptables de crecimiento.

En condiciones de campo, la emergencia de nabón ocurre principalmente sobre la línea de siembra (Anexo, Figura A2 y A3), probablemente debido a la rotura de las silicuas y la liberación y entierro de las semillas por los discos de la sembradora durante la siembra (observación personal del autor), al igual que en el pariente silvestre *R. raphanistrum*

(Cheam, 1986). Por lo tanto, aquí se evaluó la interferencia de nabón establecido al mismo tiempo que los cultivos. En todos los casos, periódicamente, se realizó desmalezado manual para evitar la interferencia de otras especies de malezas diferentes a nabón.

Colza

Se empleó el híbrido comercial de colza Hyola 575 CL cultivado en unidades experimentales compuestas por siete líneas de siembra espaciadas a 0,2 m y de 2 m de largo, bajo una densidad objetivo de 50 plantas m⁻². Las evaluaciones se realizaron en 2017 y 2018 durante la estación de crecimiento invernal (junio – diciembre). Las semillas del cultivo y de la población de nabón RSBA10 fueron sembradas simultáneamente con 2–3 semillas por golpe a 2–3 cm de profundidad, de acuerdo a su plan de densidad. En el estado de 4 hojas del cultivo, se ajustó el stand de plantas de colza y de nabón mediante raleo manual. Las densidades de nabón fueron 0 (control), 2, 4, 8 y 16 plantas m⁻². Los experimentos fueron fertilizados con 90 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico a la siembra y 200 kg ha⁻¹ de urea en el estado de 4 – 6 hojas verdaderas. Los experimentos se llevaron a cabo en un diseño en bloques completos aleatorizados, con cuatro repeticiones, y de la misma manera en 2017 y 2018.

Al finalizar el ciclo del cultivo, se midió la altura, el número de ramas primarias y el número de silicuas en la inflorescencia principal sobre diez plantas de colza vecinas ubicadas en las tres líneas centrales de cada unidad experimental. Las plantas fueron cosechadas manualmente y secadas en estufa a 60 °C hasta peso constante. En cada planta, se evaluó el número de granos por silicua, el peso de los granos y el rendimiento. El número de granos por silicua fue estimado mediante el promedio del número de granos por silicua de cinco silicuas, en cada planta. El peso unitario de los granos se estimó mediante el promedio del peso de tres repeticiones de 100 granos por planta. El rendimiento por planta fue obtenido al trillar, limpiar y pesar las semillas de cada planta. El peso de las semillas y el rendimiento de colza fueron estandarizados a un contenido de 8 % de humedad. Los datos de las diez plantas de colza de cada unidad experimental fueron promediados para el análisis estadístico.

Trigo

Se evaluaron los caracteres reproductivos en las subpoblaciones de nabón resistente RSBA3-R y susceptible RSBA3-S criadas en condiciones de interferencia con trigo. Dado que el nabón se considera una especie facultativa (Snow y Campbell, 2005), con dos cohortes diferentes, los experimentos se realizaron en dos estaciones de crecimiento. Se emplearon los cultivares de trigo, ACA 360 y KLEIN PROTEO, sembrados a mediados de mayo de 2018 (ciclo largo) y principios de agosto de 2018 (ciclo corto), respectivamente.

Las densidades del cultivo fueron ajustadas a 200 y 350 plantas m^{-2} en los trigos ciclo largo y ciclo corto, respectivamente. Las unidades experimentales estaban formadas por nueve líneas de siembra, espaciadas a 0,2 m y de 1,5 m de largo. Las subpoblaciones RSBA3-R y RSBA3-S fueron establecidas en bandejas plásticas multicelda rellenas con sustrato comercial (Grow Mix® Terrafertil), y criadas en invernáculo con luz natural, riego diario y a temperatura de 20 ± 5 °C. En el estado de 2 – 3 hojas de trigo, plántulas de tamaño similar (en el estado de 2 – 3 hojas) de cada subpoblación de nabón fueron trasplantadas al campo experimental entre las plantas de trigo de acuerdo al plan de densidad. Las densidades de nabón fueron 0 (control), 4, y 12 plantas m^{-2} . Los experimentos fueron fertilizados con 90 kg ha^{-1} de fosfato diamónico a la siembra y 200 kg ha^{-1} de urea en el estado de 5 hojas completamente expandidas. Los experimentos se llevaron a cabo en un diseño en bloques completos aleatorizados, con cuatro repeticiones, y de la misma manera en ambas estaciones de crecimiento (ciclo corto y ciclo largo). Solo los datos de la subpoblación RSBA3-R fueron expuestos en este capítulo.

En el estado de madurez del cultivo, se midió la altura de planta sobre tres réplicas de cinco plantas sucesivas en cada unidad experimental. Las espigas de tres réplicas de 0,5 m de largo, ubicadas en las tres líneas centrales de cada unidad experimental, fueron cosechadas manualmente y secadas en estufa a 60 °C hasta peso constante. En cada réplica (tres por cada unidad experimental), se evaluó el número de espigas m^{-2} , espiguillas por espiga, granos por espiguilla, peso de los granos y rendimiento. El número de espiguillas por espiga y de granos por espiguilla se obtuvieron promediando los valores de cinco espigas. El peso unitario del grano se obtuvo pesando cuatro réplicas de 100 granos. El rendimiento fue obtenido al trillar manualmente, limpiar y pesar los granos de cada repetición. El peso de los granos y el rendimiento de trigo fueron estandarizados a 13,5 % de humedad. Los datos de trigo de cada unidad experimental fueron promediados para el análisis estadístico.

Girasol

Se empleó el híbrido comercial de girasol SYN 3970 CL, sembrado en unidades experimentales compuestas de cinco líneas de siembra espaciadas a 0,52 m y de 2,1 m de largo, bajo una densidad objetivo de 6,4 plantas m^{-2} . La evaluación se realizó durante la estación de crecimiento estival (noviembre a marzo) de 2016/17. El nabón RSBA10 y el híbrido de girasol fueron sembrados simultáneamente de manera manual, colocando 2–3 semillas por golpe a 2–3 cm de profundidad, espaciadas de acuerdo al plan de densidad. En el estado de cuatro hojas del girasol, la densidad de plantas de girasol y nabón fue ajustada mediante raleo manual. Las densidades de la maleza fueron 0 (control), 1,6, 4, 8 y 16

plantas m⁻². El experimento se fertilizó con 90 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico a la siembra y 150 kg ha⁻¹ de urea en el estado de 4–6 hojas del girasol. El experimento se realizó con un diseño en bloques completos al azar con cuatro repeticiones.

Al finalizar la floración de girasol, se midió la altura de planta, el ancho foliar de las tres hojas centrales y el número de hojas verdes de girasol sobre tres plantas vecinas en la línea central de cada unidad experimental. El área foliar promedio fue estimada de acuerdo a Aguirrezábal *et al.* (1996) utilizando tres hojas por planta. Al finalizar el ciclo del cultivo, los capítulos de las tres plantas evaluadas previamente fueron cosechados manualmente y secados en estufa a 60 °C hasta peso constante. Posteriormente se midió el diámetro de capítulo, el número de granos por capítulo, la biomasa de los granos y el rendimiento por planta. El peso unitario de los granos se estimó al promediar la biomasa de cuatro réplicas de 100 granos. El rendimiento fue obtenido al trillar manualmente, limpiar y pesar los granos de cada planta. La biomasa de los granos y el rendimiento de girasol fueron estandarizados a 11 % de humedad. Los datos de girasol de cada unidad experimental fueron promediados para el análisis estadístico.

Caracteres del nabón

Se midió la altura de planta sobre cuatro plantas sucesivas de nabón en el centro de cada unidad experimental en los experimentos de interferencia en colza, trigo y girasol. Las plantas evaluadas fueron cosechadas manualmente, secadas en estufa a 60 °C hasta peso constante y pesadas para determinar la biomasa seca aérea por planta. Las silicuas de cada planta fueron separadas, contadas y trilladas manualmente o utilizando un mortero. Las semillas fueron limpiadas y pesadas para obtener el rendimiento por planta. El peso unitario de las semillas se estimó al promediar el peso de tres réplicas de 100 semillas por planta. El número de semillas por planta se estimó al dividir el rendimiento por planta dividido el peso de las semillas de cada planta. El número de semillas por silicua se estimó al dividir el número de semillas por planta dividido el número de silicuas por planta. Los datos de las plantas de nabón de cada unidad experimental fueron promediados para el análisis estadístico.

Análisis estadístico

Los datos de los cultivos fueron analizados utilizando modelos lineales generales (GLMs) con PROC GLM en SAS, considerando la densidad de nabón y el año (para los experimentos de colza) o la estación de crecimiento (para los experimentos de trigo) como factores fijos para probar la significancia de los efectos principales y sus interacciones. En cada cultivo, ANOVA y comparación de medias mediante la prueba de LSD de Fisher fueron utilizados para determinar diferencias entre los tratamientos ($P \leq 0,05$).

Las relaciones entre el rendimiento de los cultivos y la densidad de nabón fueron analizadas para cada cultivo y año o estación de crecimiento con la función no-lineal hiperbólica rectangular propuesta por Cousens, (1985) utilizando PROC NLIN en SAS. Las relaciones de pérdidas de rendimiento son descritas por la **Ecuación 8**:

$$YL = Id / (1 + Id/A) \text{ [Ecuación 8]}$$

donde YL es el porcentaje de pérdida de rendimiento relativa al tratamiento libre de malezas, I el porcentaje de pérdida de rendimiento del cultivo por unidad de maleza cuando la densidad de maleza tiende a cero (baja densidad de maleza), d la densidad de maleza, y A el porcentaje de pérdida de rendimiento del cultivo cuando la densidad de maleza tiende a infinito (alta densidad de maleza). El parámetro I se utiliza como indicador del potencial de competitividad de la maleza (Cousens, 1985).

Para analizar las relaciones entre los caracteres de nabón (por ejemplo, biomasa seca, número de silicuas y producción de semillas) y la densidad del mismo, se realizaron análisis de regresión utilizando el software Prism (Graphpad Prism 7.0; GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las relaciones se establecieron a partir de los mejores ajustes de los datos experimentales a funciones apropiadas (lógicas), y en cada caso se muestran los coeficientes de determinación (R^2). Se utilizó ANOVA para determinar diferencias entre tratamientos en altura de planta, número de semillas por silicua y biomasa de las semillas de nabón.

El modelo hiperbólico de dos parámetros **[Ecuación 9]** fue utilizado para describir los efectos denso-dependientes de nabón sobre la biomasa seca, el número de silicuas y la producción de semillas de nabón por metro cuadrado:

$$Y = ab / (b + D) \text{ [Ecuación 9]}$$

donde Y es la biomasa seca, el número de silicuas y la producción de semillas de nabón por metro cuadrado, a la asíntota o estimación de máxima biomasa seca, número de silicuas y producción de semillas de nabón por metro cuadrado, b la estimación de la densidad de nabón en que ocurre el 50 % de la máxima biomasa seca, número de silicuas y producción de semillas y D la densidad de nabón.

El modelo de decaimiento exponencial **[Ecuación 10]** fue utilizado para describir los efectos denso-dependientes de nabón sobre la biomasa seca, el número de silicuas y la producción de semillas de nabón por planta:

$$Y = b + (a - b)^{-cD} \text{ [Ecuación 10]}$$

donde Y es la biomasa seca, el número de silicuas y la producción de semillas de nabón por planta, b es el valor de Y cuando la densidad de nabón tiende a infinito, expresada en las mismas unidades que Y , a el valor de Y cuando D tiende a cero, y D la densidad de nabón.

RESULTADOS

Colza

En ambos años, el rendimiento de colza fue sustancialmente reducido a medida que incrementó la densidad de nabón (Fig. 5.1). El análisis de los caracteres de colza reveló que no existe interacción significativa entre densidad de nabón y año en altura de planta, número de ramas, silicuas por inflorescencia y granos por silicua, por lo tanto, los datos de las dos estaciones de crecimiento fueron agrupados (Tabla 5.1 y 5.2). Sin embargo, existió interacción significativa entre densidad de maleza y año en la biomasa de los granos, por lo tanto, estos datos fueron analizados en forma separada para cada año (Tabla 5.1 y 5.2). La interferencia de nabón mostró diferencias significativas en altura de planta, número de ramas, silicuas por inflorescencia principal y granos por silicua (Tabla 5.1). La altura de planta se redujo a partir de 4 plantas de nabón m^{-2} , y los incrementos en la densidad de maleza redujeron la altura de planta entre 6,0 y 15,6 %. La densidad umbral en la que se produjo reducción significativa del número de ramas fue 2 plantas de nabón m^{-2} , y los incrementos en la densidad de nabón redujeron el número de ramas desde 7,0 a 35,7 %. Sin embargo, el número de silicuas por inflorescencia principal y el número de granos por silicua fueron reducidos solamente a altas densidades de nabón (16 plantas m^{-2}), y la reducción fue de 20,6 y 18,4 %, respectivamente (Tabla 5.1). La biomasa de los granos no fue afectada por la interferencia de nabón en 2017, pero se encontraron reducciones significativas (19,8 a 28,5 %) en la biomasa de los granos como resultado de la interferencia de nabón a densidades ≥ 8 plantas m^{-2} en 2018 (Tabla 5.1). Las funciones hiperbólicas rectangulares ($R^2 = 0,95$ y $0,93$) mostraron que la presencia de nabón redujo el rendimiento de colza por 16,8 – 15,7 % a baja densidad (parámetro I), y hasta 100 % a alta densidad (parámetro A) en 2017 ($F = 622,87$; $P < 0,0001$) y 2018 ($F = 374,18$; $P < 0,0001$) (Fig. 5.1). Los rendimientos de colza en los tratamientos libres de maleza fueron 6.706 y 4.647 $kg\ ha^{-1}$ en 2017 y 2018, respectivamente.

Trigo

En ambas estaciones de crecimiento, el rendimiento de trigo fue reducido sustancialmente a medida que incrementó la densidad de nabón. Los análisis de los caracteres de trigo revelaron ausencia de interacción significativa entre densidad de nabón y estación de crecimiento en altura de planta, espigas m^{-2} , espiguillas por espiga, granos por espiguilla y biomasa de los granos, por lo tanto, los datos de ambas estaciones de crecimiento fueron agrupados (Tabla 5.3 y 5.4). La interferencia de nabón no afectó la altura de las plantas de trigo; sin embargo, las espigas m^{-2} , las espiguillas por espiga, los granos por espiguilla y la biomasa de los grano fueron significativamente reducidos por la interferencia de nabón a

partir de 4 plantas de maleza m^{-2} , y los incrementos en la densidad de nabón redujeron entre 26,5 y 36,3 % las espigas m^{-2} , 3,7 y 7,5 % las espiguillas por espiga, 9,6 y 20,1 % los granos por espiguilla y 9,3 y 12,3 % la biomasa de los granos (Tabla 5.3). Las funciones hiperbólicas rectangulares ($R^2 = 0.93$ y 0.86) mostraron que la interferencia de nabón redujo el rendimiento de trigo 46,3 y 14,5 % a baja densidades (parámetro I), y 62,2 y 74,4 % a altas densidades de maleza (parámetro A) para el trigo ciclo largo ($F = 204,15$; $P < 0,0001$) y ciclo corto ($F = 83,83$; $P < 0,0001$), respectivamente (Fig. 5.1). Los rendimientos de trigo en los tratamientos libres de maleza fueron 8.049 y 8.538 $kg\ ha^{-1}$ en trigo ciclo largo y ciclo corto, respectivamente.

Girasol

El rendimiento de girasol fue reducido a medida que incrementó la densidad de nabón. La interferencia de nabón reveló efectos significativos sobre altura de planta, número de hojas verdes y diámetro de capítulo. La altura de planta y el número de hojas verdes se redujeron solo a alta densidad de nabón (16 plantas m^{-2}), y las reducciones fueron de 6,5 y 11,0 %, respectivamente. El diámetro de capítulo se redujo a partir de 8 plantas de nabón m^{-2} , e incrementos en la densidad de nabón redujeron el diámetro de capítulo 7,2 % (Tabla 5.5 y 5.6). Sin embargo, la interferencia de hasta 16 plantas de nabón m^{-2} no afectó significativamente el número de granos por capítulo y la biomasa de los granos (Tabla 5.5 y 5.6). La función hiperbólica rectangular ($R^2 = 0,57$) mostró que la presencia de nabón redujo ($F = 48,36$; $P < 0,0001$) el rendimiento de girasol 5,4 % a bajas densidades (parámetro I) y 12,2 % a altas densidades (parámetro A) de maleza (Fig. 5.1). El rendimiento de girasol en el tratamiento libre de malezas fue 3728 $kg\ ha^{-1}$.

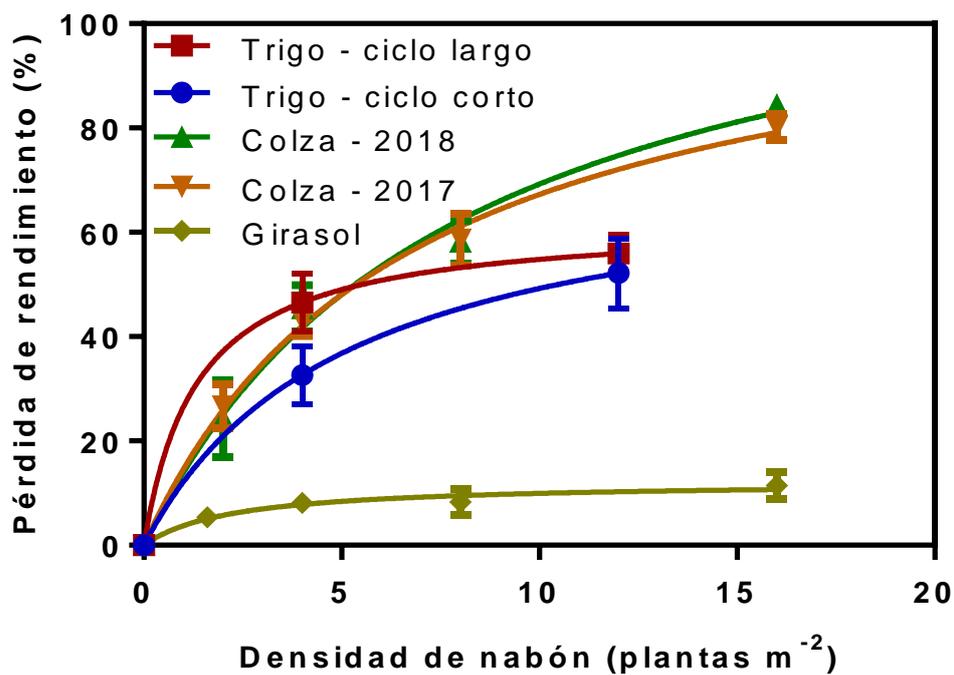


Figura 5.1. Relaciones entre densidad de nabón (plantas m⁻²) y pérdida de rendimiento (%) de los cultivos de nabón (2017 y 2018), trigo (ciclo corto y ciclo largo) y girasol descritas con un modelo no-lineal hiperbólico rectangular. Las barras verticales indican media \pm ES.

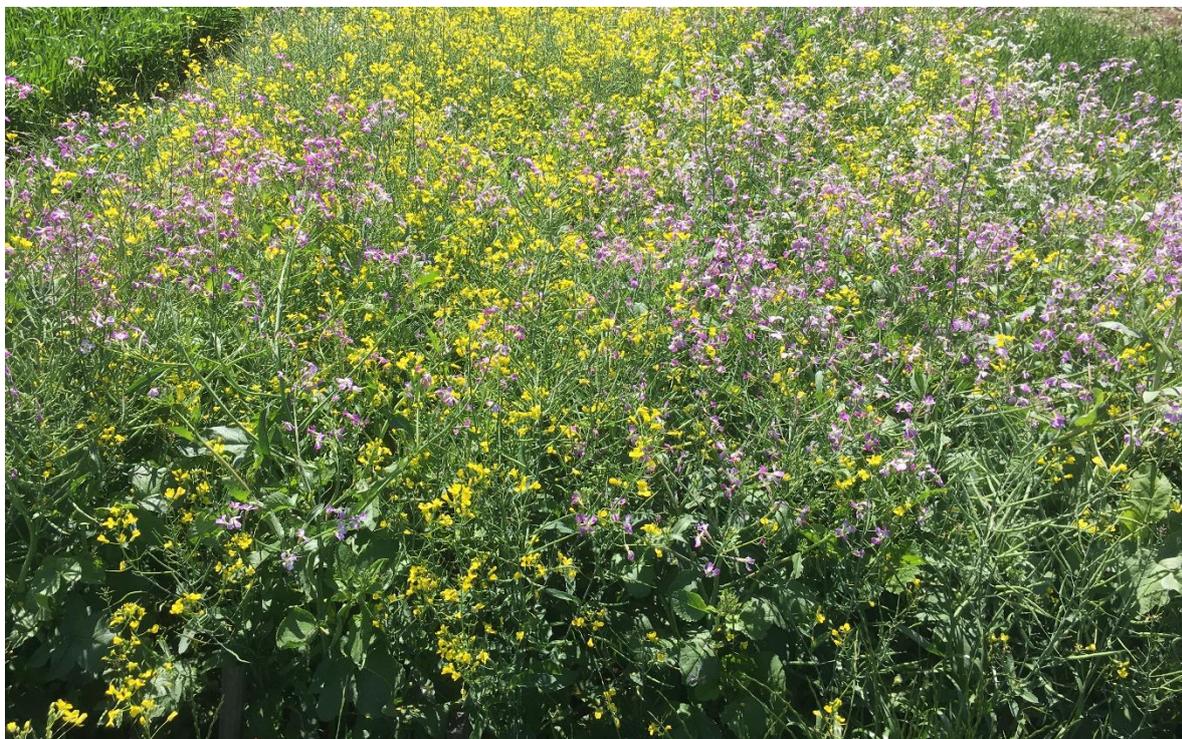


Figura 5.2. Vista del experimento de interferencia de *Raphanus sativus* (nabón) sobre el cultivo de colza.



Figura 5.3. Vista del experimento de interferencia de *Raphanus sativus* (nabón) sobre el cultivo de trigo.



Figura 5.4. Vista del experimento de interferencia de *Raphanus sativus* (nabón) sobre el cultivo de girasol.

Tabla 5.1. Rasgos de colza bajo la interferencia de cinco densidades de nabón.

Malezas m ⁻²	Altura de planta (cm)	Número de ramas	Silicuas por inflorescencia principal	Granos por silicua	Biomasa de grano (mg) - 2017	Biomasa de grano (mg) – 2018
0	99,2 ± 4,4 a	5,86 ± 0,24 a	27,6 ± 1,4 ab	17,4 ± 0,4 ab	3,27 ± 0,06	3,46 ± 0,08 a
2	97,6 ± 5,9 ab	5,30 ± 0,18 b	29,2 ± 2,0 a	17,8 ± 0,4 a	3,27 ± 0,16	3,25 ± 0,13 a
4	91,8 ± 3,9 bc	4,56 ± 0,30 c	26,6 ± 1,0 ab	17,4 ± 0,3 ab	3,20 ± 0,05	3,22 ± 0,11 a
8	92,4 ± 5,0 ab	4,66 ± 0,21 c	25,1 ± 1,6 b	16,1 ± 0,4 b	3,05 ± 0,12	2,77 ± 0,14 b
16	84,9 ± 3,2 c	3,77 ± 0,21 d	21,9 ± 1,4 c	14,2 ± 0,5 c	3,12 ± 0,10	2,46 ± 0,02 c
ANOVA	**	**	**	**	ns	**

Se presentan las medias ± ES de dos años, excepto para la variable “Biomasa de los granos” que mostró interacción densidad por año, por lo tanto, se muestran las medias ± ES para cada año (2017 y 2018). Para cada rasgo, letras distintas indican diferencias significativas (* $P \leq 0,05$ LSD de Fisher; ** $P \leq 0,01$ LSD de Fisher).

Tabla 5.2. ANOVA para los efectos de cinco densidades de nabón sobre rasgos de crecimiento y reproductivos de colza creciendo en dos años.

Efecto	Altura de planta		Número de ramas		Silicuas por inflorescencia principal		Granos por silicua		Biomasa de los granos		Biomasa de grano - 2017		Biomasa de grano - 2018	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Año (A)	108,69	<,0001	14,43	0,0009	18,84	0,0002	1,11	0,3021	7,84	0,0099	-	-	-	-
Bloque (B)	2,28	0,0702	2,85	0,0308	3,25	0,0175	0,52	0,7853	3,66	0,0101	3,54	0,0482	3,78	0,0405
Densidad (D)	6,55	0,0010	18,93	<,0001	6,57	0,0010	10,07	<,0001	16,18	<,0001	1,22	0,3522	22,61	<,0001
A x D	1,29	0,3029	0,20	0,9368	1,71	0,1802	0,15	0,9615	7,46	0,0005	-	-	-	-

Tabla 5.3. Rasgos de trigo bajo interferencia de tres densidades de nabón.

Malezas m ⁻²	Altura de planta (cm)	Espigas m ⁻²	Espiguillas por espiga	Granos por espiguilla	Biomasa de grano (mg)
0	95,7 ± 1,2	716 ± 36 a	16,0 ± 0,2 a	2,29 ± 0,06 a	43,7 ± 1,3 a
4	95,9 ± 0,8	526 ± 40 b	15,4 ± 0,1 b	2,07 ± 0,07 b	39,6 ± 1,1 b
12	96,6 ± 0,8	456 ± 29 c	14,8 ± 0,2 c	1,83 ± 0,04 c	38,3 ± 1,7 b
ANOVA	ns	**	**	**	*

Se presentan las medias ± ES de dos estaciones de crecimiento. Para cada rasgo, letras distintas indican diferencias significativas (* $P \leq 0,05$ LSD de Fisher; ** $P \leq 0,01$ LSD de Fisher).

Tabla 5.4. ANOVA para los efectos de tres densidades de nabón sobre altura y rasgos reproductivos de trigo creciendo en dos estaciones de crecimiento.

Efectos	Altura de planta		Espigas m ⁻²		Espiguillas por espiga		Granos por espiguilla		Biomasa de grano	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Estación de crecimiento (E)	14,24	0,0027	54,92	<,0001	0,21	0,6545	48,74	<,0001	20,93	0,0006
Bloque (B)	0,55	0,76	0,72	0,64	2,05	0,14	2,69	0,07	1,21	0,36
Densidad (D)	0,34	0,7190	49,50	<,0001	11,78	0,0015	61,86	<,0001	5,25	0,0230
E x D	1,71	0,22	0,60	0,57	0,05	0,95	2,23	0,15	0,62	0,55

Tabla 5.5. Rasgos de girasol bajo interferencia de cinco densidades de nabón.

Malezas m ⁻²	Altura de planta (cm)	Número de hojas verdes por planta	Área foliar (cm ²)	Diámetro de capítulo (cm)	Granos por capítulo	Biomasa de grano (mg)
0	156.3 ± 2.0 a	16.4 ± 0.7 a	361.1 ± 6.3	13.8 ± 0.4 a	1238 ± 19	47.3 ± 2.2
1.6	151.8 ± 2.7 ab	16.2 ± 0.1 ab	313.2 ± 23.5	13.6 ± 0.6 ab	1167 ± 68	47.3 ± 1.6
4	151.1 ± 1.7 ab	15.9 ± 0.6 ab	286.6 ± 5.6	13.0 ± 0.4 ab	1113 ± 39	47.3 ± 1.5
8	150.5 ± 1.8 ab	15.2 ± 0.1 ab	314.2 ± 31.5	12.8 ± 0.5 b	1099 ± 108	47.4 ± 1.2
16	146.1 ± 3.3 b	14.6 ± 0.6 b	239.9 ± 28.4	13.0 ± 0.5 ab	1094 ± 86	45.7 ± 0.8
ANOVA	*	*	ns	*	ns	ns

Se presentan las medias ± ES. Para cada rasgo, letras distintas indican diferencias significativas (* $P \leq 0,05$ LSD de Fisher'; ** $P \leq 0,01$ LSD de Fisher).

Tabla 5.6. ANOVA para los efectos de cinco densidades de nabón sobre los rasgos de crecimiento y reproductivos de girasol.

Efectos	Altura de planta		Número de hojas verdes		Área foliar		Diámetro de capítulo		Granos por capítulo		Biomasa de grano	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Bloque	3,07	0,0688	5,44	0,0135	0,28	0,8373	28,88	<,0001	7,11	0,0053	2,45	0,1138
Densidad	3,33	0,0473	4,24	0,0228	2,94	0,0661	4,96	0,0136	1,62	0,2321	0,30	0,8722

Caracteres de nabón

Los caracteres de nabón fueron más afectados en cultivos de colza y trigo respecto al girasol. La altura de planta de nabón no fue afectada por la densidad de maleza y este rasgo fluctuó entre 118.5 ± 7.9 cm y 149.0 ± 3.3 cm en los experimentos de colza y trigo. Sin embargo, la altura de planta se redujo a 65.4 ± 1.8 cm en el experimento de girasol. La biomasa seca y el número de silicuas y semillas por planta fueron dependientes de la densidad como lo indica el modelo de regresión. La biomasa seca y el número de silicuas y semillas por planta de nabón fueron reducidos a medida que incrementó la densidad de la maleza, en todos los experimentos (Tabla 5.7 y Fig. 5.5A, 5.6A y 5.7A). La biomasa seca y el número de silicuas y semillas de nabón por área también fueron dependiente de la densidad como lo indicado el modelo hiperbólico, pero a diferencia de los valores por planta, ellos tendieron a incrementar con incrementos en la densidad de la maleza (Tabla 5.7 y Fig. 5.5B, 5.6B y 5.7B). La biomasa seca y el número de silicuas y semillas de nabón en los experimentos de colza y trigo fueron al menos cuatro veces más altos que en el experimento de girasol. Por otro lado, el número de semillas por silicua y la biomasa de las semillas de nabón no fueron afectados por la densidad de la maleza en ningún experimento (datos no mostrados).

El número de semillas producidas por unidad de área incrementó con los incrementos en la densidad de nabón en todos los experimentos. El modelo hiperbólico mostro que el nabón produjo aproximadamente 4300 a 6700 y 13.800 a 31.200 semillas m^{-2} a bajas (2 plantas m^{-2}) y altas (>12 plantas m^{-2}) densidades, respectivamente, en los experimentos de colza y trigo. Sin embargo, la producción de semillas fue solo de 1000 a 4700 semillas m^{-2} a baja y alta densidad de nabón en el experimento de girasol (Fig. 5.7).

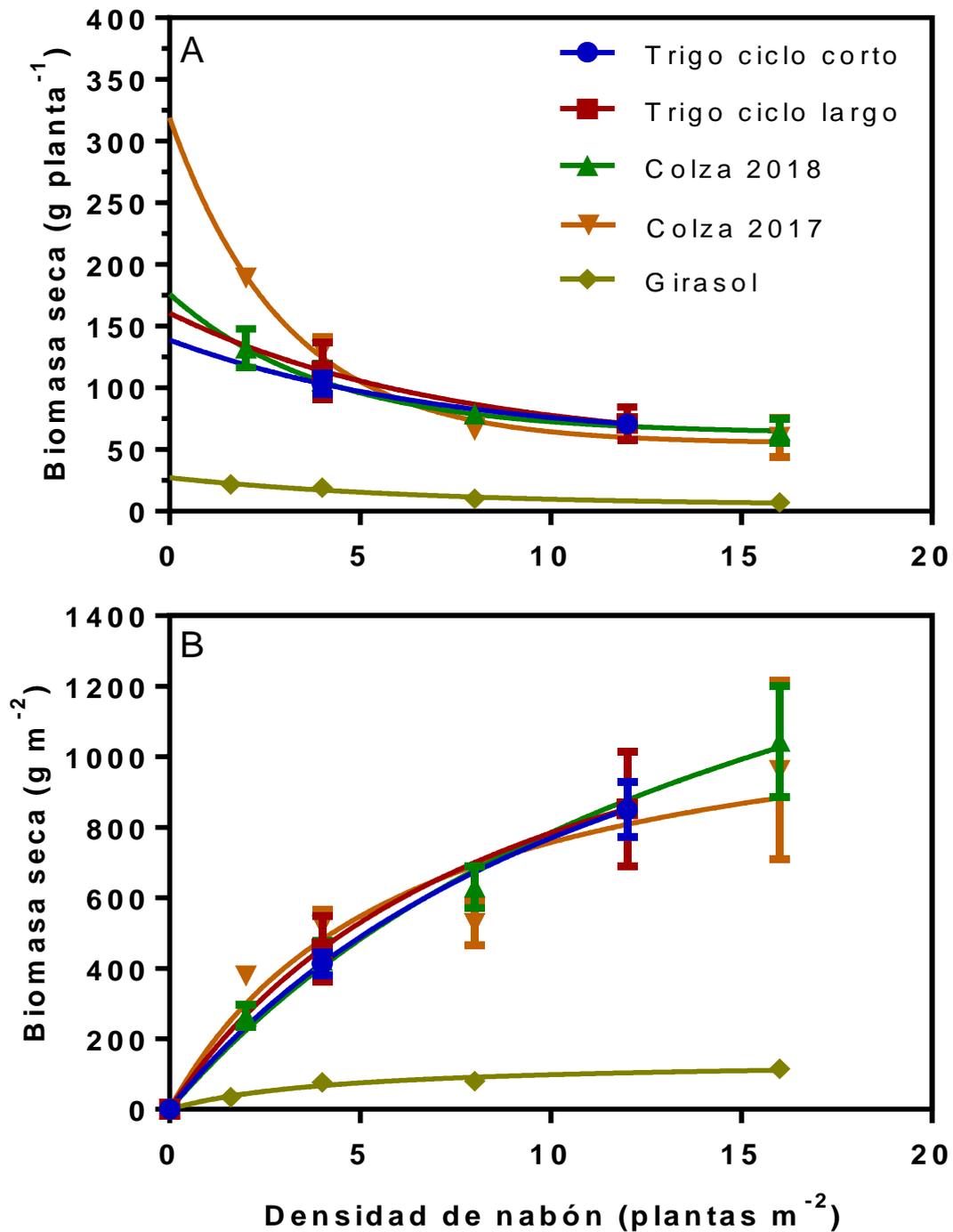


Figure 5.5. Relaciones entre la densidad de nabón y biomasa seca por planta (A) y biomasa seca por metro cuadrado (B) de nabón en colza (2017 y 2018), trigo (ciclo corto y ciclo largo) y girasol descritas por los modelos de decaimiento exponencial e hiperbólico, respectivamente. Las barras verticales indican las medias \pm ES.

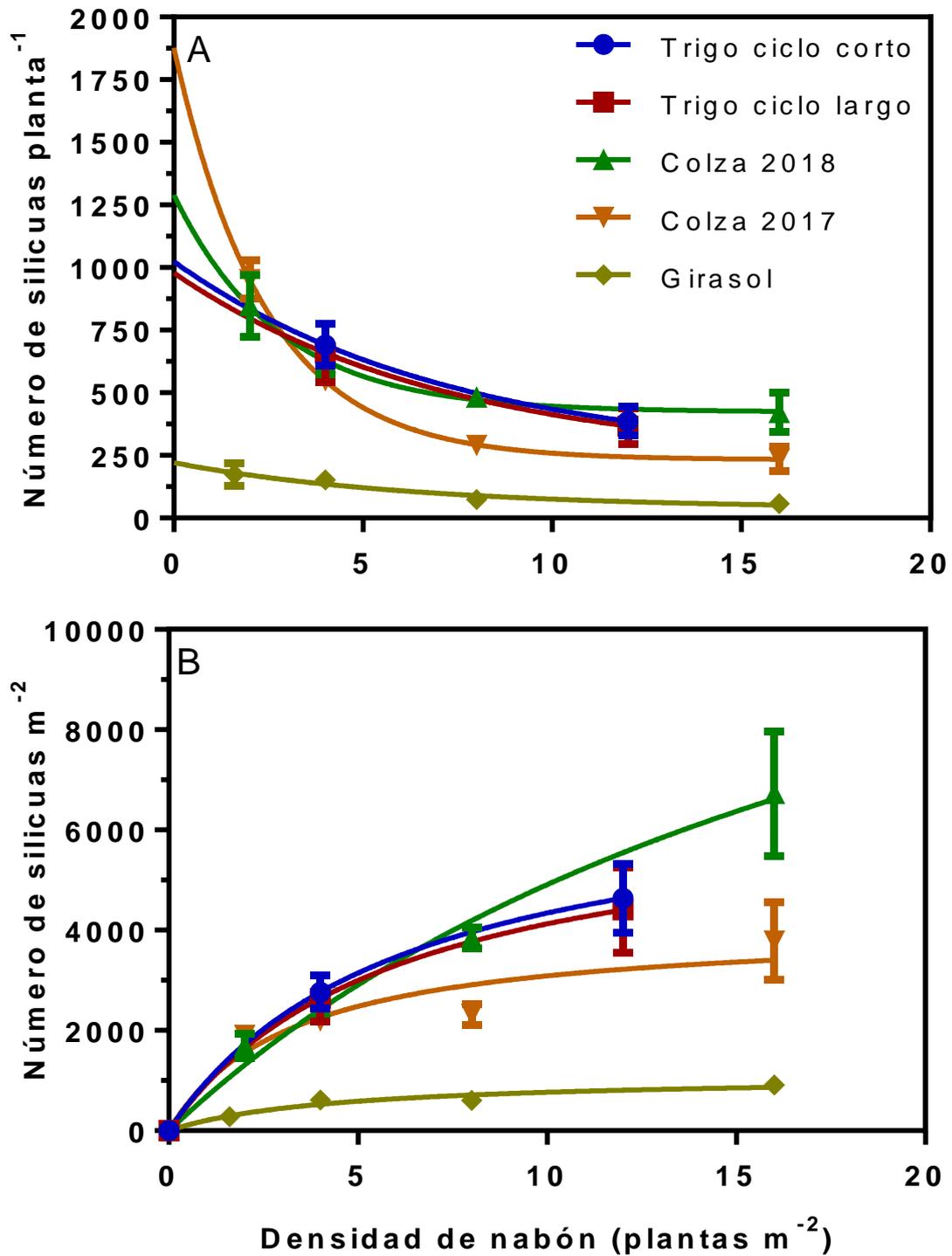


Figura 5.6. Relaciones entre la densidad de nabón y el número de silicuas por planta (A) y el número de silicuas por metro cuadrado (B) de nabón en colza (2017 y 2018), trigo (ciclo corto y ciclo largo) y girasol descritas por los modelos de decaimiento exponencial e hiperbólico, respectivamente. Las barras verticales indican las medias \pm ES.

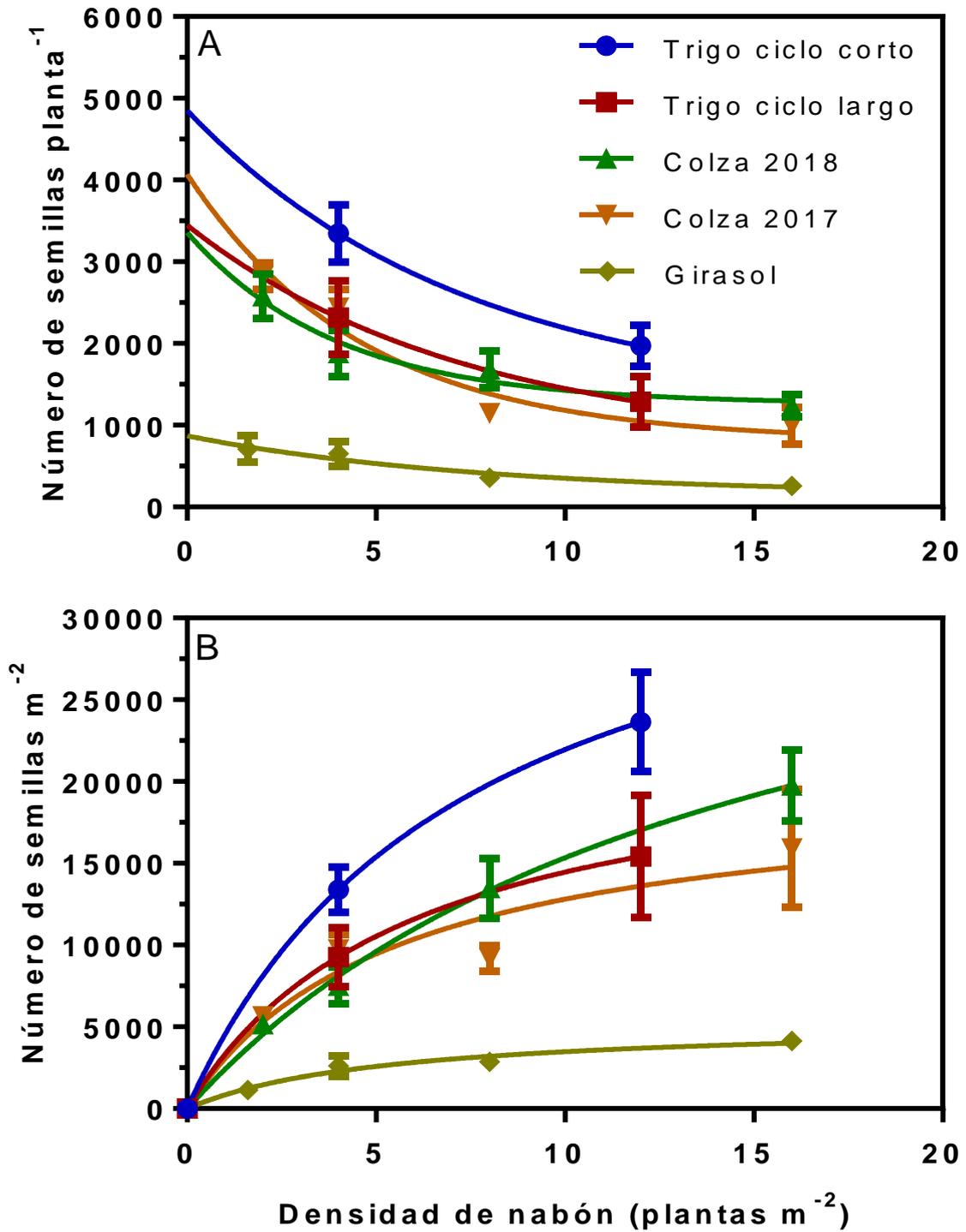


Figura 5.7. Relaciones entre densidad de nabón y el número de semillas por planta (A) y el número de semillas por metro cuadrado (B) de nabón en colza (2017 y 2018), trigo (ciclo corto y ciclo largo) y girasol descritas por los modelos de decaimiento exponencial e hiperbólico, respectivamente. Las barras verticales indican las medias \pm ES.

Tabla 5.7. Parámetros estimados para las funciones que describen el efecto de la densidad (D) de *Raphanus sativus* feral (nabón) sobre la biomasa seca, el número de silicuas y la producción de semillas por planta y por metro cuadrado

		$Y = b + (a - b)^{-cD}$					$Y = ab/(b + D)$		
		a	b	c	r ²		a	b	r ²
Colza 2017		319,3	54,95	0,3322	0,60		1225	6,19	0,86
Colza 2018	Biomasa	176,2	62,99	0,2463	0,88	Biomasa seca (g m ⁻²)	2109	16,86	0,64
Trigo ciclo largo	seca (g	160,7	49,37	0,1365	0,62		1510	9,25	0,78
Trigo ciclo corto	planta ⁻¹)	138,9	54,45	0,1365	0,30		1803	13,45	0,94
Girasol		27,3	4,56	0,1466	0,59		142	4,46	0,79
Colza 2017		1878	232,6	0,4128	0,58		4093	3,25	0,82
Colza 2018	Número de	1291	423,5	0,3611	0,91	Número de silicuas (n m ⁻²)	15758	22,10	0,72
Trigo ciclo largo	silicuas por	979	219,4	0,1365	0,44		7016	6,15	0,86
Trigo ciclo corto	planta	1024	232,7	0,1365	0,61		6618	6,04	0,78
Girasol		221	37,3	0,1564	0,50		1103	4,38	0,79
Colza 2017		4072	805	0,2160	0,55		19841	5,49	0,89
Colza 2018	Producción	3357	1261	0,2537	0,81	Producción de semillas (n m ⁻²)	38056	14,81	0,70
Trigo ciclo largo	de semillas	3448	763	0,1365	0,63		23062	5,95	0,89
Trigo ciclo corto	por planta	4852	1275	0,1365	0,37		38310	7,45	0,70
Girasol		870	149	0,1269	0,44		5338	5,33	0,79

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio revelaron que los cultivares de colza, trigo y girasol tendieron a reducir sus rendimientos con incrementos en la densidad de nabón; a pesar de ello, la interferencia fue mayor en los cultivos de invierno (es decir, colza y trigo) que en el cultivo de verano (es decir, girasol). (Fig. 5.1). La interferencia de nabón redujo principalmente el número de inflorescencias por área (representado por espigas m^{-2} en trigo y el número de ramas por planta x densidad de plantas en colza), excepto en girasol, seguido por la reducción en el tamaño de la inflorescencia y el número de granos por inflorescencia (representado por espiguillas x espiga por granos por espiguilla en trigo, silicuas por inflorescencia x granos por silicua en colza, y diámetro de capítulo y granos por capítulo en girasol), y finalmente la biomasa de los granos (Tabla 5.1, 5.3 y 5.5). La biomasa seca aérea y el número de silicuas y semillas de nabón fueron afectados por la densidad de la maleza (Fig. 5.5, 5.6 y 5.7), y fueron al menos cuatro veces mayor en los cultivos de invierno comparados con el cultivo de girasol. Sin embargo, la altura de planta, las semillas por silicua y la biomasa de las semillas de nabón no fueron afectadas por la densidad de la maleza.

La respuesta de los componentes del rendimiento de los cultivos a la interferencia de nabón varió de acuerdo al cultivo y la densidad de la maleza (Tabla 5.1, 5.3 y 5.5). En colza, la interferencia de las mayores densidades evaluadas de nabón redujo principalmente el número de ramas, seguido por el número de silicuas por inflorescencia y el número de granos por silicua (Tabla 5.1). Estos componentes del rendimiento mostraron mayor plasticidad durante la interferencia en diversos estudios (Diepenbrock, 2000; Holman *et al.*, 2004; Rondanini *et al.*, 2017). La biomasa de semilla de colza se redujo a densidades >8 plantas de nabón m^{-2} en 2018, y no fue afectada en 2017. En trigo, la interferencia de nabón redujo principalmente el número de macollos m^{-2} , seguido por granos por espiga (es decir espiguillas por espiga y granos por espiguilla) y la biomasa del grano (Tabla 5.3). En esta especie, el macollaje inicia cuando las plantas tienen tres hojas, las espiguillas por espiga y los granos por espiguilla son definidos en el estado de doble arruga y el cuaje de los granos, respectivamente, y la biomasa de los granos durante el llenado de granos en etapas avanzadas del cultivo (Zadoks *et al.*, 1974; Satorre *et al.*, 2003). Por lo tanto, la interferencia de nabón afectó tanto los componentes de rendimiento definidos temprano, como los tardíos. Resultados similares fueron encontrados en trigo y colza por la interferencia de otras especies de malezas (Holman *et al.*, 2004; Guillen-Portal *et al.*, 2006). En cambio, en girasol, la interferencia de hasta 16 plantas de nabón m^{-2} redujo el número de hojas verdes y el tamaño de las inflorescencias, y aunque no mostró

reducciones significativas en el número y peso de semillas, la combinación de estos efectos se trasladó en pérdidas significativas en el rendimiento (Fig. 5.5).

En consecuencia, la interferencia de nabón redujo el rendimiento de los tres cultivos evaluados. El modelo hiperbólico rectangular estimó pérdidas de rendimiento que fluctuaron de 15 a 17 % y 14 a 46 % a baja y 100 % y entre 62 a 74 % a altas densidades de maleza en colza y trigo, respectivamente. En trigo, a bajas densidades, la interferencia de nabón fue mayor sobre el trigo ciclo largo que sobre el trigo ciclo corto, y ello no fue debido a diferencias en el crecimiento de nabón (la biomasa seca aérea total de nabón entre experimentos no fue diferente) (Fig. 5.5). Este efecto fue posiblemente debido a la menor tasa de crecimiento del trigo durante el invierno y/o al efecto de diferentes variedades de trigo. La interferencia de bajas (4 plantas m⁻²) y altas (>60 plantas m⁻²) densidades del pariente silvestre *R. raphanistrum* redujeron el rendimiento de colza en 9 y 90 %, respectivamente (Blackshaw *et al.*, 2002), y el rendimiento del trigo (estimado mediando el modelo hiperbólico rectangular) entre 0,9 y 1 % y 43 y 47 %, respectivamente (Eslami *et al.*, 2006). La interferencia de nabón sobre el rendimiento de colza y trigo observada en el presente estudio podría ser superior a las encontradas para la interferencia de pariente silvestre *R. raphanistrum*.

Por otro lado, el modelo hiperbólico rectangular estimó pérdidas en el rendimiento en girasol que oscilaron entre 5 y 12 % a bajas y altas densidades de nabón. Estos resultados fueron similares a los encontrados para la interferencia de nabón sobre el cultivo de soja (Bianchi *et al.*, 2011); sin embargo, fueron diferentes a los encontrados por Pandolfo (2016), que mostró pérdidas de rendimiento de girasol que fluctuaron entre 9 y 79 % a bajas y altas (>30 plantas m⁻²) densidades de nabón en condiciones de campo a nivel comercial. Es posible que las diferencias con nuestro estudio estén asociadas al momento de emergencia de la maleza respecto al cultivo. La emergencia de nabón en el campo a nivel comercial podría haber sido previa a la emergencia de girasol, y ha sido demostrado que las malezas que emergen previo al cultivo son por lejos las más competitivas y resultan las mayores pérdidas de rendimiento (Swanton *et al.*, 2015).

La mayor interferencia provocada por la presencia de nabón sobre los cultivos invernales (es decir, colza y trigo) respecto al girasol podrían haber ocurrido debido a que el nabón es una maleza invernal (Snow and Campbell, 2005), y mostró mayor tamaño de planta en invierno que en verano (Fig. 5.1 y 5.7; Capítulo 2). La plantas de nabón criadas en interferencia con girasol mostraron aproximadamente 6 veces menos biomasa seca que las criadas en colza y trigo (Fig. 5.5A). Una explicación alternativa podría ser que la rápida elongación del tallo y expansión

foliar características de las plantas de girasol (Presotto *et al.*, 2017) podrían haber sombreado a las plantas de nabón y reducido su crecimiento. Además, las raíces de las plantas de girasol podrían haber explorado mayor profundidad de suelo que las raíces de trigo y colza, sugiriendo diferentes patrones de utilización de recursos, y en consecuencia una ventaja respecto a los cultivos invernales (Jaafar *et al.*, 1993; Nielsen 1997). Sin embargo, para aseverar nuestras inferencias es necesario establecer una sincronía en el uso de los recursos a lo largo del ciclo de los cultivos.

La producción de semillas en las poblaciones de malezas resistentes a herbicidas es una preocupación entre los agricultores y técnicos alrededor del mundo (Norsworthy *et al.*, 2012). Resultados de este estudio mostraron alta producción de semillas en nabón que fluctuó entre 4.300 y 31.200 semillas m^{-2} en los cultivos de invierno y entre 1.000 y 4.100 semillas m^{-2} en girasol. Eslami *et al.* (2006) informó que la producción de semillas en *R. raphanistrum* fue de aproximadamente 10.000 semillas m^{-2} a >20 plantas m^{-2} que crecieron en interferencia con trigo, y Blackshaw *et al.* (2002) informó que la producción de semillas en *R. raphanistrum* fluctuó aproximadamente entre 5.000 y 25.000 semillas m^{-2} a 4 y >30 plantas m^{-2} (Blackshaw *et al.*, 2002). Las semillas de nabón no tienen dormición primaria, pero los requerimientos de luz y la presencia del pericarpio indehisciente tienen el potencial de prevenir, retrasar y dispersar la germinación de una cohorte por un período de tiempo extendido (Capítulo 1 y 3) y por lo tanto dificultar el control de nabón debido a la falta de sincronización en la germinación (Chauhan *et al.*, 2006a). Esto dificulta el manejo del banco de semillas y hace a la erradicación de las poblaciones de nabón resistente a herbicidas AHAS realmente muy difícil de lograr.

Los resultados de este Capítulo proveen nueva información sobre el efecto de la interferencia de nabón sobre los cultivos de invierno y de verano. La interferencia de nabón durante toda la estación de crecimiento de los cultivos puede resultar en grandes pérdidas de rendimiento, indicando que puede ser perjudicial para los rendimientos de los cultivos cuando emerge antes o al mismo tiempo que el cultivo, y consecuentemente causa graves pérdidas económicas en colza, trigo y girasol. Minimizar las pérdidas de los rendimientos causadas por la interferencia de nabón y evitar o reducir la producción de semillas de malezas resistentes para prevenir la reposición del banco y la re-infestación posterior en los años subsiguientes, requiere el desarrollo e implementación de programas de manejo de malezas a largo plazo, diversos y efectivos, que deben considerar el uso de todos los recursos culturales, mecánicos y opciones químicas disponibles para el control efectivo de las malezas en cada situación en particular (Norsworthy *et al.*, 2012; Korres *et al.*, 2019; Scursoni *et al.*, 2019). Sin embargo, el nabón es

una especie que produce abundantes silicuas/semillas con prolongado e irregular patrón de emergencia, y la emergencia de las plántulas puede ocurrir a través de toda la estación de crecimiento de los cultivos (Capítulo 1 y 3). Futuras investigaciones deberían ser llevadas a cabo para determinar la interferencia y producción de semillas de nabón emergiendo en diferentes momentos luego de la siembra de los cultivos.

Nuestros resultados revelaron pérdidas de rendimiento en los cultivos de colza, trigo y girasol debido a la interferencia de nabón. La interferencia redujo principalmente el número de inflorescencias por área (excepto en girasol), seguido por la reducción en el tamaño de la inflorescencia y el número de granos por inflorescencia, y finalmente la biomasa de los granos; y fue mayor en los cultivos de invierno (colza y trigo) que en el de verano (girasol).

CONSIDERACIONES FINALES

La presente tesis se enfocó en abordar distintos aspectos relacionados con los mecanismos de control de la germinación en la maleza *Raphanus sativus*, así como los posibles efectos pleitrópicos de la mutación de resistencia a herbicidas AHAS Trp-574-Leu que podrían afectar la evolución de las poblaciones resistentes y el efecto de la interferencia de las plantas de nabón resistentes sobre los componentes del rendimiento y el rendimiento de los cultivos de trigo, colza y girasol.

Nuestros resultados revelaron que las semillas aisladas recién cosechadas de nabón no tienen dormición primaria, pero que la germinación fue parcialmente inhibida por la exposición a la luz y/o la presencia del pericarpio, especialmente a bajas temperaturas. El pericarpio impuso dormición fisiológica por restricción mecánica del endocarpio a la expansión del embrión y/o a la completa absorción de agua por las semillas dentro de las silicuas, que es consistente con el tipo de dormición encontrado en otras especies de Brassicaceae con frutos indehiscentes. Sin embargo, el almacenamiento en seco hasta 30 meses pos-cosecha y el almacenamiento en condiciones invernales fueron totalmente ineficientes para romper la dormición impuesta por el pericarpio, sugiriendo la aceptación parcial de la primera hipótesis (Página 25).

Los requerimientos de oscuridad encontrados en este estudio podrían provocar que las semillas y silicuas de nabón permanezcan en la superficie del suelo sin germinar, formando un banco de semillas superficial, hasta ser enterradas por las labores de labranza y/o siembra. Ello junto con la restricción mecánica del pericarpio tendrían el potencial de distribuir o escalonar la germinación de una cohorte durante un período de tiempo prolongado, y/o de retrasar la emergencia de las plántulas hasta la siguiente o subsiguiente estación de crecimiento después de la maduración de las semillas, resultando en la formación de un banco de semillas persistente en el suelo. Esto podría, además de dificultar el control de las poblaciones de nabón en las áreas cultivadas, actuar como refugio al provocar retraso tanto en la evolución de la resistencia a herbicidas como en la reducción de las poblaciones resistentes.

Los resultados presentados revelaron diferencias significativas en la germinación y emergencia entre los individuos resistentes y susceptibles de nabón provenientes de la misma población, y su vez, estos efectos parecen ser modificados por el ambiente, sugiriendo el rechazo de la tercera hipótesis (Página 25). El biotipo resistente mostró mayor germinación en semillas y silicuas expuestas a la luz a temperaturas medias y altas, y mayor germinación en las semillas colocadas sobre la superficie del suelo respecto al biotipo susceptible. Esto podría resultar en mayor germinación y emergencia en el biotipo resistente respecto al susceptible en sistemas

agrícolas que “podrían asemejarse” a labranza cero, ampliamente utilizados en nuestro país, en aquellas condiciones en que las semillas quedan expuestas sobre la superficie. Si ello fuera así, podría facilitar la evolución de la resistencia a herbicidas en estos ambientes. Sin embargo, el efecto encontrado podría estar influenciado por el ambiente de selección. El biotipo susceptible fue seleccionado en un ambiente ruderal y el resistente en un ambiente agrestal. En consecuencia, los resultados encontrados en este estudio podrían haber surgido a partir de la selección provocada por las prácticas agrícolas (por ejemplo, competencia con cultivos, aplicaciones de herbicidas, fertilización, labores de siembra y cosecha) independientemente de la evolución de la resistencia a herbicidas.

Por otro lado, no se encontraron diferencias entre biotipos en la germinación en condiciones de oscuridad, ni en la emergencia a partir de semillas y silicuas enterradas. Esto podría sugerir que las labores de labranza y siembra, que podrían promover la emergencia al cumplir los requerimientos de oscuridad y la ruptura de pericarpio, no tendrían un impacto considerable en la emergencia entre individuos susceptibles y resistentes dentro de una población, y consecuentemente no afectaría la evolución de la frecuencia de los alelos resistentes.

En condiciones de secano, el biotipo resistente retrasó y redujo la emergencia final de plántulas, mientras que no se encontraron diferencias entre biotipos en la emergencia en ambientes con alta disponibilidad hídrica. Estos resultados y los obtenidos para la primera hipótesis podrían ser incorporados en modelos que simulen la emergencia de plántulas y la evolución de la resistencia a herbicidas para diseñar estrategias de manejo para prevenir o retrasar la dispersión de los alelos resistentes y reducir el aporte al banco de semillas. Además, futuros experimentos deberían estar enfocados en la evaluación del comportamiento de las silicuas en la superficie del suelo (labranza cero) y el posible rol de la dormición secundaria.

Además, suficiente evidencia fue encontrada para refutar la segunda hipótesis (Página 25) ante resultados que revelaron que la mutación Trp-574-Leu impone efectos pleiotrópicos negativos sobre la actividad de la enzima AHAS y los caracteres reproductivos de nabón en ambientes con y sin interferencia con cultivos. Estos costos biológicos podrían reducir la frecuencia de los alelos resistentes y la velocidad de propagación de las poblaciones resistentes en ambientes sin selección por herbicidas AHAS.

Finalmente, nuestros resultados revelaron pérdidas de rendimiento en los cultivos de colza, trigo y girasol debido a la interferencia de nabón. La interferencia de nabón redujo el número de inflorescencias por área (representado por espigas m^{-2} en trigo y el número de ramas por planta

x densidad de plantas en colza), excepto en girasol, el tamaño de la inflorescencia y el número de granos por inflorescencia (representado por espiguillas por espiga x granos por espiguilla en trigo, silicuas por inflorescencia x granos por silicua en colza, y diámetro de capítulo y granos por capítulo en girasol) y finalmente la biomasa de grano. La interferencia fue mayor en los cultivos de invierno (colza y trigo) que en el de verano (girasol). Minimizar las pérdidas de los rendimientos causadas por la interferencia de nabón y evitar o reducir la producción de semillas de malezas resistentes requiere el desarrollo e implementación de programas de manejo de malezas a largo plazo, considerando el uso de todos los recursos culturales, mecánicos y químicos disponibles para el control efectivo de las malezas en cada situación en particular. Futuras investigaciones deberían analizar la intensidad de la competencia por recursos durante todo el ciclo de los cultivos y la maleza, y abordar la interferencia y producción de semillas de nabón emergiendo en diferentes momentos luego de la siembra de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirrezábal LAN, Orioli G, Hernández L, Pereyra V, Miravé J** (1996) *Girasol. Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento*. Unidad Integrada Balcarce. Buenos Aires. Argentina.
- Alexandratos N, Bruinsma J** (2012) *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. Rome.
- Andrade A, Riera N, Lindstrom L, Alemano S, Alvarez D, Abdala G, Vigliocco A** (2015) Pericarp anatomy and hormone profiles of cypselas in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. *Plant Biology* **17**, 351–360.
- Ashigh J, Tardif FJ** (2007) An Ala205val substitution in acetohydroxyacid synthase of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) reduces sensitivity to herbicides and feedback inhibition. *Weed Science* **55**, 558–565.
- Ashigh J, Tardif FJ** (2009) An amino acid substitution at position 205 of acetohydroxyacid synthase reduces fitness under optimal light in resistant populations of *Solanum ptychanthum*. *Weed Research* **49**, 479–489.
- Ashigh J, Tardif FJ** (2011) Water and temperature stress impact fitness of acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicide-resistant populations of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*). *Weed Science* **59**, 341–348.
- Bagavathiannan MV, Norsworthy JK** (2012) Late-season seed production in arable weed communities: management implications. *Weed Science* **60**, 325–334.
- Bajwa AA** (2014) Sustainable weed management in conservation agriculture. *Crop Protection* **65**, 105–113.
- Barrett SH** (1983) Crop mimicry in weeds. *Economic Botany* **37**, 255–282.
- Baskin JM, Baskin CC** (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* **14**, 1–16.
- Baskin CC, Baskin JM** (2014) *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, 2nd edn*. Elsevier/Academic Press, San Diego. Second. Oxford, UK.
- Batlla D, Benech-Arnold RL** (2014) Weed seed germination and the light environment: Implications for weed management. *Weed Biology and Management* **14**, 77–87.

- Baucom RS** (2019) Evolutionary and ecological insights from herbicide-resistant weeds: what have we learned about plant adaptation, and what is left to uncover?. *New Phytologist*, **223**: 68–82
- Beckie HJ** (2006) Herbicide-resistant weeds: Management ractics and practices. *Weed Technology* **20**, 793–814.
- Bergelson J, Purrington CB** (1996) Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The American naturalist* **148**, 536–558.
- Bianchi M, Fleck N, Agostinetto D, Rizzardi M** (2011) Interferência de *Raphanus sativus* na produtividade de cultivares de soja. *Planta Daninha* **29**, 783–792.
- Blackshaw RE, Lemerle D, Young KR** (2002) Influence of wild radish on yield and quality of canola. *Weed Science* **50**, 344–349.
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MHH, White JSS** (2009) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* **24**, 127–135.
- Bourgeois B, Munoz F, Fried G, Mahaut L, Armengot L, Denelle P, Storkey J, Gaba S, Violle C** (2019) What makes a weed a weed? A large-scale evaluation of arable weeds through a functional lens. *American Journal of Botany* **106**, 90–100.
- Breccia G, Vega T, Felitti SA, Picardi L, Nestares G** (2013) Differential expression of acetohydroxyacid synthase genes in sunflower plantlets and its response to imazapyr herbicide. *Plant Science* **208**, 28–33.
- Burgos NR, Streibig JC, Ritz C, Shaner D, Norsworthy JK, Davis VM, Tranel PJ** (2013) Review: Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. *Weed Science* **61**, 4–20.
- Carta A, Skourti E, Mattana E, Vandellook F, Thanos CA** (2017) Photoinhibition of seed germination: occurrence, ecology and phylogeny. *Seed Science Research* **27**, 131–153.
- Carvalho FP** (2006) Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy* **9**, 685–692.
- Chauhan BS, Johnson DE** (2010) The role of seed ecology in improving weed management strategies in the tropics. *Advances in Agronomy* **105**, 221–262.

- Chauhan BS, Gill GS, Preston C** (2006a) Tillage system effects on weed ecology, herbicide activity and persistence: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **46**, 1557–1570.
- Chauhan BS, Gill GS, Preston C** (2006b) Seedling recruitment pattern and depth of recruitment of 10 weed species in minimum tillage and no-till seeding systems. *Weed Science* **54**, 658–668.
- Cheam AH** (1986) Seed production and seed dormancy in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) and some possibilities for improving control. *Weed Research* **26**, 405–413.
- Chen J, Huang Z, Zhang C, Huang H, Wei S, Chen J, Wang X** (2015) Molecular basis of resistance to imazethapyr in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.) populations from China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **124**, 43–47.
- Cobb AH, Reade JPH** (2010) *Herbicides and plant physiology, 2nd edn*. A John Wiley & Sons, Ltd. Newport, Shropshire, UK.
- Costa LO, Rizardi MA** (2014) Resistance of *Raphanus raphanistrum* to the herbicide metsulfuron-methyl. *Planta Daninha* **32**, 181–187.
- Cousens R** (1985) A simple model relating yield loss to weed density. *Annals of Applied Biology* **107**, 239–252.
- Cousens RD, Fournier-Level A** (2018) Herbicide resistance costs: what are we actually measuring and why? *Pest Management Science* **74**, 1539–1546.
- Cousens RD, Young KR, Tadayyon A** (2010) The role of the persistent fruit wall in seed water regulation in *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *Annals of Botany* **105**, 101–108.
- Cross RB, McCarty LB, McElroy JS, Tharayil N, Bridges WC** (2015) Comparison of enzyme and growth characteristics in ALS-inhibitor susceptible and resistant annual bluegrass (*Poa annua*) biotypes. *Weed Science* **63**, 220–228.
- Dai L, Dai W, Song X, Lu B, Qiang S** (2014) A comparative study of competitiveness between different genotypes of weedy rice (*Oryza sativa*) and cultivated rice. *Pest Management Science* **70**, 113–122.
- Darmency H, Menchari Y, Le Corre V, Délye C** (2015) Fitness cost due to herbicide resistance may trigger genetic background evolution. *Evolution* **69**, 271–278.

- Darmency H, Colbach N, Le Corre V** (2017) Relationship between weed dormancy and herbicide rotations: implications in resistance evolution. *Pest Management Science* **73**, 1994–1999.
- Délye C, Menchari Y, Michel S, Cadet É, Le Corre V** (2013) A new insight into arable weed adaptive evolution: Mutations endowing herbicide resistance also affect germination dynamics and seedling emergence. *Annals of Botany* **111**, 681–691.
- Diepenbrock W** (2000) Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Field Crops Research* **67**, 35–49.
- Donohue K, Dorn L, Griffith C, Kim E, Aguilera A, Polisetty CR, Schmitt J** (2005a) Niche construction through germination cueing: Life-history responses to timing of germination in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution* **59**, 771–785.
- Donohue K, Dorn L, Griffith C, Kim E, Aguilera A, Polisetty CR, Schmitt J** (2005b) Environmental and genetic influences on the germination of *Arabidopsis thaliana* in the field. *Evolution* **59**, 740–757.
- Donohue K, Heschel MS, Chiang GCK, Butler CM, Barua D** (2007) Phytochrome mediates germination responses to multiple seasonal cues. *Plant, Cell and Environment* **30**, 202–212.
- Donohue K, Rubio de Casas R, Burghardt L, Kovach K, Willis CG** (2010) Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **41**, 293–319.
- Doyle JJ, Doyle JL** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11–15.
- Duggleby RG, McCourt JA, Guddat LW** (2008) Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 309–324.
- Dyer W, Chee P, Fay P** (1993) Rapid germination of sulfonylurea-resistant *Kochia scoparia* L. accessions is associated with elevated seed levels of branched chain amino acids. *Weed Science* **41**, 18–22.
- Eberlein CV, Guttieri MJ, Berger PH, Fellman JK, Mallory-smith CA, Thill DC, Baerg RJ, Belknap WR, Eberlein CV, Berger PH** (1999) Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor resistance. *Weed Science* **47**, 383–392.

- Eslami SV, Gill GS, Bellotti B, McDonald G** (2006) Wild radish (*Raphanus raphanistrum*) interference in wheat. *Weed Science* **54**, 749–756.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**, 501–523.
- Footitt S, Huang Z, Clay HA, Mead A, Finch-Savage WE** (2013) Temperature, light and nitrate sensing coordinate Arabidopsis seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. *Plant Journal* **74**, 1003–1015.
- Forcella F, Benec Arnold RL, Sanchez R, Ghera CM** (2000) Modeling seedling emergence. *Field Crops Research* **67**, 123–139.
- Forlani G, Mantelli M, Nielsen E** (1999) Biochemical evidence for multiple acetoin-forming enzymes in cultured plant cells. *Phytochemistry* **50**, 255–262.
- Gage KL, Gibson DJ, Young BG, Young JM, Matthews JL, Weller SC, Wilson RG** (2015) Occurrence of an herbicide-resistant plant trait in agricultural field margins. *Ecology and Evolution* **5**, 4161–4173.
- Ghera CM, Martinez-Ghera MA, Brewer TG, Roush ML** (1994) Selection pressures for diclofop-methyl resistance and germination time of Italian ryegrass. *Agronomy Journal* **86**, 823–828.
- Gianessi LP** (2013) The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest Management Science* **69**, 1099–1105.
- Goldberg DE** (1990) *Components of resource competition in plant communities*, pp. 27–49 in Grace JB y Tilman D (Eds.) *Perspectives on Plant Competition*. San Diego, California, Academic Press, Inc.
- Gressel J**, (2009) Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest Management Science* **65**, 1164–1173.
- Grime JP** (1977) Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist* **111**, 1169–1194.
- Guillen-Portal FR, Stougaard RN, Xue Q, Eskridge KM** (2006) Compensatory mechanisms associated with the effect of spring wheat seed size on wild oat competition. *Crop Science* **46**, 935–945.

- Han H, Yu Q, Purba E, Li M, Walsh M, Friesen S, Powles SB** (2012) A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. *Pest Management Science* **68**, 1164–1170.
- Hashem A, Dhammu HS** (2002) Cross-resistance to imidazolinone herbicides in chlorsulfuron-resistant *Raphanus raphanistrum*. *Pest Management Science* **58**, 917–919.
- Hashem A, Bowran D, Piper T, Dhammu H** (2001) Resistance of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in the Western Australia wheat belt. *Weed Technology* **15**, 68–74.
- Hashem A, Wilkins N** (2002) Competitiveness and persistence of wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) in a wheat-lupin rotation. En Proceedings of the 13th Australian Weed Conference. Perth, Australia: Council of Australian Weed Science Society, pp. 712–715.
- Heap IM** (1997) The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science* **51**, 235–243.
- Heap I** (2019) *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*. Internet. 28 de agosto, 2019. Disponible en: www.weedscience.org
- Heap I, Knight R** (1986) The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofop-methyl. *Australian Journal of Agricultural Research* **37**, 149–156.
- Heschel MS, Selby J, Butler C, Whitelam GC, Sharrock RA, Donohue K** (2007) A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *New Phytologist* **174**, 735–741.
- Hicks HL, Comont D, Coutts SR, Crook L, Hull R, Norris K, Neve P, Childs DZ, Freckleton RP** (2018) The factors driving evolved herbicide resistance at a national scale. *Nature Ecology & Evolution* **2**, 529–536.
- Hoffmann WA, Poorter H** (2002) Avoiding bias in calculations of relative growth rate. *Annals of Botany* **90**, 37–42.
- Holman JD, Bussan AJ, Maxwell BD, Miller PR, Mickelso JA** (2004) Spring wheat, canola, and sunflower response to persian darnel (*Lolium persicum*) interference. *Weed Technology* **18**, 509–520.
- Hu XW, Wang YR, Wu YP** (2009) Effects of the pericarp on imbibition, seed germination, and

- seedling establishment in seeds of *Hedysarum scoparium* Fisch. et Mey. *Ecological Research* **24**, 559–564.
- Ibarra FE** (1937) *Malezas más comunes del trigo y del lino*, in *Almanaque del Ministerio de Agricultura*. Ministry of Agriculture, Buenos Aires, pp. 405–410.
- Jaafar MN, Stone LR, Goodrum DE** (1993). Rooting depth and dry matter development of sunflower. *Agronomy Journal* **85**, 281–286.
- Kaneko Y, Kimizuka-takagi C, Bang SW, Matsuzawa Y** (2007) *Radish*, in *Kole C (ed.) Vegetables. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants* **5**, 141–160.
- Kaneko Y, Woo Bang S, Matsuzawa Y** (2011) *Raphanus, wild crop relatives*, in *Kole C (ed.) Vegetables. Genomic and breeding resources*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Germany, pp. *Kaneko, Yukio Bang, Sang Woo, Matsuzawa, Yasuo*, pp. 247–258.
- Keshtkar E, Mathiassen SK, Beffa R, Kudsk P** (2017) Seed germination and seedling emergence of blackgrass (*Alopecurus myosuroides*) as affected by non-target-site herbicide resistance. *Weed Science* **65**, 732–742.
- Keshtkar E, Zand E, Sasanfar H, Kudsk P, Dayan FE, Abdolshahi R, Beffa R** (2019) Assessing fitness costs from a herbicide-resistance management perspective: A review and insight. *Weed Science* **67**, 137–148.
- Kettenring KM, Gardner G, Galatowitsch SM** (2006) Effect of light on seed germination of eight wetland *Carex* species. *Annals of Botany* **98**, 869–874.
- Korres NE, Burgos NR, Travlos I, Vurro M, Gitsopoulos TK, Varanasi VK, Duke SO, Kudsk P, Brabham C, Rouse CE, Salas-Perez R** (2019) New directions for integrated weed management: Modern technologies, tools and knowledge discovery. *Advances in Agronomy* **155**, 243–319.
- Koziol L, Rieseberg LH, Kane N, Bever JD** (2012) Reduced droughty tolerance during domestication and the evolution of weediness results from tolerance-growth trade-offs. *Evolution* **66**, 3803–3814.
- Kraehmer H, van Almsick A, Beffa R, Dietrich H, Eckes P, Hacker E, Hain R, Streck HJ, Stuebler H, Willms L** (2014) Herbicides as weed control agents: state of the art: II. Recent achievements. *Plant physiology* **166**, 1132–48.

- Lamego FP, Ruchel Q, Kaspary TE, Gallon M, Basso CJ, Santi AL** (2013) Habilidade competitiva de cultivares de trigo com plantas daninhas. *Planta Daninha* **31**, 521–531.
- Légère A, Stevenson FC, Beckie HJ, Warwick SI, Johnson EN, Hrynewich B, Lozinski C** (2013) Growth characterization of kochia (*Kochia scoparia*) with substitutions at Pro 197 or Trp 574 conferring resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Science* **61**, 267–276.
- Leguizamón ES** (2009) *Herbicidas. La agricultura y el manejo de las malezas en la región pampeana. En: Ricci D (Ed.). La Argentina 2050. La revolución tecnológica del agro. Buenos Aires: CASAFA, 2009. pp. 400-416.*
- 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 Management Science* **69**, 689–695.
- Liu Y, Li Y, Wang X** (2016) Acetohydroxyacid synthases: evolution, structure, and function. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**, 8633–8649.
- Lu JJ, Zhou YM, Tan DY, Baskin CC, Baskin JM** (2015a) Seed dormancy in six cold desert Brassicaceae species with indehiscent fruits. *Seed Science Research* **25**, 276–285.
- Lu JJ, Tan DY, Baskin JM, Baskin CC** (2015b) Post-release fates of seeds in dehiscent and indehiscent siliques of the diaspore heteromorphic species *Diptychocarpus strictus* (Brassicaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **17**, 255–262.
- Lu JJ, Tan DY, Baskin CC, Baskin JM** (2017a) Role of indehiscent pericarp in formation of soil seed bank in five cold desert Brassicaceae species. *Plant Ecology* **218**, 1187–1200.
- Lu JJ, Tan DY, Baskin CC, Baskin JM** (2017b) Delayed dehiscence of the pericarp: role in germination and retention of viability of seeds of two cold desert annual Brassicaceae species. *Plant Biology* **19**, 14–22.
- Madafiglio G, Medd R, Cornish P** (1999) A decimal code for the growth and development stages of wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.). *Plant Protection Quarterly* **14**, 143–146.
- Malik MS, Norsworthy JK, Riley MB, Bridges W** (2010) Temperature and light requirements for wild radish (*Raphanus raphanistrum*) germination over a 12-month period following maturation. *Weed Science* **58**, 136–140.

- Mallory-Smith CA, Thill DC, Dial MJ** (1990) Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* **4**, 163–168.
- Mamut J, Tan DY, Baskin CC, Baskin JM** (2014) Role of trichomes and pericarp in the seed biology of the desert annual *Lachnoloma lehmannii* (Brassicaceae). *Ecological Research* **29**, 33–44.
- Marion SM, Davis VM, Stoltenberg DE** (2017) Characterization of Wisconsin giant ragweed (*Ambrosia trifida*) resistant to cloransulam. *Weed Science* **65**, 41–51.
- Marshall EJP, Moonen AC** (2002) Field margins in northern Europe: their functions and interactions with agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **89**, 5–21.
- Martínez-Ghersa MA, Ghersa CM, Satorre EH** (2000) Coevolution of agricultural systems and their weed companions: implications for research. *Field Crops Research* **67**, 181–190.
- Marzocca A** (1976) *Manual de malezas. 3.ed. Buenos Aires: Hemisferio Sur, pp. 552.*
- Massa D, Krenz B, Gerhards R** (2011) Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. *Weed Research* **51**, 294–303.
- McCourt JA, Pang SS, King-Scott J, Guddat LW, Duggleby RG** (2006) Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 569–573.
- Mekenian MR, Willemsen RW** (1975) Germination characteristics of *Raphanus raphanistrum*. I. Laboratory Studies. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **102**, 243–252.
- Menegat A, Bailly GC, Aponte R, Heinrich GMT, Sievernich B, Gerhard R** (2016) Acetohydroxyacid synthase (AHAS) amino acid substitution Asp376Glu in *Lolium perenne*: Effect on herbicide efficacy and plant growth. *Journal of Plant Diseases and Protection* **123**, 145–153.
- Mortimer AM** (1997) Phenological adaptation in weeds - An evolutionary response to the use of herbicides? *Pesticide Science* **51**, 299–304.
- Neve P, Vila-Aiub MM, Roux F** (2009) Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytologist* **184**, 783–793.
- Neve P, Busi R, Renton M, Vila-Aiub MM** (2014) Expanding the eco-evolutionary context of

- herbicide resistance research. *Pest Management Science* **70**, 1385–1393.
- Nielsen DC** (1997). Water use and yield of canola under dryland conditions in the central Great Plains. *Journal of Production Agriculture* **10**, 307–313.
- Norsworthy JK, Ward SM, Shaw DR, Llewellyn RS, Nichols RL, Webster TM, Bradley KW, Frisvold G, Powles SB, Burgos NR, Witt WW, Barrett M** (2012) Reducing the risks of herbicide resistance: Best management practices and recommendations. *Weed Science* **60**, 31–62.
- Novak MG, Higley LG, Christianssen CA, Rowley WA** (1993) Evaluating larval competition between *Aedes albopictus* and *A. triseriatus* (Diptera: Culicidae) through replacement series experiments. *Environmental Entomology* **22**, 311–318.
- Oerke EC** (2006) Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* **144**, 31–43.
- Orr HA** (2009) Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics* **10**, 531–539.
- Owen M, Michael PJ, Renton M, Steadman KJ, Powles SB** (2011) Towards large-scale prediction of *Lolium rigidum* emergence. II. Correlation between dormancy and herbicide resistance levels suggests an impact of cropping systems. *Weed Research* **51**, 133–141.
- Pandolfo CE** (2016) *Caracterización agroecológica de poblaciones ferales brasicáceas con resistencia a herbicidas. Tesis de Doctor en Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Argentina*
- 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**, 657–666.
- Pandolfo CE, Presotto A, Moreno F, Dossou I, Migasso JP, Sakima E, Cantamutto M** (2016) Broad resistance to acetohydroxyacid-synthase-inhibiting herbicides in feral radish (*Raphanus sativus* L.) populations from Argentina. *Pest Management Science* **72**, 354–361.
- Pandolfo CE, Presotto A, Cantamutto M** (2018) *Raphanus sativus* L. y *Raphanus raphanistrum* L. En: *Malezas e invasoras de la Argentina, EdiUNS, Bahia Blanca, Argentina, pp. 625–636*

- Panetsos CA, Baker HG** (1967) The origin of variation in 'wild' *Raphanus sativus* (Cruciferae) in California. *Genetica* **38**, 243–274.
- Panozzo S, Scarabel L, Rosan V, Sattin M** (2017) A New Ala-122-Asn amino acid change confers decreased fitness to ALS-resistant *Echinochloa crus-galli*. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1–13.
- Paris M, Roux F, Bérard A, Reboud X** (2008) The effects of the genetic background on herbicide resistance fitness cost and its associated dominance in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* **101**, 499–506.
- Parodi LR** (1964) *Las malezas invasoras de los cultivos. En: Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Vol. 2. Buenos Aires: ACME, pp. 201-321.*
- Pedersen BP, Neve P, Andreasen C, Powles SB** (2007) Ecological fitness of a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population: Growth and seed production along a competition gradient. *Basic and Applied Ecology* **8**, 258–268.
- Pons** (2000) *Seed responses to light, pp. 237–260 in Fenner, M. (ed), Seeds: the Ecology of Regeneration in Plant Communities (2nd edition). Wallingford: CAB International.*
- Poorter H, Nagel O** (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: A quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 595–607.
- Powles, S. B. and Yu, Q.** (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual review of plant biology* **61**, 317– 347.
- Presotto A, Hernández F, Díaz M, Fernández-Moroni I, Pandolfo CE, Basualdo J, Cuppari S, Cantamutto M, Poverene M** (2017) Crop-wild sunflower hybridization can mediate weediness throughout growth-stress tolerance trade-offs. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **249**, 12–21.
- Presotto A, Poverene M, Cantamutto M** (2014) Seed dormancy and hybridization effect of the invasive species, *Helianthus annuus*. *Annals of Applied Biology* **164**, 373–383.
- Puglia G, Grimaldi S, Carta A, Pavone P, Toorop P** (2015) Pericarp structure of *Glebionis coronaria* (L.) Cass. ex Spach (Asteraceae) cypsela controls water uptake during germination. *Seed Science Research* **25**, 255–266.

- Purrington CB, Bergelson J** (1997) Fitness consequences of genetically engineered herbicide and antibiotic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **145**, 807–814.
- Reeves TG, Code GR, Piggitt CM** (1981) Seed production and longevity, seasonal emergence and phenology of wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.). *Australian Journal of Experimental Agriculture* **21**, 524–530.
- Ritz C** (2010) Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**, 220–229.
- Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D** (2015) Dose-response analysis using R. *PLoS ONE* **10**, 1–13.
- Rondanini DP, Menendez YC, Gomez NV, Miralles DJ, Botto JF** (2017) Vegetative plasticity and floral branching compensate low plant density in modern spring rapeseed. *Field Crops Research* **210**, 104–113.
- Roth I** (1977) *Fruits of angiosperms. En: Encyclopedia of Plant Anatomy* (eds Linsbauer K, Tischler FG y Pascher A). Gebruder Borntraeger, Berlin, pp, 218–225.
- Roux F, Reboud X** (2007) Herbicide resistance dynamics in a spatially heterogeneous environment. *Crop Protection* **26**, 335–341.
- Roux F, Giancola S, Durand S, Reboud X** (2006) Building of an experimental cline with *Arabidopsis thaliana* to estimate herbicide fitness cost. *Genetics* **173**, 1023–1031.
- Roux F, Paris M, Reboud X** (2008) Delaying weed adaptation to herbicide by environmental heterogeneity: a simulation approach. *Pest management science* **64**, 16–29.
- Satorre EH, Benich Arnold RL, Slafer GA, de la Fuente EB, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R** (2003) Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. A. Pascale (Ed.). Editorial Facultad de Agronomía, UBA.
- Scursoni JA, Gigón R, Martín AN, Vigna M, Leguizamón ES, Istilart C, López R** (2014) Changes in weed communities of spring wheat crops of Buenos Aires province of Argentina. *Weed Science* **62**, 51–62.
- Scursoni JA, Vera ACD, Oreja FH, Kruk BC, De La Fuente EB** (2019) Weed management practices in Argentina crops. *Weed Technology* **33**, 459–463.
- Seefeldt SS, Jensen JE, Fuerst EP, Seefeldt SS, Jensen JE, Patrick E** (2005) Feature log-

- logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* **9**, 218–227.
- Shaner DL, Beckie HJ** (2014) The future for weed control and technology. *Pest Management Science* **70**, 1329–1339.
- Smit JJ, Cairns ALP** (2001) Resistance of *Raphanus raphanistrum* to chlorsulfuron in the Republic of South Africa. *Weed Research* **41**, 41–47.
- Snow AA, Campbell LG** (2005) *Can feral radishes become weeds?*, in *Crop Fertility and Volunteerism: A Threat to Food Security in the Transgenic Era?*, ed, Gressel J. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp.
- Sperber K, Steinbrecher T, Graeber K, Scherer G, Clausing S, Wiegand N, Hourston JE, Kurre R, Leubner-Metzger G, Mummenhoff K** (2017) Fruit fracture biomechanics and the release of *Lepidium didymum* pericarp-imposed mechanical dormancy by fungi. *Nature Communications* **8**, 1–11.
- Steinbrecher T, Leubner-Metzger G** (2017) The biomechanics of seed germination. *Journal of Experimental Botany* **68**, 765–783.
- Strauss SY, Rudgers JA, Lau JA, Irwin RE** (2002) Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 278–285.
- Swanton CJ, Nkoa R, Blackshaw RE** (2015) Experimental methods for crop–weed competition studies. *Weed Science* **63**, 2–11.
- Tan S, Evans R, Singh B** (2006) Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* **30**, 195–204.
- Tardif FJ, Rajcan I, Costea M** (2006) A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. *New Phytologist* **169**, 251–264.
- Theisen G** (2008) *Aspectos botânicos e relatos de resistência de nabo silvestre aos herbicidas inibidores de ALS. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brazil, pp. 1–24.*
- Tranel PJ, Wright TR** (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* **50**, 700–712.
- Van Etten ML, Kuester A, Chang SM, Baucom RS** (2016) Fitness costs of herbicide resistance across natural populations of the common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *Evolution* **70**,

2199–2210.

Varanasi A, Prasad PVV, Jugulam M (2016) Impact of climate change factors on weeds and herbicide efficacy. *Advances in Agronomy Agronomy* **135**, 107–146.

Vencill WK, Nichols RL, Webster TM, Soteris JK, Mallory-Smith C, Burgos NR, Johnson, WG, McClelland MR (2012) Herbicide resistance: Toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. *Weed Science* **60**, 2–30.

Venus J, Causton D (1979) Plant growth analysis: a re-examination of the methods of calculation of relative growth and net assimilation rates without using fitted functions. *Annals of Botany* **43**, 633–638.

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, Vila-Aiub MM, Gundel PE Preston C (2015) Experimental methods for estimation of plant fitness costs associated with herbicide-resistance genes experimental methods for estimation of plant fitness costs associated with herbicide-resistance genes. *Weed Science* **63**, 203–216.

Vila-Aiub MM, Neve P, Steadman KJ, Powles SB (2005a) Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: Dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. *Journal of Applied Ecology* **42**, 288–298.

Vila-Aiub MM, Neve P, Powles SB (2005b) Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. *New Phytologist* **167**, 787–796.

Vila-Aiub MM, Neve P, Powles SB (2009) Fitness costs associated with evolved herbicide resistance genes in plants. *New Phytologist* **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.

Vila-Aiub MM, Yu Q, Han H, Powles SB (2015) Effect of herbicide resistance endowing Ile-1781-Leu and Asp-2078-Gly ACCase gene mutations on ACCase kinetics and growth traits in *Lolium rigidum*. *Journal of Experimental Botany* **66**, 4711–4718.

- Walsh MJ, Duane RD, Powles SB** (2001) High frequency of chlorsulfuron-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations across the Western Australian wheatbelt. *Weed Technology* **15**, 199–203.
- Walsh MJ, Powles SB, Beard BR, Parkin BT, Porter SA** (2004) Multiple-herbicide resistance across four modes of action in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Weed Science* **52**, 8–13.
- Wang T, Picard JC, Tian X, Darmency H** (2010) A herbicide-resistant ACCase 1781 *Setaria* mutant shows higher fitness than wild type. *Heredity* **105**, 394–400.
- Warwick SI** (2011). Brassicaceae in agriculture. En: R. Schmidt y I. Bancroft (eds.) Genetics and Genomics of the Brassicaceae. Springer Berlin Heidelberg. New York, USA. pp. 33–66.
- Warwick SI, Francis A** (2005) The biology of Canadian weeds. 132. *Raphanus raphanistrum* L. *Canadian Journal of Plant Science* **85**, 709–733.
- Webster TM, MacDonald GE** (2001) A survey of weeds in various crops in Georgia. *Weed Technology* **15**, 771–790.
- Weiner J** (1982) A neighborhood model of annual-plant interference. *Ecology* **63**, 1237–1241.
- Westerfeldt WW** (1945) A colorimetric determination of blood acetoin. *Journal of Biological Chemistry* **161**, 495–502.
- Willis CG, Baskin C, Baskin J, Auld JR, Venable DL, Cavender-Bares J, Donohue K, Rubio de Casas R, The NESCent Germination Working** (2014) Dormancy and diversification: Environmentally cued dormancy, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist*. **203**, 300–309.
- Wu C, Davis AS, Tranel PJ** (2018) Limited fitness costs of herbicide-resistance traits in *Amaranthus tuberculatus* facilitate resistance evolution. *Pest Management Science* **74**, 293–301.
- Yamagishi H, Terachi T** (2003) Multiple origins of cultivated radishes as evidenced by a comparison of the structural variations in mitochondrial DNA of *Raphanus*. *Genome* **46**, 89–94.
- Younginger BS, Sirová D, Cruzan MB, Ballhorn DJ** (2017) Is biomass a reliable estimate of

plant fitness? *Applications in Plant Sciences* **5**, 1600094.

Yu Q, Powles SB (2014) Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Management Science* **70**, 1340–1350.

Yu Q, Zhang XQ, Hashem A, Walsh MJ, Powles SB (2003) ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Science* **51**, 831–838.

Yu Q, Han H, Vila-Aiub MM, Powles SB (2010) AHAS herbicide resistance endowing mutations: Effect on AHAS functionality and plant growth. *Journal of Experimental Botany* **61**, 3925–3934.

Yu Q, Han H, Li M, Purba E, Walsh MJ, Powles SB (2012) Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. *Weed Research* **52**, 178–186.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* **14**, 415–421.

Zhang J, Zhou X, Fu M (2016) Integrated utilization of red radish seeds for the efficient production of seed oil and sulforaphene. *Food Chemistry* **192**, 541–547.

Zhou YM, Lu JJ, Tan DY, Baskin CC, Baskin JM (2015) Seed germination ecology of the cold desert annual *Isatis violascens* (Brassicaceae): Two levels of physiological dormancy and role of the pericarp. *PLoS ONE* **10**, 1–16.

Zimdahl RL (2007) *Fundamentals of weed science*, 3^o ed. Elsevier Inc, USA.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA EN EL TRANSCURSO DE ESTA TESIS

a. Publicaciones en revistas científicas

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 Management Science*, **74**:1600–1607.

Vercellino RB, Pandolfo CE, Cerrota A, Cantamutto M, Presotto A (2019). The role of light and the pericarp on seed dormancy and germination in feral *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *Weed Research*, **59**: 396–406.

Presotto A, Hernández F, Casquero M, **Vercellino RB**, Pandolfo C, Poverene M, Cantamutto M. Seed bank dynamics of an invasive alien species, *Helianthus annuus* L. *Journal of Plant Ecology*.

b. Publicaciones en revistas científicas bajo revisión

Vercellino RB, Pandolfo CE, Cantamutto M, Presotto A. Interference of feral radish (*Raphanus sativus*) resistant to AHAS-inhibiting herbicides in oilseed rape, wheat and sunflower crops.

c. Publicaciones en congresos

Vercellino RB, Pandolfo CE, Breccia G, Cantamutto M, Presotto A. Costo biológico de la mutación Trp-574-Leu que confiere resistencia a herbicidas AHAS en *Raphanus sativus* (nabón). XVII Congreso Latinoamericano de Genética. Asociación Latinoamericana de Genética (ALAG). Mendoza, 6 a 9 de Octubre de 2019.

Vercellino RB, Pandolfo CE, Cantamutto M, Presotto A. Efecto del pericarpio sobre la germinación de semillas de la maleza *Raphanus sativus* (nabón). II Congreso Argentino de Malezas. Asociación Argentina de Ciencia de las Malezas (ASACIM). Buenos Aires, 5 y 6 de Junio 2018.

Vercellino RB, Torres Carbonell F, Pandolfo P, Ureta S, Cantamutto M, Presotto A. Presencia de la mutación Trp-574 en poblaciones de *Raphanus sativus* resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS en el sudeste bonaerense. XVI Congreso Latinoamericano de Genética. Asociación Latinoamericana de Genética (ALAG). Montevideo, Uruguay, 9 al 12 de octubre de 2016. *J. Bas. App. Gen.* 27(Suppl. 1):274.

d. Partes de libro

Vercellino RB. 2018. Antecedentes de resistencia a herbicidas en *R. sativus*. Caso estudio; en: *Raphanus sativus* L. y *Raphanus raphanistrum* L. Malezas e Invasoras de la Argentina. TOMO III: Edición de la Universidad Nacional del Sur. 2016. ISBN 978-987-1907-70-0.

ANEXO

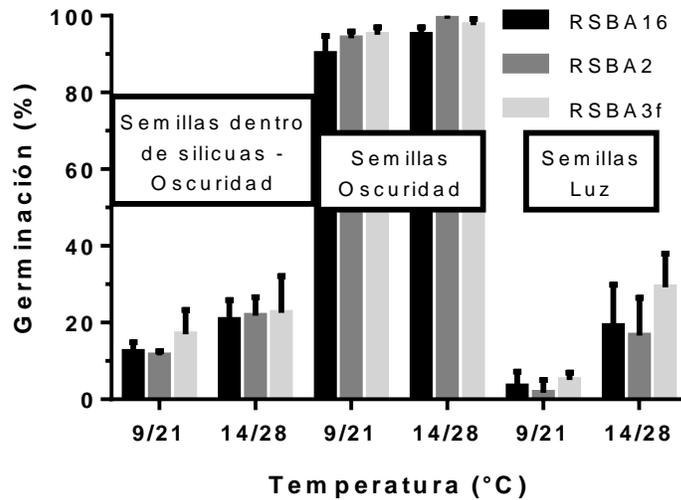


Figura A1. Germinación acumulada (media \pm 1 ES) de semillas dentro de silicuas intactas y semillas aisladas de *Raphanus sativus* (nabón). Las semillas dentro de las silicuas se incubaron solo en oscuridad constante y las semillas aisladas en condiciones de luz/oscuridad (12/12 h) y en oscuridad constante a dos regímenes temperaturas alternas.



Figura A2. Vista de la emergencia de *Raphanus sativus* (nabón) sobre las líneas de siembra de un cultivo de maíz.



Figura A3. Vista de la emergencia de *Raphanus sativus* (nabón) sobre una línea de siembra con un tubo tapado, en un cultivo de maíz.



Figura A4. Vista del experimento de caracteres reproductivos de seis poblaciones de *Raphanus sativus* (nabón) divididas en dos biotipos, susceptible y resistente a herbicidas AHAS con la mutación Trp-574-Leu, criados sin interferencia interespecífica.



Figura A5. Vista exterior de las carpas utilizadas para prevenir la contaminación por polen durante la producción de nuevas generaciones de *Raphanus sativus* (nabón).



Figura A6. Vista interior de una carpa utilizadas para la producción de nuevas generaciones de *Raphanus sativus* (nabón). La estructura marrón corresponde a un núcleo de abejas (*Apis mellifera*) utilizadas para optimizar la polinización.



Figura A7. Vista del experimento de interferencia de *Raphanus sativus* (nabón) sobre el híbrido de colza Hyola 575 CL.



Figura A8. Vista del experimento de interferencia de *Raphanus sativus* (nabón) sobre el híbrido de girasol SYN 3970 CL.