

# Respuesta diferencial al estrés por competencia interespecífica entre biotipos con y sin selección en ambientes agrícolas

Trabajo de intensificación



Alumna: Ana Julia Laurlund

Docente tutor: Ing. Agr., Dr. Alejandro Presotto

Docentes consejeros: Ing. Agr., Dr. Claudio Pandolfo

Ing. Agr., (Mag.). Juan Pablo Renzi

Asesores externos: Ing. Agr., Dr. Boris Vercellino

Ing. Agr., Dr. Fernando Hernández

Universidad Nacional del Sur



## Índice

Resumen .....	3
Introducción.....	4
Objetivo .....	10
Materiales y métodos .....	11
Resultados .....	15
Discusión.....	25
Conclusión.....	29
Referencias .....	30

## Resumen

El nabón (*Raphanus sativus*) es una especie anual invierno-primaveral, perteneciente a la familia brasicáceas. El nabón es una maleza problemática en Argentina, que ha desarrollado resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) debido a la mutación Trp-574-Leu. Esta mutación, que causa resistencia a herbicidas, puede tener un costo adaptativo sobre la aptitud de la planta. El girasol silvestre, *Helianthus annuus* spp. *annuus*, antecesor del girasol domesticado, es una especie que se ha distribuido y naturalizado en varias regiones del mundo, incluyendo Europa, el sur de Australia y la región central de Argentina. El objetivo de este trabajo fue evaluar las diferentes respuestas al estrés por competencia de distintos biotipos con y sin selección en un ambiente agrícola. Para esto, se evaluó el efecto del estrés por competencia de densidades crecientes del cultivo de trigo en dos biotipos de nabón, uno resistente a herbicidas inhibidores de AHAS y su contraparte susceptible, y de tres biotipos de girasol silvestre, uno ruderal (que crecen en los bordes de las rutas, zanjas, cercos y márgenes de campo) y dos agrestales (que crecen dentro de lotes agrícolas, como malezas), frente a densidades crecientes del cultivo de maíz. Las densidades de trigo fueron de 0, 57, 113, 226, 340 y 453 plantas m<sup>-2</sup>, y las de maíz de 0, 57 y 170 plantas m<sup>-2</sup>. El experimento se llevó a cabo en el invernáculo del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur. Los resultados revelaron que no habría un costo de resistencia en los biotipos con la mutación Trp-574-Leu, al menos durante su estadio vegetativo, ya que no se mostraron diferencias en cuanto a tamaño de hoja ni biomasa vegetativa entre los biotipos de nabón resistente y susceptible. Con respecto a los biotipos de girasol silvestre, frente a competencia, no se detectaron diferencias entre los biotipos agrestales recolectados en 2007 y 2017, aunque estos presentaron un mayor tamaño de planta que el biotipo ruderal BAR.

## **Introducción**

Las malezas son plantas bien adaptadas a los ambientes agrícolas, que interfieren directa e indirectamente con la producción de cultivos, causando importantes pérdidas económicas en todo el mundo. Estas reducen el rendimiento de los cultivos al competir por recursos esenciales como luz, agua, nutrientes y espacio y/o al liberar sustancias químicas alelopáticas (en su conjunto conocido como 'interferencia'), causando pérdidas que pueden superar el 30% del rendimiento (Fernández *et al.*, 2015). Además, la presencia de semillas de malezas puede comprometer la calidad del producto cosechado, reduciendo el valor de los cultivos. También interfieren con las operaciones de cosecha y sirven como hospederos para plagas de insectos y enfermedades, dando la posibilidad de que estos organismos reinfesten futuros cultivos (Varanasi *et al.*, 2016).

La agricultura produce ambientes relativamente estables, a través de prácticas como la labranza mínima, la fertilización, el uso de herbicidas, el monocultivo o las rotaciones a corto plazo. Este tipo de ambiente puede ejercer una alta presión de selección sobre las comunidades de malezas. Si la presión de selección agrícola es alta y existe una base genética para los rasgos benéficos, entonces las poblaciones de malezas encontradas en los campos cultivados se habrán enriquecido en alelos que permiten a las plantas sobrevivir en condiciones asociadas con las prácticas de cultivo (Owen *et al.*, 2015). Algunos de los cambios evolutivos observados en las malezas son rasgos relacionados con la germinación de las semillas, la forma de las hojas, el tiempo a floración, el tamaño y la forma de las semillas y la resistencia a herbicidas (Vigueira *et al.*, 2013). Además, cambios en la arquitectura de la planta pueden determinar el momento y la efectividad del sombreado de las malezas sobre las plantas de cultivo. Por otro lado, las estrategias de las plantas para adaptarse a ambientes de alta productividad como los agrícolas, puede resultar en un incremento en el uso de los recursos destinados a crecimiento rápido a expensas de una menor tolerancia a estrés (Presotto *et al.*, 2017).

Las malezas que coexisten y compiten con los cultivos evolucionan a través de una selección no intencional mediada por el hombre. Estas plantas están sujetas a las mismas fuerzas que influyen en la evolución en la naturaleza, pero a menudo experimentan una intensidad de selección mucho mayor que la encontrada en otros sistemas naturales (Jasieniuk *et al.* 1996). Por ejemplo, la forma predominante de control de malezas en la agricultura actual es a través del uso de herbicidas, que están diseñados para eliminar más del 90% de la población de malezas. Los individuos que sobreviven a esta alta intensidad de selección debido al azar o la resistencia genética serán los fundadores de la próxima generación (Kuester *et al.*, 2016).

La resistencia a herbicidas es la principal adaptación de las malezas a los ambientes agrícolas y representa una preocupación cada vez mayor para los agricultores y agrónomos, generando una gran cantidad de investigaciones científicas básicas y aplicadas en el país y en todo el mundo (Darmency *et al.*, 2017). Actualmente, existen biotipos de malezas resistentes a herbicidas en al menos 262 especies (152 dicotiledóneas y 110 monocotiledóneas) a nivel mundial. Las malezas han desarrollado resistencia a 23 de los 26 sitios de acción de herbicidas conocidos y se han reportado malezas resistentes a herbicidas en al menos 70 países (Heap, 2020).

La acetohidroxiácido sintasa (AHAS), también conocida como acetolactato sintasa (ALS), es la primera enzima en la vía de la biosíntesis de los aminoácidos esenciales de cadena ramificada, valina, leucina e isoleucina. La enzima AHAS es el sitio objetivo común de cinco familias químicas de herbicidas: sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil-benzoatos y sulfonil-aminocarbonil-triazolinonas. La inhibición de la enzima AHAS priva a las plantas de valina, leucina e isoleucina, lo que conlleva la muerte de estas. Los herbicidas inhibidores de AHAS han sido ampliamente utilizados desde su introducción a principios de la década de 1980 debido a su amplio espectro de control de malezas a muy bajas dosis de aplicación, amplia selectividad de cultivos, baja toxicidad en mamíferos, bajo impacto ambiental y a su relativo bajo costo (Yu y Powles, 2014).

La utilización intensiva y prolongada de herbicidas inhibidores de AHAS ha resultado en una rápida evolución de malezas resistentes a estos herbicidas. La creciente adopción del sistema de labranza mínima, junto con una reducción en la rotación de cultivos, han incrementado esta tendencia (Vercellino *et al.*, 2018). Desde entonces, biotipos de 165 especies de malezas (101 dicotiledóneas y 64 monocotiledóneas) han desarrollado resistencia a herbicidas AHAS a nivel mundial (Heap, 2020). En la mayoría de los casos informados, la resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS se debe a mutaciones puntuales en el gen que codifica para tal enzima, que reduce la sensibilidad de la enzima a estos herbicidas (Yu y Powles, 2014). Hasta el momento, se han identificado 29 sustituciones de aminoácidos, en ocho posiciones del gen AHAS que confieren resistencia a herbicidas. En condiciones de campo, la mutación Trp-574-Leu es la que se detecta con mayor frecuencia (Yu y Powles, 2014; Heap, 2020).

La adaptación a los ambientes agrícolas, ya sea por resistencia a herbicidas u otros caracteres, permite un aumento en la aptitud biológica en dichos ambientes, pero también puede producir una pérdida de aptitud biológica en ambientes en los cuáles las poblaciones no fueron seleccionadas, proceso conocido como compensación o costo adaptativo (en el caso de resistencia a herbicidas, 'costo de resistencia'). Esta compensación puede prevenir la fijación de alelos adaptativos y contribuir al mantenimiento de los polimorfismos genéticos dentro de las poblaciones (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

En el ejemplo de las mutaciones de resistencia a herbicida AHAS, el costo de la resistencia podría expresarse debido a que estas mutaciones pueden alterar la funcionalidad enzimática. Esto se debe a que algunos residuos de aminoácidos son esenciales tanto para la unión del herbicida, como para el mantenimiento de la actividad catalítica de la enzima (Yu y Powles, 2014). Los costos de resistencia a herbicidas pueden expresarse de diferente manera dependiendo de la mutación específica, la especie de maleza y las condiciones ambientales (Vila-Aiub *et al.*, 2009). *Raphanus raphanistrum* L., *Lolium rigidum* (Gaudin) Weiss ex Nyman y *Kochia scoparia* (L.) Schrad., con cuatro, tres y dos mutaciones en la enzima AHAS,

incluyendo la Trp-574-Leu, no mostraron efectos pleiotrópicos negativos sobre la tasa de crecimiento relativa y la capacidad competitiva (Yu y Powles, 2014). Sin embargo, la mutación Trp-574-Leu mostró fuertes efectos pleiotrópicos sobre la morfología y anatomía de las hojas en *Amaranthus powellii* S. Watson, resultando en reducciones significativas en el crecimiento vegetativo y reproductivo (Tardif *et al.*, 2006).

La dormición y la dinámica de la germinación son factores clave que contribuyen a concentrar la germinación en períodos donde la posibilidad de supervivencia y reproducción es máxima en un ambiente dado (Baskin y Baskin, 2014). En la mayoría de las especies maleza, la presencia de dormición regula el momento de emergencia durante la estación de crecimiento y contribuye a la formación de un banco de semillas persistente en el suelo (Batlla y Benech-Arnold, 2007). El éxito de las prácticas de control de malezas depende en gran medida de su tiempo en relación con el momento de emergencia. Sin embargo, si existe variación genética para la dormición (y por lo tanto para el momento de emergencia), las malezas pueden responder mediante cambios en el momento de emergencia, disminuyendo la eficiencia de las técnicas de control. Por ello, una comprensión integral de la durabilidad de las estrategias de manejo basadas en herbicidas debe considerar no sólo la evolución de la resistencia a herbicidas, sino también la evolución de rasgos fenológicos, como la dormición de las semillas y las interacciones entre la fenología y la resistencia a herbicidas (Darmency *et al.*, 2017).

El momento de emergencia de las malezas en relación con la emergencia de los cultivos es crucial para la competencia entre malezas y cultivos. Previo a la siembra, el productor tiene varias herramientas para combatir las malezas, como la aplicación de herbicidas no selectivos y el control mecánico. Sin embargo, una vez establecido el cultivo, estas técnicas se limitan al uso de herbicidas selectivos (Nichols *et al.*, 2015). Las malezas que surgen a principios de la temporada tienen una ventaja competitiva, aunque pueden ser controladas de manera más simple con técnicas de manejo previo a la siembra. Las malezas que emergen después de la implantación del cultivo, tienen mayor probabilidad de escapar de las prácticas de manejo

implementadas antes de la siembra, pero estarán en desventaja a la hora de competir por recursos con las plantas establecidas del cultivo (Darmency *et al.*, 2017).

*Raphanus sativus* L. (rabanito) es una especie anual, herbácea, cultivada en todo el mundo principalmente por el valor alimenticio de sus raíces engrosadas, perteneciente a la familia de las brassicáceas. La forma asilvestrada o feral de rabanito (nabón), posee ciclo anual y raíces más delgadas, aunque este rasgo puede variar y encontrarse plantas con raíces engrosadas. El nabón crece principalmente en ambientes disturbados, como banquinas de rutas, caminos, vías de trenes, baldíos y en suelos agrícolas (Pandolfo *et al.*, 2018) y es una maleza agrícola frecuente en varios países de América, incluyendo Estados Unidos, México, Paraguay, Chile, Brasil y Argentina. El nabón ha desarrollado resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS en Brasil, Chile y Argentina (Heap, 2020), lo que lo convierte en una maleza especialmente problemática.

En Argentina, el nabón ha sido considerado una especie invasora desde la década de 1930 (Ibarra, 1937). Es una maleza de trigo y otros cereales de invierno, girasol, maíz, colza, papa y forrajes. Las semillas de nabón se consideran impurezas en los granos de cereales y oleaginosas (Pandolfo *et al.*, 2016). La Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (AAPRESID) registró la presencia de nabón resistente a herbicidas AHAS en las provincias de Salta, Tucumán y Buenos Aires (AAPRESID, 2019, <https://www.aapresid.org.ar/rem-malezas/>). En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, el nabón es una de las especies con mayor incremento en incidencia (Scursoni *et al.*, 2014). La mutación Trp-574-Leu es la responsable de la resistencia a las cinco familias químicas de herbicidas AHAS en esta especie (Pandolfo *et al.*, 2016; Vercellino *et al.*, 2018). Recientemente, se demostró que esta mutación, además de conferir la resistencia a herbicidas AHAS, tiene un costo sobre la aptitud biológica de los individuos resistentes, en ausencia de competencia con cultivos (Vercellino *et al.* 2018). Sin embargo, se desconoce si la mutación Trp-574-Leu altera la acumulación de biomasa y el efecto competitivo de nabón sobre los cultivos, especialmente durante estadios vegetativos tempranos.

Por otro lado, el girasol silvestre (*Helianthus annuus* spp. *annuus*) es originario de América del Norte y es el antecesor del girasol cultivado (*H. annuus* var. *macrocarpus*). Actualmente, el girasol silvestre está ampliamente distribuido en varias regiones del mundo como el sur de Europa, Australia y Argentina, donde la hibridación espontánea con el cultivo puede ocurrir, dando lugar a híbridos cultivo-silvestre (Presotto *et al.*, 2017).

En Argentina, la mayoría de las poblaciones silvestres de girasol crecen en los bordes de las rutas, zanjas, cercos y márgenes de campo (ambientes conocidos como ruderales), pero también existen algunas poblaciones que crecen dentro de lotes agrícolas, como malezas (agrestales). El caso mejor estudiado es una población colectada en un lote agrícola en Barrow, partido de Tres Arroyos (provincia de Buenos Aires). En estudios previos, se demostró que esta población puede reducir el rendimiento del cultivo de girasol en más del 50 %, cuando la densidad de malezas es mayor a 4 plantas m<sup>-2</sup> (Casquero *et al.* 2013). Esta población mostró evidencia de introgresión del cultivo, con rasgos intermedios entre el cultivo y el girasol ruderal. Esta población fue más agresiva con el cultivo que las plantas ruderales, debido a su crecimiento inicial más rápido (Presotto *et al.*, 2017).

Estudios previos han propuesto que las malezas tienden a exhibir una menor variación genética que otros grupos de plantas y esto afectaría su capacidad de adaptación a los ambientes agrícolas. La mayor parte del trabajo hasta la fecha ha comparado poblaciones a través del espacio, es decir, poblaciones colectadas en áreas cultivadas y no cultivadas. Un enfoque novedoso, que puede proporcionar evidencia directa de cambio evolutivo, consiste en experimentos de resurrección (Kuester *et al.* 2016). Estos experimentos consisten en revivir poblaciones ancestrales (generalmente usando semillas dormantes) y compararlas con poblaciones actuales (descendientes) en condiciones iguales. Comparar la misma población colectada en dos momentos permite evaluar cambios fenotípicos y/o genéticos, en respuesta a las fuerzas de selección predominantes en ese ambiente durante el período entre las dos colectas.

## **Objetivo**

Evaluar respuestas diferenciales al estrés por competencia interespecífica entre biotipos de malezas, con y sin selección en ambientes agrícolas. Para esto se compararán biotipos resistentes y susceptibles de nabón y un biotipo maleza de girasol seleccionado por 10 años en un ambiente agrícola (colectado en 2007 y 2017).

## **Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto del estrés por competencia del cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.) sobre el crecimiento de nabón.
2. Evaluar respuestas diferenciales entre un biotipo de nabón resistente a herbicidas AHAS (R) con la mutación Trp-574-Leu y un biotipo susceptible (S).
3. Evaluar el efecto del estrés por competencia del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) sobre el crecimiento de un biotipo maleza de girasol.
4. Evaluar respuestas diferenciales entre el biotipo sin selección de girasol (colectado en 2007) y el biotipo seleccionado (colectado en 2017).

## **Hipótesis**

1. El estrés producido por la competencia con el cultivo de trigo provocará una menor acumulación de biomasa en nabón debido a una menor expansión foliar.
2. El biotipo resistente a AHAS, debido a un costo adaptativo de la mutación, acumulará menos biomasa que el susceptible, en ausencia del herbicida.
3. El estrés producido por la competencia con el cultivo de maíz provocará una menor acumulación de biomasa en girasol silvestre debido a una menor expansión foliar.
4. Debido a la selección en el ambiente agrícola durante 10 años, el biotipo de girasol silvestre colectado en 2017 presentará menor reducción del crecimiento en condiciones de estrés interespecífico, respecto del biotipo colectado en 2007.

## **Materiales y métodos**

### *Material vegetal*

Se realizaron dos experimentos independientes para analizar la respuesta de dos especies de malezas (nabón y girasol) al estrés por competencia interespecífica. El estrés por competencia se generó utilizando distintas densidades de trigo (*Triticum aestivum* L.) en el experimento de nabón y de maíz (*Zea mays* L.) en el experimento de girasol silvestre. Dentro de cada experimento se evaluó además la respuesta diferencial de los distintos biotipos. En el caso de nabón se comparó un biotipo resistente a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS (R), que presenta la mutación Trp-574-Leu, con su contraparte susceptible (S), colectado en el margen del lote del mismo campo donde se colectó el biotipo resistente (Vercellino *et al.*, 2018). En el experimento de girasol silvestre se evaluó un biotipo colectado en la localidad de Barrow en 2007 (BRW<sub>07</sub>) y otro colectado en 2017 (BRW<sub>17</sub>; seleccionado durante 10 años en un ambiente agrícola), junto con un biotipo ruderal colectado en Colonia Barón, La Pampa (BAR).

### *Evaluación de rasgos de crecimiento*

Para evaluar la respuesta de competencia por recursos limitantes (luz, agua y nutrientes) en individuos seleccionados por ambientes agrícolas 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. Por lo tanto, el rendimiento vegetativo de las plantas de maleza se evaluó bajo densidades y biomásas crecientes de plantas de cultivo.

Para generar el estrés por competencia interespecífica se utilizaron un cultivar de trigo y un híbrido de maíz, para competencia con nabón y girasol silvestre, respectivamente. Para el establecimiento del cultivo se utilizaron semillas previamente germinadas en cámara de crecimiento, bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Éstas fueron trasplantadas en macetas (15 cm de diámetro x

12 cm de alto), que contenían una mezcla 50:50 de tierra comercial para macetas y suelo del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur. Las macetas fueron colocadas en invernáculo en condiciones de temperatura controlada ( $25 \pm 5$  °C) y luz provista por lámparas bajo consumo. Durante el ensayo, Fueron reorganizadas periódicamente para aleatorizar las diferencias ambientales dentro del invernáculo y se distribuyeron espacialmente para evitar la competencia por luz.

Para el caso del trigo en competencia con nabón se utilizaron 6 densidades distintas del cultivo, de 0, 57, 113, 226, 340 y 453 plantas  $m^{-2}$ , al trasplantar 0, 1, 2, 4, 6 y 8 plántulas germinadas de manera circular en cada maceta (Fig. 1). En el caso del maíz en competencia con girasol silvestre se utilizaron 3 densidades, de 0, 57 y 170 plantas  $m^{-2}$ , al trasplantar 0, 1 y 3 plántulas por maceta (Fig. 2). Las plántulas de maleza previamente germinadas fueron trasplantadas en el centro de las macetas que contenían el cultivo, cuando el cultivo contaba con tres hojas completamente expandidas. Se utilizó una plántula de maleza por maceta en ambos casos. Se aplicó riego cada tres o cuatro días y fertilizante líquido para el óptimo crecimiento de las plantas. Las unidades experimentales (macetas) fueron distribuidas en un diseño completamente aleatorizado, utilizando lámparas bajo consumo. Los tratamientos pertenecientes a trigo contaron con 6 réplicas, dando un número total de 72 unidades experimentales (2 biotipos\*6 réplicas\*6 tratamientos). En el caso del maíz se evaluaron 5 réplicas, dando un número total de 45 unidades experimentales (3 biotipos\*5 réplicas\*3 tratamientos).

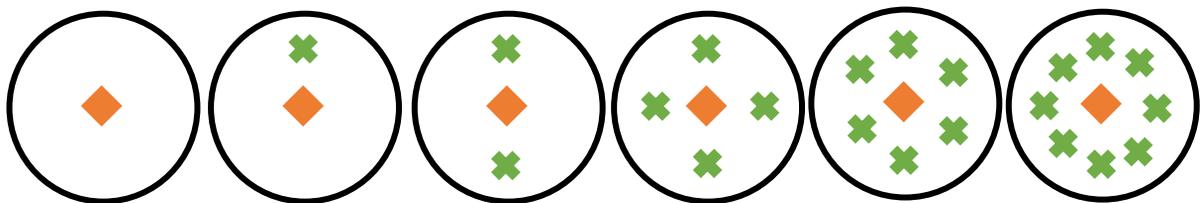


Figura 1. Diagrama visual de la distribución de las plantas de nabón en competencia con las plantas de trigo.

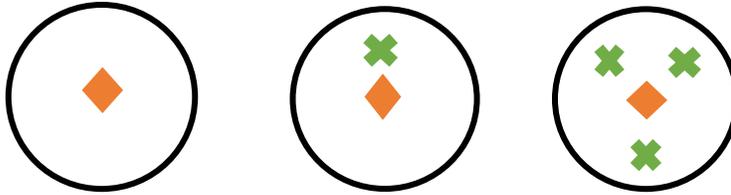


Figura 2. Diagrama visual de la distribución de las plantas de girasol en competencia con las plantas de maíz.

En ambos experimentos, se realizaron mediciones semanales durante un mes, en total 4 mediciones, de largo y ancho de la hoja más grande de la maleza (utilizados para calcular el área foliar de la misma), y en el caso del girasol silvestre se evaluó también la altura de planta. Por último, en el estado de cuatro hojas de las malezas, tanto las plantas de cultivo como de maleza se cortaron y colocaron en estufa a 60 °C hasta peso constante para evaluar materia seca aérea por unidad experimental.

Para el análisis de los datos de nabón, los valores de largo y ancho de hojas, área foliar y biomasa vegetativa de la maleza en función de la densidad de trigo se analizaron con el software Infostat, mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó biotipo (R y S), densidad (0, 57, 113, 226, 349 y 453 plantas por m<sup>2</sup>) e interacción biotipo\*densidad como factores fijos. El largo y ancho de hojas y área foliar fue analizado para cada momento (datos no incluidos en el trabajo).

Además, se realizó la evaluación de largo y ancho de hojas, área foliar y biomasa vegetativa en función de la biomasa de trigo. Los valores de largo y ancho de hojas y de biomasa vegetativa de la maleza en condiciones de estrés por competencia fueron expresados como porcentaje del rasgo en ausencia de competencia. La respuesta de los distintos biotipos al estrés por competencia se analizó utilizando un modelo hiperbólico no-lineal (Ecuación 1):

$$\text{Ecuación 1: } G = \frac{a}{1+bx}$$

donde  $G$  representa el rasgo de aptitud (biomasa vegetativa, largo y ancho de hojas) de la maleza a diferente biomasa de cultivo ( $x$ ),  $a$  es el rasgo de aptitud de la maleza

en ausencia de cultivo ( $x = 0$ ), y  $b$  es la pendiente de la regresión. El modelo fue ajustado por análisis de regresión de mínimos cuadrados.

Las pendientes de la regresión (parámetro  $b$ ) fueron comparadas utilizando la prueba  $t$  de Student en Infostat, para determinar la respuesta de las plantas de nabón (R y S) al incremento en la densidad y 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.

Para el caso del girasol silvestre, los datos de largo y ancho de hojas, área foliar, altura de planta y biomasa vegetativa de la maleza en función de la densidad de maíz se analizaron con el software Infostat mediante un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando biotipo (BRW<sub>07</sub>, BRW<sub>17</sub> y BAR), densidad (0, 1 y 3 plantas de maíz por maceta) e interacción biotipo\*densidad como factores fijos. En el caso de largo y ancho de hojas, área foliar y altura de planta, se realizó un ANOVA para cada tiempo, aunque sólo se incluyeron en el trabajo los datos de la primera y última medición.

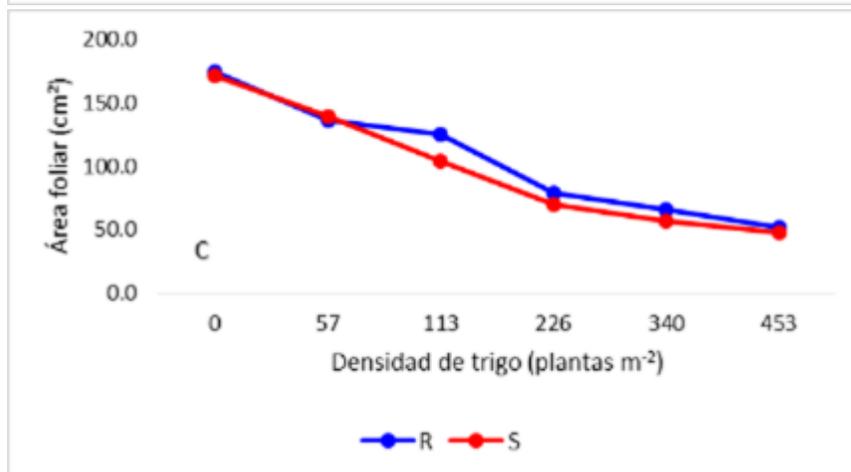
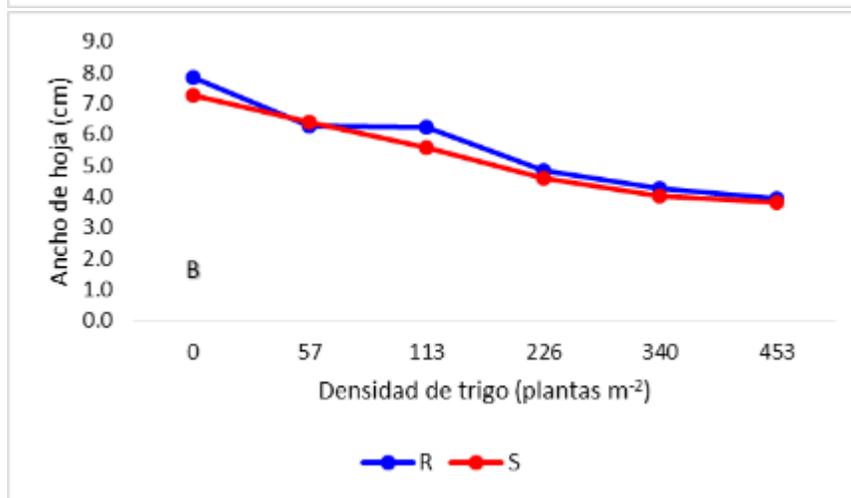
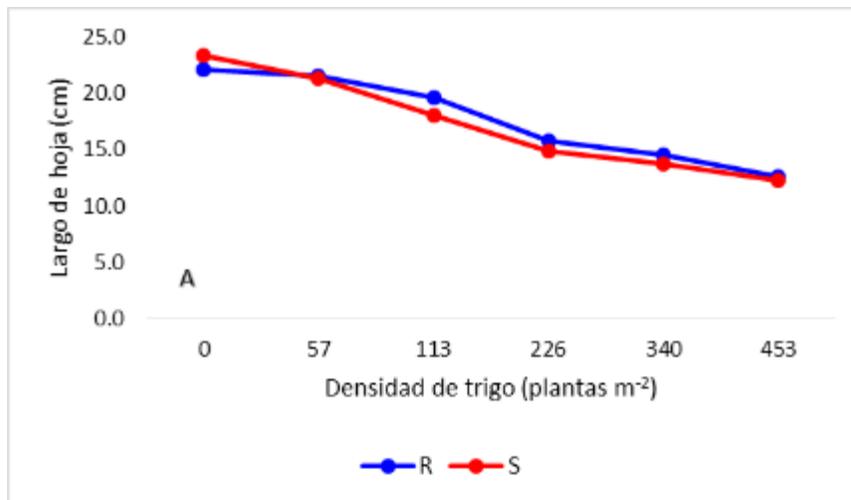
## **Resultados**

### *Efecto de la competencia de trigo sobre nabón*

Al final del experimento, luego de 33 días de crecimiento, se observó efecto significativo del tratamiento para las cuatro variables: largo ( $P < 0,0001$ ) y ancho de hoja ( $P < 0,0001$ ), área foliar (largo\*ancho) ( $P < 0,0001$ ) y biomasa seca aérea. No se observaron diferencias significativas entre los biotipos resistente y susceptible para ninguna de las variables analizadas (Fig. 3).

Al realizar las evaluaciones en función de la biomasa de trigo, el modelo hiperbólico explicó las variaciones en la respuesta en el crecimiento vegetativo del nabón, criado en condiciones de estrés por la creciente interferencia con trigo ( $R^2 = 0,57 - 0,69$ ;  $P < 0,0001$ ). La respuesta competitiva, evaluada al comparar las pendientes de las regresiones de las variables entre las plantas resistentes y susceptibles, no mostró diferencias significativas. Es decir, las reducciones en el ancho y largo foliar y la biomasa seca aérea de las plantas resistentes fueron similares a las mostradas por sus contrapartes susceptibles (Fig. 4).

Los datos fueron analizados para todas las fechas de muestreo. Debido a que no se encontraron diferencias entre los momentos de muestreo, sólo se muestran los valores recolectados al final del experimento.



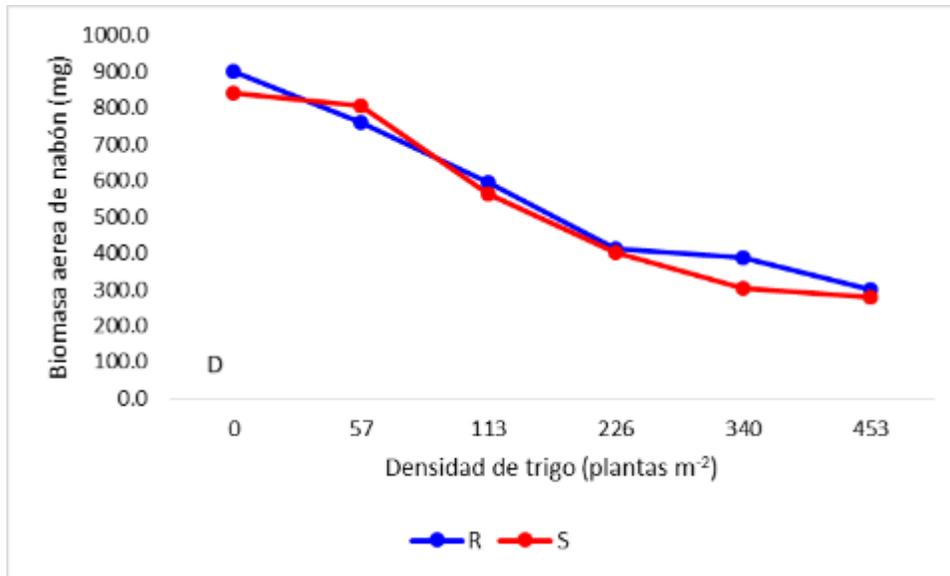


Figura 3. Respuesta en el largo de hoja (A), ancho de hoja (B), área foliar (C) y biomasa aérea (D) de los biotipos resistente a herbicidas AHAS con la mutación Trp-574-Leu (R) y su contraparte susceptible (S) de nabón (*Raphanus sativus*), frente al incremento de la densidad de trigo. Datos registrados 33 días desde del trasplante.

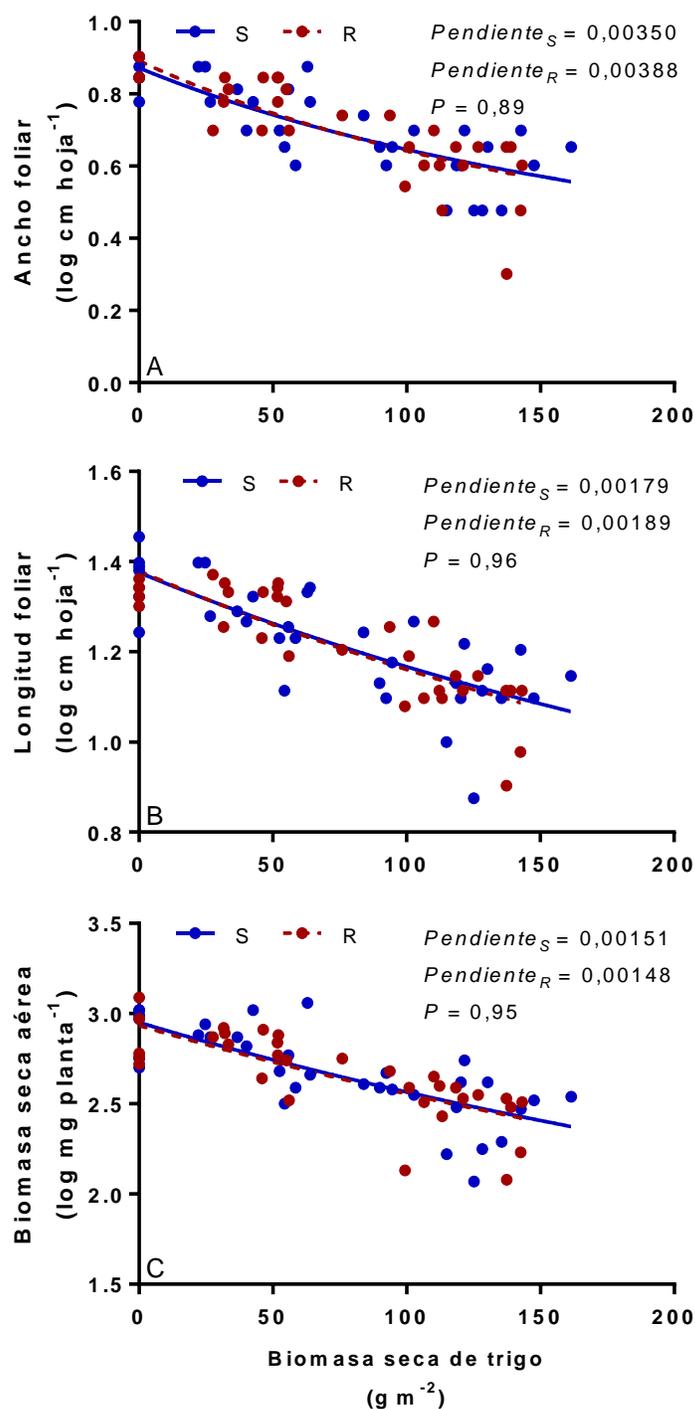
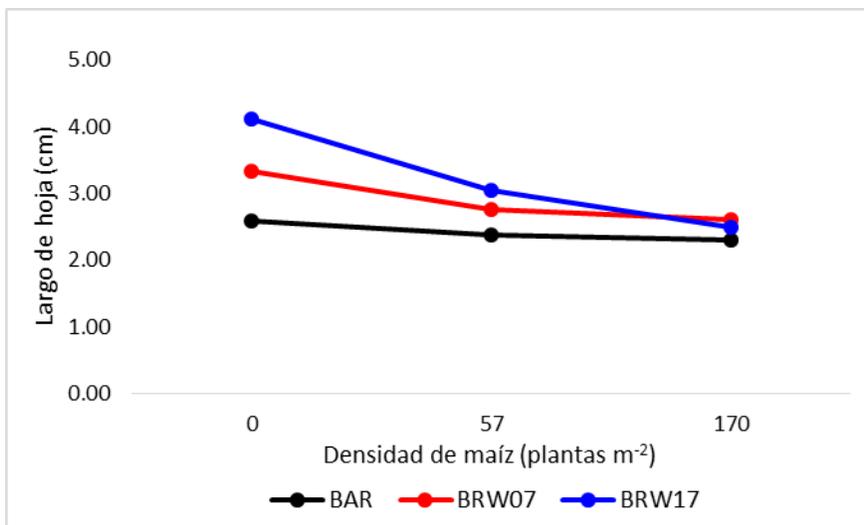
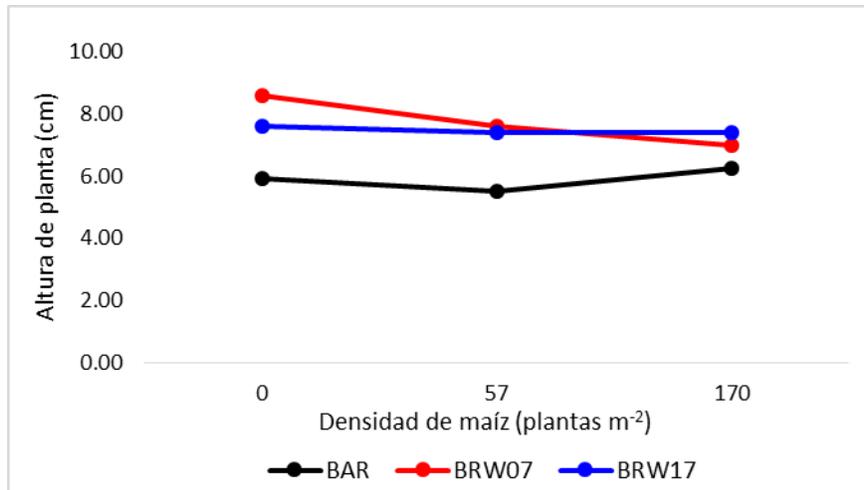


Figura 4. Respuesta del ancho (A) y largo (B) foliar y la biomasa seca aérea (C) de biotipos de nabón (*Raphanus sativus*) susceptibles (S) y resistentes (R) a herbicidas AHAS, criados en condiciones de interferencia generada por incrementos en la biomasa seca aérea del cultivo de trigo.

### *Efecto de la competencia de maíz sobre girasol silvestre*

En el tiempo 1, se observó efecto significativo del biotipo para las cuatro variables: altura de planta ( $P = 0,0250$ ), ancho ( $P < 0,0001$ ) y largo de hoja ( $P = 0,0093$ ) y área foliar ( $P = 0,0002$ ), efecto tratamiento para tres de las cuatro variables: ancho ( $P = 0,0003$ ) y largo de hoja ( $P = 0,0017$ ) y área foliar ( $P = 0,0001$ ) y no se observó interacción significativa (Fig. 5). El tratamiento de competencia con el cultivo de maíz disminuyó significativamente el ancho de hoja, largo de hoja y área foliar, pero no afectó la altura (Fig. 5). Entre biotipos, BRW<sub>07</sub> y BRW<sub>17</sub> mostraron mayor altura y tamaño de hoja (largo, ancho y área foliar) que BAR (Fig. 5), mientras que no se observaron diferencias significativas entre BRW<sub>07</sub> y BRW<sub>17</sub> para ninguna de las variables. La ausencia de interacción indica que todos los biotipos respondieron de manera similar al estrés por competencia.



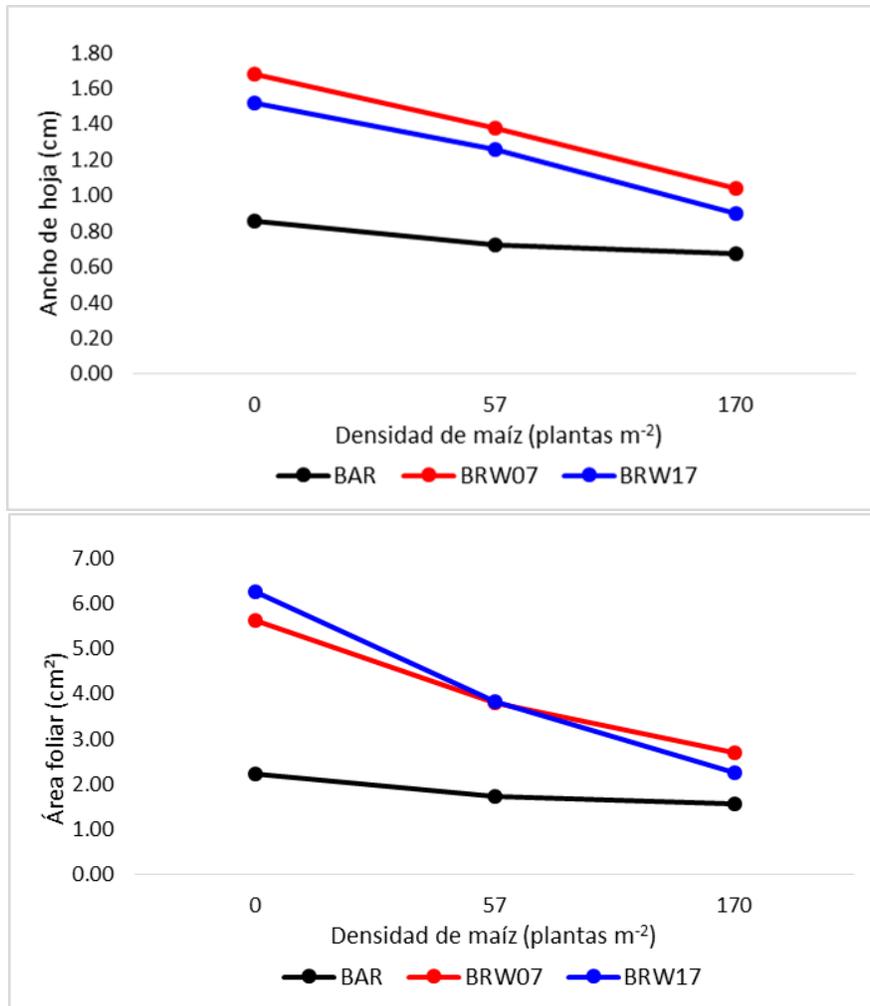
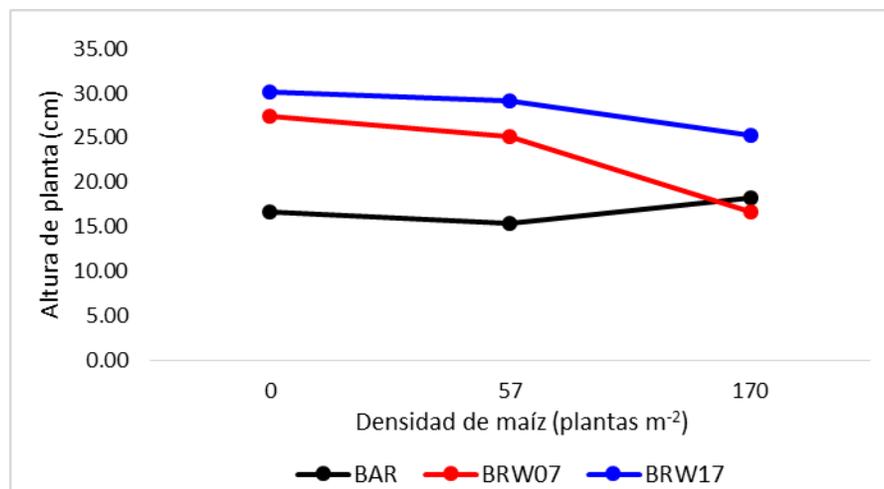


Figura 5. Respuesta de altura de planta, largo de hoja, ancho de hoja y área foliar de tres biotipos de girasol silvestre (*Helianthus annuus*): Barón (BAR), Barrow 2007 (BRW<sub>07</sub>) y Barrow 2017 (BRW<sub>17</sub>) frente a condiciones de interferencia generada por densidades crecientes de un cultivo de maíz durante la primer semana de crecimiento.

Al final del experimento, luego de 30 días de crecimiento de los biotipos de girasol silvestre frente a la competencia con el cultivo de maíz, se observó efecto significativo del biotipo para tres de las cuatro variables: altura de planta ( $P = 0,0002$ ), ancho de hoja ( $P = 0,0001$ ) y área foliar ( $P = 0,0038$ ), efecto tratamiento para tres de las variables, en este caso: ancho ( $P < 0,0001$ ) y largo de hoja ( $P < 0,0001$ ) y área foliar ( $P < 0,0001$ ) y se observó interacción significativa para ancho de hoja ( $P = 0,0036$ ) y área foliar ( $P = 0,0022$ ) (Fig. 6). El tratamiento de competencia disminuyó significativamente el ancho y largo de hoja y área foliar, la altura de planta se vio disminuida únicamente en los biotipos BRW<sub>07</sub> y BRW<sub>17</sub> (Fig. 6). Entre biotipos, BRW<sub>17</sub> mostró una mayor altura, y un mayor tamaño de hoja para los tratamientos sin interferencia, aunque para los casos con competencia no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los biotipos. La presencia de interacción en ancho de hoja y área foliar indica que los biotipos se comportaron de manera diferencial al estrés por competencia.

Los datos fueron analizados para todas las fechas de muestreo. Debido a que no se encontraron diferencias entre los momentos de muestreo, solo se muestran los valores recolectados al principio y al final del experimento.



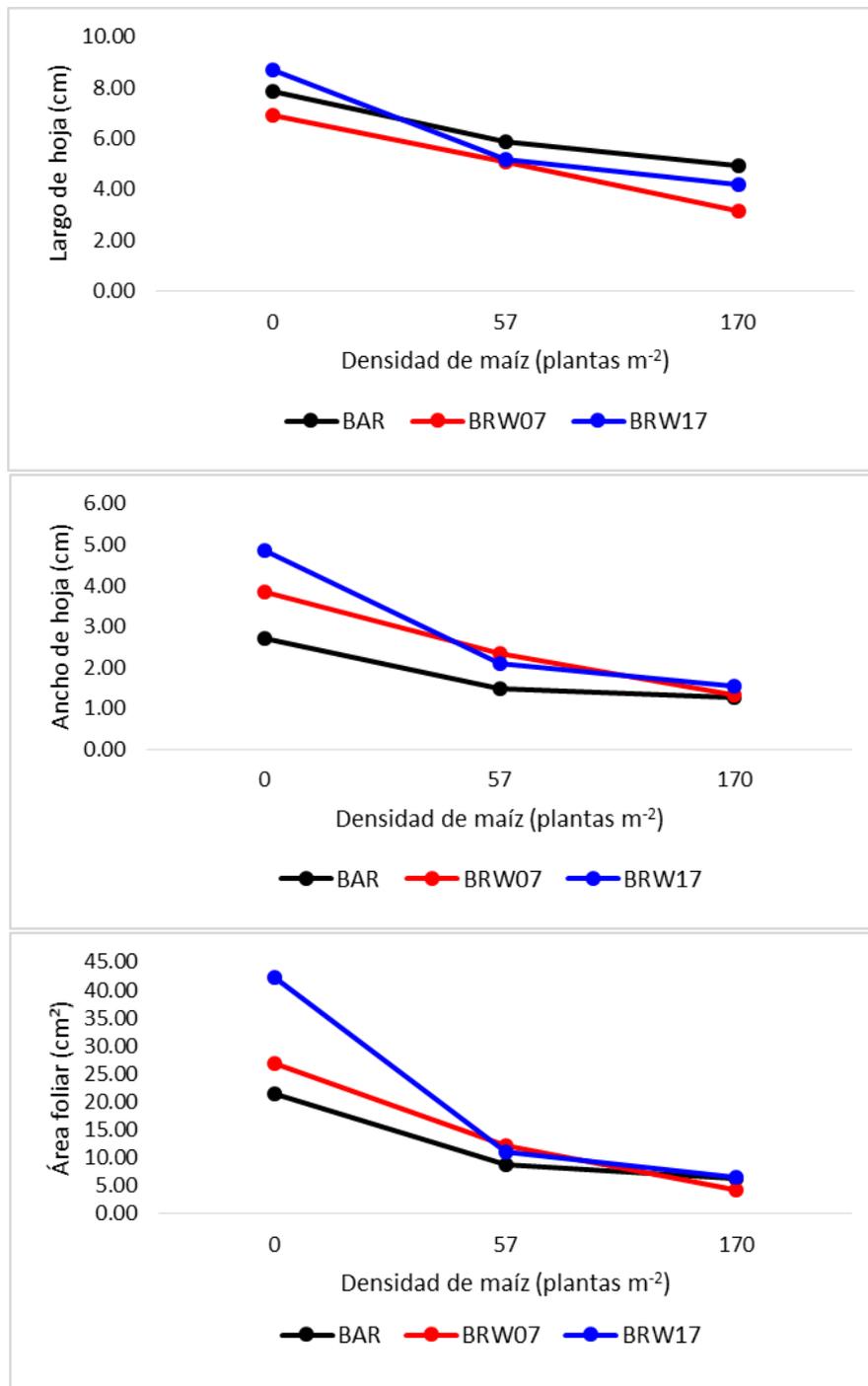


Figura 6. Respuesta de altura de planta, largo de hoja, ancho de hoja y área foliar de tres biotipos de girasol silvestre (*Helianthus annuus*): Baron (BAR), Barrow 2007 (BRW<sub>07</sub>) y Barrow 2017 (BRW<sub>17</sub>) frente a condiciones de interferencia generada por densidades crecientes de un cultivo de maíz luego de 30 días de crecimiento.

Por último, se evaluó la biomasa seca aérea de los biotipos de girasol silvestre frente a los distintos tratamientos, para la misma se observó efecto significativo del biotipo ( $P = 0,0001$ ), tratamiento ( $P < 0,0001$ ) y una interacción significativa ( $P = 0,0041$ ) (Fig. 7). El tratamiento de competencia disminuyó significativamente la biomasa aérea de todos los biotipos, aunque la mayor disminución con la competencia fue observada en  $BRW_{17}$ , seguido de  $BRW_{07}$  y  $BAR$ , con el 81 % y 64 % respectivamente.

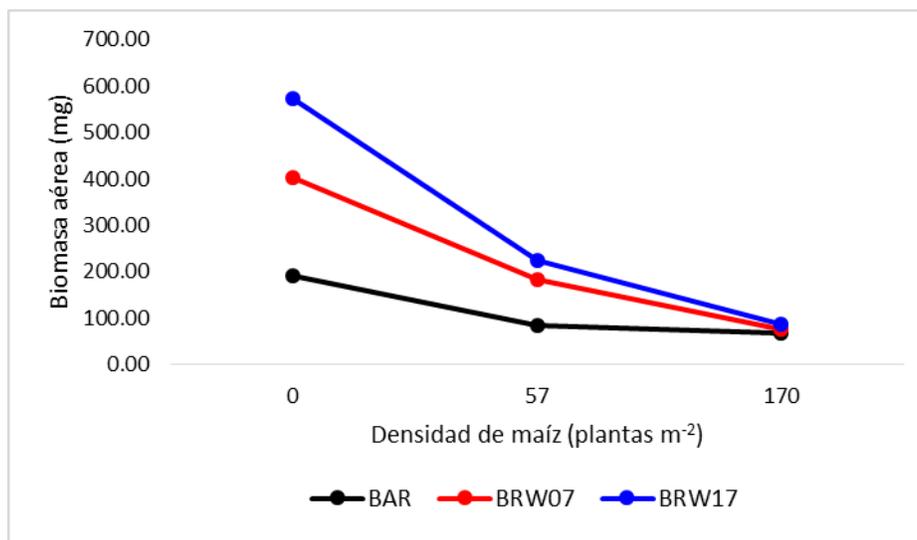


Figura 7. Biomasa seca aérea de los tres biotipos de girasol silvestre (*Helianthus annuus*): Barón (BAR), Barrow 2007 ( $BRW_{07}$ ) y Barrow 2017 ( $BRW_{17}$ ) para los distintos tratamientos luego de 30 días de crecimiento.

## **Discusión**

### *Biotipos de nabón frente a estrés por competencia de trigo*

El estrés producido por la competencia con el cultivo de trigo provocó una menor acumulación de biomasa en nabón, aunque los resultados del presente experimento no mostraron diferencia de tamaño de planta ni biomasa aérea entre los biotipos susceptible y resistente. Por lo tanto, la mutación Trp-574-Leu, que confiere resistencia a los herbicidas AHAS, no mostró un costo adaptativo (costo de resistencia) en nabón, al menos durante su estadio vegetativo. Estos resultados son similares a los encontrados por Li *et al.* (2013) en *Raphanus raphanistrum* L. (rábano silvestre), una especie emparentada con nabón. En esta especie, no se encontraron diferencias en la tasa de crecimiento ni en la capacidad competitiva entre los biotipos susceptibles y resistentes, con cuatro mutaciones de resistencia a AHAS, incluida la mutación Trp-574-Leu. Resultados similares fueron encontrados por Yu *et al.* (2010) en la especie *Lolium rigidum*.

Por otro lado, en *Amaranthus powellii* con la mutación Trp-574-Leu se encontraron fuertes efectos pleiotrópicos sobre la morfología y anatomía de las hojas, que resultó en una reducción significativa en el crecimiento y la producción de semillas. Esta alteración en la morfología foliar podría haber ocurrido debido a que la mutación interfiere con la expresión normal de C4 en hojas en desarrollo. Sin embargo, el nabón es una especie C3 y, hasta la fecha, no hay evidencia de que esta mutación afecte la expresión del desarrollo foliar. La razón por la cual el costo de resistencia del alelo Trp-574-Leu se expresa en algunas especies y en otras no, es desconocido (Yu y Powles, 2014). Ello sugiere que la existencia de costos de resistencia a herbicidas deberían ser evaluados en cada caso en particular.

Si bien en mi trabajo no se encontraron diferencias, en los resultados observados por Vercellino *et al.* (2018), en condiciones de baja interferencia intraespecífica, durante dos estaciones de crecimiento, las accesiones de nabón resistentes a AHAS mostraron 22 a 38% menor número de semillas y 21 a 47% menor rendimiento por planta que las accesiones susceptibles. Estas plantas presentaron

la mutación Trp-574-Leu y mostraron 3,2 veces menor actividad enzimática AHAS que las plantas susceptibles. En este estudio, la reducción de la actividad enzimática AHAS posiblemente haya sido el mecanismo fisiológico responsable del costo biológico encontrado (Vercellino *et al.* 2020). Este estudio sugiere que la mutación Trp-574-Leu, que otorga resistencia genética a herbicidas AHAS, impone efectos pleiotrópicos negativos sobre los rasgos reproductivos de nabón. Esto podría reducir la proporción de alelos de resistencia en ausencia de selección de herbicidas AHAS. La falta de correlación entre los efectos pleiotrópicos encontrados en estadios vegetativos y reproductivos podría indicar que 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.

En concordancia con lo observado en este trabajo, estudios realizados en *Solanum ptychanthum* Dunal con la mutación Ala-205-Val, mostraron un costo de resistencia evidente en condiciones óptimas de crecimiento, pero no mostraron efectos pleiotrópicos en condiciones de estrés hídrico y térmico (Ashigh y Tardif, 2011). En mi experimento, se evaluó el estado vegetativo de nabón en condiciones de competencia, mientras que en Vercellino *et al.* 2018 se evaluó el estado reproductivo sin interferencia con un cultivo. Por lo tanto, deberían realizarse futuras evaluaciones en estado reproductivo, en condiciones de competencia, para discutir los posibles efectos ecológicos y evolutivos de la mutación AHAS Trp-574-Leu sobre las poblaciones resistentes de nabón.

#### *Biotipos de girasol silvestre frente a estrés por competencia de maíz*

Los biotipos colectados en Barrow, tanto en 2007 como 2017, mostraron un mayor crecimiento con respecto al biotipo ruderal Barón, posiblemente debido a una adaptación al ambiente agrícola, los cuáles son ambientes con mayor disponibilidad de recursos y mayor competencia interespecífica.

Los datos recolectados por Kane y Rieseberg (2008) implican que los biotipos maleza de girasol silvestre capaces de competir y superar al maíz, han evolucionado varias veces dentro de la especie *H. annuus*. En estos, la varianza en el tamaño del

alelo y la heterocigocidad no se redujeron significativamente en los biotipos maleza estudiados, como se hubiera esperado si estas poblaciones hubieran experimentado recientemente una selección extremadamente fuerte o cuellos de botella poblacionales. Toda esta evidencia en conjunto sugiere que la forma maleza de *H. annuus*, que tiene un impacto económico negativo sustancial en algunas regiones, puede evolucionar con bastante facilidad a partir de poblaciones adaptadas a otros hábitats.

Presotto *et al.* (2017) encontró evidencia de una compensación entre crecimiento y tolerancia al estrés, implicada en la adaptación de un biotipo maleza de *H. annuus* a condiciones agrícolas, en comparación con biotipos ruderales y el cultivo. Teniendo en cuenta las demandas competitivas de recursos en cualquier planta, la adaptación a los entornos agrícolas puede resultar en un aumento en el crecimiento, pero con una menor tolerancia a distintos tipos de estrés. Sin embargo, Sultan *et al.* (2013) realizó un estudio de resurrección en el que observó lo contrario en la especie invasora *Persicaria cespitosa* (Blume) Nakai. En este caso, se documentó durante un periodo de 11 años, la evolución de una mayor producción de aquenios, así como una mayor plasticidad fisiológica y de biomasa total, en respuesta a las condiciones más abiertas y soleadas que se encuentran en el rango de América del Norte en el que la especie se ha vuelto invasora.

Sin embargo, en mi experimento no se encontraron diferencias de crecimiento entre el biotipo de maleza Barrow colectado en 2007 y 2017, aunque sí se pudo observar mayor tamaño con respecto al biotipo ruderal colectado en Barón.

En cuanto a la ausencia de diferencia entre el crecimiento de los biotipos Barrow es posible que la evolución de dicha especie ocurriera antes del 2007, por lo tanto no pudimos observarla en este periodo de tiempo analizado (2007 vs. 2017). También, probablemente no se observe una diferencia en las variables evaluadas en mi experimento, pero si se podría ver una evolución teniendo en cuenta otras variables en experimentos futuros, por ejemplo la evaluación de las mismas en estado reproductivo, la producción de semillas y/o emergencia de las mismas.

Durante las últimas décadas se ha acumulado abundante evidencia que muestra que la selección natural puede causar cambios evolutivos en sólo unas pocas generaciones. Por ejemplo, Kuester *et al.* (2016) utilizó un enfoque de resurrección para examinar el potencial de evolución genotípica y fenotípica en *Ipomoea purpurea* L. (Roth), una maleza agrícola resistente al herbicida glifosato, utilizando cohortes muestreadas con nueve años de diferencia (2003 vs. 2012). En este trabajo, encontraron que las progenies de semillas de las poblaciones muestreadas en 2012 exhibieron menor diversidad genética y mayor diferenciación genética que las progenies de semillas muestreadas de los mismos campos y ubicaciones en 2003, lo que sugiere que estas poblaciones han experimentado cuellos de botella genéticos entre períodos de muestreo.

## **Conclusiones**

- El estrés por competencia del cultivo de trigo redujo el crecimiento de nabón, provocando una menor expansión foliar, así como una menor acumulación de biomasa aérea.
- La mutación no estuvo asociada a ningún costo adaptativo, ya que no se observó una respuesta diferencial a la competencia entre los biotipos resistente y susceptible.
- El estrés por competencia con el cultivo de maíz redujo el crecimiento de todos los biotipos de girasol silvestre evaluados.
- El biotipo colectado en Barrow en 2017 presentó un mayor crecimiento que su contraparte colectado en 2007 y que Barón, aunque en presencia de estrés por competencia no se observaron diferencias entre biotipos.

## **Referencias**

AAPRESID (2019). <https://www.aapresid.org.ar/rem-malezas/>

Ashigh J y 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.

Baskin CC and Baskin JM. (2014). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*, 2nd edition. Academic Press, New York.

Batlla, D. y Benech-Arnold, RL (2007). Predecir cambios en el nivel de latencia en los bancos de suelo de semillas de malezas: implicaciones para el manejo de malezas. *Protección de cultivos*, 26 (3), 189-197.

Casquero, M., Presotto, A. y Cantamutto, M. (2013). Exoferalidad en girasol (*Helianthus annuus* L.): un estudio de caso de interferencia intraespecífica / interbiotipo promovida por la actividad humana. *Investigación de cultivos de campo*, 142, 95-101.

Darmency, H., Colbach, N., & Le Corre, V. (2017). Relationship between weed dormancy and herbicide rotations: implications in resistance evolution. *Pest management science*, 73(10), 1994-1999.

Fernández, O., Leguizamón, E. S., Acciaresi, H. A., Troiani, H. O., & Villamil, C. B. (2015). *Malezas e invasoras de la Argentina. Tomo I: Ecología y manejo*. Bahía Blanca: Editorial EDIUNS. [online] available: <https://goo.gl/UWp1c9>.

Franks, SJ, Sim, S. y Weis, AE (2007). Rápida evolución del tiempo de floración de una planta anual en respuesta a una fluctuación climática. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 104 (4), 1278-1282.

Gómez, R., Méndez-Vigo, B., Marcer, A., Alonso-Blanco, C., & Picó, F. X. (2018). Quantifying temporal change in plant population attributes insights from a resurrection approach. *AoB Plants*, 10(5), ply063.

Heap I. (2020). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [Online]. Disponible: [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)

Ibarra, F. E. (1937). Malezas más comunes del trigo y del lino. *Almanaque del Ministerio de Agricultura*, 405-410.

Jasieniuk, M., Brûlé-Babel, A. L., & Morrison, I. N. (1996). The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed science*, 176-193.

Kane, N. C., & Rieseberg, L. H. (2008). Genetics and evolution of weedy *Helianthus annuus* populations: adaptation of an agricultural weed. *Molecular Ecology*, 17(1), 384-394.

Kuester, A., Wilson, A., Chang, SM y Baucom, RS (2016). Un experimento de resurrección encuentra evidencia de una diversidad genética reducida y una evolución adaptativa potencial en la maleza agrícola *Ipomoea purpurea*. *Molecular Ecology*, 25 (18), 4508-4520.

Li, M., Yu, Q., Han, H., Vila-Aiub, M., & Powles, S. B. (2013). ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. *Pest management science*, 69(6), 689-695.

Nichols, V., Verhulst, N., Cox, R., & Govaerts, B. (2015). Agricultura de conservación y manejo de malezas.

Owen, M. J., Goggin, D. E., & Powles, S. B. (2015). Intensive cropping systems select for greater seed dormancy and increased herbicide resistance levels in *Lolium rigidum* (annual ryegrass). *Pest management science*, 71(7), 966-971.

Pandolfo, C. E., Presotto, A., Moreno, F., Dossou, I., Migasso, J. P., 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(2), 354-361.

Pandolfo, C. E., Presotto, A. D., & Cantamutto, M. Á. (2018). *Raphanus sativus* L., *Raphanus raphanistrum* L. Malezas e invasoras de la Argentina.

Presotto, A., Hernández, F., Díaz, M., Fernández-Moroni, I., Pandolfo, C., Basualdo, J.,... & Poverene, M. (2017). Crop-wild sunflower hybridization can mediate weediness throughout growth-stress tolerance trade-offs. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 249, 12-21.

Scursoni, J. A., Gigón, R., Martín, A. N., Vigna, M., Leguizamón, E. S., Istilart, C., & López, R. (2014). Changes in weed communities of spring wheat crops of Buenos Aires province of Argentina. *Weed Science*, 62(1), 51-62.

Sultan, S. E., Horgan-Kobelski, T., Nichols, L. M., Riggs, C. E., & Waples, R. K. (2013). A resurrection study reveals rapid adaptive evolution within populations of an invasive plant. *Evolutionary Applications*, 6(2), 266-278.

Tardif, F. J., 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(2), 251-264.

Varanasi, A., Prasad, P. V., & Jugulam, M. (2016). Impact of climate change factors on weeds and herbicide efficacy. In *Advances in agronomy* (Vol. 135, pp. 107-146). Academic Press.

Vercellino, R. B., Pandolfo, C. E., Breccia, G., Cantamutto, M., & Presotto, A. (2018). AHAS Trp574Leu substitution in *Raphanus sativus* L.: screening, enzyme activity and fitness cost. *Pest management science*, 74(7), 1600-1607.

Vigueira, C. C., Olsen, K. M., & Caicedo, A. L. (2013). The red queen in the corn: agricultural weeds as models of rapid adaptive evolution. *Heredity*, 110(4), 303-311.

Vila-Aiub, M. M., Neve, P., & Powles, S. B. (2009). Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist*, 184(4), 751-767.

Vila-Aiub, M. M., Yu, Q., Han, H., & Powles, S. B. (2015). Effect of herbicide resistance endowing Ile-1781-Leu and Asp-2078-Gly ACCase gene mutations on ACCase kinetics and growth traits in *Lolium rigidum*. *Journal of experimental botany*, 66(15), 4711-4718.

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

Yu, Q., & Powles, S. B. (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest management science*, 70(9), 1340-1350.

## Anexo de imágenes



**Imagen A.** Siembra de los biotipos de girasol en el centro de las macetas con el cultivo de maíz.



**Imagen B.** Primera medición de las variables evaluadas en los biotipos de girasol.



**Imagen C.** Biotipo ruderal Baron sin competencia. Última medición.



**Imagen D.** Biotipo ruderal Barón con competencia. Última medición.



**Imagen E.** Biotipo Barrow 2007. Última medición.



**Imagen F.** Biotipo Barrow 2017. Última medición.