Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Agrarias

Tesis para optar por el grado académico de:
Doctor en Ciencias Agrarias

Caracterización biológica y fisiológica de poblaciones del género *Echinochloa* con sensibilidad diferencial a glifosato en Argentina

Eduardo Cortés

Director: Dr. Ignacio Dellaferrera

Co-Director: Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti

2024

A Lorena por el apoyo constante en toda mi carrera.
A Agustina y Lautaro que son mi guía.

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que nombro a continuación por la innumerable cantidad de cosas que hicieron por la realización de esta tesis y no puedo nombrar en este texto tan breve.

A Ignacio por guiarme en esta tarea, dedicando gran parte de su tiempo a compartir su sabiduría, experiencia y por sobre todas las cosas su amistad.

A Mauro, Federico, Diego y Lucas, por su ayuda en todos los ensayos que realizamos.

Al jurado evaluador por su labor y por los aportes realizados en la corrección del presente trabajo

Al INTA San Francisco, en especial a Alejandro y Graciela quienes me apoyaron para hacer el doctorado.

A mi familia porque gran parte de esto es de ellos con su apoyo constante.

Uno, es resultado y parte del vínculo que forma con las personas que lo rodean, por eso, quiero también agradecer a todas las personas que aun sin nombrarlas podrán leer parte de sus discursos reflejados a través mío en este manuscrito.

Particularmente, además, quiero también agradecer a las instituciones que me brindaron el acceso a sus laboratorios y diversas instalaciones y recursos los cuales permitieron la realización de esta tesis.

A la Universidad Nacional del Litoral

Al INTA

Resumen

Las especies del género *Echinochloa* son algunas de las principales malezas en Argentina. Este género consta de alrededor de 33 especies en todo el mundo. En Argentina, las de mayor presencia son *E. colona* (L.) Link y *E. crus-galli* (L.) P. Beauv. pero *E. chacoensis* Michael ex Renvoize y *E. oryzoides* (Ard.) Fritsch también están presentes en cultivos de soja y maíz, pero en menor proporción. Estas malezas presentan competencia agresiva, con una alta utilización de nitrógeno, mimetismo de cultivos, alelopatía y resistencia al estrés abiótico, incluida la resistencia a herbicidas. A nivel mundial se reportan fallas en el control químico con herbicidas como glifosato, inhibidores de ALS (inhibidores de la enzima acetolactato sintetasa) y graminicidas. No existen publicaciones previas que confirmen la resistencia al herbicida glifosato en todo el mundo, como así tampoco existe un estudio comparativo sobre la sensibilidad de las diferentes especies de *Echinochloa* en Argentina.

Las poblaciones de *E. colona* reportadas como resistentes, presentan distintos mecanismos que explican su baja sensibilidad al glifosato. Las mutaciones, en particular la Pro-106-Ser, modifican la estructura de la EPSPS (5-enol-piruvil shikimato-3-fosfato sintasa), pero mantienen su funcionalidad, contrario a la mutación Thr 102 que confiere resistencia a glifosato, pero reduce la afinidad de EPSPS por PEP (fosfenol piruvato). Actualmente, no se conocen los niveles de sensibilidad al glifosato ni los mecanismos que podrían conferir resistencia a estas poblaciones. Tampoco se han encontrado registros de estudios que relacionen la sensibilidad con las posibles variaciones en el desarrollo vegetativo y potencial reproductivo de esta especie.

Entre 2015 y 2019, se recolectaron semillas de 4 especies del género *Echinochloa* en la región central de soja de Argentina. Se determinó la supervivencia, su sensibilidad a glifosato mediante ensayos de dosis-respuesta e inhibición enzimática. Se determinó el nivel de ploidía por citometría de flujo y la secuencia de ADN del gen EPSPS. Por último, se realizaron ensayos de evaluación de la forma de crecimiento y el potencial reproductivo buscando determinar el efecto de la aplicación de glifosato sobre

la forma de crecimiento de cada población.

En base a los análisis de supervivencia, y dosis respuesta, se consideran resistentes al glifosato las poblaciones: Ec04, Ec07 y Ec14 de *E. colona*, Ecg06, Ecg07, Ecg14 y Ecg16 de *E. crus-galli*, Eo02, Eo03, Eo04, Eo07 y Eo08 de *E. oryzoides*. y Ech02 de *E. chacoensis*. En *E. colona* en las poblaciones Ec5 y Ec7 existe una mutación puntual Pro-106-Thr. La población Ec4 presentó la mutación Pro-106-Gln y Pro-106-Glu, las cuales no habían sido reportadas anteriormente en ninguna especie a nivel mundial.

El nivel de ploidía para las poblaciones estudiadas de *E. colona* arrojó que un 60% de las mismas son tetraploides y un 40% son tetra y hexaploides, mientras que la población estudiada de *E. crus-galli* fue hexaploide.

La aplicación de glifosato afecto en forma diferente a cada especie. Para *E. colona* el número de panojas, peso de mil semillas y el tiempo a floración no se vieron afectados por la aplicación de glifosato, los demás parámetros de estructura de planta si se vieron reducidos. Las poblaciones de *E. crus- galli* aplicados con glifosato no se diferenciaron estadísticamente de las poblaciones sin la aplicación de este herbicida en los parámetros de largo de panoja, número de panojas y peso de mil semillas. Espigas por espiguillas, espigas por panoja, granos por planta y el tiempo a floración si se redujeron cuando se aplicó glifosato.

Summary

Species of the genus *Echinochloa* are some of the most common weeds in Argentina. This genus consists of approximately 33 species worldwide. In Argentina, the most prevalent are *E. colona* (L.) Link and *E. crus-galli* (L.) P. Beauv. However, *E. chacoensis* Michael ex Renvoize and *E. oryzoides* (Ard.) Fritsch are also present in soybean and corn crops, although to a lesser extent. These weeds exhibit aggressive competition, high nitrogen utilization, crop mimicry, allelopathy, and resistance to abiotic stress, including herbicide resistance. Failures in chemical control with herbicides such as glyphosate, ALS inhibitors (acetolactate synthase enzyme inhibitors), and graminicides are reported worldwide. There are no previous publications confirming resistance to the herbicide glyphosate worldwide, nor is there a comparative study on the sensitivity of different *Echinochloa* species in Argentina.

The *E. colona* populations reported as resistant exhibit different mechanisms that explain their low sensitivity to glyphosate. The mutations, particularly Pro-106-Ser, modify the structure of EPSPS (5-enol-pyruvyl shikimate-3-phosphate synthase) but maintain its functionality, unlike the Thr 102 mutation, which confers resistance to glyphosate but reduces the affinity of EPSPS for PEP (phosphonol pyruvate). Currently, the levels of sensitivity to glyphosate and the mechanisms that could confer resistance in these populations are unknown. No records have been found of studies linking sensitivity with possible variations in the vegetative development and reproductive potential of this species. Between 2015 and 2019, seeds of four species of the *Echinochloa* genus were collected in the central soybean region of Argentina.

Survival and sensitivity to glyphosate were determined using dose-response and enzyme inhibition assays. Ploidy level was determined by flow cytometry and DNA sequencing of the EPSPS gene. Finally, growth form and reproductive potential assessment assays were conducted to determine the effect of glyphosate application on the growth form of each population.

Based on survival and dose-response analyses, the following biotypes of *E. colona* are

considered resistant to glyphosate: Ec04, Ec07, and Ec14; Ecg06, Ecg07, Ecg14, and Ecg16; Eo02, Eo03, Eo04, Eo07, and Eo08; and Ech02; *E. chacoensis*. In *E. colona*, biotypes Ec5 and Ec7 contain a Pro-106-Thr point mutation. Biotype Ec4 presents the Pro-106-Gln and Pro-106-Glu mutations, which have not been previously reported in any species worldwide. The ploidy level for the studied *E. colona* populations showed that 60% were tetraploids and 40% were tetra- and hexaploids, while the *E. crus-galli* population studied was hexaploid.

Glyphosate application affected each species differently. For *E. colona*, the number of panicles, thousand-seed weight, and time to flowering were not affected by glyphosate application, although the other plant structure parameters were reduced. E. crusgalli biotypes applied with glyphosate did not differ statistically from biotypes without the herbicide in the parameters of panicle length, number of panicles, and thousand-seed weight. Spikes per spikelet, spikes per panicle, grains per plant, and time to flowering were reduced when glyphosate was applied.

Producción científica

Publicaciones con referato

Oreja, F. H., Moreno, N., Gundel, P. E., Vercellino, R. B., Pandolfo, C. E., Presotto, A., Perotti, V., Permingeat, H., Tuesca, D., Scursoni, J. A., Dellaferrera, I., Cortes, E., Yanniccari, M., & Vila-Aiub,

M. (2024). Herbicide-resistant weeds from dryland agriculture in Argentina. Weed Research, 64(2), 89-106. https://doi.org/10.1111/wre.12613

Schneider Ana B., Panigo Elisa S., Dotto Marcela, Cortés Eduardo, Perreta Mariel G. and Ignacio M. Dellaferrera. (2024). Growth form variations of Amaranthus hybridus L. biotypes with EPSPS mutations". Weed Research, n/a(n/a).

Cortés, E., Schneider, A., Panigo, E., Perreta, M., De Prado, R., & Dellaferrera, I. (2023). First Report of Resistance to Glyphosate in Several Species of the Genus *Echinochloa* in Argentina. Agronomy, 13(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/agronomy13051219

Dellaferrera, I., Cortés, E., Panigo, E., De Prado, R., Christoffoleti, P., & Perreta, M. (2018). First Report of *Amaranthus hybridus* with Multiple Resistance to 2,4-D, Dicamba, and Glyphosate. Agronomy, 8(8), 140. https://doi.org/10.3390/agronomy8080140.

Presentaciones en congresos

Cortés, E., Longoni, E., Vicino, M., Dellaferrera, I., Piumatti, M., & Sánchez, P. (2023). Análisis de sensibilidad diferencial al herbicida fomesafen en poblaciones de *Amaranthus hybridus*. ACTAS IV Congreso Argentino de Malezas (ASACIM), 327. https://www.malezas2023.com.ar/circulares/actas2023.pdf

Bagnolo, A., Cortés, E., Mitelsky, M., & Dellaferrera, I. (2021). Pérdida de sensibilidad de herbicidas PPO en *Amaranthus hybridus* (l.) subsp hybridus y *Conyza sumatrensis* (Retz.) e. Walker var. Sumatrensis. Actas del III Congreso Argentino de Malezas (ASACIM). III Congreso Argentino de Malezas (ASACIM).

Cortés, E., Panigo, E., Alisio, M., Perreta, M., & Dellaferrera, I. (2018). Sensibilidad a glifosato y biología de malezas del genero *Echinochloa* en Argentina. Actas del II Congreso Argentino de Malezas (ASACIM). II Congreso Argentino de Malezas (ASACIM).

Divulgación científica

Cortés, E., Mitelsky, M., Bagnolo, A., & Dellaferrera, I. (2023). Nueva resistencia en Yuyo colorado a Fomesafen. Aapresid - Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa - Argentina. https://www.aapresid.org.ar/blog/nueva-resistencia-yuyo-colorado-fomesafen

Cortés, E., Mitelsky, M., Bagnolo, A., & Dellaferrera, I. (2022). Primer reporte de Amaranthus hybridus con resistencia a Fomesafen en Argentina. Red de Manejo de Plagas Aapresid. https://www.aapresid.org.ar/webroot/archivos/pdfs/62c6d3ca5bd54.pdf

Alternativas de Control de Amaranthus y *Echinochloa* INTA AER San Francisco. Año 2017. Ensayo control de *Echinochloa colona* con diferentes graminicidas. Año 2017.

INDICE

Contenido

Caracterización biológica y fisiológica de poblaciones de *Echinochloa colona* con sensibilidad diferencial al glifosato en Argentina 1

Introducción general 1

Objetivo general 7

Objetivos específicos 7

Capítulo 1 8

Análisis de sensibilidad en poblaciones del género *Echinochloa* en Argentina 8

Introducción 8

Objetivo 15

Materiales y métodos 16

Supervivencia (screening) 17

Dosis respuesta 19

Inhibición enzimática 19

Resultados 21

Determinación de la Supervivencia 21

Ensayos de dosis respuesta 24

Inhibición enzimática 31

Discusión 34

Conclusión 38

Capítulo 2 39

Estudio de las bases bioquímicas de la resistencia a Glifosato en poblaciones de *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli* en Argentina 39

Introducción 39

Objetivo 45

Materiales y métodos 46

Evaluación del nivel de ploidía 46

Extracción de ADN genómico 47

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) 47

Electroforesis de ácidos nucleicos 48

Secuenciación de fragmentos de PCR del gen EPSPS 48

Resultados 50

Secuenciación de ADN 50

Ploidía 52

Discusión 54

Conclusión 58

Capítulo 3 59

Forma de crecimiento y alteraciones producidas por glifosato en *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli* 59

Introducción 61

Objetivo 65

Materiales y métodos 66

Evaluación de la forma de crecimiento y el potencial reproductivo 66

Resultados 67

Echinochloa colona 67

Descripción de los parámetros de desarrollo en los poblaciones de *E. colona* sin y con tratamiento herbicida 67

Comparación de poblaciones de *E. colona* con y sin tratamiento herbicida 72

Echinochloa crus-galli 73

Descripción de los parámetros de desarrollo en los poblaciones de *Echinochloa crus-galli* sin y con tratamiento de herbicida 76

Comparación de poblaciones de *E. crus-galli* con y sin tratamiento herbicida 77

Comparación entre especies de *E. colona y E. crus-galli* sin y con tratamiento herbicida 78

Discusión 80

Conclusión 84

Discusión general 85

Conclusión general 91

Bibliografía 93

Caracterización biológica y fisiológica de poblaciones del género *Echinochloa* con sensibilidad diferencial al glifosato en Argentina.

Introducción general

Malezas son denominadas todas aquellas plantas que son perjudiciales a las actividades del hombre. Su importancia económica (afectando cultivos agrícolas, ganadería y forestación) y social (afectando caminos, lugares de recreación, parques, canales de 2 agua potable o riego) es de tal magnitud, que su manejo no puede ser evitado (Baker, 1974; Fernández, 1979; Bastiaans et al., 2008).

En los agroecosistemas las malezas constituyen especies de plantas asociadas a los cultivos, donde compiten por recursos limitados, reducen la cosecha y exigen que se invierta en tecnología para su manejo, elevando los costos de producción, con el fin de lograr su control y reducir las pérdidas (Radosevich et al., 2007). Las malezas comparten algunas características biológicas que las distinguen de otras en colonizar ambientes disturbados potencialmente productivos, y la capacidad de regeneración a largo plazo bajo condiciones de disturbios repetidos" (Mohler et al., 2001). Así, la presencia de una maleza se identifica mejor con un fenómeno natural relacionado con adaptación ecológica y la evolución de dichos organismos a ambientes modificados por el hombre. En este sentido, las malezas constituyen poblaciones adaptadas a ecosistemas altamente perturbados como son los ambientes agrícolas.

Desde el punto de vista ecológico, las malezas pueden definirse como especies pioneras de una sucesión secundaria, entendiendo como sucesión a la manifestación (dentro de un sistema) de los ajustes paulatinos entre la información genética de los organismos que tienen acceso al sistema y la información

ecológica del lugar (Soriano, 1975). En este sentido, la agricultura constituye la mayor fuerza selectiva en la evolución de las malezas, siendo actualmente los herbicidas uno de los factores más influyentes debido a los elevados volúmenes de aplicación (Gressel & Levy, 2006).

Para que una población de maleza sea considerado resistente debe cumplir con todos estos criterios:

1. Cumplimiento de la definición de resistencia de la WSSA (Weed Science Society of América o Sociedad Americana de la Ciencia de las malezas en castellano).

2. Confirmación de datos utilizando protocolos científicos aceptables.

3. La resistencia debe ser heredable.

4. Demostración del impacto práctico de campo.

5. Identificación como maleza problema a nivel de especie, y no el resultado de la selección artificial.

Si no cumple con cualquiera de estos criterios, la población no será considerada como tal.

Una de las malezas reportadas como resistente a diversos herbicidas son las gramíneas del género *Echinochloa*. Este género consta de alrededor de 33 especies en todo el mundo, incluidas subespecies y variedades (Soreng et al.,2017). En Argentina están presentes 7 especies (*E. chacoënsis* Michael ex Renvoize; *E. colona* (L.) Link; *E. crus-galli* (L.) P. Beauv.; *E. crus-pavonis* (Kunth) Schult.; *E. helodes* (Hack.) Parodi; *E. polystachya* (Kunth) (Belgrano et al., 2008). Las dos especies más extendidas tanto a nivel global como en Argentina son *Echinochloa colona* (L.) Link y *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. Además, *Echinochloa chacoensis* Michael ex Renvoize y *Echinochloa oryzoides* (Ard.) Fritsch están presentes en Argentina como malezas en diversos cultivos (Zuloaga et al., 2003) particularmente en cultivos de soja y maíz (Picapietra y Ponsa, 2015).

A nivel mundial están presentes en cultivos como arroz, sorgo, caña de azúcar, algodón, maní, etc. (Holm, 1991). Estas 4 especies de *Echinochloa* se comportan como malezas y producen una fuerte competencia con muchos cultivos, *E. colona* reduce entre 12 y 27 kilogramos por hectárea de soja por cada

unidad de porcentaje de cobertura de la misma (Picapietra y Ponsa, 2015; Pautasso, 2015) y *E. crus-galli* puede reducir aproximadamente un 25% el rendimiento del arroz en condiciones de alta infestación (Chin, 2001).

Todas las especies del género *Echinochloa* son anuales C4 (Rao et al., 2007), de emergencia primavero-estival, se propagan por semillas y comparten hábitat en lotes agrícolas. Las plantas de este género varían ampliamente y su taxonomía es confusa (Damalas et al., 2008; Yabuno, 1983). Sólo *E. chacoensis* tiene lígulas, las otras tres especies no tienen lígulas ni aurículas. La inflorescencia de *E. crus-galli* es una panícula piramidal erecta, formada por 15 a 30 pseudoespigas; mientras que *E. colona* su panícula es erecta y tiene mayor número de estructuras reproductivas dispuestas en ramas laterales, presentándose entre 5 y 15 de ellas. *E. oryzoides* tiene inflorescencias espiciformes contraídas con 6-15 ramas cortas de primer orden, y *E. chacoensis* tiene una panícula contraída con espiguillas apretadas en las ramas (Pfitscher y Barreto, 1976; Renvoize, 1995).

Estas poblaciones presentan alta producción de semillas, latencia corta de las semillas, crecimiento rápido, potencial competitivo, interacción alelopática y resistencia a diversos herbicidas hacen de estas malezas un desafío permanente en diversos agroecosistemas (Gibson, et al; 2002; Clay, et al; 2005).

En cuanto a su control químico, a nivel mundial se registran fallas en diferentes poblaciones del género *Echinochloa*. La primera población resistente de *E. colona* se confirmó en 2007 en Australia (Heap, 2025). Mientras, la Weed Science Society of America declaró casos de resistencia al glifosato en poblaciones de *Echinochloa* sp. para Estados Unidos a partir de 2008 y en Argentina a partir de 2009 (Heap, 2022; Gaines, et al 2012).

La resistencia a los herbicidas es un proceso evolutivo y ecológico. La dinámica de este proceso está influenciada por 1) las características de la maleza, que incluyen además los factores morfológicos y genéticos asociados con la maleza, 2) las características del herbicida, que incluyen además el modo o

sitio de acción del herbicida y 3) finalmente, los factores operativos, es decir las prácticas agrícolas tales como siembra, cosecha y pos-cosecha (Sudershan, et al; 2020).

Se reportan un total de 83 casos de 8 especies y variedades del género *Echinochloa* con resistencia en el mundo a varios grupos de herbicidas entre ellos, *E. colona; E. crus-galli* (L.) P. Beauv. var. crus-galli; *E. crus-galli* var. formosensis Ohwi; *E. crus-galli* var. zelayensis (Humb., Bonpl. & Kunth) Hitchc.; *E. crus-pavonis* (Kunth) Schult; *E. erecta* (Pollacci) Pignatti; *E. oryzoides* y *E. phyllopogon* (Stapf) Stapf ex Kossenko (=E. oryzicola) (WFO World, 2022), siendo *E. crus-galli* var. *crus-galli* tiene el mayor número de casos y *E. colona* es la más extendida en cultivos. En todas las especies, la resistencia está presente principalmente en cultivos de arroz, pero también hay pocos casos presentes en maíz, soja, sorgo, algodón, uvas, huertos, sandías, barbechos, cercas y bordes de carreteras (Heap, 2022).

Para varias de estas especies, no existen publicaciones previas que confirmen la resistencia al herbicida glifosato en todo el mundo (Heap, 2022). Además, no existe un estudio comparativo sobre la sensibilidad de las diferentes especies de *Echinochloa* en Argentina (Leguizamon, E; 2011). En los agroecosistemas las distintas especies de *Echinochloa* exhiben síndromes típicos de adaptación, como competencia agresiva con una alta utilización de nitrógeno, mimetismo de cultivos, alelopatía y resistencia al estrés abiótico (incluida la resistencia a herbicidas).

Algunos autores reportaron una reducción del rendimiento del arroz en siembra directa de hasta un 76% cuando *E. colona* estaba presente a una densidad de 280 plantas por metro cuadrado (Fischer, A. & Valverde, BE; 2010, según Mercado y Talatala). En ensayos realizados en el cultivo de soja, se determinaron pérdidas cercanas al 20% de rendimiento cuando *E. colona* se encontraba en niveles de infestación de 25% (Picapietra y Ponsa, 2015).

En la Argentina, existen estudios en *E. colona* que muestran que su presencia y abundancia ha aumentado como consecuencia del uso continuo de glifosato y de soja resistente a este herbicida en siembra directa (Puricelli y Tuesca, 2005; Papa y Tuesca, 2013). En nuestro país, se han denunciado

poblaciones resistentes a glifosato de esta gramínea en las provincias de Santa Fe (Papa y Tuesca, 2013) y Tucumán (De la Vega, comunicación personal). En esta maleza se sospecha también la resistencia a herbicidas pertenecientes al grupo de Inhibidores de la enzima ALS en la provincia de Entre Ríos (Metzler, et al. 2018).

Las poblaciones de *E. colona* reportadas como resistentes en otros países, presentan distintos mecanismos que explican su baja sensibilidad al glifosato. Las poblaciones reportados en Australia translocan menos herbicida al sitio de acción (Alarcón-Reverte, et al: 2013) mientras que algunos poblaciones de California presentan mutaciones en la posición 106, otros solo reducciones en la translocación y otros presentan una combinación de estos mecanismos (Sudershan, et al; 2020).

Esto indica que individuos de diferentes poblaciones pueden presentar diferentes mecanismos de resistencia y también diferentes mecanismos pueden estar presentes en una misma planta de *E. colona* (Belgrano, et al; 2008). Las mutaciones, en particular la Pro-106-Ser, modifican la estructura de la EPSPS, pero mantienen su funcionalidad, contrario a la mutación Thr 102 que confiere resistencia a glifosato, pero reduce la afinidad de EPSPS por PEP (Morran et al; 2018). Así mismo la capacidad competitiva de cada población o población puede verse alterada según como se haya seleccionado.

Echinochloa, manifiesta gran adaptación ambiental, presentando porte alto en suelos húmedos -inclusive inundados- y porte más pequeño en suelos secos sujetos al pastoreo (Nguyen, T.H; 2015), por lo cual es importante caracterizar estos parámetros en las poblaciones presentes en cada zona para lograr un adecuado manejo de esta maleza. En general, las malezas anuales como *E. colona* forman un banco de semillas que asegura la perpetuación a largo plazo. La dinámica poblacional de una maleza está influenciada por muchos factores entre los cuales se puede mencionar los distintos tipos de manejo (químico, mecánico y cultural). Los cambios de la dinámica poblacional asociados a distintos tipos de manejo pueden producirse por variaciones en procesos demográficos como la germinación, el establecimiento, la fecundidad o en la viabilidad de las semillas.

Existe escasa información acerca de las características biológicas y fisiológicas de las distintas poblaciones de *E. colona,* así como de otras especies del género en la Argentina. Actualmente, no se conocen los niveles de sensibilidad al glifosato ni los mecanismos que podrían conferir resistencia a estas poblaciones. Tampoco se han encontrado registros de estudios que relacionen la sensibilidad con las posibles variaciones en el desarrollo vegetativo y potencial reproductivo de esta especie.

Objetivo general

Caracterizar diferencias en los aspectos biológicos y fisiológicos en poblaciones del género *Echinochloa* con sensibilidad diferencial a glifosato de la región central de la Argentina.

Objetivos específicos

- Determinar el grado de sensibilidad a glifosato en 25 poblaciones del género *Echinochloa* provenientes de diferentes provincias del centro-norte de Argentina.
- Evaluar la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfatosintasa en las distintas poblaciones de *Echinochloa* con sensibilidad diferencial a glifosato.
- Determinar en poblaciones de *Echinochloa colona y Echinochloa crus-galli* con sensibilidad diferencial a glifosato presencia de alteraciones en el sitio de acción.
- Determinar los niveles de ploidía en poblaciones del género *Echinochloa.*
- Caracterizar el desarrollo vegetativo y el potencial reproductivo, a fin de establecer posibles diferencias entre poblaciones de las especies *E. colona* y *E. crus-galli* con sensibilidad diferencial a glifosato, y su variación de la forma de crecimiento ante la aplicación del herbicida

Con el fin de abordar los objetivos mencionados, el presente trabajo se organiza de la siguiente manera:

- En el *Capítulo 1* se analiza la sensibilidad diferencial a glifosato en 4 especies del género *Echinochloa*. Se determina además el grado de inhibición del sitio de acción mediante una medición de ácido shikímico acumulado para estas especies.
- El *Capítulo 2* comprende el estudio de posibles mutaciones en el sitio de acción y niveles de ploidía en dos especies: *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli*.
- El *Capítulo 3* aborda el desarrollo vegetativo y el potencial reproductivo en *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli*, a fin de establecer posibles diferencias entre poblaciones con sensibilidad diferencial a glifosato.

Capítulo 1

Análisis de sensibilidad a glifosato en poblaciones del género *Echinochloa* en Argentina.

Introducción

Utilizar un herbicida con el mismo ingrediente activo durante un largo período de tiempo actúa como una importante fuerza de selección, provocando cambios en las relaciones de dominancia dentro de las comunidades de malezas y generando la aparición de malezas que muestran algún grado de tolerancia o resistencia (Christofoletti et al., 2008) o mecanismos que les permiten escapar de la acción del herbicida (Scursoni & Satorre, 2010).

Esta selección puede darse a nivel intra o inter específico; en el primer caso, cuando a partir de una población que originalmente era susceptible a un determinado herbicida resulta una subpoblación de individuos que no lo son, de aquí saldrán individuos resistentes; mientras que cuando la selección se produce a nivel inter específico, es decir la selección de especies que nunca fueron controladas por el herbicida, estamos frente a individuos tolerantes al herbicida. Numerosas especies han sido reportadas como tolerantes o resistentes a glifosato, sin embargo, la causa de esta sensibilidad diferencial no es aun completamente comprendida y la información disponible es limitada (Owen, 2008). La definición científica de resistencia y tolerancia fue presentada en 1998 por WSSA (Sociedad Americana de Ciencias de las Malezas) y deben usarse cuando corresponda en todas las publicaciones futuras. La tolerancia es definida como "la capacidad inherente de una especie a sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con herbicida. Esto implica que no hubo selección o manipulación genética para hacer la planta" (Weed Technology 1998). En cambio, la resistencia es definida como "la capacidad adquirida heredable de una planta a sobrevivir y reproducirse después de la exposición a una dosis normalmente letal para una población salvaje.

En una planta, la resistencia puede ser que ocurra naturalmente o inducida por técnicas como la ingeniería genética, entre otras" (Vila-Aiub y Fisher, 2014).

Busi et al. (2021) proponen que una supervivencia ≥ 20% sea interpretada como "resistencia" a los herbicidas. Esta clasificación de resistencia de las malezas se usa generalmente porque los agricultores a menudo reconocen visualmente la resistencia a un nivel de aproximadamente 20% de supervivencia (escapes de control) en el campo. Una resistencia ≥20% resultaría en una falla comercial del herbicida, momento en el cual los agricultores pueden dejar de usar el herbicida o considerar opciones de manejo alternativas.

Actualmente en el mundo se reportan un total de 83 casos de 8 especies y variedades del género *Echinochloa* con resistencia a varios grupos de herbicidas incluyendo *E. colona*; *E. crus-galli* var. crus-galli; *E. crus-galli* var. formosensis; *E. crusgalli* var. zelayensis; *E. crus-pavonis*; *E. erecta*; *E. oryzoides* y *E. phyllopogon* (=*E. oryzicola*).

Echinochloa crus-galli var. crus-galli es la que presenta el mayor número de casos resistencia a herbicidas y *Echinochloa colona* es la más extendida en cultivos. En todas las especies la resistencia está presente principalmente en cultivos de arroz, pero también pocos casos están presentes en maíz, soja, sorgo, algodón, uvas, huertas, sandía, barbecho, cercas y bordes de caminos (Heap 2022).

A nivel mundial, en los últimos años se han registrado dificultades para el control de *Echinochloa* colona en Brasil, con lo cual podríamos estar frente a un caso de resistencia. En Australia, Gaines et al, (2012) determinaron que una población de *Echinochloa* colona mostraba resistencia a glifosato. Dichos autores encontraron que la población resistente presentó una DL_{50} 8,6 veces mayor que la población susceptible. Alarcón et al. (2013) realizaron un experimento en el Noreste de California sobre una población de capín (*E. colona*) proveniente de un campo de maíz resistente. En la misma se confirmó la resistencia a glifosato cuando se la comparó con una población susceptible. En esta última el control fue del 96% utilizando la dosis recomendada, mientras que en la población resistente el control fue del 20%

determinando una DL_{50} de 6,6 veces superior para la población resistente. La Weed Science Society of América declaró en 2008, casos de resistencia a glifosato en poblaciones de *Echinochloa* sp. en Estados Unidos y en 2009 en Argentina.

En relación a lo anteriormente mencionado, en Argentina ya fueron mencionados casos de poblaciones resistentes al control con glifosato. Experimentos en condiciones de campo realizados en el centro de Santa Fe, sobre plantas en condiciones óptimas de receptividad de glifosato, permitieron determinar la presencia de poblaciones resistentes (Heap, 2019) con valores de DL_{50} de entre 612 a 1392 g.e.a./ha^{-1}. La relación de estos valores con los correspondientes a una curva patrón confeccionada a partir de una población susceptible (Papa et al, 2010) permitió estimar un índice de resistencia a glifosato (R/S) que osciló entre 2,7 y 6,2. Estos valores calificarían a estas poblaciones como fuertemente sospechosos de ser resistentes a glifosato, considerando que la dosis recomendada para el control total de esta maleza es de 720 a 1080 g.e.a./ha^{-1}

En Argentina *Echinochloa colona* presentó una evolución sostenida en el área ocupada desde 2013 a la actualidad (Figura 1.1), hasta lograr el 35% del área agrícola en el año 2023 y posicionarse como la cuarta maleza en importancia (Eugenia Niccia, REM, comunicación personal). Más allá de su crecimiento en superficie y la preocupación por su manejo entre técnicos y productores, existe escasa información acerca de la sensibilidad de las distintas poblaciones en Argentina. En particular, en *E. colona* existen estudios que muestran que su presencia y abundancia ha aumentado como consecuencia del uso continuo de glifosato en las provincias de Santa Fe y Córdoba (Papa et al, 2010). De esta última, no se conocen actualmente los niveles de sensibilidad a glifosato, ni los mecanismos que podrían hacer resistentes estas poblaciones. Tampoco se han encontrado registros de estudios que relacionan la sensibilidad con las posibles variaciones en el nivel del potencial reproductivo de esta especie.

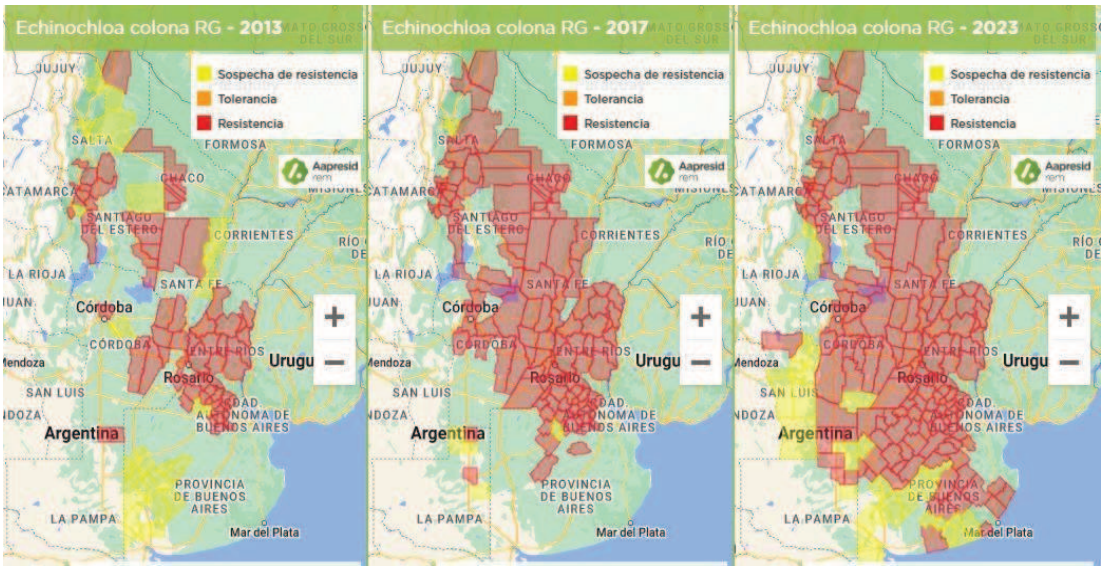

Figura 1.1. Superficie ocupada por *Echinochloa colona* resistente a glifosato en los años 2013, 2017 y 2023 en Argentina (REM, Aapresid 2023).

Echinochloa colona (L.) Link es una de las malezas más problemáticas en el mundo y con amplia expansión en nuestro país. La misma presenta diversas poblaciones, alta producción de semillas, corta latencia de las mismas, crecimiento rápido y alto potencial competitivo. La diversidad morfológica actualmente presente en las poblaciones de *Echinochloa* podría contribuir a su adaptación a la presión de selección, impuesta por diferentes herramientas de manejo, enfatizando la necesidad de un enfoque de manejo diversificado para controlar efectivamente esta especie de maleza (Liu et al., 2022).

Durante muchos años se utilizó como único herbicida postemergente para su control al glifosato. Este herbicida actúa inhibiendo la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina en especies de plantas susceptibles. El glifosato compite con el sustrato fosfoenol piruvato (PEP) por un sitio de unión en la enzima 5-enol-piruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). La EPSPS se codifica en el núcleo y se importa a los cloroplastos, donde convierte shikimato-3-fosfato y PEP en 5-enol-piruvil shikimato-3-fosfato sintasa (Arregui et al., 2013). Además de inhibir la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas susceptibles, la interacción entre glifosato y EPSPS interfiere con la producción de compuestos secundarios derivados de compuestos aromáticos. La biosíntesis de proteínas, auxinas, compuestos de defensa de patógenos, fitoalexinas, ácido fólico, precursores de ligninas,

flavonoides, plastoquinona y cientos de otros compuestos fenólicos y alcaloides pueden verse afectados por la inhibición de EPSPS debido a la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Goodwin et al, 1983).

La comprensión de los efectos producidos por el glifosato y la detección precoz de la resistencia a herbicidas es una herramienta invaluable a la hora de decidir prácticas de manejo de malezas, ya que las malezas resistentes requieren manejos particulares (Green et al., 2010). La resistencia herbicida se determina científicamente cuando se cumplen con los 5 criterios definidos en el comité de acción ante la resistencia a herbicidas en ingles definido como herbicide resistance action comittee (HRAC) (Heap, 2016), criterios de los cuales la determinación del nivel de resistencia se lleva a cabo en laboratorio.

La comparación entre poblaciones se realiza con mayor frecuencia mediante la determinación de la dosis efectiva que causa una inhibición del 50% (GR_{50}) del crecimiento observado por la reducción de la biomasa y/o las calificaciones visuales o la dosis necesaria para matar al 50% de las plantas (DL_{50}). Las variables de respuesta evaluadas son peso fresco (PF) o peso seco de tejidos (PS) (Ritz et al. 2005). Cualquiera de estas respuestas podría usarse para estimar los niveles de resistencia o las cantidades de herbicidas que podrían causar un cierto nivel de reducción o control del crecimiento. La respuesta de la planta se evalúa dentro de 1 a 4 semanas de aplicación de herbicida según el modo de acción. Para los herbicidas posemergentes

(POST), 1 semana después del tratamiento (WAT) es apropiado para aquellos con acción de contacto, mientras que los herbicidas de acción más lenta se evalúan mejor en 3 a 4 WAT (Burgos, 2015).

La tasa de supervivencia de una población es útil para predecir el posible depósito de semillas en el suelo. Para responder a esta pregunta, se recopilan datos de mortalidad y se estiman las dosis letales (DL_{50} o DL_{90}) para la población en cuestión a partir de un experimento de dosis-respuesta. El análisis es una regresión logística de datos binomiales (McCullagh, 2019), que casi corresponde a logit en una escala logarítmica del eje de dosis. Mientras que el GR_{50} de las mismas plantas podría cambiar significativamente debido a las condiciones ambientales, el DL_{50} se vería menos afectado (Streibig & Kudsk, 1993; Streibig, 1988).

Para generar respuestas de dosis reproducibles, las dosis deben cubrir todo el rango de respuesta, desde prácticamente ningún efecto alrededor del control no tratado hasta el control del 100% en dosis altas. Algunas especies altamente resistentes ya no mueren debido a la concentración de herbicida más alta posible en la mezcla de rociado, en cuyo caso el rango de dosis debe extenderse hasta un punto donde no se observe más respuesta (Seefeldt et al, 1995). Mientras que la sensibilidad del glifosato en una planta puede ser medida como se describe en los párrafos anteriores, también puede medirse el grado de inhibición del sitio de acción mediante el ácido shikímico acumulado luego de una aplicación. Elevados valores de ácido shikímico son indicadores de inhibición de la EPSPs por parte del glifosato, (Duke, 2011) y una medida indirecta del grado de sensibilidad de una especie al herbicida glifosato.

Las evaluaciones de acumulación de ácido shikímico en respuesta a la inhibición del glifosato de las enzimas EPSPS se usa no solo para determinar la exposición de la planta a este herbicida, sino también para identificar de manera rápida y precisa las malezas resistentes (Koger et al., 2005), para distinguir los cultivares resistentes de soja y algodón susceptibles (Pline et al., 2002), y para verificar su efecto

sobre el metabolismo de los aminoácidos aromáticos en *Cyperus rotundus* (Wang, 2001). De naturaleza transitoria, se ha informado que la acumulación de ácido shikímico se produce un día después de la aplicación del glifosato, alcanzando niveles máximos entre cuatro y siete días después (Koger et al., 2005).

Tras la inhibición de la EPSPS por el glifosato, el ácido shikímico, precursor metabólico del shikimato 3-fosfato, aumenta rápidamente en plantas susceptibles (Bostamam et al, 2012). La acumulación de ácido shikímico a niveles altos puede ser el resultado de una pérdida del control de retroalimentación de la vía del ácido shikímico por un producto corriente abajo que regula la actividad de la 3-deoxi-D- arabinoheptulosonato-7-fosfato (DAHP) sintasa. La falta de regulación de la DAHP sintasa puede hacer que un flujo no regulado de carbono se desvíe hacia intermedios aguas arriba de la enzima EPSPS bloqueada en la ruta del ácido shikímico.

Actualmente en Argentina se desconoce la sensibilidad de las especies *Echinochloa colona* (L.) Link; *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv; *Echinochloa chacoensis* Michael ex Renvoize y *Echinochloa oryzoides* (Ard.) Fritsch), y las poblaciones de cada una al herbicida glifosato. Por ello y por lo citado previamente, es posible establecer la siguiente hipótesis y objetivos del presente trabajo de investigación.

Hipótesis

La sensibilidad a glifosato en poblaciones de *Echinochloa* del centro-norte de Argentina está correlacionada con la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, de manera que las poblaciones más resistentes muestran menor inhibición enzimática.

Objetivo

Determinar el grado de inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfatosintasa a glifosato en 25 poblaciones del género *Echinochloa* provenientes de diferentes regiones productivas del centro-norte de Argentina.

Objetivos específicos

Determinar el grado de sensibilidad a glifosato en 25 poblaciones del género *Echinochloa* provenientes de diferentes provincias del centro-norte de Argentina.

Evaluar la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfatosintasa en las distintas poblaciones de *Echinochloa* con sensibilidad diferencial a glifosato.

Materiales y métodos

El trabajo de investigación se realizó durante el periodo agrícola 2015 y 2019. Se recolectaron semillas de 4 especies del género *Echinochloa* en cultivos de soja de la región centro-norte de Argentina (Córdoba, Santa Fe, E. Ríos y Buenos Aires) (Figura 1) con historia de al menos 10 años consecutivos de aplicación de glifosato y denuncias de productores de fallas de control y otras poblaciones sin historia agrícola (Tabla 1.1).

Figura 1.2. Localización de las poblaciones de *Echinochloa* estudiadas en Argentina.

La determinación de cada una de las especies analizadas en este trabajo fue realizada a través de la lista de Flora Argentina (Soreng et al, 2003; Zuloaga et al 2003).

Las semillas de cada población se limpiaron y se almacenaron en sobres de papel a temperatura ambiente (~18°C), en el laboratorio hasta la siembra. Cada una de las poblaciones seleccionadas se pusieron a germinar en papel de filtro húmedo dentro de placas Petri y luego fueron trasplantadas a macetas de un litro que contenían aproximadamente 720 g de suelo Argiudol típico Serie Esperanza

(textura franco-arcillosa-limosa; 66.7- 28.7-4.7). Todas las macetas se mantuvieron en sala de crecimiento a una temperatura de 28/18ºC (día y noche) con un fotoperiodo de 16 h y una intensidad lumínica de 850 µmol m-2 s-1 con 60 – 80 % de humedad relativa (según se sugiere para especies de ciclo primavero estival (Panigo, et al., 2012).

Determinación de la Supervivencia (screening)

Para determinar la sensibilidad al glifosato, inicialmente se examinaron 25 poblaciones del género *Echinochloa* (Tabla 1.1). Del total de poblaciones 9 son de *E. colona*, 7 de *E. crus-galli*, 6 de *E. oryzoides* y 3 de *E. chacoensis*, con el objetivo de detectar posibles resistencias.

Tabla 1.1. Poblaciones del género *Echinochloa*: especie, cultivo en el que fue encontrada, ubicación (localidad y provincia), años de agricultura del campo donde se colectó y año de cosecha de las semillas.

Población	Especie	Cultivo	Ubicación (localidad)	Provincia	Años de agricultura	Fecha de cosecha
Ec2	*E colona*	Soja-Maíz	Manfredi	Córdoba	20	2015
Ec3	*E colona*	Soja-Maíz	Colonia Marina	Córdoba	20	2016
Ec4	*E colona*	Soja-Maíz	Freyre	Córdoba	20	2015
Ec5	*E colona*	Soja-Maíz	Luxardo	Córdoba	10	2015
Ec6	*E colona*	Soja-Maíz	Estación Luxardo	Córdoba	20	2016
Ec7	*E colona*	Soja-Maíz	Colonia Castelar	Santa Fe	20	2015
Ec12	*E colona*	Soja-Maíz	San Francisco	Córdoba	20	2016
Ec14	*E colona*	Soja-Maíz	Arias	Córdoba	15	2019
Ec16	*E colona*	Soja-Maíz	El Paraíso	Buenos Aires	15	2018
Ecg6	*E crus-galli*	Soja-Maíz	Colonia Mascias	Santa Fe	10	2016
Ecg7	*E crus-galli*	Soja-Maíz	Saladero Cabal	Santa Fe	10	2016
Ecg12	*E crus-galli*	Soja	Santa Anita	Entre Ríos	10	2016
Ecg13	*E crus-galli*	Arroz	Villa Elisa	Entre Ríos	15	2016
Ecg14	*E crus-galli*	Maíz	Chajarí	Entre Ríos	15	2016
Ecg15	*E crus-galli*	Soja	San Salvador	Entre Ríos	15	2016

Ecg16	*E crus-galli*	No agrícola	Concepción del Uruguay	Entre Ríos	----	2016
Eo 2	*E. oryzoides*	Soja-Maíz	Colonia Mascías	Santa Fe	15	2015
Eo 3	*E. oryzoides*	No agrícola	Colonia Mascías	Santa Fe	-----	2015
Eo4	*E. oryzoides*	Soja-Maíz	Colonia Mascías	Santa Fe	15	2016
Eo5	*E. oryzoides*	Arroz	Colonia Mascías	Santa Fe	15	2016
Eo6	*E. oryzoides*	Soja-Maíz	Colonia Mascías	Santa Fe	15	2016
Eo7	*E. oryzoides*	Soja-Maíz	Colonia Mascías	Santa Fe	15	2016
Ech1	*E. chacoensis*	Soja-Maíz	Colonia Mascías	Santa Fe	10	2016
Ech2	*E. chacoensis*	Soja-Maíz	Colonia Mascías	Santa Fe	10	2016
Ech3	*E. chacoensis*	No agrícola	Colonia Mascías	Santa Fe	10	2016

Cuando las plántulas tenían 4 hojas se aplicaron utilizando una dosis discriminante de 600 g.e.a ha_{-1}. Todas las aplicaciones se realizaron con una cámara de aspersión de laboratorio equipada con boquillas de abanico plano Magnojet 8001, calibradas para asperjar 175 L ha-1 a una presión de 275 kPa. Previo a la aplicación (plantas nacidas) y 21 días después de la aplicación de glifosato (planta sobreviviente) se determinó el número de plantas presentes por maceta. La supervivencia (%) se determina como (supervivencia de la planta) / (plantas nacidas) * 100.

La supervivencia de las plantas se evaluó 3 semanas después del tratamiento. La resistencia al herbicida glifosato se clasificó en función de umbrales específicos de supervivencia de la planta: una supervivencia del 0 al 5 % indicaba una muestra 'susceptible' al herbicida, los valores de supervivencia del 6 % al 19 % identificaban poblaciones de campo con un estado de 'resistencia en desarrollo' y la supervivencia ≥20 % era interpretado como 'resistencia' al herbicida.

Determinación del nivel de resistencia

Para cada combinación de dosis y población se utilizaron 10 repeticiones y el ensayo fue conducido en un DCA (Diseño Completamente al Azar). Para comparar la sensibilidad de las distintas poblaciones aplicaron dosis crecientes de glifosato 0X, ¼ X, ½ X, X, 2X, 4X y 8 X, siendo X (600 g.e.a ha_{-1}) la dosis recomendada para glifosato. Todas las aplicaciones se realizaron con una cámara de asperjado de laboratorio equipada con pastillas de abanico plano Teejet 8001, calibradas para asperjar 175 L ha-1 a una presión de 275 kPa.

Por maceta se determinó el peso fresco 21 días post aplicación. Estos pesos fueron expresados como porcentaje del testigo sin tratar. Los datos por especie y población fueron ajustados a un modelo logístico representado por la función logística de 3 parámetros (Michel, 1983), donde GR_{50} es la dosis que produce la respuesta media entre el límite superior *d*, y el límite inferior *c*. El parámetro *b* marca la inflexión alrededor de *e* (Knezevic, et al; 2007, Ritz, et al; 2005).

$$f(x) = c + \frac{d-c}{1+exp\, b\left(log(x)-log(GR_{50})\right)} \quad (1)$$

Para cada población se determinó la dosis de herbicida que inhibe el crecimiento en un 50% respecto al control sin tratar (GR_{50}). Se evaluaron las diferencias de sensibilidad mediante el factor de resistencia (FR) que se determinó como: GR_{50} (resistente)/GR_{50} (susceptible). La determinación del nivel de resistencia se repitió 3 veces con 5 repeticiones por tratamiento.

Inhibición enzimática

Individuos de las especies antes mencionadas, bajo las mismas condiciones de crecimiento descritas anteriormente, fueron rociados con una solución de glifosato que contenía 600 g.e.a ha^{-1}en las

mismas condiciones específicas del ensayo anterior. Las últimas hojas expandidas de plantas de todas las especies se recolectaron para la extracción de ácido shikímico (csk) 96 horas después de la aplicación. Los tejidos foliares (50 mg de peso fresco) se homogeneizaron y las muestras se congelaron a -40ºC. Posteriormente se siguió el protocolo descrito por Singh y Shaner (1998). La absorción de ácido shikímico se midió ópticamente a 380 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-640. Las curvas estándar se determinan utilizando plantas no tratadas y soluciones de concentración de ácido shikímico conocidas. La cuantificación de la acumulación de ácido shikímico fue medida en mg. g^{-1} de hoja. La determinación de la inhibición enzimática se repitió 3 veces con 5 repeticiones por tratamiento.

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa R con la interface Rstudio y el complemento drc (Ritz, 2015; Posit team, 2024).

Resultados

Determinación de la Supervivencia (screening)

Las semillas de las distintas especies del género *Echinochloa* se recolectaron de 4 provincias de la región central de soja de Argentina (Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires, figura 1.2).

Los ensayos de supervivencia realizados con las distintas poblaciones de *Echinochloa* analizadas muestran diferencias entre ellas. Las muestras analizadas se dividieron en tres categorías según el porcentaje de supervivencia observado con la dosis discriminante de 600 g.e.a ha^{-1}. Se diagnosticó 'resistencia' al herbicida con ≥ 20 % de supervivencia, resistencia 'en desarrollo' con una supervivencia que oscila entre el 6 % y el 19 % y muestras 'susceptibles' con una supervivencia ≤ 5 % (Busi et al 2021).

Cuando analizado la supervivencia por especie en particular los valores son más dispersos. En *Echinochloa colona* (Figura 1.3) sólo 3 poblaciones superan el 20% de supervivencia, con valores que van entre 25 y 94%. Una sola población se encontró en desarrollo de resistencia y 5 poblaciones no presentaron resistencia.

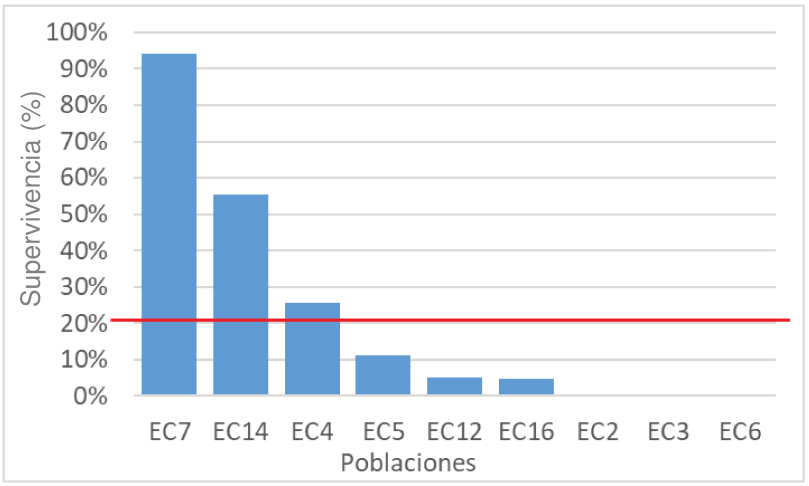

Figura 1.3. Supervivencia (%) de las poblaciones de *E. colona* estudiadas. La línea roja indica el 20 %, límite de resistencia según Bussi y col. (2021).

En *Echinochloa crus-galli* (Figura 1.4) 5 de las 7 poblaciones evaluadas superaron el 20% de supervivencia, con valores observados entre 25 y 96%. Una sola población se observó con resistencia en desarrollo y la restante fue susceptible al herbicida glifosato.

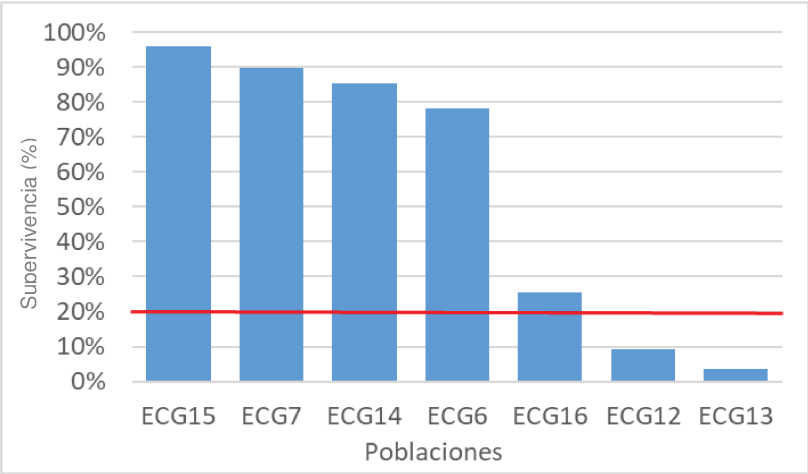

Figura 1.4. Supervivencia (%) de las poblaciones de *E. crus-galli* estudiadas. La línea roja indica el 20 %, límite de resistencia según Bussi y col. (2021).

En *Echinochloa oryzoides* (Figura 1.5) los valores de las poblaciones resistentes, que superan el 20% presentan menores diferencias, que van entre 73 y 87%. Aquí no se encontraron poblaciones con resistencia en desarrollo. En cambio, 2 poblaciones si fueron susceptibles.

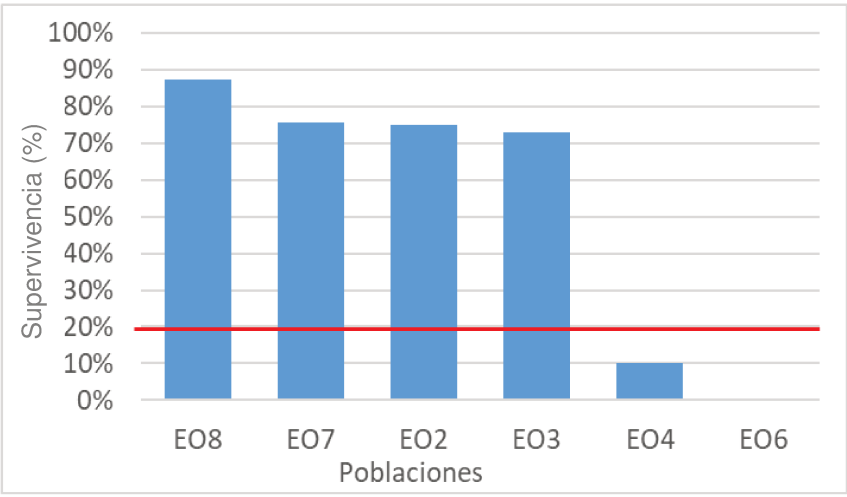

Figura 1.5. Supervivencia (%) de las poblaciones de *E. oryzoides* estudiadas. La línea roja indica el 20 %, límite de resistencia según Bussi y col. (2021).

En *E. chacoensis* (Figura 1.6) solo 1 población presenta supervivencia por encima del 20%. Las otras 2 poblaciones fueron susceptibles.

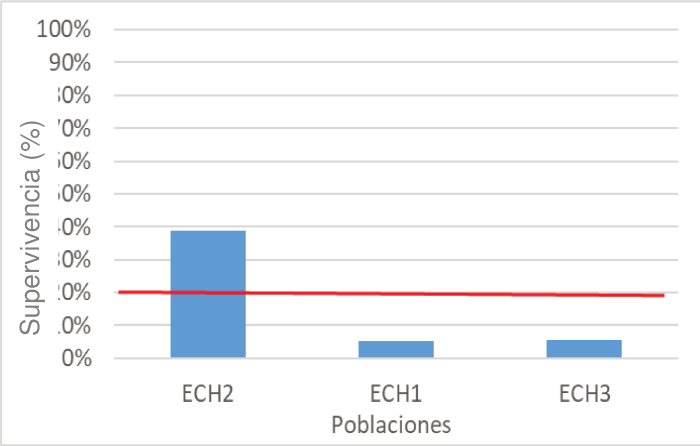

Figura 1.6. Supervivencia (%) de las poblaciones de *E. crus-galli* estudiadas. La línea roja indica el 20 %, límite de resistencia según Bussi y col. (2021).

Si agrupamos las especies evaluadas por género (Figura 1.7) podemos observar que el 52% de las poblaciones evaluadas son consideradas como resistentes. El 12% de las poblaciones se encuentra en desarrollo de resistencia y el 36% de las mismas no presentan por el momento resistencia.

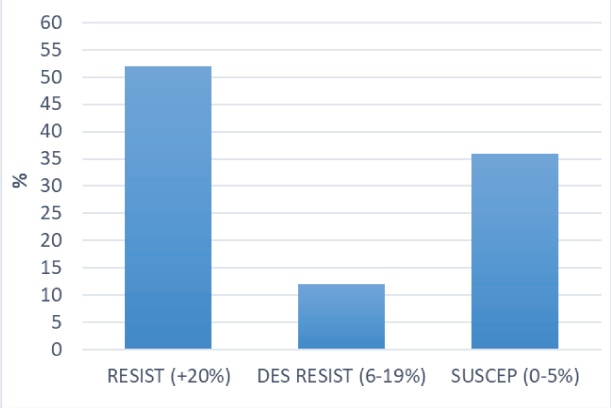

Figura 1.7. Distribución porcentual de la resistencia de las distintas poblaciones de *Echinochloa* estudiadas en Argentina.

Analizando los valores de supervivencia (%) de las poblaciones evaluadas con la cantidad de años de agricultura y antecesor del lote (Tabla 1.1) donde se colectaron las muestras, no se aprecia una correlación entre las mismas.

Ensayos de dosis respuesta

Echinochloa colona

La biomasa de la parte aérea de las poblaciones disminuye a medida que aumenta la dosis de herbicida (Figura 1.8), pero particularmente la ED_{50} difiere significativamente entre las poblaciones, siendo la más alta en las poblaciones Ec4 y Ec14 (Tabla 1.2).

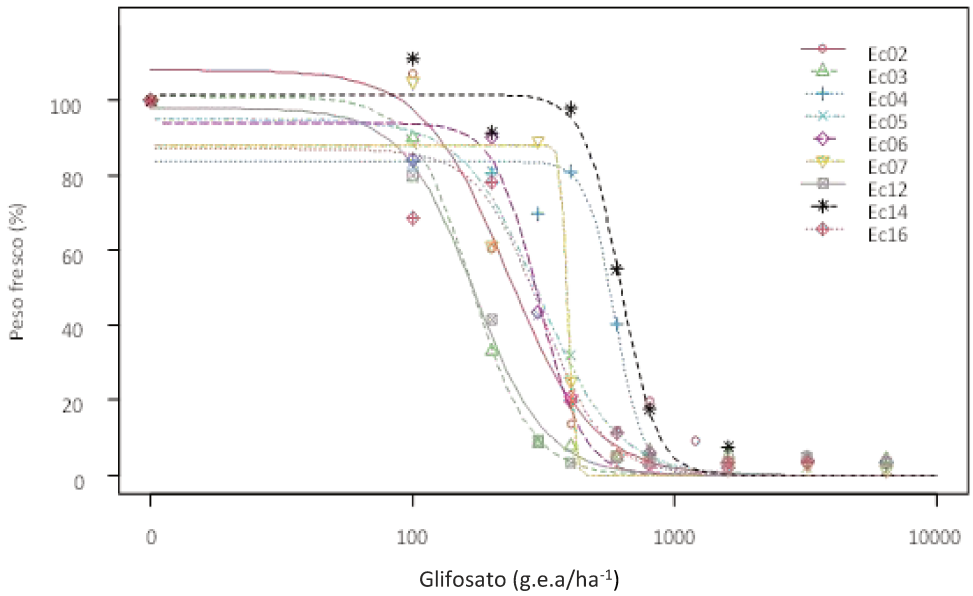

Figura 1.8. Curvas dosis respuesta correspondientes a las diferentes poblaciones de *E. colona*. Cada punto es el promedio de tres experimentos. Estas curvas se calcularon utilizando el modelo propuesto por Streibig & Kudsk (1993).

Los parámetros de la regresión indican además que las poblaciones Ec4 y Ec14 son las que más han expresado esta variación de sensibilidad, mientras que el resto son menos susceptibles a la variación de dosis, esto queda cuantificado mediante el punto de inflexión alrededor de e (parámetro b de la regresión) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. *E. colona* - Parámetros del modelo ajustado logístico (3 parámetros, GR_{50} como parámetro y GR_{80} estimado); dosis requeridas para una reducción del 50% y 80% del peso fresco respectivamente, el parámetro e corresponde al GR_{50} los parámetros c, d y b fueron definidos en la fórmula 1.1, límite inferior fijado en 0.

Población	**b**	**d**	**GR_{50}**	**se**	**Factor**	***p*-value**	**GR_{80}**	**se**
Ec2	2.585585	1.065524	224.276	23.825	1.35	0.0218	383.39	61.27
Ec3	3.726338	1.008724	165.993	18.160	1.00	----	240.80	26.87
Ec4	10.74425	0.746329	610.123	30.627	3.68	< 0.0001	694.15	78.72
Ec5	2.569705	0.957845	292.053	40.473	1.76	< 0.0001	500.90	76.89
Ec6	5.147392	0.933955	300.983	19.148	1.81	< 0.0001	394.01	38.05
Ec7	24.22164	0.871925	385.122	39.361	2.32	< 0.0001	407.81	22.27
Ec12	3.294016	0.984736	175.349	23.188	1.06	0.7428	267.10	29.37
Ec14	5.708362	0.926718	608.017	24.187	3.66	< 0.0001	775.15	47.18
Ec16	1.635326	0.985857	187.777	37.313	1.13	0.5632	438.33	84.83

FR: Factor de resistencia. El valor de p es el nivel de probabilidad de significación de cada factor para el modelo. La prueba de falta de ajuste indica que la regresión describe con precisión los datos de la tabla.

Los experimentos de dosis-respuesta confirmaron que las poblaciones Ec12 y Ec16 no fueron significativamente distintas (p=0,7428 y p=0,5632 respectivamente) a la población Ec3, mientras que las poblaciones Ec2, Ec4, Ec5, Ec6, Ec7 y Ec14, si fueron distintas significativamente respecto de la población Ec3 (p= 0,0218 para el Ec2 y p<0,0001 para el resto). Las poblaciones Ec4 y Ec14 presentaron un factor de resistencia (FR) desde 3,66 a 3,68 respecto de Ec3, aunque su GR80 se encontraba entre un 30 y 35% menor a la dosis tomada como de uso a campo (1080 g.e.a ha-1).

Las poblaciones Ec7, Ec6, Ec5 y Ec2 presentaron un FR desde 1,35 a 2,32 respecto de Ec3, y su GR80 estaba entre 2 y 3 veces por debajo de la dosis de uso considerada anteriormente.

Echinochloa crus-galli

La biomasa de la parte aérea de las poblaciones disminuye a medida que aumenta la dosis de herbicida (Figura 1.9), pero particularmente la ED_{50} difiere significativamente entre las mismas, siendo la más alta en las poblaciones Ecg6, Ecg7, Ecg14 y Ecg15 (Tabla 1.3).

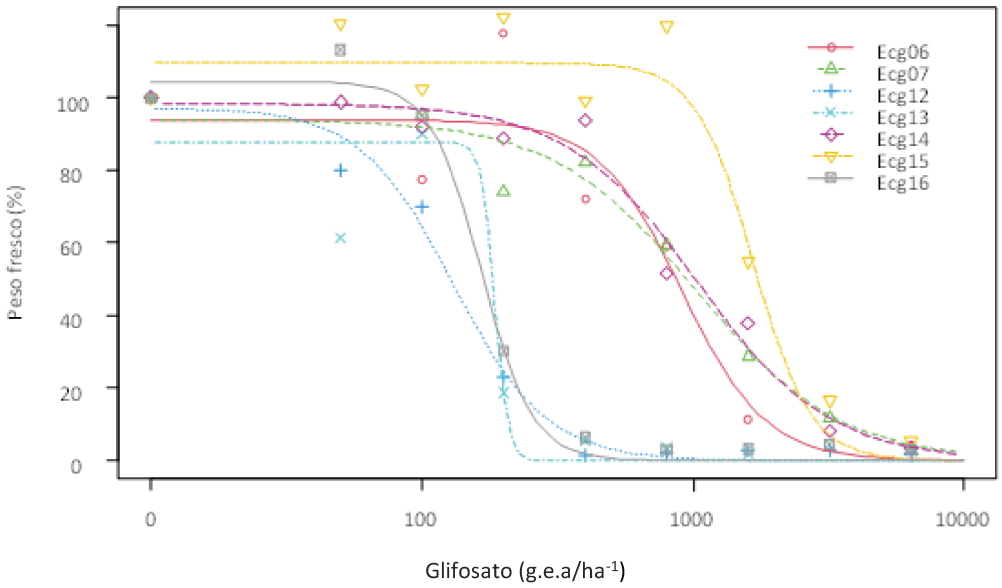

Figura 1.9. Curvas dosis respuesta correspondientes a las diferentes poblaciones de *E. crus-galli*. Cada punto es el promedio de tres experimentos. Estas curvas se calcularon utilizando el modelo propuesto por Streibig & Kudsk (1993).

Los parámetros de la regresión indican además que las poblaciones Ecg7, Ecg15 y Ecg14 son las que más han expresado esta variación de sensibilidad, mientras que la población Ecg13 resultó la menos susceptible a la variación de dosis, esto queda cuantificado mediante el punto de inflexión alrededor de e (parámetro b de la regresión) (Tabla 1.3).

Evaluando la sensibilidad al herbicida glifosato en los ensayos de dosis-respuesta en las distintas poblaciones, se determinó que Ecg6, Ecg7, Ecg14 y Ecg15 fueron significativamente distintas (p<0,0001) a Ecg12 (considerada como susceptible). En cambio, las poblaciones Ecg13 y Ecg16 (p=0,62128 y p=*0,18881* respectivamente) no fueron significativamente distintas de Ecg12.

Las poblaciones Ecg6, Ecg7, Ecg14 y Ecg15 presentaron un FR desde 6,91 a 13,08 respecto de Ecg12, y su GR_{80} estaba por encima de la dosis de uso (1080 g.e.a ha^{-1}) entre 1,5 y 2,5 veces. Las poblaciones Ecg13 y Ecg16 presentaron un FR desde 1,25 a 1,45 respecto de Ecg12, concordando con su GR_{80}, la cual estaba por muy por debajo de la dosis de uso considerada anteriormente.

Tabla 1.3. *E. crus-galli* - Parámetros del modelo ajustado logístico (3 parámetros, GR_{50} como parámetro y GR_{80} estimado); las dosis requeridas para una reducción del 50% y 80% del peso fresco respectivamente, el parámetro e corresponde al GR_{50} los parámetros c, d y b fueron definidos en la fórmula 1.1, límite inferior fijado en 0.

Población	**b**	**d**	**GR_{50}**	**se**	**FR**	***p*-value**	**GR_{80}**	**se**
Ecg06	2.657	91.13	884.88	138.486	6.91	< 0.0001	1491.04	359.49
Ecg07	1.595	93.01	984.30	241.805	7.72	< 0.0001	2347.04	600.34
Ecg12	2.405	97.35	127.40	20.451	1.00	-----	226.77	44.10
Ecg13	17.329	87.43	185.43	127.837	1.45	0.621	200.88	11.08
Ecg14	1.776	98.26	1039.17	172.755	8.15	< 0.0001	2267.93	524.42
Ecg15	4.070	97.40	1667.59	190.313	13.08	< 0.0001	2344.36	615.55
Ecg16	4.145	102.58	160.41	17.114	1.25	0.1888	224.11	29.17

FR: Factor de resistencia. El valor de p es el nivel de probabilidad de significación de cada factor para el modelo. La prueba de falta de ajuste indica que la regresión describe con precisión los datos de la tabla.

Echinochloa oryzoides

La biomasa de la parte aérea de las poblaciones disminuye a medida que aumenta la dosis de herbicida (Figura 1.10), pero particularmente la ED_{50} difiere significativamente entre ellas, siendo la más

alta en las poblaciones Eo02, Eo03, Eo07 y Eo08 (Tabla 1.4), mientras que resultó intermedia en la población Eo04.

Los parámetros de la regresión indican además que las poblaciones Eo02, Eo03, Eo07 y Eo08 son las que más han expresado esta variación de sensibilidad, mientras que la población Eo06 resultó la menos susceptible a la variación de dosis, esto queda cuantificado mediante el punto de inflexión alrededor de e (parámetro b de la regresión) (Tabla 1.4).

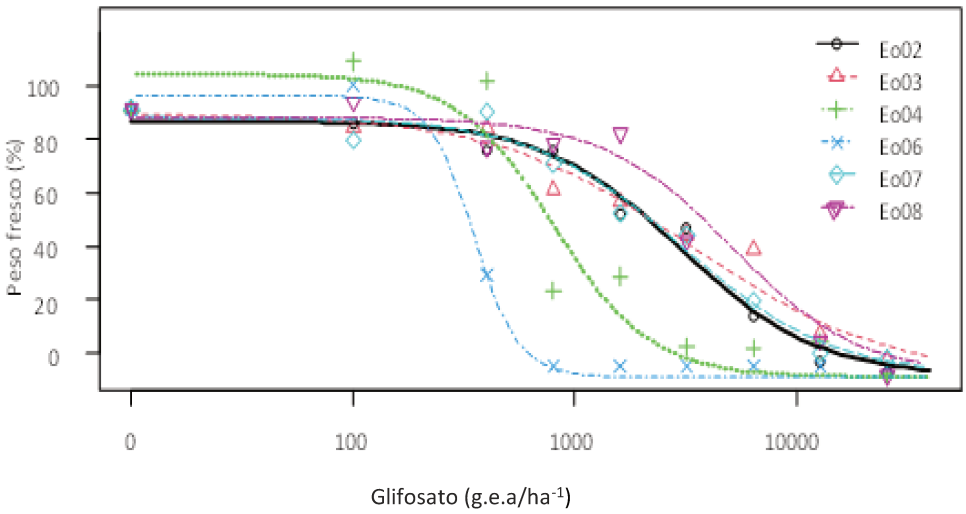

Figura 1.10. Curvas dosis respuesta correspondientes a las diferentes poblaciones de *E. oryzoides*. Cada punto es el promedio de tres experimentos. Estas curvas se calcularon utilizando el modelo propuesto por Streibig & Kudsk (1993).

Evaluando la sensibilidad al herbicida glifosato en los ensayos de dosis- respuesta en las distintas poblaciones, se determinó que Eo02, Eo03, Eo07 y Eo08 fueron significativamente distintas (p<0,0001 para las poblaciones Eo02 y 03; y p=0,0003, p=0,0023 y p=0,0045 para Eo02, Eo03 y Eo04 respectivamente) de Eo06 (considerada como susceptible).

A diferencia de las otras especies evaluadas en *E. oryzoides* todas las poblaciones presentaron un FR desde 2,28 a 14,49 respecto de Eo06, y su GR_{80} estaba por encima de la dosis de uso (1080 g.e.a ha^{-1}) entre 1,5 y 12 veces. Los valores de FR en esta especie son mucho más altos en comparación con todas las demás especies.

Tabla 1.4. *E. oryzoides* - Parámetros del modelo ajustado logístico (3 parámetros, GR_{50} como parámetro y GR_{80} estimado); dosis requeridas para una reducción del 50% y 80% del peso fresco respectivamente, el parámetro e corresponde al GR_{50} los parámetros c, d y b fueron definidos en la fórmula 1.1, límite inferior fijado en 0.

Población	**b**	**d**	**GR_{50}**	**se**	**Factor**	***p*-value**	**GR_{80}**	**se**
Eo02	1.400	95.44	3.006,63	615.24	8.53	0.0003	8.090,58	1.798,65
Eo03	0.988	98.00	3.312,02	856.80	9.39	0.0023	13.463,87	3.820,10
Eo04	1.984	112.91	804.93	117.44	2.28	0.0045	1.619,15	450.23
Eo06	4.295	104.75	352.54	45.94	1.00	—--	486.83	83.65
Eo07	1.282	96.95	3.070,23	981.31	8.71	< 0.0001	9.055,23	3.455,12
Eo08	1.488	96.65	5.107,50	1.050,11	14.49	< 0.0001	12.969,33	3.078,01

FR: Factor de resistencia. El valor de p es el nivel de probabilidad de significación de cada factor para el modelo. La prueba de falta de ajuste indica que la regresión describe con precisión los datos de la tabla.

Echinochloa chacoensis

La biomasa de la parte aérea de las poblaciones disminuye a medida que aumenta la dosis de herbicida (Figura 1.11), pero particularmente la ED_{50} difiere significativamente entre las poblaciones siendo la más alta en la población Ech02 (Tabla 1.5), mientras que resultó intermedia en la población Ech03.

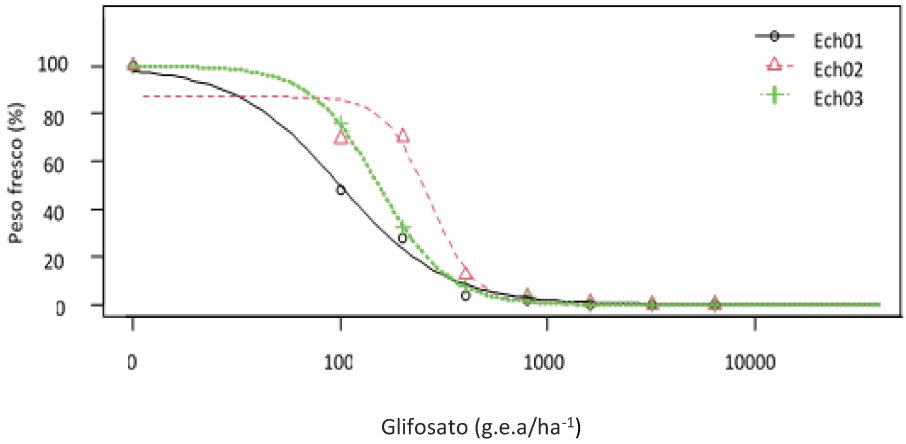

Figura 1.11. Curvas dosis respuesta correspondientes a las diferentes poblaciones de *E. chacoensis*. Cada punto es el promedio de tres experimentos. Estas curvas se calcularon utilizando el modelo propuesto por Streibig & Kudsk (1993).

Tabla 1.5. *E. chacoensis* - Parámetros del modelo ajustado logístico (3 parámetros, GR_{50} como parámetro y GR_{80} estimado); dosis requeridas para una reducción del 50% y 80% del peso fresco respectivamente, el parámetro e corresponde al GR_{50} los parámetros c, d y b fueron definidos en la fórmula 1.1, límite inferior fijado en 0.

Población	**b**	**d**	**GR_{50}**	**se**	**Factor**	**p-value**	**GR_{80}**	**se**
Ech01	1.708	99.45	99.67	13.13	1.00	-	224.42	31.04
Ech02	4.004	86.91	269.36	21.08	2.70	<0.0001	380.78	39.79
Ech03	2.622	99.93	152.44	12.63	1.53	0.00101	258.62	27.93

FR: Factor de resistencia. El valor de p es el nivel de probabilidad de significación de cada factor para el modelo. La prueba de falta de ajuste indica que la regresión describe con precisión los datos de la tabla.

Evaluando la sensibilidad al herbicida glifosato en los ensayos de dosis- respuesta en las distintas poblaciones, se determinó que Ech02 y Ech03 fueron significativamente distintas (p<0,0001 para la población Ech02 y p=0,00101 para la Ech03), a la población Ech01 (considerada como susceptible). *E. chacoensis* presentó un FR desde 1,53 a 2,70 respecto de Ech01, pero sus GR_{80} estaban muy por debajo de la dosis de uso (1080 g.e.a ha^{-1}), entre 3 y 4 veces la misma.

Inhibición enzimática

Los ensayos de inhibición de ácido shiquímico mostraron que de las 9 poblaciones de *E. colona*, el 33% de las mismas incrementaron el nivel de ácido shikímico a medida que iba transcurriendo el tiempo, tal como se puede observar en la Figura 1.12.

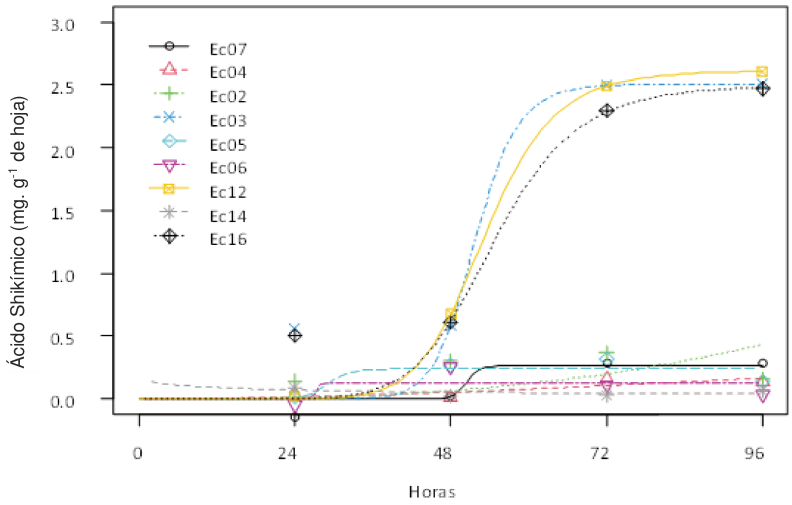

Figura 1.12. Acumulación de ácido shikímico (mg. g^{-1} de hoja) desde 24 a 96 h sobre plantas de *E. colona* tratadas con glifosato (600 g e.a ha^{-1}).

Las poblaciones Ec3, Ec12 y Ec16 mostraron un incremento a 48 hs post aplicación, respectivamente, alcanzando valores máximos de 2,50 y 2,60 mg. g-1 de hoja a las 96 horas post aplicación. En las poblaciones Ec2, Ec4, Ec5, Ec6, Ec7 y Ec14 estos aumentos no fueron significativos y no superan los 0,50 mg. g-1 de hoja de ácido shikímico.

Realizando contrastes particulares (InfoStat) se comprobó que las poblaciones Ec3, Ec12 y Ec16 acumulan a partir de las 48 hs valores significativamente distintos al resto de los tiempos (p=0, 0003 para las 48 hs y p>0.0001 para las 72 y 96 hs).

En las poblaciones de *E. crus-galli*, el 33% de ellas (Ecg12, Ecg13 y Ecg16) aumentaron los niveles de ácido shikímico después de 48 horas, (Figura 1.13). En las poblaciones Ecg06, Ecg07, Ecg14 y Ecg15 estos aumentos no fueron significativos y no superaron los 0,50 mg. g-1 de hoja de ácido shikímico. Mientras que, Ecg12, Ecg13 y Ecg16 inhibieron su ruta metabólica y alcanzaron valores máximos de 1,59, 2,30 y 2,53 mg. g-1 de hoja respectivamente a las 96 horas post aplicación.

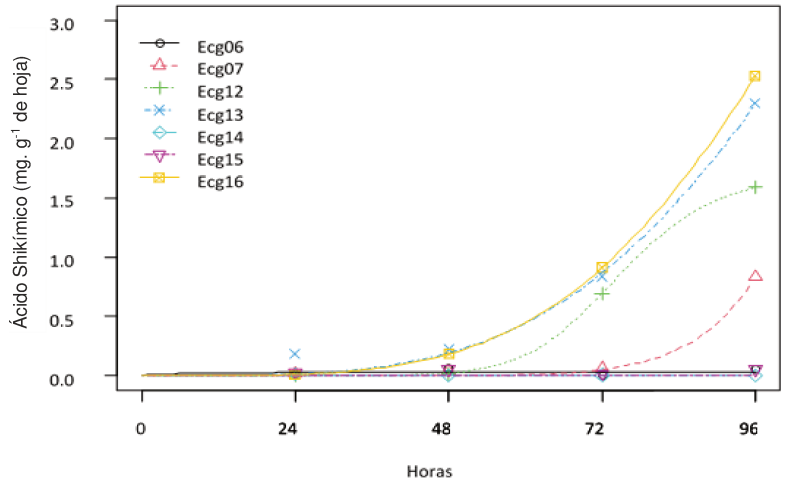

Figura 1.13. Acumulación de ácido shikímico (mg. g^{-1} de hoja) desde 24 a 96 h sobre plantas de *E. crus-galli* tratadas con glifosato (600 g e.a ha^{-1}).

Al realizar contrastes particulares se encontró que las poblaciones Ecg13 y Ecg16 acumulan ácido shikímico *(csk)* después de 48 horas, presentando valores significativamente diferentes al resto de los tiempos (p=0,0037; p=0,0009 y p>0,0001 para 48, 72 y 96 horas respectivamente).

E. oryzoides presenta solo una población (Eo06) que incrementa los niveles de ácido shikímico por encima de los 0,50 mg. g^{-1} de hoja a partir de las 96 hs (Figura 1.14), mientras que las poblaciones Eo02, Eo03, Eo04, Eo07 y Eo08 estos aumentos no fueron significativos. La ruta metabólica de la población Eo06 alcanza su valor máximo de 2,12 mg. g^{-1} de hoja de ácido shikímico a las 96 horas post aplicación.

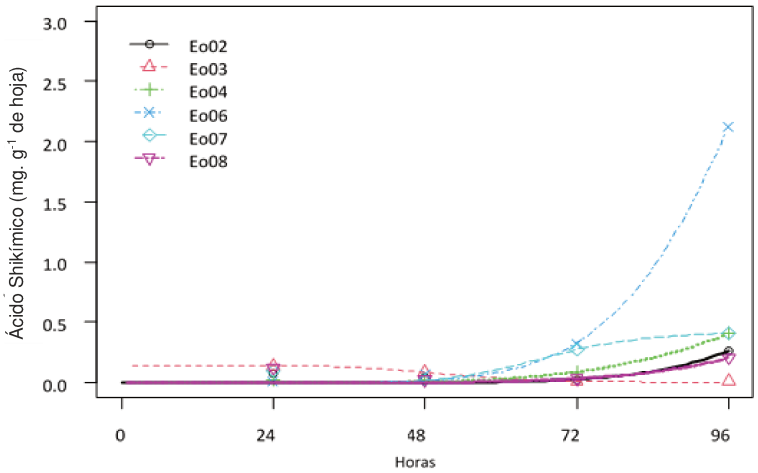

Figura 1.14. Acumulación de ácido shikímico (mg. g^{-1} de hoja) desde 24 a 96 h sobre plantas de *E. oryzoides* tratadas con glifosato (600 g e.a ha^{-1}).

Los contrastes comprueban que la población Eo06 acumula ácido shikímico recién a partir de las 96 hs presentando valores significativamente distintos al resto de los tiempos (p>0.0001).

En *E. chacoensis* las 3 poblaciones evaluadas incrementan los niveles de ácido shikímico por encima de los 0,50 mg. g^{-1} de hoja a partir de las 72 hs (Figura 1.15), pero la población Ech02 desciende a las 96 hs por debajo del valor considerado como límite. En las poblaciones Ech01 y Ech03 sus rutas metabólicas alcanzan su valor máximo de mg. g^{-1} de hoja de ácido shikímico a las 96 horas post aplicación. Los contrastes comprueban que la población Ech01 y Ech03 acumulan ácido shikímico recién a partir de las 96 hs presentando valores significativamente distintos al resto de los tiempos (p>0.0001).

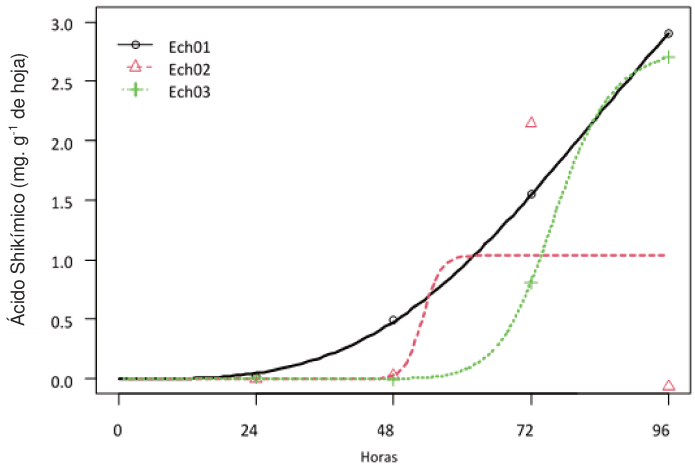

Figura 1.15. Acumulación de ácido shikímico (mg. g^{-1} de hoja) desde 24 a 96 h sobre plantas de *E. chacoensis* tratadas con glifosato (600 g e.a ha^{-1}).

Discusión

En muchas de las localidades seleccionadas para la recolección de muestras y en diversos ensayos realizados a campo con glifosato a dosis de 1080 g.e.a ha^{-1} en poblaciones de *E. colona* y *crus-galli* se evidenció una merma de control a través del paso de los años (Oreja et al. 2024). En el 2013, los primeros ensayos con glifosato arrojaron controles de 95-98% de efectividad a los 21 días de aplicados; mientras que en 2017 los controles promedios descendieron aproximadamente un 10% y se ubicaron en 85-88% de control. En los últimos ensayos realizados a campo en el año 2021, estas eficiencias no superaban el 70% de control. Así mismo, estos porcentajes son promedios de ensayos y varían con las distintas poblaciones evaluadas, similar a lo registrado en laboratorio con los ensayos de dosis-respuesta.

Supervivencia

Las pruebas de supervivencia realizadas con las diferentes poblaciones de *Echinochloa* analizadas muestran diferencias entre ellas. Las muestras se dividieron en tres categorías según el porcentaje de supervivencia observado (Busi, 2021) con la dosis discriminante de 600 g.e.a ha^{-1}. En las poblaciones evaluadas del género *Echinochloa*, 13 de ellas presentaron alta supervivencia y pueden considerarse resistentes, otro grupo conformado por 2 poblaciones presentó resistencia en desarrollo y las 10 poblaciones restantes presentaron valores de supervivencia inferiores al 5%, lo que las convierte en susceptibles.

Respecto a las poblaciones particulares cubiertas por este trabajo, para *E. colona* los valores de supervivencia oscilaron entre 0 y 94%, siendo similar a Alarcón-Reverte y colaboradores (2015) o Alarcón-Reverte y colaboradores (2013), con valores entre 4 y 80% en 3 poblaciones de California, en las que para este ensayo la dosis discriminante fue 620 g e.a ha^{-1}. Asaduzzaman y colaboradores (2021) en poblaciones del sur y suroeste de Australia encontraron que cuando 18 poblaciones de *E. colona*

fueron expuestas a la tasa de glifosato de 540 g e.a ha^{-1}, dos de ellas sobrevivieron más del 80% y el 87% de las plantas sobrevivieron respectivamente.

En *E. crus-galli*, sólo Ecg13 no mostró resistencia (susceptible), Ecg12 presentó resistencia en desarrollo y el resto de las poblaciones (Ecg06, Ecg07, Ecg14, Ecg15 y Ecg16) superan el 20% de supervivencia, con valores que oscilan entre el 25 y el 96%. En *E. oryzoides* del total de poblaciones, 4 de ellas (Eo02, Eo03, Eo07 y Eo08) presentaron valores muy altos en supervivencia entre 75 y 87% presentándose en claros resistentes. Por otro lado, dos poblaciones (Eo04 y Eo06) no sobrevivieron a la aplicación de glifosato. Y finalmente, la prueba de supervivencia de *E. chacoensis* muestra que solo 1 población (Ech02) muestra una supervivencia superior al 20%, las otras dos eran susceptibles.

Dosis-respuesta

En cuanto a los experimentos de dosis-respuesta, se pueden observar diferencias en la susceptibilidad al herbicida glifosato en todas las poblaciones de las 4 especies estudiadas. Con base en el factor de resistencia (FR) estimado, que se toma como valor de referencia para discriminar entre poblaciones resistentes y susceptibles (Burgos et al., 2013), en las poblaciones de *E. colona* Ec04, Ec07 y Ec14 presentaron un FR mayor a 2, por lo que se consideran poblaciones resistentes al glifosato y el resto de poblaciones (Ec02, Ec03, Ec05, Ec12 y Ec16) como susceptibles. Estudios realizados sobre *E. colona* por diversos autores en otros países (Alarcón-Reverte et al., 2013; Gaines et al., 2012; Morran et al., 2018), confirman que las poblaciones utilizados tienen diferencias en la susceptibilidad a este herbicida, sin embargo, los valores de FR y GR_{50} calculados varían entre los diferentes autores.

Además, los FR calculados en este estudio fueron inferiores a los obtenidos por Gaines et al. (2012) en Australia, donde el FR fue 5,6 veces mayor que el de la población susceptible. Nguyen et al. (2015), en otra región de Australia, determinaron un FR de 2 a 12 veces mayor en comparación con una población susceptible. En Grecia, Travlos et al. (2020), obtuvieron poblaciones con un FR que estaba entre 3,6 y 12,4. Más cercanos a los valores encontrados en este trabajo en *E. colona* son los realizados

en las poblaciones de California (EE.UU.), analizados por Morran y colaboradores (2018), quienes encontraron FR entre 2,1 y 6,3. En otras poblaciones del suroeste y sur de Australia Asaduzzaman y colaboradores (2021) encontraron poblaciones que eran de 2,5 a 5 veces más resistentes que sus correspondientes fenotipos susceptibles. En otras poblaciones del norte de Australia, Mahajan et al. (2020) evaluaron poblaciones que mostraron valores de FR entre 6,7 y 15,1 en relación con poblaciones susceptibles.

La población de *E. colona* con mayor FR en este estudio necesitó 610 g.e.a ha^{-1}, similar a las poblaciones de California con 736 g.e.a ha^{-1}, pero lejos de los 1116, 1289, 1187 y 3064 g.e.a ha^{-1}para reducir el GR_{50} que necesitan las poblaciones del sur y sureste de Australia. También eran muy diferentes de las poblaciones del norte de Australia con 1086 a 2339 g.e.a ha^{-1}o 1220 g.e.a ha^{-1}en el caso de las poblaciones griegas.

Respecto a *E. crus-galli*, las poblaciones resistentes (cuyo FR es mayor a 2) son Ecg06, Ecg07, Ecg14 y Ecg15, mientras que las poblaciones susceptibles son Ecg12, Ecg13 y Ecg16. En las declaradas como resistentes, los valores GR_{50} de *E. crus-galli* respecto a *E. colona* son aproximadamente 3 veces superiores, por lo que es importante poder reconocer la especie y actuar en consecuencia. Las experiencias llevadas a cabo en otros países muestran evidencia considerable de que estas dos especies tienen propensión a desarrollar resistencia a la mayoría de los grupos de herbicidas. Por lo tanto, se deben continuar los esfuerzos para gestionar y controlar la resistencia a los herbicidas en esta especie (Talbert, et al., 2007).

En *E. oryzoides* Eo06 es una población susceptible al glifosato y el resto (Eo02, Eo03, Eo04, Eo07 y Eo08) son resistentes ya que sus FR están en un rango de 2.28 a 14.49. Mientras que en *E. chacoensis* solo la población Ech02 es resistente y las demás (Ech01 y Ech03) son susceptibles.

Además, en el trabajo de Vázquez-García y colaboradores (2021) clasificaron la susceptibilidad al glifosato según el valor de FR obtenido, donde poblaciones con un FR menor a 4 son susceptibles, entre 4 y 10 son resistentes y mayores a 11 son muy resistentes. De esta clasificación sólo interesa poder

determinar las poblaciones que englobarían el criterio de muy resistentes, que sería la población Ecg15 (FR de 13.089) en *E. crus galli* y la Eo08 (FR de 14,49) en *E. oryzoides*.

Ácido shikímico

El ácido shikímico se acumuló después de la exposición al glifosato (a una dosis de 600 g.e.a ha^{-1}) en todas las poblaciones susceptibles de las diferentes especies de *Echinochloa*. Esta acumulación sugiere que el glifosato está llegando exitosamente al cloroplasto y que al menos parte de la enzima EPSPS presente es susceptible al herbicida. Aquí también se encontraron diferencias entre las 4 especies analizadas en cuanto a la acumulación de ácido shikímico a lo largo del tiempo evaluado. Además, permite discriminar los diferentes niveles de susceptibilidad al glifosato en diferentes poblaciones.

En *E. colona* y *E. chacoensis*, el 66% de las poblaciones tenían su ruta metabólica inhibida (Ec2, Ec3, Ec5, Ec6, Ec12 y Ec16 y Ech01 y Ech03 respectivamente). En *E. crus-galli* este porcentaje fue del 40% (Ecg12, Ecg13 y Ecg16) y en *E. oryzoides* fue solo del 17% (Eo06). Mientras que en el resto de las poblaciones no hubo inhibición de la ruta metabólica, lo cual concuerda con lo explicado por Singh y Shaner (1998) de que la falta de acumulación de shikimato en plantas tratadas con glifosato puede tomarse como un indicio de que la planta es resistente a este herbicida.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo expresado en el trabajo de Alarcón-Reverte et al. (2013) y Morran et al. (2018), que también determinó en *E. colona* que la acumulación de ácido shikímico es mayor en poblaciones susceptibles que en resistentes. Dicha acumulación con el tiempo (24 horas después de la aplicación) en poblaciones susceptibles puede ser de hasta más del doble de la concentración de ácido shikímico que en las poblaciones resistentes. A las 96 horas, estos valores de ácido shikímico pueden ser hasta cinco veces mayores.

Conclusión

Considerando los resultados de supervivencia, la diferencia de sensibilidad entre poblaciones obtenida de los análisis de dosis respuesta, además del análisis de acumulación de ácido shikímico, y teniendo en cuenta los parámetros que definen a una población como resistente o susceptible, se consideran resistentes al glifosato las siguientes poblaciones: Ec04, Ec07 y Ec14 de *E. colona*, Ecg06, Ecg07, Ecg14 y Ecg16 de *E. crus-galli*, Eo02, Eo03, Eo04, Eo07 y Eo08 de *E. oryzoides*. y Ech02 de *E. chacoensis*. Las poblaciones susceptibles al glifosato son Ec02, Ec03, Ec05, Ec06, Ec12 y Ec16 para *E. colona*, Ecg12, Ecg13 y Ecg16 para *E. crus-galli*, sólo Eo06 para *E. oryzoides* y Ech01 y Ech03 para *E. chacoensis*.

Sin embargo, los diferentes niveles de resistencia en cada población y la presencia de plantas resistentes sin mutación podrían significar que está involucrado más de un mecanismo de resistencia. Actualmente se están realizando más experimentos, incluidos estudios de absorción y translocación de glifosato y análisis de los niveles de expresión del gen EPSPS.

Capítulo 2

Estudio de las bases bioquímicas de la resistencia a Glifosato en poblaciones de *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli* en Argentina.

Introducción

La resistencia de malezas a herbicidas es un proceso evolutivo y, según Powles y Yu (2010), su dinámica e impacto dependen de los factores genéticos, la biología de las especies de malezas, el herbicida y los aspectos técnicos. La frecuencia, el número y la dominancia de los genes de resistencia (preexistentes a las aplicaciones de un herbicida) condicionarán el tiempo en que éstos se vuelven "relevantes" en la población, provocando la detección de un nuevo caso de resistencia. Además, los costos biológicos o efectos de estos genes sobre la capacidad reproductiva y/o vegetativa de la especie, podrían tener inherentemente un impacto en la tasa de evolución de la resistencia, dada la habilidad competitiva diferente que pueden presentar las plantas resistentes en ausencia de la presión de selección (Neve et al., 2003; Ashigh y Tardif, 2009; Wang et al., 2010; Vercellino et al., 2018).

Por otro lado, la biología de las especies de malezas condiciona la difusión de la resistencia en la población; el porcentaje de alogamia y autogamia, la producción de semillas, su longevidad en el banco de semillas del suelo y el flujo génico por medio de semillas y polen cobran trascendencia al considerar sus efectos sobre la dispersión y frecuencia de genes de resistencia (Jasieniuk et al., 1996; Busi et al., 2008). Además, el herbicida utilizado y su tipo de acción fisiológica son factores importantes a ser considerados.

La estructura química, sitio de acción y residualidad del herbicida modulan la probabilidad de que los genes de resistencia incrementen su frecuencia, aspectos que condicionan la presión de selección (Tranel y Wright, 2002). Por último, las dosis empleadas, la tecnología y la habilidad del operador para llevar a cabo la tarea de control químico junto a otros factores de manejo agronómico (prácticas

alternativas de control de malezas, rotación de cultivos y principios activos) son de gran importancia y estos factores son los primeros sobre los que se puede actuar para minimizar los riesgos de aparición de malezas resistentes (Jasieniuk et al., 1996, Norsworthy et al., 2012). En términos generales, el desarrollo de resistencia a cualquier herbicida involucra un proceso de selección ligado al de variabilidad intraespecífica. Se asume que cualquier población de malezas puede tener poblaciones resistentes en baja frecuencia, debido a mutaciones que ocurren naturalmente (Villalba, 2009).

Las mutaciones que confieren resistencia a los herbicidas pueden ser clasificados en dos tipos. El primer tipo es estructural, produciendo cambios en una secuencia de ADN que codifica una proteína, es decir, mutaciones estructurales; se espera que las mutaciones estructurales que confieren resistencia a los herbicidas causen una modificación en la estructura tridimensional de una proteína que conducirá a una disminución en la eficacia de un herbicida, por ejemplo, mutaciones confiriendo una sustitución de aminoácidos en el sitio de unión del herbicida de una proteína objetivo pueden disminuir la afinidad del herbicida, comúnmente llamado resistencia de sitio de acción (TSR) (Délye et al. 2015). Alternativamente, las mutaciones en el sitio de acción de una enzima metabólica o una proteína transportadora pueden mejorar la actividad de estas proteínas en degradación o compartimentación del herbicida desde su sitio de acción, llamado resistencia fuera del sitio de acción (NTSR) (Délye et al. 2015).

Puede haber mutaciones en el sitio objetivo con fuertes consecuencias que confieren un alto nivel de resistencia a los herbicidas (>20 a 100 veces), como varias mutaciones que otorgan resistencia a los herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa (ALS) o la acetil coenzima A carboxilasa (ACCase), y mutaciones con efectos débiles que proporcionan un nivel marginal de resistencia (2 a 5 veces), como las mutaciones Pro-106 en el gen EPSPS que otorgan resistencia al glifosato (Powles SB and Yu Q, 2010).

Se confirmaron poblaciones con resistencia al sitio de acción, caracterizados por presentar mutaciones simples, dobles y triples que resultan en sustituciones de aminoácidos en la secuencia codificante de EPSPS (Yabuno, T, 1966; Preston C and Wakelin AM, 2008). Si estas sustituciones ocurren solo en la posición 106 de la secuencia EPSPS, cambiando el aminoácido prolina a una serina (mutación única), esto resulta en una resistencia leve. Por el contrario, cuando la sustitución en la posición 106 se combina con un cambio de treonina a isoleucina en la posición 102, se produce una doble mutación (en adelante denominada TIPS), que resulta en un mayor nivel de resistencia al glifosato (Iwakami, et al., 2015; Shaner, et al., 2009; Powles SB and Yu Q, 2010). Además, cuando se produce una mutación triple (llamada TAP-IVS), los aminoácidos en las posiciones 102 (treonina por isoleucina), 103 (alanina por valina) y 106 (prolina por serina) se reemplazan, lo que resulta en un mayor nivel de resistencia que en las demás sustituciones, surgiendo el concepto de supermalezas (García et al; 2019).

La razón probable por la que a menudo se seleccionaron las mutaciones débiles de EPSPS Pro-106 en el campo es que el glifosato compite con el sustrato PEP por el sitio de unión en la EPSPS sintasa (Schonbrunn, et al., 2001) y, por lo tanto, es poco probable que una mutación que otorga un alto nivel de resistencia al glifosato sin comprender la capacidad catalítica se seleccione en la naturaleza (Yu, et al., 2015). De hecho, desde que se identificó por primera vez la mutación Pro-106-Ser en *Eleusine indica* (Baerson, et al., 2002), se han identificado cuatro mutaciones de Pro-106 (Pro-106-Ala, Pro-106-Thr, Pro-106-Ser y Pro-106-Leu) reportado en poblaciones resistentes al glifosato de seis especies de malezas (Sammons y Gaines T, 2015).

Estas especies de malezas con mutaciones conocidas incluyen especies diploides como *Amaranthus tuberculatus, Digitaria insularis, E. indica, Lolium rigidum* y *L. multiflorum*, (Yu, et al., 2007; Kaundun, et al., 2011; De Carvalho, et al., 2012) y la especie poliploide *E. colona* (Escarabel; et al. 2010; Iwakami, et al., 2012). Estas mutaciones generalmente proporcionan un nivel bajo (2 a 4 veces) de resistencia al glifosato, lo que permite la supervivencia de la planta a ciertas tasas de glifosato (Kaundun, et al., 2011). Por ejemplo, en *E. indica* diploide, la mutación homocigota Pro-106-Ser confirió

solo un nivel moderado (2,8 veces basado en la relación GR_{50} resistentes/susceptibles) de resistencia al glifosato, que sin embargo fue suficiente para la supervivencia de la planta en la tasa de campo de glifosato recomendada de alrededor de 1000 g a.e. ha -1 (Kaundun, et al., 2008).

Se espera que el nivel de resistencia conferido por las mutaciones Pro-106 en especies diploides también pueda verse afectado por el número de copias de EPSPS. De manera similar, aunque más evidente en especies poliploides, el nivel de resistencia otorgado por una mutación en el sitio objetivo de un herbicida (especialmente para alelos mutantes semidominantes) puede ser mucho más bajo que en especies diploides debido a la dilución y/o efecto de expresión por múltiples copias de EPSPS, como se ha demostrado para la resistencia a los herbicidas inhibidores de la ACCasa en la maleza hexaploide *Avena fatua.* Esto también explica por qué las plantas de *E. colona*, incluso con una o dos mutaciones de EPSPS Pro-106, todavía pueden controlarse con la tasa de campo de glifosato de 450 g a.e. ha^{-1} en condiciones de invernadero a temperatura templada (Kaundun, et al., 2008).

En otros casos en los que se observa un nivel más alto (de 5 a 10 veces o más) de resistencia al glifosato en plantas que poseen las mutaciones Pro-106, también se identificaron mecanismos de resistencia adicionales en sitios no objetivo (Yu, et al., 2007; Bostaman, et al., 2012; Nandula, et al., 2013) Por ejemplo, en *E. colona* se informaron niveles más altos (de 6 a 12 veces) de resistencia al glifosato como resultado de la mutación Pro-106-Ser o Pro-106-Thr. Esto probablemente se debió a mecanismos de resistencia adicionales no identificados (Escarabel; et al. 2010; Iwakami, et al., 2012).

Resultados revelan que las mutaciones débiles de EPSPS en plantas poliploides de *E. colona* pueden permitir la supervivencia de las plantas en el campo en condiciones de temperatura más altas. Por lo tanto, incluso un alelo mutante de resistencia débil a EPSPS en un fondo poliploide puede tener mucho éxito para conferir resistencia en el campo o tasas de glifosato más altas, sujeto a las condiciones ambientales (Han, H., Yu, Q., Widderick, MJ y Powles, SB, 2016).

Es evidente que en condiciones de invernadero suaves y sin estrés (p. ej., 25/20 °C), donde la eficacia del glifosato es alta, uno o dos alelos de resistencia a EPSPS en las plantas de *E. colona* no son suficientes para otorgar resistencia al glifosato a las tasas de glifosato de campo. Sin embargo, tales mutantes de EPSPS pueden sobrevivir en el campo o en dosis más altas de glifosato cuando se aplica en el campo en condiciones ambientales extremas o desfavorables. En este caso, se requirieron tasas de glifosato más altas (p. ej., 1000 g e.a. ha^{-1}) para controlar las plantas mutantes (Han, H., Yu, Q., Widderick, MJ y Powles, SB, 2016).

Muchas especies de malezas resistentes a los herbicidas son poliploides, pero se sabe muy poco sobre la evolución de las mutaciones de resistencia en los poliploides. La avena silvestre hexaploide (*Avena fatua*) es una maleza de cultivo mundial y muchas poblaciones han desarrollado resistencia a los herbicidas. Es probable que la baja resistencia conferida por mutaciones individuales de resistencia a ACCasa se deba a un efecto de dilución por ACCasa susceptible expresada por homólogos en avena silvestre hexaploide y/o a la expresión diferencial de copias de genes ACCasa homólogos. En *Lolium rigidum* diploide resistente a cletodim sobrevivió a la tasa de campo de 60 g/ha o pinoxaden (30 g/ha) debido a la mutación de resistencia 2078 o 2088 (Yu et al., 2007). Pero la avena salvaje hexaploide que poseía la misma mutación, rara vez sobrevivió al herbicida en tasas iguales o inferiores (Ahmad-Hamdani et al., 2011; Christoffers, M. J., & Varanasi, A. V. 2010)

Por lo tanto, la poliploidía en la avena silvestre hexaploide puede ralentizar la evolución de la resistencia. También se revelaron pruebas de la coexistencia de mecanismos de resistencia fuera del sitio objetivo entre las poblaciones de avena silvestre. Se estima que alrededor del 30 al 70% de las especies de plantas son de origen poliploide y muchas especies de malezas resistentes a los herbicidas son poliploides. En Pakistán, por ejemplo, se encontró que más de dos tercios de las especies investigadas eran de naturaleza poliploide (Ahsan et. al; 1994).

Los resultados encontrados en la bibliografía sugieren que las especies de *Echinochloa* se pueden separar en dos grupos, que incluyen las especies hexaploides y tetraploides. Enfoques citogenéticos y moleculares han proporcionado información sobre el número de cromosomas y la ploidía de las especies chinas de *Echinochloa* (Juihuan & Tingbi, 1993). Aún no está claro cuántas copias de genes y qué copias específicas son responsables de la evolución de la resistencia a los herbicidas en *Echinochloa* y otras especies poliploides (Panozzo, et al.; 2021). Para las especies y poblaciones evaluados en este trabajo, no se conocen las alteraciones en las posiciones conocidas de ADN, ni tampoco la influencia del nivel de ploidía en la sensibilidad al herbicida glifosato.

Hipótesis

La sensibilidad diferencial a glifosato en las poblaciones de *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli* está relacionada con la presencia de diferentes mutaciones en el sitio de acción del herbicida, así como con el nivel de ploidía.

Objetivo

Determinar alteraciones en el sitio de acción y niveles de ploidía en distintas poblaciones de *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli*.

Objetivos específicos

Determinar en poblaciones de *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli* con sensibilidad diferencial a glifosato si existen alteraciones en el sitio de acción.

Determinar los niveles de ploidía para distintas poblaciones del género *Echinochloa.*

Materiales y métodos

Evaluación del nivel de ploidía

Se utilizó la citometría de flujo para determinar el nivel de ploidía en 6 individuos de 12 poblaciones (7 de *E. colona* y 5 de *E crus galli*). Se utilizaron como controles poblaciones de *Echinochloa crus-galli* determinadas como hexaploides. La intensidad de fluorescencia de los núcleos teñidos con DAPI (4′,6-diamidino-2-fenilindol) se analizó con un citómetro de flujo Partec PA II (Partec, Münster, Alemania). El nivel de ploidía de cada individuo se determinó utilizando muestras de tejido de hojas frescas siguiendo las recomendaciones del manual Partec P kit CySatin UV Precise P 05-5002. Brevemente, se colocó material foliar de 0,5 cm^2 en una pequeña placa de Petri con una cantidad similar de tejido del control (una planta de la misma especie para la cual el número de cromosomas se estableció mediante el recuento de cromosomas en las puntas de las raíces). Después de añadir el tampón de extracción (0,5 ml), el tejido se cortó con una cuchilla de afeitar afilada. Después de una incubación de 2 minutos, las muestras se filtraron a través de una malla de nylon de 50 lm directamente en el tubo de muestra, al que se le aplicó una solución de tinción de DAPI (40,6-diamidino-2-fenilindol) (kit Partec P) CySatin UV). La mezcla se incubó durante otros 2 minutos a temperatura ambiente y se analizó. Los niveles de ploidía se estimaron en relación con los picos de ADN en las muestras y el patrón interno.

Las plantas se midieron una vez por repetición. Además, los resultados se confirmaron mediante el recuento del número de cromosomas somáticos en las puntas de las raíces en plantas representativas de cada población. Las puntas de las raíces se retiraron de las plantas en macetas, se fijaron en una solución saturada de a-bromonaftaleno durante 2 h y se hidrolizaron en 1,0 mol /m^3 HCl durante 10 min a 60 °C. Las puntas de las raíces se tiñeron con fucsina básica 20 mol /m^3, se aplastaron con una gota de aceto-orceína en portaobjetos y se observaron con un microscopio de contraste de fase.

Extracción de ADN genómico

Las muestras de ADN genómico se obtuvieron utilizando el protocolo de extracción de CTAB-PVPP (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio-Polivinilpirrolidona; Gupta et al, 2020). Brevemente, un fragmento de hoja de individuos de cada una de las poblaciones en estudio de las especies *E. colona* y *E. crus-galli* se trituró en N2 (l) hasta obtener un polvo fino y se agregó 500 µl de buffer de extracción compuesto por 3% p/v CTAB; 20 mM EDTA, pH 8; 100 mM Tris-HCl, pH 8; 1,4 M NaCl; 3,9 g/L $NaHSO_3$; 1% p/v PVPP (polivinilpirrolidona) y 1% v/b β-mercaptoetanol, previamente calentado a 65 °C, agitando con vortex durante 30 s.

El extracto se incubó en baño de agua a 65 °C durante 1 h, invirtiendo los tubos cada 10 minutos. Se centrifugó a 12.000 rcf (fuerza centrífuga relativa) en microcentrífuga a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo donde se agregó el mismo volumen de mezcla 24:1 v/v de cloroformo: alcohol isoamílico. Luego de agitar con vortex durante 30 s se centrifugó a 12.000 rcf durante 10 minutos a 4 °C. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó el ADN con un volumen de alcohol isopropílico previamente enfriado. Los tubos se incubaron a 4 °C durante 2 horas y se centrifugó a 12.000 rcf durante 20 minutos a 4 °C. Luego de retirar el sobrenadante, se lavó el pellet con 70% v/v etanol, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Finalmente se centrifugó a 12.000 rcf durante 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante, el pellet se secó a temperatura ambiente durante 1 hora y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizaron reacciones de PCR utilizando la enzima T-Plus Free ADN Polimerasa (Inbio Highway) y los siguientes oligonucleótidos específicos: EcLF: 5'-AAGGACGCCAAAGAGGAAGT-3' y EcLR: 5'-ATCCCCTTGACACGAACAGG-3'. La mezcla de reacción se preparó con 1X buffer de reacción (provisto por el fabricante); 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM dNTPs, 0,3 µM oligonucleótido EcL; 0,3

µM oligonucleótido EcL; 0,5 U de ADN polimerasa y 1 µl de ADN molde (10 ng aproximadamente). El programa de amplificación utilizado fue: una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos con una etapa de desnaturalización de 30 segundos a 94°C, etapa de hibridación de 30 segundos a 56°C y 30 segundos de extensión a 72°C. El programa se completó con una extensión final de 2 minutos a 72°C. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador TC1000-S (DLab).

Electroforesis de ácidos nucleicos

Para la visualización de los fragmentos de amplificación se utilizó la técnica de electroforesis submarina en geles de agarosa, de acuerdo con lo descrito por Ausubel y col. (2003). Para la preparación de geles de concentración 1 % p/v, se disolvió la cantidad necesaria de agarosa en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM-pH 8,0; EDTA 1 mM), usando también TAE 1X como buffer de corrida electroforética. Las muestras se sembraron con buffer de siembra 1X (Naranja G 0,25% p/v; sacarosa 40% p/v) y se visualizaron por tinción con GelGreen (Biotium). Se utilizó marcador 100 pb (PBL Productos Bio-Lógicos) para estimar el tamaño molecular de las bandas resultantes. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a una intensidad de corriente de 80 V y para la visualización se utilizó un transiluminador de luz verde (Maestrogen).

Secuenciación de fragmentos de PCR del gen EPSPS

Para analizar si la respuesta a glifosato observada en las curvas de sensibilidad e inhibición enzimática se correlacionan con cambios en la secuencia de ADN del gen EPSPS, se realizó la secuenciación del fragmento que contiene a la región codificante de los aminoácidos 102 a 106 en las dos especies. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit Monarch PCR&DNA Clean up (New England Biolabs) y la cuantificación del fragmento purificado se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher) determinando la absorbancia a 260 nm. La secuenciación tipo Sanger fue realizada en el Acuario del Río de la Plata (Rosario) utilizando primers EcL y EcR para ambas especies.

Resultados

Secuenciación de ADN

Se analizaron y enviaron a secuenciar muestras correspondientes a individuos de 5 poblaciones de *E. colona* y 3 poblaciones de *E. crus-galli* evaluadas en el Capítulo 1, donde se seleccionaron las poblaciones Ec2 y Ec3 de *E. colona* debido a que el análisis de sensibilidad e inhibición enzimática mostraron que las mismas eran susceptibles. La población Ec4 y Ec7, debido a que su comportamiento en ambos casos fue resistente, y la población Ec5, presentó un comportamiento susceptible en la curva de sensibilidad, pero resistente en la curva de inhibición enzimática. Los resultados del análisis de los cromatogramas obtenidos se presentan en la Figura 2.1. En nuestros estudios no se encontraron cambios en la posición 102 y 103.

Si se observan cambios en la posición 106, donde las poblaciones Ec2 y Ec3 (Figura 2.1a y 2.1b) presentan la secuencia CCA (Pro) nativa, correspondiente a poblaciones susceptibles, en la región de ADN que codifica para el aminoácido en la posición 106. En la población Ec4 (Figura 1c) se determinó la presencia de la secuencia CAA (Gln), inédita para estas mutaciones, mientras que las poblaciones Ec5 y Ec7 (Figura 1d y 1e) tenían la secuencia ACA (Thr) mutada en esta región del gen EPSPS.

Dentro de las poblaciones de *E. crus-galli*, Ecg16 (Figura 2.1f) muestra en los cromatogramas la secuencia CCA (Pro) nativa, en la región de ADN que codifica para el aminoácido en posición 106. En cambio, en las poblaciones Ecg14 y Ecg15 (Figura 2.1g y 2.1h), los resultados de los cromatogramas muestran que los picos no son únicos o que podría haber superposición de señales para distintos nucleótidos, y no puede descartarse que haya algún otro alelo.

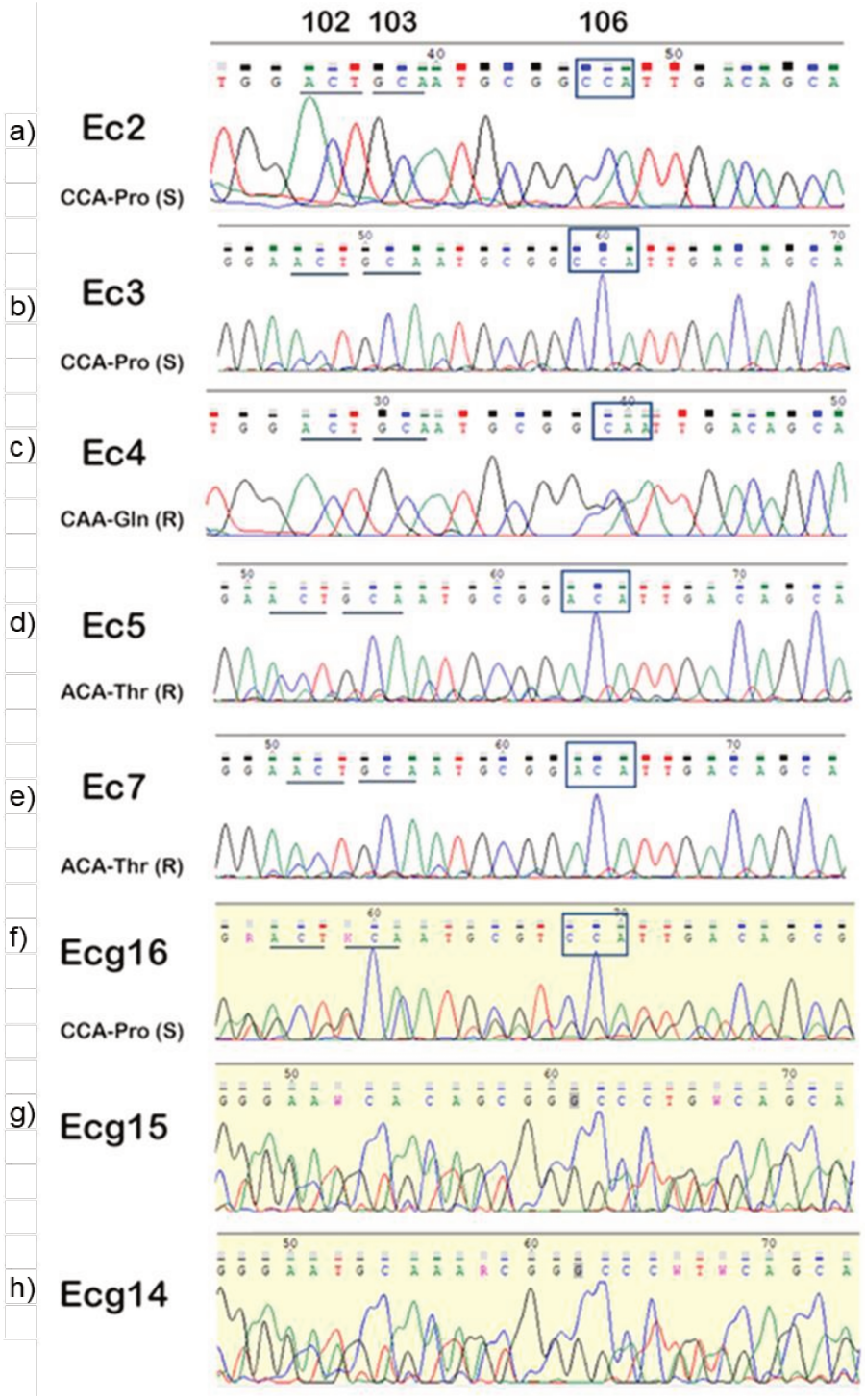

Figura 2.1. Cromatogramas de la secuenciación del gen EPSPS en poblaciones de *E. colona* y *E. crus-galli* resistentes y susceptibles a glifosato, donde se muestran las posiciones de las mutaciones conocidas correspondientes a los aminoácidos 102, 103 y 106. Ec2, Ec3, Ec4, Ec5, Ec7 para poblaciones de *Echinochloa colona*. Ecg14, Ecg15 y Ecg16 para poblaciones de *Echinochloa crus-galli*.

Ploidía

En lo que respecta a ploidía, de las poblaciones enviadas solo se muestran los resultados de 6 de ellas (5 *Echinochloa colona* y 1 *Echinochloa crus-galli*), ya que de las restantes no se obtuvieron datos (Figura 2.2).

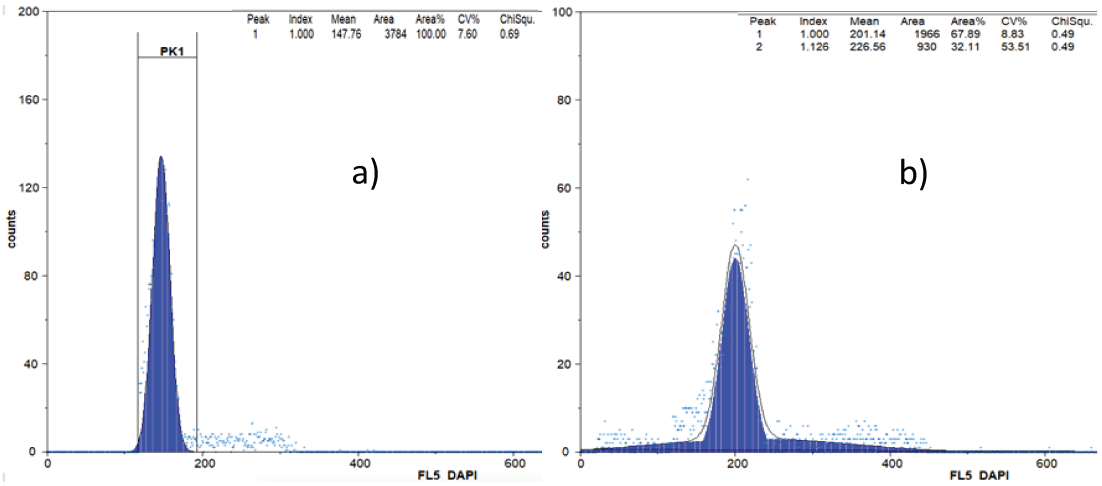

Figura 2.2. Histogramas de núcleos celulares de muestras de hojas con diferentes niveles de ploidía en 2 poblaciones de *E. colona*. a) Ec5 modelo tetraploide (2n = 4x); b) Ec14 modelo hexaploide (2n = 6x)

El conteo celular permite diferenciar en el histograma de flujo citométrico, picos de conteos en las posiciones 135 y 203. Estos picos indican niveles de ploidía de 4x y 6x respectivamente teniendo un número base de 34.

Población	Número de individuos con ploidía	
	4x	6x
Ec4	5	0
Ec5	5	0
Ec6	5	0
Ec7	3	2
Ec14	3	2
Ecg14	0	6

Tabla 2.1. Poblaciones estudiadas y su nivel de ploidía.

Estos resultados permiten inferir que la población de *Echinochloa crus-galli* (Ecg14) evaluada tiene un nivel de ploidía de 6 (hexaploide, Tabla 2.1) mientras que las poblaciones Ec4, Ec5 y Ec6 de *Echinochloa colona* poseen un nivel de ploidía de 4 (tetraploide, Tabla 2.1), y Ec14 y Ec7 poseen niveles de ploidía que varían entre 4 y 6 (tetra y hexaploide, Tabla 2.1) según la repetición seleccionada dentro de cada grupo de individuos.

Discusión

El rango de niveles de resistencia reportados en *E. colona* en todo el mundo y entre las poblaciones examinadas en este estudio puede reflejar el papel de los diferentes mecanismos que contribuyen a la resistencia. Por ejemplo, la translocación reducida de glifosato en la planta generalmente confiere un nivel de resistencia más alto que el observado con las mutaciones TSR, y más de un mecanismo de resistencia puede estar presente dentro de la planta (Morran et al.; 2018).

Las mutaciones en el sitio de acción más reportadas se dan en la posición 106, en este sitio, las plantas con secuencia nativa presentan los codones CCA, que codifican para Prolina. La mayoría de las investigaciones citan sustituciones en el primer nucleótido de este codón que resultan en cambios a Serina (TCA), Treonina (ACA) o Alanina (GCA), (Alcántara et al., 2016; Ng et al., 2003 y Yu et al., 2007), aunque también se han reportado cambios en el segundo nucleótido del codón, resultando en un cambio de Prolina a Leucina (CUA), (Collavo y Sattin, 2012) y solo un reporte donde se observaron cambios en la segunda y tercera posición, dando como resultado un cambio a Histidina (Yanniccari et al, 2022).

Una sustitución en la segunda base del codón en la posición 106 de la EPSPS es poco frecuente, y hasta la fecha no se han reportado otras mutaciones de transversión en esta posición, es decir, no se han reportado cambios de Pro 106 a Arg o Gln (Gaines & Heap, 2024; Yanniccari 2022). Estudios previos han demostrado que las sustituciones de aminoácidos en Pro 106 en el gen EPSPS generalmente confieren un nivel bajo a moderado (2 a 4 veces) de resistencia al glifosato en muchas especies de malezas (Kaundun et al., 2008, y revisado por Sammons y Gaines, 2014).

La mayoría de las investigaciones en *Echinochloa* determinaron que la mutación mayormente encontrada fue la de Pro-106-Ser (Alarcón-Reverte et al., 2013; Han et al., 2016 y Morran et al., 2018). En nuestro trabajo no observamos esa mutación, pero sí se identificó la mutación Pro-106-Thr para Ec5 y Ec7 (Figura 2.1), al igual que lo reportado por Han et al., 2016 y Morran et al., 2018. Este último, concluyó que esa mutación no otorgó resistencia al glifosato a la dosis de campo en una población,

mientras que en otra población (con esta misma mutación Pro 106), estos autores determinaron una supervivencia relativamente alta. Una explicación de estas diferencias puede ser que las líneas aquí tienen otros mecanismos que brindan resistencia.

En nuestro trabajo, además, se logró determinar por primera vez una sustitución del aminoácido 106 que codifica para Gln o Glu en Ec4 (Figura 2.2). Esta población arrojó los valores más altos de IR de este trabajo, pero bajos respecto de otras investigaciones referidas a sustituciones que resultan en cambios por His particularmente (Yanniccari et al, 2022). Yu et al (2015) y Han et al. (2016) también citan una mutación en la EPSPS en la posición 102, denominada "TIPS" en otra gramínea como es *Eleusine indica*, lo que redunda en índices de resistencia mayor. En otra maleza dicotiledónea como *Amaranthus hybridus* también se encontraron sustituciones en la posición 103 sumadas a las 102 y 106, denominadas TAP- IVS (Perotti et al.; 2019, García et al.; 2019). En nuestros estudios no se encontraron cambios en las posiciones 102 y 103 (Figura 2.2).

Es posible que la dependencia de la PCR para la identificación de TSR no amplifique adecuadamente todas las copias expresadas de un sitio objetivo determinado. Se ha demostrado que la duplicación del gen EPSPS es un mecanismo de resistencia en *Amaranthus* spp., lo que agrava aún más el problema de determinar si la TSR es el resultado de la duplicación del gen, la mutación del sitio de acción o una combinación de ambos mecanismos (McElroy & Hall 2020). En conjunto, nuestros resultados sugieren que uno de los mecanismos subyacentes a la resistencia/susceptibilidad de *E. colona* en Argentina es el tipo TSR, específicamente basado en una mutación puntual de EPSPS en la posición 106, aunque el nivel de ploidía encontrado en ambas especies podría generar el efecto de dilución, alterando los factores de resistencia (Alarcón-Reverte et al.; 2015).

Por último, los diferentes niveles de resistencia en cada población y la presencia de plantas resistentes sin mutación podrían significar que está involucrado más de un mecanismo de resistencia. Actualmente se están realizando más experimentos, incluidos estudios de captación y translocación de

glifosato y análisis de los niveles de expresión del gen EPSPS que aportarán mayores detalles sobre los distintos factores que actúan en la resistencia a glifosato de estas líneas. Los organismos poliploides tienen múltiples conjuntos de cromosomas como resultado de la duplicación del genoma completo, En *Echinochloa* el nivel de ploidía suma un grado de complejidad donde, sí existe homología en las mutaciones que confieren resistencia, el factor de resistencia será mayor. (Alarcón-Reverte et al.; 2015).

En base a los resultados obtenidos no fue posible relacionar la presencia de mutaciones o el nivel de ploidía con variaciones en la sensibilidad al glifosato observadas en el Capítulo 1.

Echinochloa colona y *Echinochloa crus-galli* se basan en x=9 como número básico común en este género y en la mayoría de los géneros de la familia Poaceae (Haroun & Alotaibi, 2015). Ambas especies son autocompatibles y altamente autógamas; sin embargo, se han reportado algunos cruces (1.4%) mediados por el viento (Maun y Barrett 1986; Nguyen 2015). Otros autores aseguran que esa tasa de polinización cruzada asegura el intercambio de genes (Salguero et al.; 2015).

Echinochloa colona es un alopoliploide y las líneas estudiadas aquí presentaron diferencias entre las distintas poblaciones en su nivel de ploidía (Tabla 2.1). Tres poblaciones aquí estudiadas fueron confirmadas como tetraploides, en coincidencia con poblaciones de *E. colona* de Arabia Saudita (Haroun & Alotaibi, 2015) y Texas (EEUU) (Brown, 1950). En otros estudios realizados por Alarcón- Reverte et al. (2015), la secuenciación directa de los productos de PCR reveló la presencia de dos secuencias diferentes de genes EPSPS que comparten un 92% de homología a nivel de ADN en todas las plantas. Esto es consistente con una naturaleza tetraploide para *E. colona*, luego confirmada por citometría de flujo. Sin embargo, nuestros estudios también revelaron que dos de estas poblaciones se determinaron como tetra y hexaploide, al igual que lo expuesto por Nadeem et al; 1994 en poblaciones de *E. colona* de Pakistán realizadas mediante análisis citológicos.

Por último, nuestro trabajo no reveló poblaciones solamente hexaploides, como sí lo hicieron autores como Mulligan (1961); Yabuno (1962); Michael, (1983); Hilu, (1994); Nakayama & Yamaguchi, (1999); Asíns et al. (1999); Morran et al. (2018); y Wu et al (2022) en distintas poblaciones de *E. colona*

en otros países.

En cuanto a *Echinochloa crus-galli* los análisis citológicos de la población aquí estudiada revelan que la misma es hexaploide (Tabla 2.1), en coincidencia con toda la bibliografía consultada (Mulligan 1961; Yabuno 1962; Michael, 1983; Hilu, 1994; Nakayama & Yamaguchi, 1999; Ye et al.; 2020; Wu et al.; 2022)

Conclusión

En *E. colona* las poblaciones susceptibles Ec2 y Ec3 no sufrieron alteraciones en la secuencia que codifica para la enzima EPSPS, conservando la versión nativa CCA que codifica Prolina. En las poblaciones resistentes Ec5 y Ec7 existe una mutación puntual en la posición Pro-106-Thr.

La población Ec4 presentó la mutación Pro-106-Gln y Pro-106-Glu, las cuales no habían sido reportadas anteriormente en ninguna especie a nivel mundial.

El nivel de ploidía para las poblaciones estudiadas de *E. colona* arrojó que un 60% de las mismas son tetraploides y un 40% son tetra y hexaploides, mientras que la población estudiada de *E. crus-galli* fue hexaploide.

Capítulo 3

Evaluación del efecto de glifosato sobre el crecimiento y desarrollo de *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli*

Resumen

Desde mediados de los años 90, el uso de herbicidas, especialmente glifosato, se incrementó con la introducción de soja transgénica y la adopción de labranza cero (Gianessi, 2013). Esto generó cambios en la composición de malezas, favoreciendo gramíneas anuales y especies leñosas dispersadas por el viento (de la Fuente et al., 2006; Scursoni & Satorre, 2010; Tuesca et al., 2001; Oreja et al., 2024).

Ante factores estresantes las plantas responden ajustando su fisiología y crecimiento, lo que modifica su estructura (Malpassi, 2004; Barthélémy, 2000). Analizar su morfología y anatomía permite comprender su comportamiento ante herbicidas (Grosso, 2001). Este análisis no solo se limita a las características de un individuo adulto, sino que también abarca las etapas sucesivas desde la germinación, describiendo de manera ordenada y coordinada los eventos morfogénicos (Bell, 1986). Permite un análisis integral de los caracteres vegetativos y reproductivos, los cuales varían dentro de un rango específico de plasticidad fenotípica (Dengler, 1994; Grosso, 2001).

El conocimiento morfológico es clave para mejorar el control de malezas de difícil manejo (Kraus et al., 2007). La resistencia a herbicidas es la capacidad heredada de una planta para sobrevivir a dosis letales (Vila-Aiub et al., 2014). Aunque hay información sobre el control químico de malezas tolerantes (Monquero, 2003; Rainero, 2004; Puricelli & Faccini, 2005), falta un análisis detallado de *Echinochloa colona* y *E. crus-galli* en cuanto a su crecimiento y estrategias de escape.

Este estudio evaluó la forma de crecimiento y la respuesta al glifosato en ambas especies, analizando su estructura hasta 85 días después de la aplicación (realizada a los 20 días de la emergencia de las plantas). Se registraron síntomas del herbicida en distintos órganos. Las poblaciones mostraron

variabilidad, posiblemente por diferencias en el manejo agronómico de sus poblaciones de origen.

Echinochloa colona mostró reducción en todos los parámetros evaluados, excepto el número de panojas y el peso de mil semillas. En *E. crus-galli*, la aplicación de glifosato no afectó significativamente el largo de panoja, el número de panojas ni el peso de mil semillas, pero sí redujo otros parámetros como espigas por espiguilla y granos por planta.

No se observaron cambios en el tiempo de floración de *E. colona*, mientras que en *E. crus-galli* hubo un adelanto en este proceso tras la aplicación del herbicida. A pesar de los efectos, ambas especies lograron reproducirse, permitiendo la persistencia de los genotipos menos susceptibles.

Introducción

Desde mediados de los años 1990, la adopción de herbicidas aumentó notoriamente con la introducción de soja genéticamente modificada resistente al glifosato y la adopción de sistemas de labranza cero (Gianessi, 2013). La introducción de cultivares resistentes a glifosato y el uso intensivo de este herbicida en la Argentina, son los principales factores que han provocado una importante presión de selección de resistencia a este herbicida sobre las comunidades de malezas.

En Argentina, desde 2010 hasta la actualidad, el género *Echinochloa* registró un desarrollo sostenido en la superficie ocupada, alcanzando el 35% de la superficie agrícola en 2021 y posicionándose como la cuarta maleza más importante (REM, 2021). Dentro del género *Echinochloa* las dos especies más extendidas que se encuentran tanto a nivel global como en Argentina son *Echinochloa colona* (L.) Link y *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Estas dos malezas están presentes particularmente en los cultivos de soja y maíz en Argentina, aunque a nivel mundial, se encuentran también en cultivos como arroz, sorgo, caña de azúcar, algodón, maní, etc.

Todas las especies del género *Echinochloa* son anuales de tipo C4, emergen en primavera y verano, y se reproducen por semilla, coexistiendo en áreas agrícolas (Rao et al., 2007). Las plantas de este género son muy diversas y su taxonomía es confusa (Damalas et al, 2008; Yabuno, 1981). La inflorescencia de *E. crus-galli* es una panícula piramidal erecta compuesta por 15 a 30 pseudo espiguillas. La panícula de *E. colona* es erecta y tiene un mayor número de órganos reproductivos dispuestos en ramas laterales, entre 5 y 15 de ellos. Diversas poblaciones, alta producción de semillas, corta latencia, rápido crecimiento, el potencial competitivo, la interacción alelopática y la resistencia a diversos herbicidas, hacen que *Echinochloa* sea un gran desafío para el manejo de malezas (Masood et al., 2016).

Las malezas anuales como *E. colona* y *crus-galli* forman un banco de semillas que asegura la perpetuación a largo plazo. La dinámica poblacional de una maleza está influenciada por muchos factores entre los cuales se puede mencionar los distintos tipos de manejo (químico, mecánico y cultural). En lo

referido al control químico, en los últimos años se evidenciaron disminuciones significativas en el control de *E. colona* con glifosato a lo largo de los años que van del 95 % al 98 % en 2013 al 85 % al 88 % en 2017. En las últimas pruebas de campo realizadas en 2021, el control de *E. colona* con glifosato no superó el 70%. (Oreja et al. 2024).

Cuando una planta es expuesta a un herbicida y sobrevive, puede alterar su estructura o comportamiento, principalmente, debido a la acción del herbicida sobre los meristemas. Ante factores estresantes una planta puede modificar su fisiología y dirección de crecimiento (Malpassi, 2004), variando su respuesta fisiológica y redirigiendo el crecimiento a meristemas remanentes (Malpassi, 2004). Esto último se verá reflejado en la estructura de la planta (Barthélémy, 2000). Los síntomas típicos producidos por el glifosato, son la detención del crecimiento y clorosis en las hojas, seguida luego de necrosis de tejidos y marchitamiento de la planta; en algunas especies el follaje se torna de color rojizo (Tuesca & Nisensohn, 2004). Dichos síntomas son más acentuados y ocurren primero en el ápice y zonas meristemáticas, luego se extienden a partes más viejas de las plantas. aunque la sintomatología post aplicación inmediata del glifosato está bien documentada, la variación a largo plazo en la estructura de plantas que persisten post aplicación está menos documentada, Hasta el momento existe escasa información de modificaciones en la estructura de vástagos o en las tasas de crecimiento que a nivel competitivo que acompañen a las modificaciones fisiológicas que otorgan resistencia (Dellaferrera et al., 2015; Goh et al., 2016; Powles & Yu, 2010).La capacidad de continuar el crecimiento o rebrotar desde áreas no dañadas permite a los poblaciones menos susceptibles aumentar su densidad en la población, siempre y cuando las condiciones de cultivo no se modifiquen. Muchas especies anuales, como *Conyza bonariensis* (Mellendorf et al., 2013), *Poa annua* (Binkholder et al., 2011), *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris* (Dellaferrera et al., 2015) presentan mecanismos de rebrote que les aseguran la producción de semillas.

El análisis de las formas de crecimiento comprende el estudio de las características exomorfológicas y anatómicas; incorporando la relación con el ambiente (Grosso, 2001). No sólo abarca las características de un individuo adulto, sino que también incorpora las etapas que se suceden desde la

germinación; e involucra una descripción ordenada y coordinada de eventos morfogénicos (Bell, 1986). Permite un análisis integral del conjunto de caracteres vegetativos y reproductivos, que varían sólo dentro de un rango específico de plasticidad fenotípica (Dengler, 1994; Grosso, 2001). El estudio de las formas a partir de principios dinámicos de construcción es inicialmente cualitativo, pero provee información básica que permite la cuantificación (Barthélémy, 2000).

Este enfoque morfológico y dinámico constituye una herramienta que permite esclarecer las distintas adaptaciones que presentan las especies en lo que concierne a la ocupación del espacio, competencia y resistencia a perturbaciones (Fournier, 1982; Barthélémy & Caraglio, 2007). Las investigaciones en formas de crecimiento son la base de muchos estudios fitosociológicos, de ecología de poblaciones y comunidades, y biogeográficos (Krumbiegel, 1998); y permiten comprender e interpretar relaciones ecológicas (Hagemann, 1981) y su correlación, por ejemplo, con la dispersión (Bernard, 1990). Las mismas pueden ser aplicadas a plantas que crecen en condiciones naturales o modificadas por el hombre, a estudios agronómicos (Meusel et al., 1977) o de manejo productivo de especies nativas (Montenegro & Ginocchio, 1992).

El conocimiento de la morfología y la anatomía de especies de difícil control es una herramienta de gran valor para lograr el control de las mismas (Kraus et al., 2007). Entre las especies de malezas la resistencia a los herbicidas es la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse después de la exposición a una dosis de herbicida normalmente letal para el tipo salvaje. (Vila-Aiub et al., 2014). Además del estudio de las especies en particular es necesario considerar las distintas poblaciones que han sido seleccionadas en los distintos ambientes de cultivo. Las poblaciones se definen como plantas genéticamente adaptadas a sus hábitats específicos, mientras que las poblaciones se definen como plantas dentro de poblaciones que exhiben variaciones genéticas aleatorias (Klingaman et al., 1996). Las diferentes poblaciones de *Echinochloa* muestran variaciones morfológicas debido a diferencias geográficas (Rui Liu et al., 2022).

Esta diversidad en las poblaciones de malezas de *Echinochloa* puede contribuir a su adaptación

a presiones selectivas impuestas por diferentes prácticas de manejo. Además, los hábitos de crecimiento del *Echinochloa* están fuertemente influenciados por el medio ambiente. condiciones, incluidas las condiciones del suelo, los niveles de fertilidad y las prácticas de cultivo, que pueden afectar ciertas características morfológicas de *Echinochloa* (Yabuno, 1983; Lopez-Martinez et al., 1999). Existe buena cantidad de información sobre los aspectos de control, dosis de herbicidas, combinaciones de herbicidas con diferente tipo de acción y utilización de coadyuvantes para el control de malezas tolerantes (Monquero, 2003; Rainero, 2004; Puricelli & Faccini, 2005), sin embargo, para *Echinochloa crus-galli* y *Echinochloa colona* no se dispone de trabajos que hayan abordado el estudio en detalle de las características de crecimiento que permitan determinar sus posibles estrategias de escape a la aplicación del herbicida.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y considerando el problema que representan las especies elegidas como malezas invasoras de campos dedicados a la siembra directa con aplicaciones intensivas de glifosato, este trabajo aborda el estudio de sus sistemas de ramificación desde la germinación, a fin de determinar sus patrones estructurales y analizar el efecto que la aplicación de glifosato tiene sobre los mismos.

Hipótesis

Las diferencias en las características vegetativas y reproductivas entre las poblaciones de *Echinochloa colona* y *Echinochloa crus-galli* están relacionadas con su sensibilidad al glifosato.

Objetivo

Caracterizar el desarrollo vegetativo y el potencial reproductivo de *E. colona* y *E. crus-galli*, identificando diferencias entre sus poblaciones con distinta sensibilidad al glifosato y evaluando cómo varía su crecimiento tras la aplicación del herbicida.

Objetivos específicos

Caracterizar el desarrollo vegetativo y el potencial reproductivo en *E. colona* y *E. crus-galli*, a fin de establecer posibles diferencias entre poblaciones con sensibilidad diferencial a glifosato.

Caracterizar el desarrollo vegetativo y el potencial reproductivo de plantas de *E. colona* y *E. crus-galli* y sus respectivas poblaciones, tratados y no tratados con glifosato.

Materiales y métodos

Evaluación de la forma de crecimiento y el potencial reproductivo.

Se realizó la evaluación de la forma de crecimiento normal y del efecto de la aplicación de glifosato sobre la forma de crecimiento de cada población. Las plantas evaluadas crecieron según las condiciones detalladas en el capítulo 1. Para evaluar el efecto de la aplicación de glifosato sobre la forma de crecimiento se realizará un DCA en arreglo factorial donde los factores son las poblaciones (7 niveles para *E. colona* y 4 niveles para *E. crus-galli*) y la aplicación de glifosato (2 niveles: sin y con 720 g i.a. ha-1). Se utilizarán 10 repeticiones por cada combinación de aplicación de glifosato y población. La aplicación se realizará luego de 20 días de crecimiento, en estado vegetativo 2.4 a 2.5 de la escala fenológica BBCH (Hess et al., 1997).

Semanalmente, luego de la aplicación, se observará y registrará la aparición y desarrollo de estructuras vegetativas (número de hojas y número de macollos) y reproductivas (número de panojas). Cada unidad de muestreo corresponde a una maceta con una planta por combinación. Finalmente, las plantas sobrevivientes serán diseccionadas para determinar su estructura a los 105 días de emergencia y serán comparadas entre grupos tratados y no tratados por población. La aparición de hojas, macollos, panojas y el comienzo del estadio de floración, se expresarán en días, además, se estimó el crecimiento semanal en altura mediante un ajuste a regresiones lineales. Se cuantificó también el potencial reproductivo como semillas totales por planta a los 105 días de emergencia y el peso de mil semillas de las mismas.

Se evaluaron las diferencias entre las poblaciones, la especie y la condición de aplicación, en los parámetros: altura de planta, número de hojas, número de macollos, número de panojas, fecha de aparición de panojas, fecha de floración, fecha de madurez fisiológica, largo de la panoja, espigas por panoja, espigas por espiguillas, granos por planta y peso de mil semillas. Todas las variables fueron sometidas a análisis de la varianza (ANOVA) y se establecieron diferencias entre las medias mediante el test DGC o t de Student a un nivel de significancia del 5%.

Resultados

Echinochloa colona

Las plantas de *Echinochloa colona* crecieron en promedio 80,23 cm, con valores mínimos de 65 cm y máximos de 115 cm. Al inicio de su crecimiento se presentan de forma erguida y luego próximo a floración presentan un porte más rastrero siendo, por tanto, sus tallos decumbentes. Las distintas poblaciones presentan de 2 a 15 macollos, los cuales pueden originar raíces adventicias en algunos casos. Sobre el tallo principal se diferencian entre 3 a 6 hojas alternas, con láminas linear-lanceoladas, vainas glabras, lustrosas y verdosas sin tintes purpúreos. Los bordes de las hojas son membranosos y no poseen lígulas. El número de panojas varía de 3 a 14, con un largo entre 9 y 17 centímetros. La inflorescencia se desarrolla en forma de panoja donde se pueden distinguir a las espiguillas que forman los racimos que están adheridos al raquis primario, estas inflorescencias son terminales, con 17 a 24 espigas por espiguillas. No presenta aristas.

Descripción de los parámetros de desarrollo en las poblaciones de *Echinochloa colona* sin y con tratamiento herbicida.

Desde el día 7 de evaluación hasta el día 55 las plantas aumentaron progresivamente su altura, aunque podemos diferenciar 2 velocidades de crecimiento. Desde el día 7 al 35 las poblaciones de *Echinochloa colona* sin aplicación de glifosato crecieron en promedio 5 centímetros por semana. Del día 35 al 55 el crecimiento aumentó y en promedio elevaron su altura en 17 centímetros por semana, para luego descender a 2 centímetros por semana desde el día 55 al 66 (Figura 3.1a), alcanzando los valores máximos para cada población para después estabilizarse y no producirse mayor crecimiento en altura. La altura final de las plantas para los individuos no aplicados presentó diferencias estadísticas entre las

poblaciones ($p<0,0001$) siendo las poblaciones Ec14 y Ec 03 las más altas alcanzando los 110 y 105 cm respectivamente.

Pasados cuatro días luego de su aplicación las plantas de las poblaciones Ec02, Ec03, Ec07 y Ec14 murieron y mientras que el resto de las poblaciones continuaron su crecimiento, presentando síntomas de amarillamiento, clorosis de las hojas y detención parcial del crecimiento. En el caso de las plantas aplicadas también se evidenciaron diferencias significativas en la altura final entre las poblaciones ($p<0,0001$). Las plantas crecieron hasta el momento de la aplicación (a los 30 días de nacidas) a razón de 5 cm por semana (Figura 3.1e). Las poblaciones que sobrevivieron (Ec 04, 05 y 06) crecieron en promedio 1,3 cm por día hasta el día 41 donde lograron el máximo tamaño (Figura 3.1e). La población que obtuvo mayor altura fue la Ec06. El promedio de altura fue de 19,67 cm, con valores entre 18 y 23 cm.

En la variable número de hojas en las plantas sin aplicar se observaron diferencias entre poblaciones ($p<0,0001$). La Ec04 y Ec05 se diferenciaron estadísticamente de las demás, pero no entre ellas ($p<0,0001$). El promedio de hojas fue de 4, el cual se alcanzó a los 28 días de nacidas las plantas para luego permanecer sin modificaciones (Figura 3.1b). En las plantas aplicadas también se observaron diferencias entre poblaciones en este parámetro ($p<0,0001$). Luego de la aplicación las poblaciones que sobrevivieron (Ec04, 05 y 06) redujeron el número de hojas por senescencia registrando 3,60, 2,45 y 2,00 hojas respectivamente. La Ec04 fue la que mayor número de hojas presentó y se diferenció de las demás (Figura 3.1f).

En el número de macollos se observaron diferencias entre poblaciones en las plantas sin aplicar. La Ec06 y Ec07 se diferenciaron estadísticamente de las demás, pero no entre ellas ($p<0,0001$). A los 15 días de nacidas las plantas, se inició el macollaje para la mayoría de las poblaciones, excepto la Ec14, que comenzó a macollar a los 21 días de nacidas las plantas (Figura 3.1c). Todas las poblaciones, a

excepción de la Ec14, extendieron el macollaje hasta los 82 días de nacidas las plantas donde se alcanzó el máximo número. El promedio de macollos fue de 10, con valores entre 2 y 14. En las plantas aplicadas se presentaron diferencias entre poblaciones (p<0,0001).

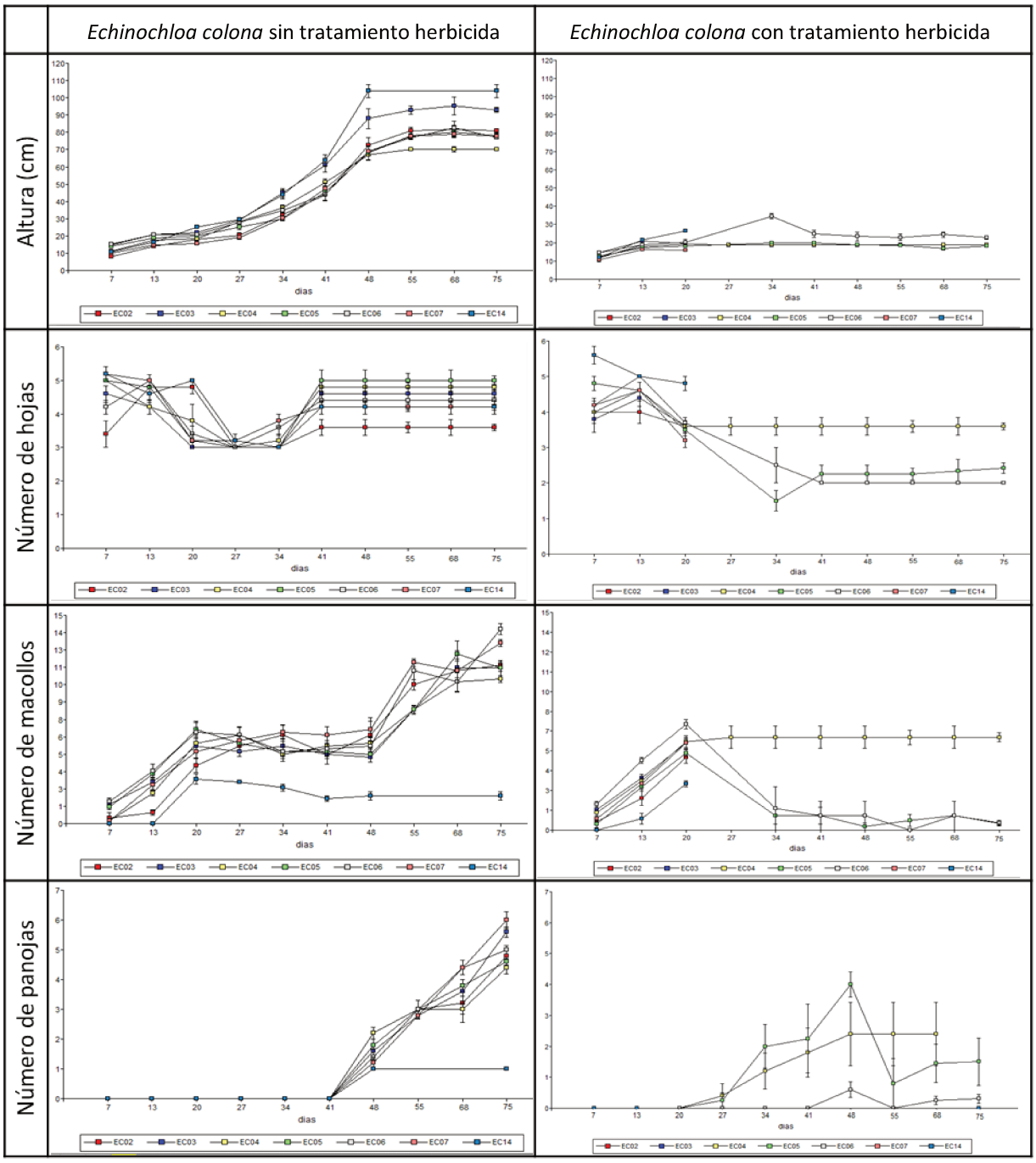

Figura 3.1. *Echinochloa colona* sin tratamiento herbicida: a) Altura en centímetros, b) Número de hojas, c) Número de macollos, d) Número de panojas. *Echinochloa colona* con tratamiento herbicida: e) Altura en centímetros, f) Número de hojas, g) Número de macollos, h) Número de panojas.

La Ec04 presentó el mayor número de macollos y su número no descendió desde el momento de la aplicación (Figura 3.1g), en cambio la Ec04 y Ec05 redujeron su número de macollos a 1. El promedio de macollos fue de 3, con valores entre 1 y 6.

En la variable número de panojas las plantas sin aplicar presentaron diferencias estadísticas y las poblaciones Ec06 y Ec07 evidenciaron el mayor número de panojas y se diferenciaron estadísticamente de las demás, pero no entre ellas ($p<0,0001$). A partir del día 48 (55 días desde el nacimiento de las plantas) comenzaron a aparecer las panojas y los máximos se alcanzaron a los 82 días de nacidas las plantas (Figura 3.1d). El promedio de panojas fue de 4, con valores entre 1 y 6. En las plantas aplicadas también se observaron diferencias entre poblaciones ($p<0,0001$). La población que mayor número de panojas arrojó fue la Ec05 (Figura 1h). El promedio de panojas fue de 2 con valores entre 1 y 4.

Echinochloa colona sin tratamiento herbicida

El tiempo a floración (medido en días) presentó diferencias entre las poblaciones. Ec04, Ec05 y Ec06 se diferenciaron estadísticamente de las demás (p 0,0041) estas poblaciones necesitan entre 5 y 9 días más que el resto para llegar a antesis. El promedio del tiempo a floración fue de 52,6 días (Tabla 3.1). La población Ec14 no llegó a floración en los días evaluados por lo que no se registraron los componentes de rendimiento, solo se computó una panoja porque la misma estaba emergiendo.

Tabla 3.1. Floración (días), b) Panoja (centímetros), Espiga por espiguillas (Epg*esp), Espiguillas por panoja (Epg*panoja), Granos*planta, P1000 semillas (miligramos) de las 6 poblaciones de *E. colona* sin aplicación de glifosato.

Biotipos		EC02		EC03		EC04		EC05		EC06		EC07	
Floración	µ (días) + SE*	50,80+6,26	b	48,00+0,00	b	55,00+0,00	a	57,80+6.26	a	55,00+0,00	a	49,40+0,00	b
Panoja (cm)	µ (cm) + SE*	12,50+2.15	b	15.20+1.35	a	13.60+0.89	b	14.80+1.30	a	13.60+1.34	b	13.00+0.71	b
Epg*esp	µ + SE*	20.60+4.51	a	22.60+1.52	a	21.00+2.00	a	17.40+0.55	b	18.60+0.55	b	17.40+1.67	b
Epg*panoja	µ + SE*	10.60+1.34	a	11.80+1.64	a	10.60+0.89	a	12.60+1.14	a	11.40+0.55	a	11.40+0.55	a
Granos*planta	µ + SE*	987.40+304.37	b	1423.20+393.38	b	1100.60+370.33	b	953.40+152.31	b	1050.00+208.12	b	2012.20+382.95	a
P1000 sem (mg)	µ (mg) + SE*	773.60+140.78	a	640.40+166.53	a	765.20+236.96	a	764.80+101.25	a	698.80+114.86	a	837.20+77.03	a

El largo de la panoja, medido en centímetros, evidenció diferencias entre las poblaciones. La Ec03 y Ec05 tuvieron panojas estadísticamente más largas que el resto de las poblaciones (p 0,0364) (Tabla 3.1). El promedio del largo de la panoja fue de 14 cm.

En lo referido a espigas por espiguillas, las poblaciones Ec02, Ec03 y Ec04 presentaron diferencias estadísticas comparadas con las otras poblaciones, pero no entre ellas (p 0,0048) (Tabla 3.1). El promedio de espigas por espiguillas fue de 20, con valores entre 17 y 24. En lo referido a espigas por panoja, no se presentaron diferencias estadísticas entre poblaciones (p 0,0670) (Tabla 3.1). El promedio de espigas por panoja fue de 11,4 con valores entre 10,6 y 12,6.

En el número de granos por planta, se observaron diferencias significativas entre poblaciones, siendo la Ec07 la que presentó diferencias respecto de las demás (p 0,0001) (Tabla 3.1). El promedio fue de 1261 granos por planta, con valores máximos de 2012 y mínimos de 953. En cuanto al peso de mil semillas, no se observaron diferencias significativas entre poblaciones (p 0,4145) (Tabla 3.1). El promedio fue de 746,67 mg, con valores máximos de 837 y mínimos de 640.

Echinochloa colona con tratamiento herbicida

En las plantas aplicadas con glifosato se evidenciaron diferencias en el tiempo a floración, presentando la Ec06 el mayor tiempo (p 0,0041) (Tabla 3.2). El promedio del tiempo a floración fue de 54,2 días. La población Ec06 además de ser la población que más demoró la floración, presentó mayor número de días que la misma, pero sin aplicar.

El largo de la panoja, medida en centímetros, no evidenció diferencias significativas entre las poblaciones (p 0,1565) (Tabla 3.2). El promedio del largo de la panoja fue de 10 centímetros. En lo referido a Espigas por espiguillas y Espigas por panoja, no se presentaron diferencias estadísticas entre poblaciones (p 0,3170 y p 0,4962 respectivamente) (Tabla 3.2). El promedio de espigas por espiguillas fue de 15 y el promedio de espigas por panoja fue de 7,5.

Tabla 3.2. Floración (días), b) Panoja (centímetros), Espiga por espiguillas (Epg*esp), Espiguillas por panoja (Epg*panoja), Granos*planta, P1000 semillas (miligramos) de las 3 poblaciones de *E. colona* con aplicación de glifosato.

Biotipos		EC04		EC05		EC06	
Floración	µ (días) + SE*	48,0+0,00	b	47,75+6,13	b	69,00+0,00	a
Panoja (cm)	µ (cm) + SE*	10.33+0.58	a	10.50+0.58	a	9.00+0.00	a
Epg*esp	µ + SE*	16.00+1.73	a	15.00+0.00	a	14.00+0.00	a
Epg*panoja	µ + SE*	7.67+0.58	a	7.75+0.50	a	7.00+0.00	a
Granos*planta	µ + SE*	639.67+262.35	a	441.00+241.82	a	303.00+0.00	a
P1000 sem (mg)	µ (mg) + SE*	1122.00+115.64	a	705.00+382.39	a	604.00+0.00	a

En los parámetros número de granos por planta y peso de mil semillas, no se observaron diferencias significativas entre poblaciones (p 0,4677 y p 0,2341 respectivamente) (Tabla 3.2). El promedio fue de 461 granos por planta, con valores máximos de 640 y mínimos de 303 granos. En cuanto al peso de mil semillas el promedio fue de 810 miligramos, con valores máximos de 1122 y mínimos de 640.

Comparación de poblaciones de *E. colona* con y sin tratamiento herbicida.

A excepción del número de panojas (p 0,4447) y el peso de mil semillas (p 0,4332), todos los parámetros estudiados se vieron reducidos cuando se aplicó el herbicida glifosato. En cuanto a los demás parámetros cuando las plantas fueron aplicadas con glifosato, el largo de la panoja, medido en centímetros, se reduce en un 26,78% ($p<0,0001$). Las espigas por espiguillas mermaron un 19,73% (p 0,0001) y las espigas por panoja un 33,82% ($p <0,0001$). En relación al número de granos por planta, la aplicación de glifosato redujo en promedio un 51,83% ($p>0,0001$). Aunque se reduce el número de semillas en poblaciones tratados, el número sigue siendo elevado para asegurar la perpetuación de individuos menos susceptibles.

En los tiempos de floración se pueden observar dos comportamientos entre las mismas poblaciones que sobrevivieron respecto de los que no lo hicieron. Las poblaciones Ec04 y Ec05 nunca

detienen su crecimiento luego de la aplicación y florecen antes que las plantas sin aplicar y otro grupo compuesto por la población Ec06 que detiene el crecimiento y florece después que las plantas sin aplicar.

Echinochloa crus-galli

Las plantas de *E. crus-galli* crecieron hasta una altura de 68 centímetros, aunque el menor valor fue de 25 centímetros. Presentan porte generalmente erecto, las cañas son huecas, las mismas pueden ser erguidas a decumbentes. Los bordes de las hojas son membranosos; no poseen lígulas. Con 3 a 4 hojas sobre el eje principal y con las láminas linear-lanceoladas. Presentan de 2 a 15 macollos. El número de panojas varía de 1 a 3, con un largo de 10 a 15 centímetros. Posee inflorescencias contraídas, terminales, con 15 a 37 espigas por espiguillas. Presenta aristas, entre 3 y 10 centímetros. El fruto es una cariopse ovoide de color verde.

Descripción de los parámetros de desarrollo en las poblaciones de *Echinochloa crus-galli* sin y con tratamiento herbicida.

Desde el día 7 de evaluación hasta el día 41 las plantas aumentaron progresivamente su altura (Figura 3.2a), aunque podemos diferenciar 2 velocidades de crecimiento en altura. Desde el día 7 al 27 las poblaciones de *E. crus-galli* sin aplicación de glifosato crecieron en promedio 4 centímetros por semana. Del día 27 al 41 el crecimiento descendió y en promedio elevaron su altura en 2 centímetros por semana, para volver a aumentarlo desde el día 41 al 75 en promedio 6 centímetros por semana (Figura 2a). La altura final de las plantas para los individuos no aplicados presentó diferencias estadísticas entre las poblaciones ($p<0,0001$), siendo la Ecg 16 la que alcanzo el valor más alto (figura 3.2a).

En el caso de las plantas aplicadas no se evidenciaron diferencias significativas en la altura final entre las poblaciones ($p>0,9999$). Las plantas crecieron hasta el momento de la aplicación (a los 30 días de nacidas) a razón de 5 centímetros por semana. La población Ecg16 no sobrevivió y luego de la

aplicación las poblaciones que sobrevivieron (Ecg14 y Ecg15) permanecieron sin crecimiento hasta el día 41 donde luego retomaron su crecimiento en 2 centímetros por semana hasta lograr el máximo tamaño a los 75 días (figura 3.2e). La población que obtuvo mayor altura fue la Ecg14.

En la variable número de hojas en las plantas sin aplicar se observaron diferencias entre poblaciones. La Ecg13 se diferenció estadísticamente de las demás ($p<0,0001$). El promedio de hojas fue de 5, el cual se alcanzó a los 28 días de nacidas las plantas para luego permanecer sin modificaciones (figura 3.2b). En las plantas aplicadas no se observaron diferencias entre poblaciones ($p>0,9999$). Luego de la aplicación las poblaciones que sobrevivieron Ecg14 y Ecg15 redujeron las mismas debido a senescencia foliar y se registraron finalmente en promedio 3 hojas (figura 3.2f).

En el número de macollos también se observaron diferencias entre poblaciones en las plantas sin aplicar. La Ecg14, Ecg15 y Ecg16 se diferenciaron estadísticamente de la Ecg13, pero no entre ellas ($p<0,0010$). A los 21 días de nacidas las plantas, se inició el macollaje para todas las poblaciones y las mismas extendieron el macollaje hasta los 82 días de nacidas las plantas donde se alcanzó el máximo número (figura 3.2c). El promedio de macollos fue de 8; con valores entre 7 y 9. En las plantas aplicadas se presentaron diferencias entre poblaciones ($p<0,0001$). La Ecg15 presentó el mayor número de macollos y se diferenció de la Ecg14 (figura 3.2g). El promedio de macollos fue de 9, con valores entre 7 y 10.

En la variable número de panojas las plantas sin aplicar presentaron diferencias estadísticas y la población Ecg16 evidenció el mayor número de panojas ($p<0,0001$). A partir del día 55 (62 días desde el nacimiento de las plantas) comenzaron a aparecer las panojas y su número se hizo máximos a los 82 días de nacidas las plantas (figura 3.2d). El promedio de panojas fue de 2, con valores entre 1 y 3. En las plantas aplicadas no se observaron diferencias entre poblaciones ($p<0,2252$). El promedio de panojas fue 1 (figura 3.2h). En cuanto al largo de la panoja (en centímetros), no se evidenciaron diferencias entre las poblaciones (p 0,2692). El promedio del largo de la panoja fue de 11,88 centímetros (datos no graficados).

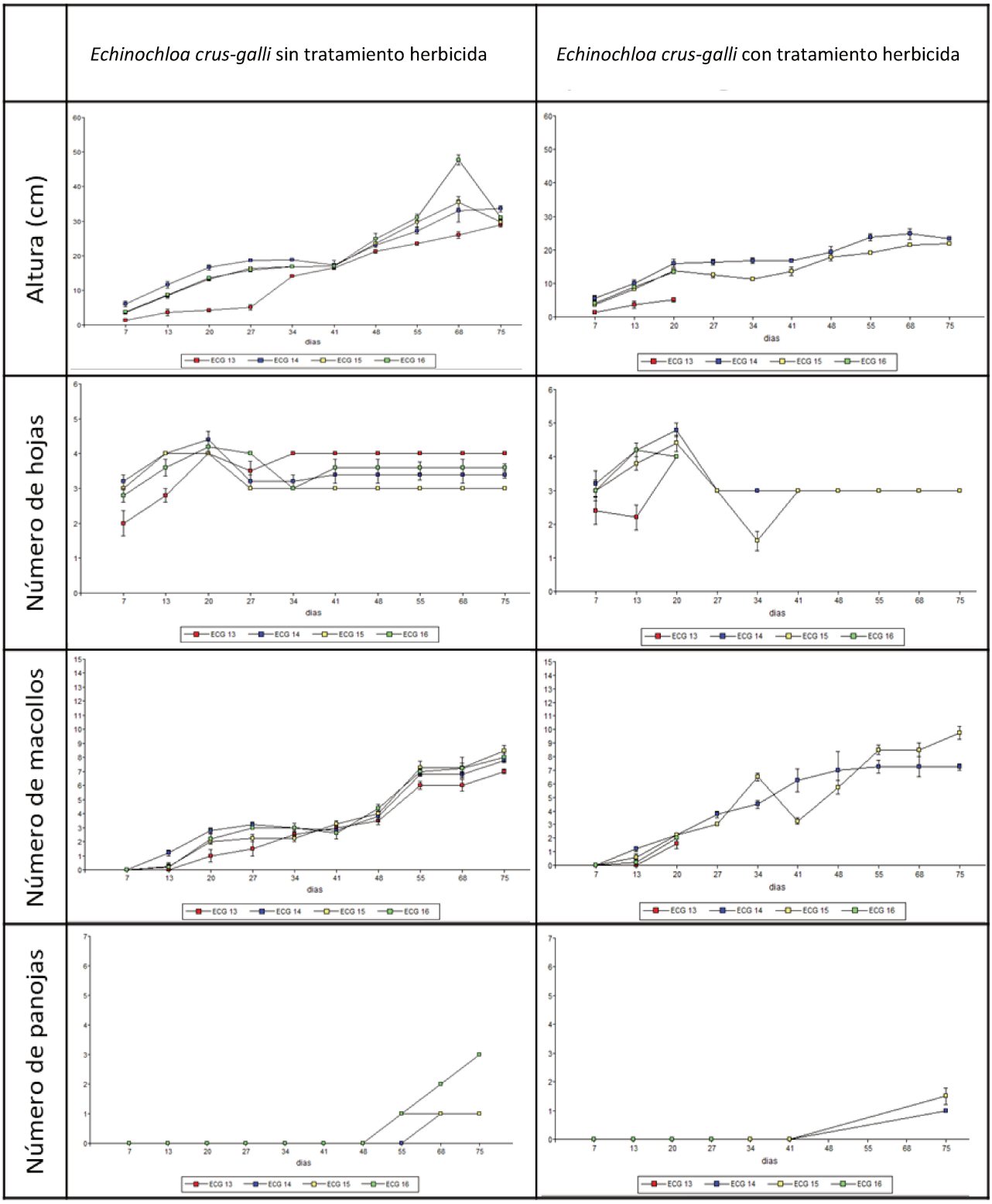

Figura 3.2. *Echinochloa crus-galli* sin tratamiento herbicida: a) Altura en centímetros, b) Número de hojas, c) Número de macollos, d) Número de panojas. *Echinochloa crus-galli* con tratamiento herbicida: e) Altura en centímetros, f) Número de hojas, g) Número de macollos, h) Número de panojas.

***Echinochloa crus-galli* sin tratamiento herbicida.**

En las plantas de *E. crus-galli* sin aplicación, el tiempo a floración (medido en días) no presentó diferencias entre las poblaciones (p>0,9999). El promedio del tiempo a floración fue de 82 días (Tabla 3.3). La población Ecg13 no se incluye en las medidas finales porque el tiempo a floración excede el tiempo propuesto de medición. En lo referido a Espigas por espiguillas, la población Ecg14 presentó diferencias estadísticas respecto de las otras poblaciones (p 0,0002) (Tabla 3.3). El promedio de espigas por espiguillas fue de 24, con valores entre 21 y 28. En lo referido a Espigas por panoja, también se presentaron diferencias estadísticas entre poblaciones (p 0,0001) y la población Ecg15 se diferenció del resto (Tabla 3.3). El promedio de espigas por panoja fue de 18 con valores entre 15 y 20.

En relación al número de granos por planta, se observaron diferencias significativas entre poblaciones, siendo la Ecg15 la que presentó diferencias respecto de las demás (p 0,0025) (Tabla 3.3). El promedio fue de 1298 granos por planta, con valores máximos de 1440 y mínimos de 1225. En cuanto al peso de mil semillas, la Ecg16 presentó diferencias significativas respecto de las demás poblaciones (p 0,0016) (Tabla 3.3). El promedio fue de 1337 miligramos, con valores máximos de 1862 y mínimos de 926.

Tabla 3.3. Floración (días), b) Panoja (centímetros), Espiga por espiguillas (Epg*esp), Espiguillas por panoja (Epg*panoja), Granos*planta, P1000 semillas (miligramos) de las 6 poblaciones de *E. colona* sin aplicación de glifosato.

Población		ECG14		ECG15		ECG16	
Floración	µ (días) + SE*	82,00+0,00	a	82,00+0,00	a	82,00+0,00	a
Epg*esp	µ + SE*	27.67+0.58	a	24.50+0.71	b	21.67+0.58	c
Epg*panoja	µ + SE*	15.00+0.00	c	20.00+0.00	a	18.33+0.58	b
Granos*planta	µ + SE*	1225.00+8.66	b	1440.00+0.00	b	1277.33+53.00	a
P1000 sem (mg)	µ (mg) + SE*	1038.00+97.32	b	1084.00+226.27	b	1805.00+93.00	a

***Echinochloa crus-galli* con tratamiento herbicida.**

El tiempo a floración (medido en días) no registró diferencias entre poblaciones (p 0,4865) (Tabla 3.4) estableciendo un tiempo promedio de 66,64 días. En lo referido a Espigas por espiguillas, sin diferencias entre poblaciones (Tabla 3.4). Las mismas presentaron un valor p de 0,2722, y el promedio de espigas por espiguillas fue de 15. Las espigas por panoja arrojaron un promedio de 13 y su valor p fue de 0,5367.

En cuanto al número de espigas por espiguilla, no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones (Tabla 3.4). El valor p para este análisis fue de 0,2722, lo que indica que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de que las poblaciones tienen el mismo número promedio de espigas por espiguilla. El promedio general de espigas por espiguilla fue de 15. En cuanto al número de espigas por panoja, el promedio general fue de 13, y el valor p para este análisis fue de 0,5367. Nuevamente, este valor p no es significativo, lo que indica que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de que las poblaciones tienen el mismo número promedio de espigas por panoja.

En relación al número de granos por planta el valor de p fue de 0,4065 y el promedio de granos por planta fue de 614, con valores entre 591 y 648. En cuanto al peso de mil semillas el promedio fue de 860,80 miligramos, con valores máximos de 834 y mínimos de 878,67 y el valor de significancia fue de 0,6590 (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Floración (días), b) Panoja (centímetros), Espiga por espiguillas (Epg*esp), Espiguillas por panoja (Epg*panoja), Granos*planta, P1000 semillas (miligramos) de las 6 poblaciones de *E. colona* sin aplicación de glifosato.

Población		ECG14		ECG15	
Floración	µ (días) + SE*	69,50+0,51	a	65,75+6,50	a
Epg*esp	µ + SE*	15.50+0.71	a	15.00+0.00	a
Epg*panoja	µ + SE*	13.50+0.71	a	12.67+1.53	a
Granos*planta	µ + SE*	648.50+53.03	a	591.00+70.76	a
P1000 sem (mg)	µ (mg) + SE*	834.00+70.71	a	878.67+112.17	a

Comparación de poblaciones de *E. crus-galli* con y sin tratamiento herbicida.

Las poblaciones de *E. crus-galli* aplicados con glifosato no se diferenciaron estadísticamente de las poblaciones sin la aplicación de este herbicida en los parámetros de: largo de panoja (p 0,2967); número de panojas (p 0,3632) y peso de mil semillas (p 0,7500). Para el caso de espigas por espiguillas, espigas por panoja y granos por planta si se presentaron diferencias entre las poblaciones aplicados y los no aplicados.

Todos estos parámetros se redujeron cuando se aplicó el herbicida glifosato. Las espigas por espiguillas mermaron un 61,35% (p 0,0002), y las espigas por panoja un 23,5% (p 0,0092). En relación al número de granos por planta, la aplicación de glifosato redujo en promedio un 54,88% (p 0,0013). Así como sucedió con *E. colona*, aunque en *E. crus-galli* se reduce el número de semillas en poblaciones tratados, el número sigue siendo elevado para asegurar la perpetuación de individuos menos susceptibles. La aplicación del herbicida glifosato redujo los tiempos a floración de las poblaciones con aplicación en relación a los no aplicados en un 17,53% ($p<0,0001$).

Comparación entre especies de *E. colona y E. crus-galli* sin y con tratamiento herbicida.

Cuando comparamos las especies, en las plantas que no tuvieron aplicación de glifosato a excepción de los granos por planta en el cual no se evidenciaron diferencias estadísticas, todos los demás parámetros presentaron diferencias significativas entre *Echinochloa colona* (EC) y *Echinochloa crus-galli* (ECG) (Tabla 3.5 y 3.6).

La altura de planta fue 2,46 veces mayor en EC que ECG, y el número de macollos fue un 47,5% mayor en las plantas de EC que las de ECG (Tabla 3.5). El número de panojas en promedio fue 3 veces mayor en EC que ECG (Tabla 3.6), pero el largo de la misma también registró un 17,7% más de tamaño (datos no presentados). El número de granos por panoja fue 52% menor en EC que ECG. La floración de EC ocurrió en promedio 31,4 días antes que la de ECG y cuando se cosecharon las plantas, EC no arrojó diferencias en el número de granos por planta respecto de ECG, en cambio el peso de mil granos

fue un 51% menor en promedio en EC (Tabla 3.6). En las plantas aplicadas con el herbicida glifosato 6 de los 10 parámetros estudiados arrojaron valores menores en EC que ECG y presentaron diferencias estadisticas.

Tabla 3.5. Altura (cm), Número de hojas, Número de macollos en las especies de *E. colona* (EC) y *E. crus-galli* (ECG) sin y con aplicación de glifosato

	SIN APLICACIÓN DE GLIFOSATO			CON APLICACIÓN DE GLIFOSATO		
Población	**EC**	**ECG**	**p-valor**	**EC**	**ECG**	**p-valor**
Altura (cm)	80,23	32,59	<0,0001	20,60	25,05	0,0011
N° de hojas	4,43	3,50	<0,0001	2,66	2,78	0,3887
N° de macollos	11,55	7,83	<0,0001	6,37	7,24	0,3396

Tabla 3.6. Floración (días), Número de panojas, Espiga por espiguillas (Epg*esp), Granos*panoja (Epg*panoja), Granos*planta, P1000 semillas (miligramos) en especies de *E. colona* (EC) y *E. crus-galli* (ECG) sin y con aplicación de glifosato.

	SIN APLICACIÓN DE GLIFOSATO			CON APLICACIÓN DE GLIFOSATO		
Biotipos	**EC**	**ECG**	**p-valor**	**EC**	**ECG**	**p-valor**
Floración	52,60	82,00	<0,0001	54,20	67,62	0,00365
N° panoja	6,10	1,75	<0,0001	4,38	1,00	0,0013
Epg*panoja	11,40	17,50	<0,0001	7,63	13,00	0,0002
Granos*panoja	223	423	<0,0001	111	196	<0,0001
Granos*planta	1261	1298	0,6877	498	614	0,0184
P1000 sem (mg)	746,67	1337,25	0,0048	848,75	860,80	0,9275

La altura de planta fue 18% menor en EC que ECG, el número de macollos presentó una merma importante y fue un 12% menor en las plantas de EC que las de ECG (Tabla 3.5). El número de panojas mantuvo la relación positiva de EC respecto de ECG y en promedio fue 3,7 veces mayor (Tabla 3.6), aunque el largo de la misma registró un promedio de 21% menos de tamaño (datos no presentados). El número de granos por panoja fue menor en EC que ECG aproximadamente un 56%. La floración de EC ocurrió en promedio 13,4 días antes que la de ECG. Cuando se cosecharon las plantas, EC presentó 2,18 veces más de granos por planta que ECG, pero mantuvo más bajo el peso de mil granos promediando 73% menos (Tabla 3.6).

Discusión

Las poblaciones de ambas especies estudiadas presentan diferencias en su forma de crecimiento sin la aplicación de glifosato. La altura de la planta difiere entre especies y en este trabajo fue mayor en *Echinochloa colona* (EC) que en *Echinochloa crus-galli* (ECG) coincidiendo con los valores de altura de planta relevados por Flora Argentina, pero más bajos que los obtenidos por Masum et al, 2022 en Bangladesh y en China por Xuli Hu et al, 2023, particularmente en ECG, pero similares a las poblaciones medidas por Chauhan (2022) y Mahboobeh Mollaee et al, (2020) en Queensland, Australia en EC, y más altas que las obtenidas por Rui Liu (2022) en Texas para EC. Contrariamente a esto, Bagavathiannan et al 2011 no encontraron diferencias entre poblaciones resistentes y susceptibles a propanil y clomazone en ECG en cultivos de arroz en Arkansas.

En este experimento el número de hojas (medidas en el tallo principal) fue mayor en EC que en ECG a diferencia de Xuli Hu et al (2023) que encontró valores similares entre las dos especies al igual que Bagavathiannan et al 2011 en poblaciones de ECG resistentes y susceptibles a propanil y clomazone en Arkansas. Mahajan y colaboradores (2020) revelaron que el número de macollos por planta juega un papel importante en la producción de semillas, junto con el número de hojas por planta. en este estudio, el número de macollos y el número de panojas presentó variabilidad entre las especies y poblaciones, pero

siempre fue superior en EC respecto de ECG, tal como lo observaron Xuli Hu et al. (2023). Sin embargo, los valores obtenidos por este autor fueron mayores que los relevados en este estudio. Esto puede deberse a que las mediciones de estos autores se realizaron en campo sin restricciones, a diferencia de este trabajo, donde las condiciones en la sala de crecimiento fueron homogéneas pero restrictivas en cuanto a la cantidad de luz y espacio.

El rendimiento de semillas de *Echinochloa* está determinado principalmente por el número efectivo de panojas, el número de granos por panoja y el peso del grano. El número de granos por panoja es un factor clave en la formación de granos (Xuli Hu et al., 2023). Respecto a la longitud de la panoja, se ha informado que esta y la producción de semillas están también positivamente correlacionadas en ECG (Norris, 1992; Pannwitt et al., 2019).

En este estudio, la longitud de la panoja fue mayor en EC que en ECG, lo cual difiere de los hallazgos de Rui Liu (2022), quien reportó una mayor longitud de panícula en ECG en comparación con EC. Por otro lado, EC presentó valores similares de semillas por planta respecto de ECG, en contraste con lo encontrado por Xuli Hu et al. (2023), quienes observaron que EC presentó un número más bajo de semillas por planta en comparación con ECG y otras especies de *Echinochloa*. Sin embargo, el número de granos por panoja fue menor en EC que en ECG. En relación al peso de mil semillas, EC presentó valores menores que ECG, similar a lo encontrado por Xuli Hu et al. (2023). considerando lo anterior no se observó el número mayor de semillas en la especie con mayor longitud de panoja, dejando esta relación sin comprobarse en este trabajo, además la longitud de panícula podría estar asociada en este estudio a las condiciones de crecimiento o a alguna diferencia en la selección a campo de estas poblaciones particulares.

Conocer la producción de semillas y la relación con otros parámetros que puedan influenciar esta producción en estas poblaciones es necesario para comprender la evolución y propagación de la resistencia a los herbicidas, particularmente en las poblaciones resistentes a los herbicidas. La floración

de las plantas presentó diferencias entre especies, EC floreció en promedio 31,4 días antes que la de ECG distinto de los encontrados por Rui Liu (2022) que observó valores similares en los días de floración de las dos especies estudiadas. En otro estudio, Xuli Hu (2023), encontró que ECG y otras especies de *Echinochloa* tuvieron períodos de crecimiento significativamente más largos que EC.

Chauhan (2022), encontró valores similares a este estudio en los periodos de floración de EC, pero además destacó que la floración varía en función del fotoperiodo a la que es expuesta la planta, ya que con fotoperiodos más largos se observó que EC presentó hasta 40 días más de retraso de la floración, similar a lo encontrado por Vengris et al. 1996 (pero en ECG), en el cual con menos de 11 horas de duración del día produjeron semillas en 52 días en comparación con 84 días con fotoperiodos de 16 horas. La planta construye su forma a medida que avanza el desarrollo y se establecen las ramificaciones (Barthélemy & Caraglio, 2007). Cuando se aplica un herbicida se crean condiciones ambientales artificiales extremas negativas para el crecimiento y desarrollo de la vegetación (Monquero, 2003; Rodríguez, 2004), por lo que una planta que sobrevive a la acción de un herbicida modifica su comportamiento debido principalmente a la acción ejercida por el herbicida sobre los meristemas (Meusel et al., 1977).

Evaluando las plantas aplicadas, en ECG todos los parámetros se redujeron cuando se les aplicó glifosato, en el caso de EC 7 de 9 parámetros fueron reducidos. El número de panojas se redujo en un 30% (EC) y un 48% (ECG), valores similares a los encontrados por Asaduzzaman et al., 2021 en poblaciones de EC en Australia. Los valores de producción de semillas se redujeron en un 61% en EC y en un 53% en ECG. Estos valores fueron similares a los obtenidos por Vila-Aiub et al., 2021 en una población de *Eleusine indica* de Australia. En otros estudios, Dellaferrera (2013) observó también una disminución en la producción de semillas en *Parietaria debilis* y *Petunia axilaris* cuando fueron aplicadas con glifosato sin embargo esto asegura la perpetuación de las poblaciones menos susceptibles. Además, este mismo autor determinó que la floración en *Petunia axilaris* evidenció un adelanto con la aplicación de este herbicida en comparación a las plantas sin aplicar.

Una ventana de floración prolongada aumenta las oportunidades para el cruzamiento entre diferentes poblaciones y especies de *Echinochloa*. Aunque los miembros de *Echinochloa* son autógamos y predominantemente autopolinizante, el cruzamiento ocasional aún podría suceder (Maun y Barrett 1986). Flujo de genes mediado por polen se detectó entre plantas de *E. crus-galli* hasta un máximo de distancia de 50 metros (Bagavathiannan y Norsworthy 2014). Una ventana de floración extendida tiene implicaciones para la propagación de resistencia a herbicidas a través de flujo de genes mediados por polen en todos los campos. Estas ventanas de floración se ven alteradas en las poblaciones estudiados ya que los tiempos a floración variaron significativamente en Ecg con lo reportado.

Conclusión

Ambas especies presentan diferentes estrategias de crecimiento inicial, lo que determina que la aplicación de herbicida afecta en forma diferente a cada especie. Para *Echinochloa colona* a excepción del número de panojas y el peso de mil semillas, todos los parámetros estudiados se vieron reducidos cuando se aplicó el herbicida glifosato. Sin embargo, *Echinochloa colona* no modificó el tiempo a floración de las plantas aplicadas en relación a las no aplicadas.

Las poblaciones de *Echinochloa crus-galli* aplicados con glifosato no se diferenciaron estadísticamente de las poblaciones sin la aplicación de este herbicida en los parámetros de: largo de panoja, número de panojas y peso de mil semillas. Para el caso de espigas por espiguillas, espigas por panoja y granos por planta si se presentaron diferencias entre las poblaciones aplicadas y los no aplicadas. Todos estos parámetros se redujeron cuando se aplicó el herbicida glifosato. En *Echinochloa crus-galli* si se produjo un adelanto de la floración cuando se aplicó el herbicida glifosato. Sin embargo, aún ante estas modificaciones las plantas sobrevivientes de las dos especies fueron capaces de dejar descendencia y perpetuar así los genotipos menos susceptibles.

Discusión general

Este estudio aborda la importancia de conocer las poblaciones de *Echinochloa* presentes en Argentina, el grado de susceptibilidad de estas a glifosato, el mecanismo de acción implicado en la generación de la resistencia y como se desarrollan y crecen las plantas ante la presencia o ausencia de este herbicida. Se pudo apreciar que existe una susceptibilidad diferencial entre las distintas especies de *Echinochloa* al herbicida glifosato tanto en los parámetros de supervivencia y de sensibilidad.

La supervivencia de las plantas presentó diferencias entre especies y dentro de las mismas. *E. colona, E crus-galli* y *E. oryzoides* presentaron alta capacidad de supervivencia, llegando a valores del 90%, (Figuras 1.3, 1.4 y 1.5) similar a lo encontrado por Alarcón-Reverte et al. (2015), Alarcón-Reverte et al. (2013) y Asaduzzaman et al. (2021) en poblaciones de *E. colona* de otros países, indicando esto una evolución similar de la especie ante la presión de selección herbicida. En cambio, *E. chacoensis* presentó supervivencias muy inferiores, llegando al 30% aproximadamente (figura 1.6). Estas poblaciones que superan el 20% de supervivencia, son consideradas resistentes a glifosato según Busi (2021), el cual toma este parámetro para calificar a una población resistente. Tomando como valor de referencia para discriminar entre poblaciones resistentes y susceptibles un factor de resistencia (FR) mayor a 2, propuesto por Burgos et al. (2013), se observó una diferencia de sensibilidad en las especies de *E. chacoensis* en comparación con *E. colona, E. crus-galli* y *E. oryzoides* presentando menor sensibilidad estas dos últimas, pero con variaciones dentro de cada especie, similar a lo observado por otros autores (Alarcón-Reverte et al., 2013; Gaines et al., 2012; Morran et al., 2018).

Esta menor sensibilidad al herbicida glifosato fue confirmada con los análisis de inhibición enzimática, coincidiendo con lo observado en el trabajo de Alarcón-Reverte et al. (2013) y Morran et al. (2018), que también determinaron en *E. colona*, que la acumulación de ácido shikímico es mayor en poblaciones susceptibles que en resistentes. El 66% de las poblaciones de *E. colona* y *E. chacoensis* (Figuras 1.12 y 1.15) tenían su ruta metabólica inhibida y acumularon ácido shikímico. En *E. crus-galli* este porcentaje fue del 40% (figura 1.13) y en *E. oryzoides* (figura 1.14) fue solo del 17% permitiendo

discriminar los diferentes niveles de susceptibilidad al glifosato en diferentes poblaciones. Dicha acumulación con el tiempo (24 horas después de la aplicación) en poblaciones susceptibles puede ser de hasta más del doble de la concentración de ácido shikímico que en las poblaciones resistentes. A las 96 horas, estos valores de ácido shikímico pueden ser hasta cinco veces mayor.

El rango de niveles de resistencia reportados en *Echinochloa* en todo el mundo y entre las poblaciones examinadas en este estudio puede reflejar el papel de los diferentes mecanismos que contribuyen a la resistencia. Diferentes autores citan cambios o mutaciones de la enzima EPSPS en las posiciones 102, 103 y 106 (Yu et al; 2015, Han et al; 2016; Perotti et al.; 2019; García et al.; 2019). En nuestros estudios no se encontraron cambios en las posiciones 102 y 103, pero si en la posición 106. En este sitio, las plantas con secuencia nativa presentan los codones CCA, que codifican para Prolina. Estudios previos han demostrado que las sustituciones de aminoácidos en Pro 106 en el gen EPSPS generalmente confieren un nivel bajo a moderado (2 a 4 veces) de resistencia al glifosato en muchas especies de malezas (Kaundun et al., 2008, y revisado por Sammons y Gaines, 2014), confirmando lo encontrado en este trabajo en las poblaciones de *E. colona*.

La mutación comúnmente encontrada en la mayoría de las investigaciones en *Echinochloa* fue la de Pro-106-Ser (Alarcón-Reverte et al., 2013; Han et al., 2016 y Morran et al., 2018); en nuestro trabajo no observamos esa mutación, pero sí se identificó la mutación Pro-106-Thr para Ec5 y Ec7 (Figura 2.1d y 2.1f), al igual que lo reportado por Han y colaboradores (2016) o Morran y colaboradores(2018);la mayoría de las sustituciones se observan en el primer nucleótido de este codón que resultan en cambios a Serina (TCA), Treonina (ACA) o Alanina (GCA), (Alcántara et al., 2016; Ng et al., 2003 y Yu et al., 2007), aunque también se han reportado cambios en el segundo nucleótido del codón, resultando en un cambio de Prolina a Leucina (CUA), (Collavo y Sattin, 2012) y solo un reporte donde se observaron cambios en la segunda y tercera posición, dando como resultado un cambio a Histidina (Yanniccari et al, 2022). En nuestro trabajo, además, se logró determinar por primera vez una sustitución del aminoácido 106 que codifica para Gln o Glu en Ec4 (Figura 2.1c). Esta población arrojó los valores más altos de IR de este trabajo (Tabla 1.2). En conjunto, nuestros resultados sugieren que uno

de los mecanismos subyacentes a la resistencia de *E. colona* en Argentina es el tipo TSR, específicamente basado en una mutación puntual de EPSPS en la posición 106, aunque el nivel de ploidía encontrado en ambas especies podría generar el efecto de dilución, alterando los factores de resistencia (Alarcón-Reverte et al.; 2015).

Echinochloa colona es un alopoliploide y las líneas estudiadas aquí presentaron diferencias entre las distintas poblaciones en su nivel de ploidía (Tabla 2.1). Tres poblaciones aquí estudiadas fueron confirmadas como tetraploides, en coincidencia con poblaciones de *E. colona* de Arabia Saudita (Haroun & Alotaibi, 2015) y Texas (EEUU) (Brown, 1950). Nuestros estudios también revelaron que dos de estas poblaciones se determinaron como tetra y hexaploide, al igual que lo expuesto por Nadeem et al; 1994 en poblaciones de *E. colona* de Pakistán realizadas mediante análisis citológicos. Ambas especies son autocompatibles y altamente autógamas; sin embargo, se han reportado algunos cruces (1.4%) mediados por el viento (Maun y Barrett 1986; Nguyen 2015). Otros autores aseguran que esa tasa de polinización cruzada asegura el intercambio de genes (Salguero et al.; 2015).

Por último, nuestro trabajo no reveló poblaciones solamente hexaploides, como sí lo hicieron autores como Mulligan (1961); Yabuno (1962); Michael, (1983); Hilu, (1994); Nakayama & Yamaguchi, (1999); Asíns et al. (1999); Morran et al. (2018); y Wu et al (2022) en distintas poblaciones de *E. colona* en otros países. En cuanto a *Echinochloa crus-galli* los análisis citológicos de la población aquí estudiada revelan que la misma es hexaploide (Tabla 1), en coincidencia con toda la bibliografía consultada (Mulligan 1961; Yabuno 1962; Michael, 1983; Hilu, 1994; Nakayama & Yamaguchi, 1999; Ye et al.; 2020; Wu et al.; 2022).

Los organismos poliploides tienen múltiples conjuntos de cromosomas como resultado de la duplicación del genoma completo, que puede ser causada, por ejemplo, por una división celular anormal. En *Echinochloa* el nivel de ploidía suma un grado de complejidad donde, sí existe homología en las mutaciones que confieren resistencia, esta será de un factor mayor (Alarcón-Reverte et al.; 2015).

Sin embargo, los diferentes niveles de resistencia en cada población y la presencia de plantas

resistentes sin mutación confirmada, podría significar que está involucrado más de un mecanismo de resistencia. Actualmente se están realizando más experimentos, incluidos estudios de absorción y translocación de glifosato y análisis de los niveles de expresión del gen EPSPS.

La planta construye su forma a medida que avanza el desarrollo y se establecen las ramificaciones (Barthélemy & Caraglio, 2007). Cuando se aplica un herbicida se crean condiciones ambientales artificiales extremas negativas para el crecimiento y desarrollo de la vegetación (Monquero, 2003; Rodríguez, 2004), por lo que una planta que sobrevive a la acción de un herbicida modifica su comportamiento debido principalmente a la acción ejercida por el herbicida sobre los meristemas (Meusel et al., 1977).

Las poblaciones de ambas especies estudiadas presentan diferencias en su forma de crecimiento sin la aplicación de glifosato. La altura de la planta difiere entre especies y en este trabajo fue mayor en *E. colona* (EC) que en *E. crus-galli* (ECG) (Tabla 3.4). Los valores de altura de planta estuvieron dentro de los relevados por Flora Argentina (Zuloaga et al. 2003), pero más bajos que los obtenidos por Masum et al. (2022) en Bangladesh y en China por Xuli Hu et al. (2023), particularmente en ECG, pero similares a las poblaciones medidas por Chauhan (2022) y Mahboobeh Mollaee et al, (2020) en Queensland, Australia en EC, y más altas que las obtenidas por Rui Liu (2022) en Texas para EC. En este experimento el número de hojas (medidas en el tallo principal) fue mayor en EC que en ECG (Tabla 3.4) a diferencia de Xuli Hu et al (2023) que encontró valores similares entre las dos especies al igual que Bagavathiannan et al 2011 en poblaciones de ECG resistentes y susceptibles a propanil y clomazone en Arkansas.

El rendimiento de semillas de *Echinochloa* está determinado principalmente por el número efectivo de panojas, el número de granos por panoja y el peso del grano. El número de granos por panoja es un factor clave en la formación de granos (Xuli Hu et al., 2023). En este estudio, la longitud de la panoja fue mayor en EC que en ECG (Tabla 3.5), lo cual difiere de los hallazgos de Rui Liu (2022), quien reportó una mayor longitud de panícula en ECG en comparación con EC. Por otro lado, EC presentó valores similares de semillas por planta respecto de ECG, en contraste con lo encontrado por

Xuli Hu et al. (2023), quienes observaron que EC presentó un número más bajo de semillas por planta en comparación con ECG (Tabla 3.5) y otras especies de *Echinochloa*. Sin embargo, el número de granos por panoja fue menor en EC que en ECG (Tabla 3.5). En relación al peso de mil semillas, EC presentó valores menores que ECG (Tabla 3.5), similar a lo encontrado por Xuli Hu et al. (2023).

La floración de las plantas presentó diferencias entre especies, EC floreció en promedio 31,4 días antes que la de ECG (Tabla 3.5), distinto de los encontrados por Rui Liu (2022) que observó valores similares en los días de floración de las dos especies estudiadas. En otro estudio, Xuli Hu (2023), encontró que ECG y otras especies de *Echinochloa* tuvieron períodos de crecimiento significativamente más largos que EC.

Evaluando las plantas aplicadas, en ECG todos los parámetros se redujeron cuando se les aplicó glifosato, en el caso de EC 7 de 9 parámetros fueron reducidos (Tabla 3.5). El número de panojas se redujo en un 30% (EC) y un 48% (ECG), valores similares a los encontrados por Asaduzzaman y colaboradores (2021) en poblaciones de EC en Australia. Los valores de producción de semillas se redujeron en un 61% en EC y en un 53% en ECG (Tabla 3.5).

Estas reducciones en la producción de semillas también fueron observadas por Vila-Aiub y colaboradores (2021) en una población de *E. indica* de Australia. Dellaferrera (2013) observó también una disminución en la producción de semillas en *Parietaria debilis* y *Petunia axilaris* cuando fueron aplicadas con glifosato, sin embargo, aunque el número de semillas sea menor, esto asegura la perpetuación de las poblaciones menos susceptibles. Además, este mismo autor determinó que la floración en *Petunia axilaris* evidenció un adelanto con la aplicación de este herbicida en comparación a las plantas sin aplicar.

Una ventana de floración prolongada aumenta las oportunidades para el cruzamiento entre diferentes poblaciones y especies de *Echinochloa* y puede tiene implicancias en la propagación de resistencia a herbicidas a través de flujo de genes mediados por polen. Aunque los miembros de *Echinochloa* son autógamos y predominantemente autopolinizante, el cruzamiento ocasional aún podría

suceder (Maun y Barrett 1986). Por último, el comportamiento de crecimiento y el potencial de producción de semillas en estas poblaciones no tuvieron correlación con el índice de resistencia al igual que lo encontrado por Mahajan y colaboradores (2020).

Sin embargo, aún ante estas modificaciones las plantas sobrevivientes de las dos especies fueron capaces de dejar descendencia y perpetuar así los genotipos menos susceptibles, por lo cual es importante el conocimiento de las mismas y la adopción de un manejo integrado de malezas donde intervengan técnicas de procesos (rotaciones, cultivos de cobertura, cultivares competitivos, espaciamiento de siembra, etc.) y tecnologías de insumos (uso de preemergentes y posemergentes, mezclas, momentos, utilización de adyuvantes, etc) a fin de reducir el número de semillas de estas de poblaciones resistentes.

Conclusión general

El presente estudio sobre las poblaciones de *Echinochloa*, las diferencias entre las especies y poblaciones y el efecto del glifosato sobre estas resulta en un aporte significativo a la comprensión de las diferencias entre las mismas debido a las variaciones en las características morfológicas y el comportamiento de resistencia a glifosato.

Este estudio determina como resistentes al glifosato las poblaciones: Ec04, Ec07 y Ec14 de *E. colona*, Ecg06, Ecg07, Ecg14 y Ecg16 de *E. crus-galli*, Eo02, Eo03, Eo04, Eo07 y Eo08 de *E. oryzoides* y Ech02 de *E. chacoensis*. Las DL_{50} más altas se presentaron en *E. oryzoides*, seguido de *E. crus-galli*. En cambio, *E. colona* y *E. chacoensis* presentan valores moderados a bajos del factor de resistencia (FR). Todas están poblaciones presentan supervivencias altas, las cuales aseguran su permanencia en el campo.

No se encontraron mutaciones en las posiciones 102 y 103, pero sí en la posición 106, la más común en *Echinochloa*. Las mutaciones encontradas en las poblaciones resistentes resultaron en un cambio en la posición Pro-106-Thr, además la población Ec4 presentó la mutación Pro-106-Gln y Pro-106-Glu, las cuales no habían sido reportadas anteriormente en ninguna especie a nivel mundial.

El nivel de ploidía para las poblaciones estudiadas de *E. colona* arrojó que un 60% de las mismas son tetraploides y un 40% son tetra y hexaploides, mientras que la población estudiada de *E. crus-galli* fue hexaploide.

Ambas especies presentan diferentes estrategias de crecimiento inicial, lo que determina que la aplicación de herbicida afecta en forma diferente a cada especie. Para *Echinochloa* colona a excepción del número de panojas y el peso de mil semillas, todos los parámetros estudiados se vieron reducidos cuando se aplicó el herbicida glifosato. Sin embargo, *Echinochloa* colona no modificó el tiempo de floración de las plantas aplicadas en relación a las no aplicadas.

Las poblaciones de *Echinochloa crus-galli* aplicados con glifosato no se diferenciaron estadísticamente de las poblaciones sin la aplicación de este herbicida en los parámetros de: largo de

panoja, número de panojas y peso de mil semillas. Para el caso de espigas por espiguillas, espigas por panoja y granos por planta si se presentaron diferencias entre las poblaciones aplicados y los no aplicados. Todos estos parámetros se redujeron cuando se aplicó el herbicida glifosato. En *Echinochloa crus-galli* si se produjo un adelanto de la floración cuando se aplicó el herbicida glifosato. Para las especies estudiadas el comportamiento de crecimiento y el potencial de producción de semillas en estas poblaciones no tuvieron correlación con el índice de resistencia.

Bibliografía

Abramoff, M.D., P.J. Magalhães, & S.J. Ram. 2004. Image processing with Image J. Biophotonics international 11(7): 36–42.

Acosta, J.M. 2012. Arquitectura y modelos de crecimiento de malezas tolerantes a glifosato. Caracterización de las posibles estrategias de escape a la acción herbicida.

Alarcón-Reverte, R., García, A., Urzúa, J., & Fischer, AJ (2013). Resistencia al glifosato en junglerice (*Echinochloa colona*) de California. Ciencia de malezas, 61 (1), 48-54.

Alarcón-Reverte, R., García, A., Watson, SB, Abdallah, I., Sabaté, S., Hernández, MJ, & Fischer, AJ (2015). Acción concertada de mutaciones en el sitio objetivo y alta actividad de EPSPS en arroz selvático (*Echinochloa colona*) resistente al glifosato de California. *Ciencia del manejo de plagas*, *71* (7), 996-1007.

Alcántara-de la Cruz, R., Rojano-Delgado, A.M., Giménez, M.J., Cruz-Hipólito, H.E., Domínguez-Valenzuela, J.A., Barro, F. and De Prado, R. 2016. First resistance mechanisms characterization in glyphosate-resistant *Leptochloa virgata*. Frontiers in Plant Science 7:1742.

Arregui, M.C., & E. Puricelli. 2008. Mecanismo de acción de plaguicidas. Dow AgroScience Argentina S.A.

Arregui, M.C., Puricelli, E., 2013. Mecanismos de acción de plaguicidas. UNR Editora.

Arregui, M.C., R. Scotta, & D. Sánchez. 2006. Improved weed control with broadleaved herbicides in glyphosate-tolerant soybean (Glycine max). Crop Protection 25(7): 653–656.

Asaduzzaman, M., Koetz, E., Wu, H. et al. Destino y plasticidad adaptativa de la población heterogénea resistente de *Echinochloa colona* en respuesta al glifosato. Informe científico 11, 14858 (2021). https://doi.org/10.1038/s41598-021-94370-7

Asíns MJ, Carretero JL, Del Busto A, Carbonell EA, De Barreda DG. Morphologic and Isozyme Variation in Barnyardgrass (*Echinochloa*) Weed Species. *Weed Technology*. 1999;13(2):209-215. doi:10.1017/S0890037X00041622

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman J.G., Smith J.A. & Struhl, K. (Eds.) (2003). Current protocols in molecular biology. USA: John Wiley & Sons Inc.

Baerson SR, Rodriguez DJ, Tran M, Feng YM, Biest NA and Dill GM, Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Plant Physiol 129:1265–1275 (2002).

Bagavathiannan MV, Norsworthy JK, Jha P, Smith K. ¿La resistencia al propanil o a clomazone altera el crecimiento y las capacidades competitivas de *Echinochloa crus-galli*? Ciencia de las malas hierbas. 2011;59(3):353-358. doi:10.1614/WS-D-10-00151.1

Bagavathiannan, MV, Norsworthy JK (2014) Pollen-mediated transfer of herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli*. Pest Manag Sci 70:1425–143

Baker, E.A. 1982. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. p. 140–161. In The plant cuticle. Cutler, D. F.; Alvin, K. L.; Price, C. E. (Eds.). London Academic Press, London.

Bariuan, J.V., K.N. Reddy, & G.D. Wills. 1999. Glyphosate Injury, Rainfastness, Absorption, and Translocation in Purple Nutsedge (*Cyperus rotundus*). Weed Technology 13(1): 112–119.

Barthélémy D, Sabatier SA & O. Pascal. 1995. Le développement architectural du noyer commun Juglans regia L. (Juglandaceae). Forêt Entreprise. 103:61–68.

Barthélémy, D. 2000. Análisis, Modelización y Simulación Informática de la Arquitectura de las Plantas: Aplicaciones Agronómicas y Paisajistas. p. 45–77. In Ciudades Arboladas para el siglo XXI. Ponencias del IV Congreso Isa Europeo y V Español de Arboricultura. La Pobla Llarga. Valencia., Valencia, España.

Barthélémy, D., & Y. Caraglio. 2007. Plant Architecture: A Dynamic, Multilevel and Comprehensive Approach to Plant Form, Structure and Ontogeny. Ann Bot 99(3): 375–407.

Barthlott, W., & C. Neinhuis. 1997. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. Planta 202(1): 1–8.

Barthlott, W., C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen, & H. Wilhelmi. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. Botanical Journal of the Linnean Society 126(3): 237–260.

Baucom RS & R. Mauricio. 2007. The evolution of novel herbicide tolerance in a noxious weed: the geographic mosaic of selection. Evolutionary Ecology. 22:85–101.

Bell, A.D. 1986. The simulation of branching patterns in modular organisms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 313: 143–159.

Belgrano, M.J.; Morrone, Osvaldo.; Zuloaga, F.O. Catálogo de Las Plantas Vasculares Del Cono Sur: (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay); Catalog of the vascular plants of the Southern Cone; Missouri Botanical Garden Press: St. Louis, Mo., U.S.A., 2008; ISBN 978-1-930723-76-4.

Belz, R.G., & N. Cedergreen. 2010. Parthenin hormesis in plants depends on growth conditions. Environmental and Experimental Botany 69(3): 293–301.

Bernard, J.H. 1990. Life history and vegetative reproduction in Carex. Canad. J. Bot. 68: 1441–1448.

Bonser, S. P. & Aarssen, L. W. 2009. Interpreting reproductive allometry: Individual strategies of allocation explain size-dependent reproduction in plant populations. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 11: 31-40.

Bostamam, Y., Malone, JM, Dolman, FC, Boutsalis, P. y Preston, C. (2012). Las poblaciones de raigrás rígido (*Lolium rigidum*) que contienen una mutación del sitio objetivo en EPSPS y una translocación de glifosato reducida son más resistentes al glifosato. Ciencia de malezas, 60 (3), 474-479.

Brain, P., Cousens, R., 1989. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research 29, 93–96. https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1989.tb00845.

Bromilow, R.H., & K. Chamberlain. 2000. The herbicide glyphosate and related molecules: physicochemical and structural factors determining their mobility in phloem. Pest Management Science 56(4): 368–373.

Brown, W. V. (1950). A Cytological Study of Some Texas Gramineae. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 77(2), 63–76. https://doi.org/10.2307/2482267.

Bukovac, M.J. 1976. Herbicide entry into plants. p. 335–364. In Herbicides: Physiology, Biochemistry, Ecology, Audus L.J. Academic Press, New York, New York.

Burgos, N. R., Tranel, P. J., Streibig, J. C., Davis, V. M., Shaner, D., Norsworthy, J. K., & Ritz, C. (2013). Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. Weed Science, 61(1), 4-20.

Burgos, N.R., 2015. Whole-Plant and Seed Bioassays for Resistance Confirmation. Weed Science 63, 152–165. https://doi.org/10.1614/WS-D-14-00019.1

Burke, I.C., C.H. Koger, K.N. Reddy, & J.W. Wilcut. 2007. Reduced Translocation Is the Cause of Antagonism of Glyphosate by MSMA in Browntop Millet (*Brachiaria ramosa*) and Palmer Amaranth (*Amaranthus palmerii*). Weed Technology 21(1): 166–170.

Busi, R, Beckie, HJ. ¿Are herbicide mixtures unaffected by resistance? A case study with Lolium rigidum. Weed Res. 2021; 61: 92– 99. https://doi.org/10.1111/wre.12453.

Cabanne, Gaudry, & Streibig. 1999. Influence of alkyl oleates on efficacy of phenmedipham applied as an acetone: water solution on Galium aparine. Weed Research 39(1): 57–67.

Cabrera, A. 1967. Flora de la provincia de Buenos Aires. Colección científica del INTA (III), Buenos Aires, Argentina.

Calabrese, E.J. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. Environ. Toxicol. Chem. 27(7): 1451–1474.

Calabrese, E.J., & R.B. Blain. 2011. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. Regulatory Toxicology and Pharmacology 61(1): 73–81.

Caseley, J.C 1996. Herbicidas. In: Labrada, R, J.C. Caseley y C. Parker, eds. Manejo de malezas para países en desarrollo. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal 120. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.

Cedergreen, N., & C.F. Olesen. 2010. Can glyphosate stimulate photosynthesis? Pesticide Biochemistry and Physiology 96(3): 140–148.

Cedergreen, N., J.C. Streibig, P. Kudsk, S.K. Mathiassen, & S.O. Duke. 2006. The Occurrence of Hormesis in Plants and Algae. Dose Response 5(2): 150–162.

Cerdeira, A.L., D.L.P. Gazziero, S.O. Duke, & M.B. Matallo. 2011. Agricultural Impacts of Glyphosate-Resistant Soybean Cultivation in South America. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(11): 5799–5807.

Chachalis, D., K.N. Reddy, C.D. Elmore, & M.L. Steele. 2001. Herbicide efficacy, leaf structure, and spray droplet contact angle among *Ipomoea* species and smallflower morningglory. Weed Science 49(5): 628–634.

Chin, D.V. Biology and Management of Barnyardgrass, Red Sprangletop and Weedy Rice. Weed Biology and Management 2001, 1, 37–41, doi:10.1046/j.1445-6664.2001.00009. x.

Chen, G., Chen, Y., Yu, H., Zhou, L. y Zhuang, X. (2022). "Requisitos de temperatura acumulada para el establecimiento de semillas de *Echinochloa crus-galli*: un estudio de caso con poblaciones recolectadas de campos de arroz ". Biología y manejo de malezas, 22 (2), 47 – 55. https://doi.org/10.1111/wbm.12248

Christoffoleti, P.J., A.J. Galli, S.J. Carvalho, M.S. Moreira, M. Nicolai, L.L. Foloni, B.A. Martins, & D.N. Ribeiro. 2008. Glyphosate sustainability in South American cropping systems. Pest Management Science 64(4): 422–427.

Collavo, A.; Sattin, M. 2012. Resistance to glyphosate in Lolium rigidum selected in Italian perennial crops: bioevaluation, management and molecular bases of target-site resistance. Weed Research (Oxford) 52: 16 - 24.

Córdova, D., J. Salaba, O. Martincová, & M. Cvikrová. 2009. Horseweed with Reduced Susceptibility to Glyphosate Found in the Czech Republic. J. Agric. Food Chem. 57(15): 6957–6961.

Costa, N.V., D. Martins, R.A. Rodella, & A.C.P. Rodrigues. 2011. Alterações anatômicas do limbo foliar de plantas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms submetidas à aplicação de herbicidas. Planta Daninha 29(1).

Cousens, R., & M. Mortimer. 1995. Dynamics of Weed Populations. Faint, Small Crease to Lower Corner. Cambridge University Press.

Cruz-Hipólito, H., A. Rojano-Delgado, J.A. Domínguez-Valenzuela, A. Heredia, M.D.L. Castro, & R. Prado. 2011. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. Plant and Soil 347(1-2): 221–230.

Cruz-Hipólito, H., M.D. Osuna, A. Heredia, J.P. Ruiz-Santaella, & R. De Prado. 2009. Non Target Mechanisms Involved in Glyphosate Tolerance Found in *Canavalia ensiformis* Plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(11): 4844-4848.

Culpepper, A.S. 2006. Glyphosate-Induced Weed Shifts. Weed Technology 20(2): 277–281.

Damalas, C.A.; Dhima, K.V.; Eleftherohorinos, I.G. Morphological and Physiological Variation among Species of the Genus *Echinochloa* in Northern Greece. Weed Sci. 2008, 56, 416–423. [CrossRef]

De Carvalho LB, Alves PLCA, González-Torralva F, Cruz-Hipólito HE, Rojano-Delgado AM, de Prado R et al., Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. J Agric Food Chem 60:615–622 (2012).

De Reffye, P., & F. Houllier. 1997. Modeling plant growth and architecture: some recent advances and applications to agronomy and forestry. Current Science 73: 984–992.

De Ruiter, H., A.J.M. Uffing, E. Meinen, & A. Prins. 1990. Influence of surfactants and plant species on leaf retention of spray solutions. Weed Science 38: 567–572.

Della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley, & G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 83(18): 6873–6877.

Dellaferrera IM, Panigo ES, Vegetti AC, and Perreta MG, Growth forms of *Parietaria debilis* (Urticaceae) and *Veronica persica* (Plantaginácea). Bol. Soc. Argentina. Bot. 49:361–372 (2014).

Dellaferrera, I. 2007. Variación en la forma de crecimiento de *Parietaria debilis* G. Forst. y *Veronica persica* Poir. producida por glifosato.

Dellaferrera, I. M. (2013). Mecanismos de tolerancia al glifosato en *Parietaria debilis* y *Petunia axillaris*.

Dellaferrera, I., J.M. Acosta, P. Capellino, & A. Amsler. 2009. Relevamiento de malezas en cultivos de soja en sistema de siembra directa con glifosato del departamento Las Colonias (provincia de Santa Fe). Revista FAVE - Ciencias Agrarias 8(1): 7–12.

Dellaferrera, I., N. Guarise, & A. Amsler. 2007. Relevamiento de malezas en cultivos de soja en sistema de siembra directa con glifosato del departamento San Justo (provincia de Santa Fe). Revista FAVE - Ciencias Agrarias 5/6: 15–25.

Délye, C., Duhoux, A., Pernin, F., Riggins, C. W., & Tranel, P. J. (2015). Molecular Mechanisms of Herbicide Resistance. Weed Science, 63(SP1), 91-115. https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00096.1

Dengler, N.G. 1994. The influence of light on Leaf Development. p. 100–136. In M. IQBAL (ed). Growth Patterns in Vascular Plants. Dioscorides Press.

Dimitri, M. J. 1979. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I - Descripción de las plantas cultivadas. Primer Volumen. Tercera Edición. Editorial ACME S.A.C.I. Buenos Aires.

Dinelli, I. Marotti, P. Catizone, A. Bonetti, J.M. Urbano, & J. Barnes. 2008. Physiological and molecular basis of glyphosate resistance in C. bonariensis (L.) Cronq. biotypes from Spain. Weed Research 48: 257.

Dolman F, Malone J, Boutsalis P, Storrie A and Preston C, Mechanisms of glyphosate resistance in *Echinochloa colona* from Australia. No. 286. Weed Science Society of America, Orlando, FL (2009).

Duke, S.O. 2011. Glyphosate Degradation in Glyphosate-Resistant and -Susceptible Crops and Weeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(11): 5835–5841.

Edelin, C. 1984. L'architecture monopodiale: l' exemple de quelques arbres d'Asie tropicale.

Eichert, T., & J. Burkhardt. 2001. Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. J. Exp. Bot. 52(357): 771–781.

Esau, K. 1987. Anatomía de las plantas con semilla. Hemisferio Sur.

Escarabel, L.; Locascio, A.; Furini, A.; Sattin, M.; Varotto, S. Caracterización de genes de ELA en la especie poliploide *Schoenoplectus mucronatus* e implicaciones para el manejo de la resistencia. *Manejo de plagas. Ciencia.* **2010**, *66*, 337–344

Evert FR. 2006. Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development. John Wiley & Sons.

Faccini, D. 2000. Los Cambios Tecnológicos y Las Nuevas Especies de Malezas en Soja. Agromensajes 4: 5–8.

Faccini, D., & E. Puricelli. 2006. Efecto de la temperatura y de la luz sobre la germinación de *Nicotiana longiflora* Cavaniles y *Oenothera indecora* Camb. Agriscientia 23(1): 15–21.

Faccini, D., and E. Puricelli. 2007. Eficacia de herbicidas según la dosis y el estado de crecimiento de malezas presentes en un suelo en barbecho. Agriscientia 24(1): 29–35.

Fahy, E., S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J.O. Wakelam, & E.A. Dennis. 2008. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. The Journal of Lipid Research 50 (Supplement): S9–S14.

Feng, P.C.C., M. Tran, T. Chiu, R. Douglas Sammons, G.R. Heck, & C.A. CaJacob. 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. Weed Science 52(4): 498–505.

Ferreira, E.A., S.O. Procópio, E.A.M. Silva, A.A. Silva, & R.J.N. Rufino. 2002a. Estudios anatómicos de hojas de plantas daninhas: I - *Nicandra physaloides, Solanum viarum, Solanum americanum* e *Raphanus raphanistrum*. Planta Daninha 20(2): 159–167.

Ferreira, E.A., S.O. Procópio, E.A.M. Silva, A.A. Silva, & R.J.N. Rufino. 2002b. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas: II - *Bidens pilosa, Emilia sonchifolia, Ageratum conyzoides* e *Sonchus asper*. Planta Daninha 20(3): 327–335.

Ferreira, E.A., S.O. Procópio, E.A.M. Silva, A.A. Silva, & R.J.N. Rufino. 2003. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil: IV - *Amaranthus deflexus, Amaranthus spinosus, Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. Planta Daninha 21(2): 263–271.

Ferreira, J.F. & K. N. Reddy. 2000. Absorption and translocation of glyphosate in *Erythroxylum coca* and *E. novogranatense*. Weed Sci. 48:193–199.

Fischer, A.; Valverde, B.E. Resistencia a herbicidas en malezas asociadas con arroz. In Producción eco-eficiente del arroz en A. Latina.; Cali, 2010; Vol. Tomo 1, pp. 447–484 ISBN 978-958-694-103-7.

Fournier, A. 1982. Cycle saisonnier de la biomasse et démographie des feuilles de quelques graminées dans les savanes guinéennes de Ouango-Fitini (Côte d´Ivoire).

Gaines TA, Duke SO, Morran S, Rigon CAG, Tranel PJ, Küpper A et al., Mechanisms of evolved herbicide resistance. J Biol Chem 295: 10307–10330 (2020)

Gaines, T.A., and Heap, I.M. Mutations in herbicide-resistant weeds to Inhibition of Enolpyruvyl Shikimate Phosphate Synthase. Online http://www.weedscience.com. 6/19/2024.

Gaines, TA, Cripps, A. y Powles, SB (2012). Resistencia evolucionada al glifosato en junglerice (*Echinochloa colona*) de la región tropical del río Ord en Australia. Tecnología de malezas, 26 (3), 480-484.

Galvani, J., M.A. Rizzardi, C.M. Carneiro, & M.A. Bianchi. 2012. Leaf anatomy of *Lolium multiflorum* sensitive and resistant to glyphosate. Planta Daninha 30(2): 407–413.

García, M.J., Palma-Bautista, C., Rojano-Delgado, A.M., Bracamonte, E., Portugal, J., Alcántara-de la Cruz, R., De Prado, R., 2019. The Triple Amino Acid Substitution TAP-IVS in the EPSPS Gene Confers High Glyphosate Resistance to the Superweed Amaranthus hybridus. IJMS 20, 2396. https://doi.org/10.3390/ijms20102396

García-Torres, L., & C. Fernández-Quintanilla. 1989. Fundamentos sobre las malas hierbas y herbicidas. Coedición Ministerios de Agricultura, pesca y alimentación Servicio de extensión agraria y Ediciones Mundi-Prensa, España.

Gauvrit, C. 2003. Glyphosate Response to Calcium, Ethoxylated Amine Surfactant, and Ammonium Sulfate 1. Weed technology 17(4): 799–804.

Gómez de Enciso, C. 2009. Mecanismos de resistencia de *Parthenium hysterophorus* L. a glifosato, Valle Del Cauca, Colombia.

González-Torralva, F., H. Cruz-Hipolito, F. Bastida, N. Mülleder, R.J. Smeda, & R. De Prado. 2010. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. Journal of agricultural and food chemistry 58(7): 4361–4366.

Goodwin, T.W., & E.I. Mercer. 1983. Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press.

Gougler, J.A., & D.R. Geiger. 1981. Uptake and distribution of N-phosphonomethyl-glycine in sugar beet plants. Plant physiology 68:668–672.

Green, J.M. y Owen, M.D.K. 2010. Herbicide-resistant crops: Utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. Journal of agricultural and food chemistry 59(11): 5819–5829.

Gressel, J., y Levy, AA (2006). Agricultura: el selector de mutaciones improbables. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, *103* (33), 12215-12216.

Grosfeld J, Barthélémy D, Brion C. 1999. Architectural variations of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch (Araucariaceae) in its natural habitat. In: Kurmann MH, Hemsley AR eds. The evolution of plant architecture. Kew: Royal Botanic Gardens, 109–122.

Grosfeld, J. 2002. Análisis de la variabilidad morfológica y arquitectural de *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Serm. et Bizzarri, *Fitzroya cupressoides* (Molina) I.M. Johnst., *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin y *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae).

Grosso, M. 2001. Formas de crecimiento de especies herbáceas y arbustivas a lo largo de un gradiente altitudinal en el área serrana de la provincia de Córdoba. Tesis doctoral. UNRC. Río Cuarto, Argentina.

Gupta P, Salava H, Sreelakshmi Y, Sharma R. A Low-Cost High-Throughput Method for Plant Genomic DNA Isolation. Methods Mol Biol. 2020; 2072:1-7. doi: 10.1007/978-1-4939-9865-4_1. PMID: 31541433.

Hagemann, W. 1981. Wuchsformenuntersuchungen an Balkanischen Hypericum – sippen. Bot. Jahrb. Syst. 102: 239–254.

Han, H., Yu, Q., Widderick, MJ y Powles, SB (2016). Mutaciones EPSPS Pro-106 en el sitio objetivo: ¿suficientes para dotar de resistencia al glifosato en *Echinochloa colona* poliploide? *Ciencia del manejo de plagas*, *72* (2), 264-271.

Hank J. Mager, Bryan G. Young, John E. Preece, & Joseph L. Matthews. 2003. Weed behavior following loss of apical dominance. p. 58:83. In North Central Weed Science Proceedings. Champaign, IL. United States.

Haroun, S. A., & Alotaibi, M. K. (2015). Cytogenetic Studies on Two Wild Species of Genus *Echinochloa* P. Beauv. From Saudi Arabia. CYTOLOGIA, 80(1), 117-123. https://doi.org/10.1508/cytologia.80.117

Hatterman-Valenti, H., A. Pitty, & M. Owen. 2011. Environmental Effects on Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Epicuticular Wax Deposition and Herbicide Absorption. Weed Science 59(1): 14–21.

Heap, I. (2016). Confirming Resistance. Herbicide Resistance Action Committee. (HRAC) https://hracglobal.com/herbicide-resistance/confirming-resistance

Heap, I.M. 2022. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds Available online: weedscience.org.

Herbicide Resistant Plants Committee. 1998. “herbicide resistance” and herbicide tolerance" defined. Weed Technology 12(4): 789–790.

Herrmann, K.M., & L.M. Weaver. 1999. The shikimate pathway. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 473–503.

Hess, F. D., D. E. Bayer, and R. H. Falk. 1974. Herbicide dispersal patterns: I. As a function of leaf

surface. Weed Science. 22:394–401.

Hess, M., Barralis, G., Bleiholder, H., Buhr, L., Eggers, Th., Hack, H., Stauss, R., 1997. Use of the extended BBCH scale—general for the descriptions of the growth stages of mono; and dicotyledonous weed species. Weed Research 37, 433–441. https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.1997.d01-70.

Hilu, K. W. 1994. Evidence from RAPD markers in the evolution of *Echinochloa* millets (Poaceae). Plant Syst. Evol. 189:247–257.

Holm LG (1991) The World's Worst Weeds: Distribution and Biology. Krieger. 609 p

Huangfu, C., X. Song, & S. Qiang. 2009. Morphological disparities in the epidermal and anatomical features of the leaf among wild *Brassica juncea* populations. Weed Biology and Management 9(3): 234–242.

Hull, H., H. Morton, & J. Warrie. 1975. Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. The Botanical Review 41: 421–452.

Hull, H.M. 1970. Leaf structure is related to absorption of pesticides and other compounds. Residue Rev 31: 1–150.

Iwakami, S.; Hashimoto, M.; Matsushima, KI; Watanabe, H.; Hamamura, K.; Uchino, A. Resistencia a múltiples herbicidas en *Echinochloa crus-galli* var. formosensis, una especie de maleza alohexaploide, en arroz de semilla seca. *Pestoso. Bioquímica. Fisiol.* 2015, *119*, 1-8.

Iwakami, S.; Uchino, A.; Watanabe, H.; Yamasue, Y.; Inamura, T. Aislamiento y expresión de genes para acetolactato sintasa y acetil-CoA carboxilasa en *Echinochloa phyllopogon*, una especie de maleza poliploide. *Manejo de plagas. Ciencia.* 2012, *68*, 1098–1106

J. Scott McElroy, Nathan D. Hall, *Echinochloa colona* with Reported Resistance to Glyphosate Conferred by Aldo-Keto Reductase Also Contains a Pro-106-Thr EPSPS Target Site Mutation, *Plant Physiology*, Volume 183, Issue 2, June 2020, Pages 447–450, https://doi.org/10.1104/pp.20.00064

Jeannoda-Robinson, V. 1977. Contribution à l'étude de l'architecture des herbes. Université de Sciences et Techniques du Languedoc.

Kaundun SS, Dale RP, Zelaya IA, Dinelli G, Marotti I, McIndoe E et al., A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. J Agric Food Chem 59:3227–3233 (2011).

Kaundun SS, Zelaya IA, Dale RP, Lycett AJ, Carter P, Sharples KR et al., Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. Weed Sci 56:637–646 (2008).

Kim, S. C., & Moody, K. (1989). Germination and Seedling Development of Rice and *Echinochloa* Species. Korean Journal of Weed Science, 9(2), 108-115.

Kirkwood, R., & I. Mckay. 1994. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. Pesticide Science 42: 241–249.

Kitson, F. G., B. S. Larsen, and C. N. McEwen. 1996. Quantitative GC/MS. Pages 35–41 in Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. San Diego: Academic Press.

Klingaman, T.E.; Oliver, L.R. Existence of ecotypes among populations of entireleaf morningglory (Ipomoea hederacea var integriuscula). Weed Sci. 1996, 44, 540–54.

Klonowski, W. 1999. Non-linearity and Statistics-Implications of Hormesis on Dose-response Analysis. Biocybernetics and Biomedical Engineering 19(4): 41–56.

Knecht, G.N., & E.R. Orton. 1970. Stomate density in relation to winter hardiness of llex opaca Ait. Journal of the American Society of Horticultural Science 95: 341–5.

Knezevic, S.Z., J.C. Streibig, & C. Ritz. 2007. Utilizing R Software Package for Dose-Response Studies: The Concept and Data Analysis. Weed Technology 21(3): 840–848.

Kniss, A.R., J.D. Vassios, S.J. Nissen, and C. Ritz. 2011. Nonlinear Regression Analysis of Herbicide Absorption Studies. Weed Science 59(4): 601–610.

Koch K & H. Ensikat. 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. Micron 39:759–772.

Koger, C.H., & K.N. Reddy. 2005. Glyphosate efficacy, absorption, and translocation in pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*). Weed Science 53(3): 277–283.

Kraus, T.A., M.A. Grosso, S.C. Basconsuelo, C.A. Bianco, & R.N. Malpassi. 2007. Morphology and anatomy of shoot, root, and propagation systems in *Hoffmannseggia glauca*. Plant Biol (Stuttg) 9(6): 705–712.

Krumbiegel, A. 1998. Growth forms of annual vascular plants in central Europe. Nord. J. Bot. 18: 563–575.

Leguizamón, E., & G. Ferrari. 2005. Relevamiento de las comunidades de malezas en sistemas de producción de soja bajo siembra directa. Soja en siembra directa. Rev. Técnica AAPRESID: 124–127.

Leyser, O. 2009. The control of shoot branching: an example of plant information processing. Plant, Cell & Environment 32: 694-703

Liu, R., Singh, V., Abugho, S., Lin, HS, Zhou, XG y Bagavathiannan, M. (2022). Diversidad morfofisiológica y su asociación con la resistencia a herbicidas en poblaciones de *Echinochloa*. Ciencia de malezas, 70 (1), 26-35.

Lopez-Martinez, N.; Salva, A.P.; Finch, R.P.; Marshall, G.; De Prado, R. Molecular markers indicate intraspecific variation in the control of *Echinochloa* spp. with quinclorac. Weed Sci. 1999, 47, 310–315.

Lorraine-Colwill, D.., S. Powles, T. Hawkes, P. Hollinshead, S.A. Warner, & C. Preston. 2002. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pesticida Biochemistry and Physiology 74(2): 62–72.

Mahajan G, Kaur V, Thompson M, Chauhan BS (2020) Growth behavior and glyphosate resistance level in 10 populations of *Echinochloa colona* in Australia. PLoS ONE 15(1): e0221382. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221382.

Malpassi, R. 2004. Efecto de la aplicación de herbicidas sobre la morfología y anatomía de *Eleusine indica* (L.) Gaertner y Portulaca oleracea L.

Masood A, Ahsan A, Singh B. Biology, impact, and management of *Echinochloa colona* (L.) Link. Crop Prot. 2016; 83:56-66. Available from: https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.01.011

Maun MA, Barrett SCH (1986) The biology of Canadian weeds. *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Can J Plant Sci 66:739–759

Maun MA, Barrett SCH (1986) The biology of Canadian weeds: 77. *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Canadian Journal of Plant Science 66, 739–759. doi:10.4141/cjps86-093.

Mauricio, R. 2000. Natural selection and the joint evolution of tolerance and resistance as plant defenses. Evolutionary Ecology 14: 491-507.

McAllister, R.S., & L.C. Haderlie. 1985. Translocation of 14C-Glyphosate and 14CO2-labeled photoassimilates in Canada thistle (*Cirsium arvense*). Weed science v. 33:153-159.

McCullagh, P. (2019). *Modelos lineales generalizados*. Rutledge.

Mcwhorter, C.G., & C. Ouzts. 1994. Leaf Surface Morphology of Erythroxylum sp. and Droplet Spread. Weed science 42(1): 18–26.

Meusel H, Jäger E, and Mörchen G, The study of growth-forms of higher plants in relation to application of biocide. Vegetation Science and Environmental Protection 6:71–76 (1977).

Meusel, H. 1970. Wuchsformenriehen Mediterranean-mitteleuropäischer Angiosperm-Taxa. Feddes Repert 81: 41–59.

Michael, P.W. Taxonomy and Distribution of *Echinochloa* Species with Special Reference to Their Occurrence as Weeds of Rice. Weed control in rice. 1983, 291–306.

Monquero, P. 2003. Dinámica populacional e mecanismos de tolerancia de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. Tesis Doctoral. ESALQ – USP. Piracicaba, Brasil.

Monquero, P., P.J. Christoffoleti, J.A. Matas, & A. Heredia. 2004a. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus.* Planta Daninha 22(2): 203–210.

Monquero, P., P.J. Christoffoleti, M.D. Osuna, & R.A. De Prado. 2004b. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. Planta Daninha 22(3): 445–451.

Montenegro, G., & R. Ginocchio. 1992. Modular interpretation of architecture in shrub species. An. Acad. Bras. Ci. 65: 189 – 202.

Moore, K.J., & L.E. Moser. 1995. Quantifying developmental morphology of perennial grasses. Agronomy–Faculty Publications: 81.

Morran, S., Moretti, M. L., Brunharo, C. A., Fischer, A. J., & Hanson, B. D. (2018). Multiple target site resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) lines from California orchards. Pest management science, *74*(12), 2747-2753.

Mühlberg, H. 1970. Wuchsformen der Gattung Brachypodium (Poaceae). Feddes Repert 81: 119–130.

Nadeem Ahsan, S. M. Vahidy, A. A., & Ali, S. I. (1994). Chromosome Numbers and Incidence of Polyploidy in Panicoideae (Poaceae) from Pakistan. Annals of the Missouri Botanical Garden, 81(4), 775–783. https://doi.org/10.2307/2399922

Nakayama, Y., Umemoto, S., & Yamaguchi, H. (1999). Identification of polyploid groups in the genus *Echinochloa* by isozyme analysis.

Nandula VK, Ray JD, Ribeiro DN, Pan Z and Reddy KN, Glyphosate resistance in tall waterhemp (Amaranthus tuberculatus) from Mississippi is due to both altered target-site and nontarget-site mechanisms. Weed Sci 61:374–383 (2013).

Ng CH, Wickneswari R, Salmijah S, Teng YT and Ismail BS, Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. Weed Res 43:108–115 (2003).

Ng CH, Wickneswary R, Salmijah S, Teng YT and Ismail BS, Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L.) Gaertn. from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. Aust J Agric Res 55:407–414 (2004).

Nguyen, T. H. (2015). Evolution and spread of glyphosate resistant barnyard grass *Echinochloa colona* (L.) Link from Australia (Doctoral dissertation).

Nguyen, TH, Malone, JM, Boutsalis, P., Shirley, N. y Preston, C. (2016). La temperatura influye en el nivel de resistencia al glifosato en el pasto de corral (*Echinochloa colona*). Ciencia del manejo de plagas, *72* (5), 1031-1039.

Norsworthy, J.K., N.R. Burgos, & L.R. Oliver. 2001. Differences in Weed Tolerance to Glyphosate Involve Different Mechanisms. Weed Technology 15(4): 725–731.

Metzler, M. J.; Rampoldi, A.; Dellaferrera, I.; 2018. - En: Alerta rojo: *Echinochloa crus-galli* "Capín arroz", resistente a glifosato e imidazolinonas en la provincia de Entre Ríos. - Aapresid.

Mohler, CL, Liebman, M., y Staver, CP (2001). Mejora de la capacidad competitiva de los cultivos. *Gestión ecológica de malezas agrícolas*, 269-321.

Oreja, F.H., Moreno, N., Gundel, P.E., Vercellino, R.B., Pandolfo, C.E., Presotto, A. et al. (2024). Herbicide-resistant weeds from dryland agriculture in Argentina. Weed Research, 1–18. Available from: https://doi.org/10.1111/wre.12613

Owen, M. D. Weed species shifts in glyphosate-resistant crops. Pest Manage. Sci., v. 37, n. 4, p. 377-387, 2008.

Panigo, E.S., I.M. Dellaferrera, J.M. Acosta, A.G. Bender, J.I. Garetto, & M.G. Perreta. 2012. Glyphosate-induced structural variations in *Commelina erec*ta L. (Commelinaceae). Ecotoxicology and Environmental Safety 76(0): 135–142.

Panigo, E; Ramos, J.; Lucero, L; Perreta M. & A. Vegetti. 2011. The inflorescence in Commelinaceae. Flora. 206:294-299.

Panozzo, S., Mascanzoni, E., Scarabel, L., Milani, A., Dalazen, G., Merotto, A. J., Tranel, P. J., & Sattin, M. (2021). Target-Site Mutations and Expression of ALS Gene Copies Vary According to *Echinochloa* Species. Genes, 12(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/genes12111841.

Papa, J.C., & E. Puricelli. 2003. Control de Parietaria debilis con distintas dosis de herbicidas postemergentes. Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias IV. Available at http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev4/4.htm (verified 19 September 2007).

Papa, J.C., & L. Carrancio. 2005. Experiencias de control de ocucha. Para mejorar la producción. INTA EEA Oliveros 30: 153–154.

Papa, J.C., Tuesca, D., Bacigaluppo, D., 2010. Detección reciente en la provincia de Santa Fe de poblaciones de *Echinochloa* colona sospechosos de presentar resistencia a glifosato. Para mejorar la producción 45. Revista Cultivos Estivales. Inta Oliveros. 91–94.

Pautasso, J.M. Pérdida del Rendimiento Del Cultivo de Soja Por La Presencia de Rama Negra y Capín. Serie Extensión No 76. Actualización Técnica Soja. 2015, 87–91.

Pérez-Jones, A., K.-W. Park, N. Polge, J. Colquhoun, & C.A. Mallory-Smith. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in Lolium multiflorum. Planta 226(2): 395–404.

Perotti, VE, Larran, AS, Palmieri, VE, Martinatto, AK, Alvarez, CE, Tuesca, D., & Permingeat, HR (2019). Una nueva sustitución triple de aminoácidos en la EPSPS encontrada en una población de Amaranthus hybridus de alto nivel resistente al glifosato de Argentina. *Ciencia del manejo de plagas*, *75* (5), 1242-1251.

Perreta, M.G., & A.C. Vegetti. 2004. Estructura de las inflorescencias en especies de Melica (Meliceae, Pooideae, Poaceae). Darwiniana 42(1-4): 37–49.

Perreta, M.G., & A.C. Vegetti. 2005. Structural patterns in vascular plants: a review. Gayana Bot 62: 9–19.

Perreta, M; Ramos, J; Tivano J. C & A. Vegetti. 2011. Descriptive characters of growth form in Poaceae – an overview. Flora. 206:283-293.

Pfitscher, E.m; Barreto, I.L. Species of the genus *Echinochloa* (Gramineae) occurring in Rio Grande do Sul [Brazil]. Anuario Tecnico do Instituto de Pesquisas Zootecnicas Francisco Osorio 1976, 3, 245–289.

Picapietra, G.; Ponsa, J.C. Competencia y Manejo de Capín de Arroz En El Cultivo de Soja | Instituto

Nacional de Tecnología Agropecuaria. Informe Técnico INTA 2015.

Pline, WA, Wilcut, JW, Duke, SO, Edmisten, KL y Wells, R. (2002). Tolerancia y acumulación de ácido shikímico en respuesta a aplicaciones de glifosato en algodón resistente y no resistente al glifosato (*Gossypium hirsutum* L.). Revista de Química Agrícola y Alimentaria, 50 (3), 506-512.

Posit team (2024). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL: http://www.posit.co/

Powles SB and Yu Q, Evolution in action: plants resistant to herbicides. Annu Rev Plant Biol 61:317–347 (2010).

Preston C and Wakelin AM, Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. Pest Manag Sci 64:372–376 (2008).

Procópio, S.O., E.A. Ferreira, E.A.M. Silva, A.A. Silva, & R.J.N. Rufino. 2003a. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. V - *Leonurus sibiricus*, *Leonotis nepetaefolia*, *Plantago tomentosa* e *Sida glaziovii*. Planta Daninha 21: 403–411.

Procópio, S.O., E.A. Ferreira, E.A.M. Silva, A.A. Silva, R.J.N. Rufino, & J.B. Santos. 2003b. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil: III-*Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* e *Ipomoea cairica*. Planta Daninha 21: 1–9.

Puricelli, E., & D. Faccini. 2005. Control de *Eustachys retusa* y *Chloris barbata* con glifosato. Soja en siembra directa. Rev. Técnica AAPRESID: 122–123.

Puricelli, E., & D. Faccini. 2009. Efecto de la dosis de glifosato sobre la biomasa de malezas de barbecho al estado vegetativo y reproductivo. Planta Daninha 27: 303–307.

Puricelli, E., & J.C. Papa. 2006. Growth of *Parietaria debilis* in fallow and in undisturbed areas. Weed Research 46: 129–137.

R Development Core Team. 2010. A Language and Environment for Statistical. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria

Radosevich, S.R., J.S. Holt, & C.M. Ghersa. 2007. Ecology of Weeds and Invasive Plants: Relationship to Agriculture and Natural Resource Management.

Rainero, H. 2004. Avances en el control de malezas con tolerancia al glifosato. INTA- EEA Manfredi 12: 5–12.

Rao AN, Johnson DE, Sivaprasad B, Ladha JK, Mortimer AM (2007) Weed Management in Direct-Seeded Rice. Pages 153–255 in DL Sparks, ed. Advances in Agronomy. Academic Press

Rao, A.N.; Johnson, D.E.; Sivaprasad, B.; Ladha, J.K.; Mortimer, A.M. Weed Management in Direct-Seeded Rice. In Advances in Agronomy; Sparks, D.L., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2007; Volume 93, pp. 153–255.

Renvoize, S. A new species of *Echinochloa* (Poaceae) from Bolivia and Northern Argentina. Kurtziana 1995, 24, 161–163.

Ricotta, J.A., & J.B. Masiunas. 1992. Relationship of leaf surface characteristics to acifluorfen tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and related species. Weed science v. 40(3) p. 402-407Available at http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1993/US/US93167.xml;US9312764 (verified 24 November 2012).

Riederer, M., & L. Schreiber. 2001. Protecting Against Water Loss: Analysis of the Barrier Properties of Plant Cuticles. J. Exp. Bot. 52(363): 2023–2032.

Ritz, C. y Streibig, J.C. 2005. Bioassay analysis using R. Journal of Statistical Software 12(5): 1–22

Ritz, C., N. Cedergreen, J.E. Jensen, & J.C. Streibig. 2006. Relative potency in non-similar dose–response curves. Weed Science 54(3): 407–412.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose-Response Analysis Using R. PLoS ONE 10, e0146021. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021

Rodríguez, N. 2004. ¿Malezas nuevas? o viejas que se adaptan a los nuevos sistemas. Malezas con grado de tolerancia al glifosato. Bol. n° 1, INTA- EEA Manfredi 12: 1–5.

Rojano-Delgado, A.M., H. Cruz-Hipólito, R. De Prado, M.D. Luque de Castro, & A.R. Franco. 2012. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants. Phytochemistry 73: 34–41.

Rua, G. H. & F. Weberling. 1995. Growth form and inflorescence structure of *Paspalum l.* (Poaceae, Paniceae): a comparative morphological approach. B eitr. Biol. Pflanzen 69: 363-431

Salguero, J., Romano, Y., Álvarez Barrientos, A., Torralbo, P., Alarcón, M. V., Amaro Blanco, I., & Osuna Ruiz, M. D. (2015). Identificación de especies de" *Echinochloa*" spp. en arrozales de Extremadura mediante citometría de flujo. In XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología: La Malherbología y la transferencia tecnológica: Sevilla, 19-22 octubre 2015, 451-457. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.

Sammons RD and Gaines T, Glyphosate resistance: state of knowledge. Pest Manag Sci 70:1367–1377 (2014)

Sandberg, C.L., W.F. Meggitt, & D. Penner. 1980. Absorption, translocation and metabolism of 14C-glyphosate in several weed species. Weed Research 20(4): 195–200.

Santier, S., & A. Chamel. 1998. Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules through plant cuticles. Plant Physiology and Biochemistry 36(3): 225–231.

Satchivi, N.M., L.M. Wax, E.W. Stoller, & D.P. Briskin. 2000. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. Weed Science 48(6): 675–679.

Schonbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss JV, Amrhein N, Evans JN. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proc Natl Acad Sci USA 98:1376–1380 (2001).

Schönbrunn, E., S. Eschenburg, W.A. Shuttleworth, J.V. Schloss, N. Amrhein, J.N.S. Evans, & W. Kabsch. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. PNAS 98(4): 1376–1380.

Scursoni, J.A., & E.H. Satorre. 2010. Glyphosate management strategies, weed diversity and soybean yield in Argentina. Crop Protection 29(9): 957–962.

Scursoni, J.A., F. Forcella, & J. Gunsolus. 2007. Weed escapes and delayed weed emergence in glyphosate-resistant soybean. Crop Protection 26(3): 212–218.

Seefeldt, S.S., Jensen, J.E., Fuerst, E.P., 1995. Log-Logistic Analysis of Herbicide Dose-Response Relationships. Weed Technol. 9, 218–227.

Shaner, D.L. 2009. Role of Translocation as A Mechanism of Resistance to Glyphosate. Weed Science 57(1): 118–123.

Sharma, S.D., & M. Singh. 2007. Effects of two surfactant series on the absorption and translocation of 14C-glyphosate in sicklepod and prickly sida. Weed Biology and Management 7(4): 219–225.

Sikkema PH, Shropshire C, Hamill AS, Weaver SE, Cavers PB. Response of Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to Glyphosate Application Timing and Rate in Glyphosate-Resistant Corn (Zea mays). Weed Technology. 2005;19(4):830-837. doi:10.1614/WT-03-106R1.1

Singh, B.; Shaner, D. Rapid Determination of Glyphosate Injury to Plants and Identification of Glyphosate-Resistant Plants. *Weed Technology* 1998, *12*, 527–530.

SøBye, K.W., J.C. Streibig, & N. Cedergreen. 2011. Prediction of joint herbicide action by biomass and chlorophyll a fluorescence. Weed Research 51(1): 23–32.

Soreng, RJ, Peterson, PM, Davidse, G., Judziewicz, EJ, Zuloaga, FO, Filgueiras, TS y Morrone, O. (2003). Catálogo de pastos del nuevo mundo (Poaceae): IV. Subfamilia Pooideae. Contribuciones del Herbario Nacional de los Estados Unidos, 48, 1-730.

Soreng, R.J.; Peterson, P.M.; Romaschenko, K.; Davidse, G.; Teisher, J.K.; Clark, L.G.; Barberá, P.; Gillespie, L.J.; Zuloaga, F.O. A Worldwide Phylogenetic Classification of the Poaceae (Gramineae) II: An Update and a Comparison of Two 2015 Classifications: Phylogenetic Classification of the Grasses II. Jnl. Sytematics Evol. 2017, 55, 259–290.

Soriano, A. (1975). Gloria y miseria de las malezas de los cultivos.

Souza, R.T., E.D. Velini, & L.A. Palladini. 2007. Aspectos metodológicos para análise de depósitos de pulverizações pela determinação dos depósitos pontuais. Planta Daninha 25(1): 195–202.

Steinrücken, H.C., & N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94(4): 1207–1212.

Storkey, J. 2004. Modeling Seedling growth rates of 18 Temperate Arable Weeds Species as a Function of the Environment and Plant Traits. Annals of Botany 93: 681–689.

Streibig, J.C. 1988. Herbicide bioassay. Weed Research 28(6): 479–484.

Streibig, J.C., & P. Kudsk. 1993. Herbicide bioassays. CRC Press.

Talbert, R.E.; Burgos, N.R. History and Management of Herbicide-Resistant Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas Rice. Weed Technology 2007, 21, 324–331, doi:10.1614/WT-06-084.1.

Tardif, F.J., I. Rajcan, & M. Costea. 2006. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. New Phytol. 169(2): 251–264.

Thai HN, Malone J, Boutsalis P and Preston C, Glyphosate resistance in barnyard grass (*Echinochloa colona*), in Proceedings of the 18th Australasian Weeds Conference, 8–11 October, Melbourne, Australia, ed. by Eldershaw L. Weed Society of Victoria, Melbourne, Australia, pp. 237–240 (2012).

Tourn, G.M., D. Barthelemy, & J. Grosfeld. 1999. Una aproximación a la arquitectura vegetal: conceptos, objetivos y metodología. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 34(1-2): 85–99.

Traggiay, M., I. Dellaferrera, R. De Prado, & M.G. Perreta. 2009. Influencia de la edad de la planta y la temperatura de crecimiento de *Commelina erecta* sobre la cantidad y distribución de ceras epicuticulares y la tolerancia a glifosato. In Resúmenes del XIX Congreso ALAM. Lisbon, Portugal.

Travlos, I., Kanatas, P., Tsekoura, A., Gazoulis, I., Papastylianou, P., Kakabouki, I. y Antonopoulos, N. (2020). Eficacia de diferentes herbicidas en el control de *Echinochloa colona* (L.) Link y el primer caso de su resistencia al glifosato en Grecia. Agronomía, 10 (7), 1056.

Trejo, D., & M. Sobrero. 2012. Determinación de la eficacia de glifosato para el control de *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Stern & Poggenb. In actas do XXVIII CBCPD. Campogrande, Brasil.

Troiani HO, Steibel PE. 2008. Reconocimiento de Malezas Región Semiárida y Subhúmeda Pampeana. Colegio Ingenieros Agrónomos La Pampa – Facultad de Agronomía UNLPam. Edición en CD.

Tuesca, D., & L. Nisensohn. 2004. Inhibidores de las síntesis de aminoácidos. In Herbicidas: Características y fundamentos de su actividad. Vitta, J. UNR Editora, Rosario.

Tuffi Santos, L.D., B.F. Sant' Anna-Santos, R. Meira, F.A. Ferreira, R.A.S. Tiburcio, & A.F.L. Machado. 2009. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. Brazilian Journal of Biology 69(1): 129–136.

Tuffi Santos, L.D., R.M.S. Meira, I.C. Santos, & F.A. Ferreira. 2004. Efeito do glyphosate sobre a morfoanatomia das folhas e do caule de *Commelina diffusa* e *C. benghalensis*. Planta Daninha 22: 101–107.

Vázquez-García, J.G.; Rojano-Delgado, A.M.; Alcántara-de la Cruz, R.; Torra, J.; Dellaferrera, I.; Portugal, J.; De Prado, R. Distribution of Glyphosate-Resistance in *Echinochloa crus-galli* across Agriculture Areas in the Iberian Peninsula. Front. Plant Sci. 2021, 12, 33, doi:10.3389/fpls.2021.617040.

Vegetti, A. 1997. Sobre la estructura de la inflorescencia en especies de Anthistiriinae (Poaceae: Andropogoneae). On the inflorescence structure in Anthistiriinae species (Poaceae: Andropogoneae). Candollea 52: 87–103.

Velini, E.D., E. Alves, M.C. Godoy, D.K. Meschede, R.T. Souza, & S.O. Duke. 2008. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. Pest Management Science 64(4): 489–496.

Velini, E.D., M.L.B. Trindade, L.R.M. Barberis, & S.O. Duke. 2010. Growth Regulation and Other Secondary Effects of Herbicides. Weed Science 58(3): 351–354.

Vengris J, Kacperska-Palacz AE, Livingston RB (1966) Growth and development of barnyardgrass in Massachusetts. Weeds 14:299–301.

Vesk, P. & M. Westoby. 2004. Sprouting ability across diverse disturbances and vegetation types worldwide. J. Ecol. 92, 310–320.

Vila-Aiub MM, Han H, Yu Q, García F, Powles SB. Contrasting plant ecological benefits endowed by naturally occurring EPSPS resistance mutations under glyphosate selection. Evol Appl. 2021; 00:1–11. https://doi. org/10.1111/eva.1323

Vila-Aiub MM; Fischer A (2014). Resistencia a Herbicidas. En: Malezas e Invasoras de la Argentina: su identificación, biología y manejo. Editores: Osvaldo A. Fernández (UNSur), Eduardo S. Leguizamón (UNR) y Horacio Acciaresi (UNLa Plata). Editorial: Universidad Nacional del Sur, 964 pág., ISBN 978-987-1907-70-0.

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

Villalba, Andrea. (2009). Resistencia a herbicidas: Glifosato. *Ciencia, docencia y tecnología*, (39), 169-186. Recuperado en 12 de febrero de 2024, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162009000200010&lng=es&tlng=es.

Vitta, J.., D. Tuesca, & E. Puricelli. 2004. Widespread use of glyphosate tolerant soybean and weed community richness in Argentina. Agriculture, Ecosystems & Environment 103(3): 621–624.

Vitta, J.I., 2004. Herbicidas: características y fundamentos de su actividad. UNR Editora, Rosario, Argentina.

Vitta, J.I., D.E. Faccini, & L.A. Nisensohn. 2000. Control of *Amaranthus quitensis* in soybean crops in Argentina: an alternative to reduce herbicide use. Crop Protection 19(7): 511–513.

Wakelin, A.M., D.F. Lorraine-Colwill, & C. Preston. 2004. Glyphosate resistance in four different populations of Lolium rigidum is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. Weed Research 44(6): 453–459.

Walker, E.R., & L.R. Oliver. 2008. Translocation and Absorption of Glyphosate in Flowering Sicklepod (Senna obtusifolia). Weed Science 56(3): 338–343.

Wanamarta, G., & D. Penner. 1989. Foliar absorption of herbicides. Rev. Weed Sci 4: 215–231.

Wang, C.J., & Z.Q. Liu. 2007. Foliar uptake of pesticides—Present status and future challenge. Pesticide Biochemistry and Physiology 87(1): 1–8.

Wang, CY (2001). Efecto del glifosato sobre el metabolismo de los aminoácidos aromáticos en coquillo morado (*Cyperus rotundus*). Tecnología de malezas, 15 (4), 628-635.

Webster, T.M., M.G. Burton, A.S. Culpepper, J.T. Flanders, T.L. Grey, & A.C. York. 2006. Tropical spiderwort (*Commelina benghalensis*) control and emergence patterns in preemergence herbicide systems. J. Cotton Sci 10: 68–75.

Weed Technology Volumen 12, Número 4 (octubre-diciembre) 1998. p. 789.

Wen, M., C. Buschhaus, & R. Jetter. 2006. Nanotubules on plant surfaces: chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of Taxus baccata L. Phytochemistry 67: 1808–1817.

Westhoven, A.M., G.R. Kruger, C.K. Gerber, J.M. Stachler, M.M. Loux, & W.G. Johnson. 2008. Characterization of selected common lambsquarters (*Chenopodium album*) biotypes with tolerance to glyphosate. Weed Science 56(5): 685–691.

Wet, J. M. J., Rao, K. P., Mengesha, M. H., & Brink, D. E. (1983). Domestication of mawa millet (*Echinochloa colona*). Economic Botany, 37(3), 283-291.

WSSA Terminology Committee. 1998. Resistance and tolerance definitions. Weed Technology 12: 789.

Wu, D., Shen, E., Jiang, B., Feng, Y., Tang, W., Lao, S. & Ye, C. Y. (2022). Genomic insights into the evolution of *Echinochloa* species as weed and orphan crop. *Nature communications*, *13*(1), 689.

Xu, X., G.Q. Wang, S.L. Chen, C.Q. Fan, & B.H. Li. 2010. Confirmation of Flixweed (*Descurainia sophia*) Resistance to Tribenuron-Methyl Using Three Different Assay Methods. Weed Science 58(1): 56–60.

Yabuno, T. Biology of *Echinochloa* Species. In Proceedings of the Conference on Weed Control in Rice, Los Baños, Philippines, 31 August–4 September 1981; International Rice Research Institute: Los Baños, Philippines, 1983; pp. 307–318.

Yabuno, T. Biology of *Echinochloa* species. In Proceedings of the Conference on Weed Control in Rice, Los Baños, Philippines, 31 August–4 September 1983.

Yabuno, T. Estudio biosistemático del género *Echinochloa*. *Japón. J. Bot*, 1996. *19*, 277–323.

Yanniccari, M., Vázquez-García, J. G., Gigón, R., Palma-Bautista, C., Vila-Aiub, M., & De Prado, R. (2022). A novel EPSPS Pro-106-His mutation confers the first case of glyphosate resistance in Digitaria sanguinalis. *Pest Management Science*, *78*(7), 3135-3143.

Ye C.-Y., Wu D., Mao L., Jia L., Qiu J., Lao S., Chen M., Jiang B., Tang W., Peng Q., Pan L., Wang L., Feng X., Guo L., Zhang C., Kellogg E.A., Olsen K.M., Bai L., and Fan L. (2020). The genomes of the allohexaploid *Echinochloa crus-galli* and its progenitors provide insights into polyploidization-driven adaptation. Mol. Plant. doi: https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.07.001.

Yu Q, Cairns A and Powles SB, Glyphosate, paraquat, and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a Lolium rigidum biotype. Planta 225:499–513 (2007).

Yu Q, Han H and Powles SB, Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. Pest Manag Sci 64:1229–1236 (2008).

Yu Q., Jalaludin A., Han H., Chen M., Sammons D., Powles S., Evolution of a Double Amino Acid Substitution in the 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase in *Eleusine indica* Conferring High-

Level Glyphosate Resistance, *Plant Physiology*, Volume 167, Issue 4, April 2015, Pages 1440–1447, https://doi.org/10.1104/pp.15.00146.

Yu, Q.; Powles, SB Resistencia a los herbicidas inhibidores de AHAS: conocimientos actuales. *Manejo de plagas. Ciencia.* 2014, *70*, 1340–1350

Zuloaga, F. O., Morrone, O., Davidse, G., Filgueiras, T. S., Peterson, P. M., Soreng, R. J. & Judziewicz, E. J. Año: 2003 Pfitscher, E. M. Barreto, I. L. Año: 1976 De Marco, N. Año: 2009

Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Davidse, G.; Filgueiras, T.S.; Peterson, P.M.; Soreng, R.J.; Judziewicz, E.J. Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae. Catalogue of new world grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae. 2003.