

Departamento de Ciencias

Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology

Tesis Doctoral

FISIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA MÚLTIPLE A LOS HERBICIDAS GLIFOSATO E INHIBIDORES DE ACETOLACTATO SINTASA EN *AMARANTHUS PALMERI*

Memoria presentada por Dña. María Barco Antoñanzas para optar al grado de Doctor con Mención Internacional

Pamplona, noviembre de 2021





https://doi.org/10.48035/Tesis/2454/42275







AUTORIZACIÓN DIRECTORAS DE TESIS

Las Dras. Mercedes Royuela Hernando, Catedrática de Unicersidad y Ana Zabalza Aznárez, Profesora Titular de Universidad, del Área de Fisiología Vegetal, del Departamento de Ciencias de la Universidad Pública de Navarra.

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado "Fisiología de la resistencia múltiple a los herbicidas glifosato e inhibidores de acetolactato sintasa en Amaranthus palmeri" que presenta Dña. María Barco Antoñanzas para optar al titulo de Doctor Internacional por la Universidad Pública de Navarra, ha sido desarrollado bajo su dirección en el grupo de Fisiología Vegetal y Agrobiología en el Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology (IMAB) de la Universidad Pública de Navarra y reúne todos los requisitos necesarios para su defensa.

Revisado el trabajo, consideran que reúne las condiciones necesarias para su defensa, por lo que autorizan la presentación de la citada Tesis Doctoral.

En Pamplona, 9 noviembre de 2021

Fdo: Mercedes Royuela Hernando

Fdo: Ana Zabalza Aznárez





Parte de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral están recogidos en la siguiente publicación y en las siguientes comunicaciones a Congresos nacionales e internacionales:

Barco-Antoñanzas M, Gil Monreal M, Vicente-Eceiza M, Royuela M and Zabalza A. "Primary metabolism in an *Amaranthus palmeri* population with multiple resistance to glyphosate and ALS-inhibiting herbicides". Plant Science (2021). Publicación aceptada.

Barco-Antoñanzas M, Zulet González A, Fernández-Escalada M, Gil Monreal M, Royuela M and Zabalza A. "Physiological response of *Amaranthus palmeri* multiple resistant to glyphosate and ALS inhibitors". 18th European Weed Research Society Symposium. 17-21 de junio 2018, Ljubljana (Eslovenia). Presentación de póster.

Barco-Antoñanzas M, Zulet González A, Gil Monreal M, Royuela M and Zabalza A. "Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological response of susceptible and resistant populations to the herbicides glyphosate and pyrithiobac". XXIII Meeting of the Spanish Society of Plant Physiology/XVI Spanish Portuguese Congress of Plant Physiology. 26-28 de junio de 2019, Pamplona (España).

Barco-Antoñanzas M, Zulet González A, Gil Monreal M, Royuela M and Zabalza A. "Resistencias *Target site* en una población de *Amaranthus palmeri* con resistencia múltiple a Glifosato y a Piritiobac-Na ". XVII Congreso de la Sociedad Española de Malherbología. 8-10 de octubre de 2019, Vigo (España). Presentación de póster.

Barco-Antoñanzas M, Gil Monreal M, Vicente-Eceiza M, Royuela M and Zabalza A. "Molecular and biochemical characterization of a multiple resistant population in *Amaranthus palmeri* to glyphosate and ALS-inhibiting herbicides". XXIV Meeting of the Spanish Society of Plant Physiology/XVII Spanish Portuguese Congress of Plant Physiology. 7-8 de julio de 2021 (Online). Presentación de póster y presentación oral en formato Flash talk.





Este trabajo se engloba en un proyecto de investigación subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (AGL2016-77531-R).

María Barco Antoñanzas fue beneficiaria de un contrato predoctoral de la Universidad Pública de Navarra (2017-2021) y recibió dos becas de movilidad, una correspondiente al programa Erasmus+ (2018) y otra procedente de la Escuela de Doctorado de Navarra (EDONA) (2019).





A mis abuelos

Miraremos las sillas vacías, y celebraremos con sus recuerdos, estén donde estén.





"Y la vida, que es movimiento"

Viva Belgrado





AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directoras por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y enseñarme tanto de este mundo que de primeras me daba mucho vértigo. Quien me iba a decir a mí, que una ambientóloga fuese a acabar investigando en el mundo de las malas hierbas y de los herbicidas, las vueltas que da la vida... Gracias a Mercedes por sus buenas ideas, por ser la voz de la experiencia y su buena disponibilidad en todo momento. A Ana, por tu cercanía y confianza tanto en lo profesional como en lo personal, por tu paciencia infinita con mis éxceles y cálculos al estilo jeroglífico (¡Eso sí que ha sido un verdadero aprendizaje en estos 4 años!), por ser un ejemplo de fuente inagotable de energía y por tener siempre un (a)brazo tendido para ayudarme. En definitiva, gracias a las dos por preocuparos y estar siempre con las puertas abiertas.

Gracias Gustavo por tu ayuda y "salvación" con el manejo de los diferentes equipos de laboratorio, y por tu infinita paciencia, siempre con una sonrisa, encontrando los compuestos químicos que muchas veces estaban prácticamente delante nuestro.

También me gustaría agradecer al centro que me acogió durante la estancia. I would like to thank Renier van der Hoorn from the Department of Plant Sciences in the University of Oxford, for giving me the opportunity to be part of your team for a while. It was a real pleasure working in your lab and learn so much about science. Moltes gracies María por enseñarme tanto, por tu tiempo, y por hacerme sentir como una más del lab, mucha suerte en el final y en las nuevas etapas que vienen [©]

Y como no, también quiero agradecer a mis compañeras del día a día en Oxford, a Carmen, a María y al resto del *"guetto"* español, me disteís mucha vida después de las largas jornadas en la Universidad. Nos vemos pronto.

Gracias a mis compañeras del grupo herbicidas: a Miriam por ser un referente a la hora de trabajar, enseñarme tanto del mundo molecular y por aguantar mis venturas y desventuras, siempre con buenos consejos. A Ainhoa por abrirme la primera puerta hacia esta bonita oportunidad en el mundo de la Malherbología, gracias por tu ayuda durante todo este tiempo. A Manu, por pasarme la "antorcha" con la caracterización de palmeri, gracias también por los consejos y la buena música compartida, ojalá en 2022 salgan todos esos planes. A Mikel,



gracias por ser tan buen compañero, por los ratos en el laboratorio escuchando ABBA o poperadas en bucle, mantén siempre esa vitalidad tan peculiar que te caracteriza, vas a ser un gran Doctor y sobre todo... ¡el Doctor que más sabe de pokemons del planeta! A Josu, por convertirte en tan poco tiempo en un buen amigo y compartir tantos buenos ratos (¡y quiches!), ojalá te animes a continuar con las malas hierbas ;)

Al resto de compañeros, a Libertad, gracias por ser más que una compañera de despacho, una hermana mayor, por tu sinceridad y por estar ahí cuando más lo he necesitado, las risas, los lloros, gracias con mayúsculas. A Andrés, mi compi de lado de despacho, gracias por los buenos momentos y todas las aventurillas vividas ¡desde Estella hasta Japón! Gracias también a todos los del grupo de Fisiología vegetal y del departamento, antes y ahora, pre y postdoc, a todos los profesores y técnicos, Esti, Berta, gracias por los consejos en el café, a David, por los buenos ratos y por ser el mejor embajador de Albacete hasta un 31 de diciembre en Tokyo, a Mikel, muchísimo ánimo, ya no te queda nada. A Maribel por su disponibilidad y ayuda en todo momento, Ximena por otros tantos ratos de desahogo y consejo mutuo. A Amaia S, Joseba, Ester, Pedro, Jordan, Saúl, Antonio, a todos muchas gracias por el buen ambiente dentro y fuera de estas paredes.

Y bueno, dar las gracias a mi familia se me queda corto en este papel, principalmente a mis padres por aguantar la montaña rusa que han sido estos cuatro años, por su infinito apoyo, siempre con la fe y confianza de que todo iba a salir bien. A mi tía Mari Tere, por creer en mí incluso más que yo misma. A mis abuelos, que, aunque no estén, estoy segura de que sobre todo Agustín y Pepe, estarían orgullosos de ver a su nieta asomando la cabecita en el mundo de la agricultura. Al resto, aún sin saber muy bien de que va todo este denso libro, "algo de plantitas", gracias por el apoyo recibido.

También quiero dar las gracias a otros pilares incondicionales durante este largo camino, Nacho, por la magia de conectar y la suerte de coincidir, mucho ánimo futuro Doctor, vas a llegar muy lejos. A Amaia, por los buenos consejos de amiga y de vida, es una suerte tenerte. Al resto de "Saurias", a "Logroñear" y a las "Jurrus", por los buenos momentos de desconexión. Gracias Miriam por la alegría compartida en la larga cuarentena y por ayudarme tanto durante estos últimos años en Pamplona. Y a todas aquellas personas que habéis estado al principio como un pilar robusto, no se si llegarás a leer los agradecimientos, pero gracias de corazón, siempre.



Durante estos largos y duros cuatro años, puedo decir que, en muchos momentos, sobre todo en aquellos en los que compaginar la tesis con el mundo asociativo parecía que iba a acabar conmigo, la música me ha hecho de trampolín a la motivación y a mirar hacia delante, no sólo a nivel mental, sino también ha conseguido acercarme a gente que, a día de hoy, es otra pata importante de mi mesa. GRACIAS.

•••

Y como dice Catorce en La ingravidez;

"Que el tiempo es ahora y el ahora me sienta tan bien"

...

Muchísimas gracias a todos.



LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos	CHST	Carbohidratos solubles totales
AAA	Aminoácidos aromáticos	СМ	Corismato mutasa
AAR	Aminoácidos ramificados	соон	Grupo carboxilo
ΔΑΤ	Aminoácidos libres totales	CPS	CarbamovI-fosfato sintasa
	Activity based protein profiling		Corismoto sintaco
ADPP	Activity-based protein proming	CS	Constituto sintasa
ACCasa	Acetil CoA carboxilasa	Ct value	Threshold cycle value/Umbral de ciclo
ADH	Alcohol deshidrogenasa	CysProt	Cisteína proteasas
ADN	Ácido desoxirribonucleico	D	Muestra digerida
ADNecc	ADN circular extracromosómico de replicación autónoma	DAHPS	3-desoxi-D-arabino- heptulosanato 7-fosfato sintasa
ADNg	ADN genómico	dCAPS	Digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas
AEP	Asparagina endopeptidasa	DHAD	Dihidroxiácido deshidratasa
AHAIR	Acetohidroxiácido isomero reductasa	DHD	3-dehidroquinato deshidratasa
AHAS	Acetohidroxiácido sintasa	DHQS	Dehidroquinato sintasa
AIA	Ácido indol acético	DHPS	Dihidropterato sintasa
AKR	Aldo-ceto reductasa	DMSO	Dimetil sulfóxido
ALS	Acetolactato sintasa	dNTP	Trifosfato de
			desoxirribonucleótido
AMPA	Ácido aminometilfosfónico	DOXP	1-deoxy-d-xilulosa 5-fosfato sintasa
AOX	Oxidasa alternativa	DQSD	Dímero bifuncional (DHD + SDH)
AS	Antranilato sintasa	DR	Dosis recomendada
BAA	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos	DTT	Ditiotreitol
BAR	Biosíntesis de aminoácidos ramificados	E64	Inhibidor N-(trans- epoxisuccinil)-L-leucina-4- guanidinobutilamida
BP	Pares de bases	EPPO	Organización europea y mediterránea para la protección vegetal
cDNA	ADN complementario	EPSP	5-enolpiruvilsiquimato 3- fosfato
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno	EPSPS	5-enolpiruvilsiquimato-3- fosfato sintasa

FAD	Flavín adenín dinucleótido	Р	Piritiobac
FISH	Fluorescence in situ hybridization	PAL	Photoaffinity probes or photoaffinity labelling
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	PAN	Plan de Acción Nacional
FP	Sonda Fluorofosfonato	PBS	Tampón fosfato salino
FR	Factor de Resistencia	PCD	Muerte celular programada
FRAC	Comité de acción de resistencia a fungicidas	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
G	Glifosato	PDS	Fitoeno desaturasa
GABA	Ácido γ-aminobutírico	PEP	Fosfoenolpiruvato
GOX	Glifosato oxidorreductasa	PF	Peso fresco
GP	Glifosato + Piritiobac	PLCPs	Papain-like cisteín-proteasas
GPX	Glutation peroxidasa	PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
GS	Glutamina sintetasa	POEA	Polioexietileno amina
GSH	Glutation reducido	PPO	Protoporfirinógeno oxidasa
GSSG	Glutation oxidado	РТВ	Ácidos pirimidinil benzoatos
GST	Glutation S-transferasa	PVDF	Difluoruro de polivinilideno
GT	Glicosil transferasas	PVPP	Polivinil polipirrolidona
HRAC	Comité de Acción contra la	P450	CitocromoP450
	Resistencia a Herbicidas		monooxigenasa
IARC	Agencia Internacional de	qPCR	Reacción en cadena de la
	Investigación del Cáncer	·	polimerasa cuantitativa
IBA	Inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos	RG	Resistente al glifosato
IBAA	Inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos	RM	Resistente múltiple
IBAR	Inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados	ROS	Especies de oxígeno reactivas
IMI	Imidazolinonas	RR	Resistente homociaoto
MEROPS	Base de datos de enzimas	RS	Resistente beterocianto
WEIGH 5	proteolíticas, sus sustratos e inhibidores	NS .	Resistence neterologoto
MMPs	Metaloproteasas	RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
MOPS	Ácido 3- (N-morfolino) propanosulfónico	S	Sensible
MT	Malonil transferasas	SCPLs	Serina carboxypeptidasas
MVRs	Factores de la familia	SCT	Sulfonilaminocarbonil
1011 03	mieloblastosis	501	triazolinonas
ND	Muestra no digerida	SDH	Siquimato deshidrogenasa
NTSR	Non-Target Site Resistance	SDS	Dodecilsulfato sódico
OMG	Organismos modificados genéticamente	SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico
OP	Compuestos organofosforados	SHs	Serine hydrolases/Serinas hidrolasas

SK	Siquimato kinasa
SU	Sulfonilureas
S3P	Siquimato-3-fosfato
TA	Transaminasa
TBS	Tris-buffer salino
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) fosfina
	clorhidrato
TD	Treonina desaminasa
TPP (o ThDP)	Difosfato de tiamina
TPs	Triazolopirimidinas
TSR	Target site resistance
TTBS	Tween Tris-buffer salino
VPEs	Enzimas de procesamiento
	vacuolar
WSSA	Sociedad Norteamericana de
	Malherbología
WT	Wild type/Tipo silvestre



RESUMEN

En la actualidad una de las principales limitaciones en el uso de herbicidas es la evolución de poblaciones resistentes de malas hierbas a herbicidas. Este proceso dinámico afecta tanto a la producción de los cultivos (por descenso de eficacia herbicida) como al medio ambiente (por el consecuente incremento en el uso de otros herbicidas para su control) y representa uno de los mayores retos en la malherbología actual. El incremento de poblaciones de malas hierbas resistentes se debe principalmente a la utilización de herbicidas como única estrategia (lejos del manejo integrado), incrementándose la presión de selección con el uso continuado de herbicidas con el mismo mecanismo de acción. Además, es de destacar la imparable aparición de poblaciones de malas hierbas con resistencia múltiple, que presentan más de un mecanismo de resistencia.

Amaranthus palmeri S. Watson, es una mala hierba nativa de EE.UU. muy competitiva y problemática para los cultivos que ha demostrado una gran capacidad de desarrollar resistencias múltiples a distintos mecanismos de acción herbicida. Uno de los tipos más habituales de resistencia múltiple en esta especie, es la resistencia a dos tipos de herbicidas inhibidores de biosíntesis de amino ácidos: glifosato e inhibidores de ALS (acetolactato sintasa). El glifosato es el herbicida más usado a nivel mundial y su diana es la inhibición del enzima 5-enol-piruvato-siquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (BAA). Los herbicidas inhibidores del enzima ALS, incluyen cinco familias químicas que tienen su diana en la vía de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BAR).

Este trabajo se plantea en el marco de la necesidad de profundizar en el conocimiento de la **fisiología de las plantas resistentes a herbicidas**, lo que requiere, no solo identificar y dilucidar las bases moleculares de las resistencias, sino también abordar el plano fisiológico, analizando la respuesta a nivel de metabolismo a la aplicación de estos herbicidas. La utilización de plantas que ya han desarrollado resistencia múltiple a estos herbicidas es una buena herramienta para desarrollar métodos para su detección, aportar claves para su manejo y prevenir su aparición. Además, el **establecimiento de la acción herbicida** en plantas resistentes permite comprender cómo y por qué son letales estos herbicidas (conocimiento del modo de acción herbicida), ayudando a que su utilización sea más racional y sostenible.



Se ha profundizado en la fisiología de una población de *A. palmeri* con resistencia múltiple (RM) a los herbicidas glifosato y piritiobac (inhibidor de ALS) y en los efectos fisiológicos de estos herbicidas. Para ello, se han caracterizado a nivel molecular los mecanismos de resistencia, y se ha abordado la acción herbicida estudiando la respuesta fisiológica a diferentes niveles tras el tratamiento con glifosato, piritiobac o la mezcla de ambos.

La población RM en estudio presentó dos mecanismos *target site resistance* (*TSR*): La resistencia a glifosato estaba basada en la amplificación génica de *EPSPS*, y la resistencia a inhibidores de ALS, se identificaron mutaciones puntuales en cinco posiciones del gen *ALS* (W574, S653, A122, A205 y G654). Algunas de estas mutaciones fueron simples, identificándose en un único locus, y otras fueron dobles, encontrándose individuos con mutaciones en dos locus distintos del gen *ALS*. La mutación en la posición W574L fue la más habitual, estando presente en todos los casos de mutación doble, y estuvo relacionada con los mayores niveles de resistencia en la actividad ALS. Se caracterizó el efecto de estos mecanismos de resistencia en la expresión de las vías de síntesis afectadas y en la actividad ALS.

Se estudió la fisiología de las plantas RM sin tratar, buscando caracteres complementarios (factores pleiotrópicos) a los mecanismos de resistencia. Se detectó una mayor expresión génica de los enzimas de las rutas de BAA y BAR, y en el contenido de AAR en las plantas RM frente a las plantas sensibles de referencia (S). Estos efectos están indirectamente relacionados con la modificación génica de la resistencia múltiple, pero muy localizados en las rutas dianas de los herbicidas a los que la población es resistente. No se detectaron caracteres adicionales en otros parámetros fisiológicos.

Los efectos fisiológicos característicos de la aplicación de glifosato e inhibidores de ALS (acumulación de carbohidratos y de aminoácidos) fueron evidentes en la población S tratada con estos herbicidas, mientras que no se detectaron en la población RM, con la excepción de la acumulación de almidón. La aplicación conjunta de los dos herbicidas provocó un efecto antagonista o como mucho un efecto aditivo para los parámetros fisiológicos evaluados, aspecto a tener en cuenta a la hora de aplicar mezclas de estos herbicidas, ya que sugiere que la aplicación de mezclas en campo a las dosis recomendadas podría no ser disminuida.

El perfil proteolítico de los individuos correspondientes a las poblaciones S, RM y a una población solo resistente a glifosato (RG) se analizó mediante la técnica

ABPP, para evaluar si las actividades de las proteasas vacuolares (VPEs), papainlike cisteín-proteasas (PLCPs) y proteasas de serina (SHs) eran diferentes entre las poblaciones y valorar si estaban afectadas por los tratamientos herbicida, complementando así el análisis del perfil de aminoácidos libres. El aumento en el contenido de aminoácidos detectado con los tratamientos herbicidas en las plantas sensibles, sería consecuencia de la inducción de VPEs y PLCPs detectada, mientras que en las poblaciones RG y RM tratadas con los herbicidas a los que son resistentes, no se detectó ni acumulación de aminoácidos ni inducción de actividades proteolíticas.

Por último, se abordó el metabolismo de glutation en la acción y en la resistencia a los herbicidas glifosato y piritiobac mediante la determinación del contenido de glutation (en todas sus formas) y en la actividad de las glutation S-transferasas (GSTs). La respuesta fisiológica de las plantas sensibles fue diferente según el herbicida aplicado, incrementando el contenido de glutation tras glifosato e induciendo la actividad GST tras la inhibición de ALS. Se detectó una mayor actividad enzimática GST potencial en las plantas sin tratar de las poblaciones RG y RM, que podría complementar su fisiología resistente como mecanismo *NTSR* (no relacionado con la diana, *non target site*), si bien su implicación en presencia de los herbicidas no es tan evidente.

Este trabajo proporciona nuevos detalles acerca de la caracterización y de la fisiología de la población RM y aporta información novedosa en cuanto a los efectos fisiológicos provocados en las plantas sensibles y resistentes por los herbicidas IBAR e IBAA. Estos resultados son, potencialmente, de interés práctico para el sector agrícola, por la importancia global de las malas hierbas resistentes a glifosato, herbicida más usado a nivel mundial y a inhibidores de ALS, grupo de herbicidas que incluye un gran número de materias activas. Todo ello, unido al incesante incremento de resistencias múltiples a ambos tipos de herbicidas, hace necesarios los estudios que profundicen en el conocimiento fisiológico de este tipo de resistencias para avanzar hacia un manejo más sostenible y duradero.



ABSTRACT

One of the main constraints in the current use of herbicides is the constant evolution of herbicide-resistant weed populations. This dynamic process affects both crop production (due to a decrease in herbicide efficacy) and the environment (due to the consequent increase in the use of other herbicides for its control) and represents one of the greatest challenges in current weed control. The increase in resistant weed populations is mainly due to the use of herbicides as the unique weed control strategy (far from integrated management) by exerting an enormous selection pressure with the continuous use of herbicides with the same mechanism of action. In addition, the unstoppable evolution of multiple resistant weed populations (with more than one resistance mechanism) is noteworthy.

Amaranthus palmeri S. Watson is a weed native to the USA, very competitive and problematic due to its ability to evolve multiple resistance to different herbicide mechanisms of action. One of the most common multiple resistances detected in this species is the resistance to two types of amino acid biosynthesis inhibiting-herbicides: glyphosate and ALS (acetolactate synthase) inhibitors. Glyphosate is the most widely used herbicide worldwide and its target is the inhibition of the enzyme 5-enol-pyruvate-acetolactate-3-phosphate synthase (EPSPS) in the biosynthesis pathway of aromatic amino acid. ALS inhibitors belong to five chemical families that target the branched-chain amino acid (BAR) biosynthesis pathway.

This work is performed within the framework of the need of obtaining new insights about **physiology of resistant weeds**. This involves not only identifying and elucidating the molecular bases of resistance, but also addressing the plant physiology, by analyzing the metabolic response to the herbicide application. The study of plants that have already developed multiple resistance to herbicides is a good tool to develop methods to detect them, improve their management and prevent their evolution. Furthermore, the full knowledge of the **herbicidal action on resistant plants** will unravel how and why these herbicides are lethal (knowledge of the mode of action of the herbicide), helping to make their use more rational and sustainable.

In this study, a full study of the physiology of an *A. palmeri* population with multiple resistance (RM) to the herbicides glyphosate and pyrithiobac (ALS

inhibitor), and of the physiological effects of these herbicides have been approached. For this purpose, the resistance molecular basis has been deciphered and the physiological response to different levels of each herbicide (and their mixture) has been approached to study the herbicide action.

The resistant population (RM) showed two mechanisms of target site resistance (TSR): resistance to glyphosate by *EPSPS* gene amplification and resistance to ALS inhibitors by point mutations at five positions of the *ALS* gene (W574, S653, A122, A205, and G654). Some of these mutations were single, being identified at a single locus, and others were double, finding individuals with mutations at two different loci of the *ALS* gene. The most common mutation was W574L as it was detected in all cases with double mutations, and it was related to the highest levels of resistance in ALS activity. It was evaluated the effect of these TSR mechanisms on the expression level of the targeted pathways and on ALS activity.

In order to detect additional physiological aspects of the resistant population (pleiotropic factors), the physiology of the untreated plants was evaluated. When the untreated RM plants were compared with the sensitive population of reference (S): a higher gene expression of the enzymes of the branched-chain and aromatic amino acid biosynthetic pathways and a higher branched-chain amino acid content were detected. These effects were indirectly related to gene modifications involved in multiple resistance, but much localized in the pathways containing the target of the herbicides to which the population is resistant to. No further additional characters were detected in other physiological parameters.

The characteristic physiological effects of glyphosate and ALS inhibitors (carbohydrate and amino acid accumulation) were evident in the S population, while they were not detected in the RM population, with the exception of the observed starch accumulation. The application of the two herbicides together caused an antagonistic effect or at most, an additive effect at the level physiological parameters evaluated. This aspect has to be considered when applying mixtures of these herbicides, as it suggests the recommended field rates of both herbicides have to be fully applied, and the application rates cannot be reduced.

The proteolytic profile of plants of the S, RM, and one glyphosate-resistant population (RG) was analyzed using the ABPP technique, to evaluate whether the activities of vacuolar proteases (VPEs), papain-like cysteine proteases



(PLCPs), and serine proteases (SHs) were different among the populations and whether they were affected by the herbicide treatments. This study was complementary to the profile of the free amino acids performed. The increase in free amino acid pool detected in S treated plants would be a consequence of the detected VPEs and PLCPs induction, while RG and RM plants treated with the herbicides to which they are resistant to did not show amino acid accumulation nor proteolytic activity induction.

Finally, the role of glutathione metabolism in the herbicide action of and resistance to the herbicides glyphosate and pyrithiobac was addressed by determining glutathione content (in all its forms) and the activity of glutathione S-transferases (GSTs). The response in the S population was different between the herbicides: glutathione content was increased after glyphosate and GST activity was induced after ALS inhibition. Higher basal GST enzyme activity was detected in untreated RG and RM plants, which could be an additional NTS (non target resistance) mechanism in their resistant weed physiology, although its specific role in treated plants is less evident.

In summary, this work provides new insights on the characterization and physiology of the RM population and unravels the physiological effects of glyphosate and ALS inhibitors on sensitive and resistant plants. These results are, potentially, of great practical and agricultural interest, due to the global significance of weed populations resistant to glyphosate (the most used herbicide worldwide) or to ALS-inhibitors (where a great number of active ingredients are included). All this, together with the continuous evolution of RM populations to both types of herbicides, makes essential to deepen our physiological knowledge of this type of resistances, moving forward a more sustainable and lasting weed management.





ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN3
1.1 MALAS HIERBAS Y HERBICIDAS
1.1.1 CONCEPTO DE MALA HIERBA
1.1.2 CONTROL DE LAS MALAS HIERBAS4
1.1.3 CONCEPTO DE HERBICIDA
1.1.4. CONTEXTO HISTÓRICO Y SITUACIÓN ACTUAL DE LOS HERBICIDAS
1.2 LAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS E INHIBIDORES DE LAS RUTAS
1.2.1 LA INHIBICIÓN DE LAS RUTAS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS Y RAMIFICADOS COMO DIANA HERBICIDA20
1.2.2 MODO DE ACCIÓN COMÚN DEL GLIFOSATO E INHIBIDORES DE ALS 40
1.3 PROTEASAS EN PLANTAS
1.3.1 PROTEASAS DE CISTEÍNA (CysProt)51
1.3.2 PROTEASAS DE SERINA HIDROLASA (SHs)
1.3.3 ACTIVITY-BASED PROTEIN PROFILING (ABPP) EN PLANTAS54
1.4 RESISTENCIAS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA A HERBICIDAS EN MALAS HIERBAS
1.4.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA NON-TARGET SITE (NTSR)61
1.4.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA <i>TARGET-SITE</i> (<i>TSR</i>)65
1.4.3 RESISTENCIAS, UN PROBLEMA GLOBAL65
1.4.4 RESISTENCIA A GLIFOSATO E INHIBIDORES DE ALS
1.5 AMARANTHUS PALMERI87
2. OBJETIVOS
3. MATERIALES Y MÉTODOS103
3.1 MATERIAL VEGETAL103
3.1.1 POBLACIÓN SENSIBLE103
3.1.2 POBLACIÓN RESISTENTE AL GLIFOSATO (RG)

	3.1.3 POBLACIÓN RESISTENTE MÚLTIPLE (RM)	103
	3.2 CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS Y TRATAMIENTOS	105
	3.2.1 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS	105
	3.2.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO	106
	3.2.3 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON HERBICIDAS	107
	3.3 MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	109
	3.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS	110
	3.4.1 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	110
	3.4.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ALS in vitro	120
	3.4.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GST	124
	3.4.4 MEDICIONES DEL CONTENIDO DE LOS ENZIMAS EPSPS Y DAF	IPS 125
		128
	3.4.6 ACTIVITY-BASED PROTEIN PROFILING (ABPP)	123
	3 5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	138
4	I. RESULTADOS	142
-	4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA EN LA POBLACIÓN CON RM	142
	4.1.1 EFECTOS VISUALES EN EL CRECIMIENTO Y LETALIDAD DE LAS DOSIS RECOMENDADAS DE G Y/O PIRITIOBAC	142
	4.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A GLIFOSATO	147
	4.1.3 CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A INHIBIDORES DE AL	S150
	4.2 EFECTO DE LOS HERBICIDAS GLIFOSATO Y/O PIRITIOBAC EN LAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS Y RAMIFICA	DOS
	4.2.1 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS (BAA)	163
	4.2.2 CONTENIDO DE LOS ENZIMAS EPSPS Y DAHPS	167
	4.2.3 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS (BAR)	169
	4.3 EFECTO DEL HERBICIDA GLIFOSATO Y/O PIRITIOBAC EN EL CONTE	INIDO

4.4 EFECTO DEL HERBICIDA GLIFOSATO Y/O PIRITIOBAC EN LOS
AMINOÁCIDOS LIBRES Y EN EL PERFIL PROTEOLÍTICO174
4.4.1. CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS175
4.4.2 ACTIVIDADES PROTEOLÍTICAS185
4.5 ANÁLISIS DE GLUTATION (GSH) Y GLUTATION S-TRANSFERASA (GSTs) 192
4.5.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GST193
4.5.2 DETERMINACIÓN DE GLUTATION195
5. DISCUSIÓN
5.1 LOS MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A G Y P EN LA POBLACIÓN RM201
A) CONFIRMACIÓN DE LA RESISTENCIA MÚLTIPLE A G Y P201
B) LA AMPLIFICACIÓN GÉNICA DE <i>EPSPS</i> COMO MECANISMO DE RESISTENCIA A G EN LA POBLACIÓN RM202
C) LAS MUTACIONES PUNTUALES DEL GEN <i>ALS</i> COMO MECANISMO DE RESISTENCIA A P EN LA POBLACIÓN RM204
5.2 IMPLICACIONES DE LA RESISTENCIA MÚLTIPLE EN LAS VÍAS DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS ALTERADAS POR LAS RESISTENCIAS Y EN LA FISIOLOGÍA DE LAS PLANTAS RESISTENTES
5.3 EFECTOS DE LOS HERBICIDAS G Y/O P EN LA POBLACIÓN RM Y S215
A) EN LA POBLACIÓN RM LOS EFECTOS DEL G ESTÁN MUY ATENUADOS215
B) EN LA POBLACIÓN RM LOS EFECTOS DEL P ESTÁN MENOS ATENUADOS QUE LOS EFECTOS DEL G218
C) LA APLICACIÓN CONJUNTA DE G Y P NO EXACERBÓ LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS PROVOCADOS POR SU APLICACIÓN INDIVIDUAL220
D) FALTA DE REGULACIÓN CRUZADA TRANSCRIPCIONAL ENTRE LA RUTA DE BAA Y LA RUTA DE BAR223
E) DIFERENTE EFECTO DE LOS HERBICIDAS EN EL PATRÓN PROTEOLÍTICO DE LAS POBLACIONES SENSIBLES Y RESISTENTES224
 F) METABOLISMO DEL GLUTATION EN RESPUESTA A LOS HERBICIDAS 227
6. CONCLUSIONES



7. BIBLIOGRAFÍA	242
8. ANEXOS	



INTRODUCCIÓN GENERAL





1. INTRODUCCIÓN

1.1 MALAS HIERBAS Y HERBICIDAS

1.1.1 CONCEPTO DE MALA HIERBA

Las malas hierbas se han considerado tradicionalmente, como plantas que crecen siempre o de forma predominante en situaciones marcadamente alteradas por el hombre y que resultan no deseables por él en un lugar y momento determinado (Pujadas Salvà & Bermejo, 1988). Este concepto de "mala hierba" tiene un origen antropocéntrico, enfocado principalmente en el sector agrícola, y algunas de estas malas hierbas son consideradas especies invasoras. El término invasora, hace referencia a especies exóticas con gran capacidad de expansión, que llegan a alterar los ecosistemas naturales y afectan significativamente sobre cultivos o aprovechamientos con un importante interés económico (Ramil-Rego & Vales, 2019)

Si analizamos las malas hierbas desde otro punto de vista, muchas de ellas cumplen una gran diversidad de servicios ecosistémicos (Moonen & Bàrberi, 2008), y tienen un valor agroecológico, limitando el daño de las plagas de insectos en los cultivos, al ser hábitats de enemigos naturales de estas plagas (Nentwig *et al.*, 1998), o incluso reduciendo la erosión del suelo (Weil, 1982). Por todo ello, y al margen de las consideraciones de carácter antrópico, algunos autores también han definido las malas hierbas desde una perspectiva ecológica como "plantas que son especialmente exitosas colonizando ambientes alterados, pero potencialmente productivos, y manteniendo su abundancia en condiciones de perturbación repetida" (Mohler, 2001). Este nuevo concepto se esfuerza por integrar las funciones agroecológicas de las malas hierbas y las estrategias de manejo y control para prevenir problemas. No sólo deben ser evaluadas por su potencial impacto en la calidad de los cultivos, sino también como componentes integrales de los agroecosistemas con los que interactúan (Roma-Burgos *et al.*, 2019).

Las comunidades de malas hierbas presentan unas características específicas en comparación con otros tipos de vegetación (Cousens & Mortimer, 1995; Booth *et al.*, 2003). Las malas hierbas son organismos altamente adaptables (Navas, 2012), tienen una gran plasticidad genética, lo que les permite desarrollar una elevada capacidad de crecer de forma competitiva por los nutrientes, la luz y el agua. Además, también son capaces de germinar en variados y numerosos



INTRODUCCIÓN

ambientes, produciendo una gran cantidad de semillas que presentan gran longevidad (Baker, 1974) y que se dispersan fácilmente, sobre todo en hábitats alterados por la actividad humana. Por todas estas características, se cree que las malas hierbas son las que mejor se adaptan a las condiciones locales y a los desafíos climáticos actuales, poniendo en peligro muchas veces la flora autóctona e interfiriendo en los rendimientos, producción y recolección de diferentes cultivos.

Sin embargo, no todas las malas hierbas poseen todas las características que se consideran indeseables. Adicionalmente a la capacidad de crecimiento en hábitats alterados, todas tienen al menos algunos de los siguientes rasgos: poseen un rápido crecimiento de las plántulas, elevada capacidad de reproducirse tempranamente, rápida maduración o cortos periodos de estado vegetativo, reproducción tanto vegetativa como por semilla, plasticidad ambiental (tolerando amplios rangos de condiciones edafoclimáticas), autocompatibilidad, polinización sin gran especificidad de polinizadores, pocos requerimientos de germinación, producción de semillas de tamaños similares a los cultivos en los que se suele desarrollar, altas producciones de semillas de fácil dispersión, sistemas radicales muy profundos y sistemas de desarrollo vegetativo con gran almacén de nutrientes capaces de generar nuevas plantas.

Es importante comprender el tipo de daños que pueden ocasionar las malas hierbas en la agricultura porque esto puede ayudar a determinar el tipo de acción apropiada contra las malas hierbas. Los efectos perjudiciales en cultivos se suelen agrupar en: A) competición con plantas del cultivo por nutrientes, agua y luz, siendo el elemento más limitante la principal razón de la competencia, B) descenso de la calidad del producto agrícola, ya sea el producto cosechado como la calidad de un pasto, C) manejo de agua en regadío, D) descenso del valor de la tierra y del cultivo elegido por presencia de malas hierbas y E) incremento de los costes de producción y procesado.

1.1.2 CONTROL DE LAS MALAS HIERBAS

Existen diversos sistemas de control de malas hierbas capaces de restringir su crecimiento y dispersión: sistemas de prevención, erradicación y control (reducción). Los sistemas de prevención mantienen zonas e incluso países libres de malas hierbas, evitando su introducción a través de medidas legislativas e higiénicas. Los sistemas de erradicación son medidas basadas en la eliminación



INTRODUCCIÓN

total de las malas hierbas, aunque solo es aconsejable cuando se lucha contra especies muy agresivas que intentan colonizar un área limitada. Los métodos de control procuran mantener las poblaciones de malas hierbas a niveles aceptables dentro del umbral económico de daños (en una estrategia de contención), o bien para reducir sus poblaciones desde un punto de vista a más largo plazo (en una estrategia de reducción). Los métodos de control pueden clasificarse como métodos químicos y no químicos.

En el grupo de los métodos de control no químicos se incluyen los agronómicos o también llamados culturales, mecánicos y biológicos. El manejo cultural de malas hierbas hace referencia a las prácticas agronómicas que utilizan la competitividad del cultivo para maximizar su crecimiento mientras que disminuye el crecimiento y competitividad de las malas hierbas asociadas. Las estrategias culturales incluyen tácticas como la rotación de cultivos, la mejora de competencia de cultivos mediante la selección de distintas variedades y la fecha de siembra (Beckie, 2006; O'Donovan *et al.*, 2007).

Los métodos mecánicos se basan principalmente en el laboreo y en métodos físicos como la siega, uso de coberturas inertes, acolchados y aplicación de técnicas térmicas como la solarización. Los métodos biológicos se sirven de un conjunto de agentes y procesos biológicos para eliminar las malas hierbas. El control biológico clásico, se basa en controlar malas hierbas invasoras no nativas con enemigos naturales originarios del ambiente nativo de las malas hierbas, demostrando ser una estrategia viable para el cultivo de malas hierbas en áreas sometidas a un manejo de baja intensidad (pastizales, bosques, etc.) (Vencill *et al.*, 2012), aunque su uso continúa muy limitado. El control biológico por técnica inundativa, también llamado estrategia de bioherbicidas, consiste en aplicar un organismo vivo (habitualmente esporas de un hongo) para lograr una rápida reducción de las poblaciones de malas hierbas. Este tipo de control ha demostrado tener éxito en condiciones puntuales, pero no con características muy rentables económicamente.

A pesar de tener un amplio abanico de opciones de control no químico, como métodos mecánicos, métodos culturales y métodos biológicos (Figura 1.1), una de las herramientas principales de control de estas plantas no deseadas, son los herbicidas, que representan el mayor insumo agroquímico mundial dentro de los plaguicidas, en la producción de cultivos (Edwards & Hannah, 2014). Las ventajas del control químico sobre los métodos no químicos se basan en la facilidad y rapidez en su aplicación en distintos estadios, permitiendo mantener



los cultivos libres de competencia en las primeras etapas del cultivo, lo que conlleva una optimización de recursos, con menores costes de mano de obra y tiempo. Aunque también tienen varias limitaciones como el riesgo de generación de resistencias, además de suponer un potencial peligro para el medio ambiente y la salud, si no se les da un uso correcto.



Figura 1.1. Principios generales de la gestión integrada de malas hierbas.

El método ideal de control y manejo, sería combinar varias de estas estrategias, en lo que se conoce como manejo integrado de malas hierbas (Figura 1.1). Esta gestión integrada puede ser definida con un enfoque holístico capaz de integrar diferentes métodos de control para brindar al cultivo una ventaja sobre estas malas hierbas. De esta forma se incrementa la sostenibilidad de los sistemas de cultivos y se reduce la presión de selección sobre la resistencia a herbicidas de las malas hierbas (Harker & O'Donovan, 2013).



1.1.3 CONCEPTO DE HERBICIDA

Se puede definir herbicida como aquel producto químico que mata organismos vegetales o inhibe total o parcialmente su crecimiento. Los herbicidas causan disrupciones en la fisiología o metabolismo de la planta durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo como para matarla o limitar severamente su crecimiento.

Los herbicidas pueden ser absorbidos vía radical, foliar o ambas; pueden afectar a todas las plantas (herbicidas totales) o por el contrario afectar solo a algunas especies (herbicidas selectivos), también pueden persistir en el medio ambiente o ser rápidamente degradados y pueden afectar de manera local (afectan solo a la zona de la planta en contacto con el herbicida) o de manera sistémica (los herbicidas son translocados por toda la planta y producen efectos tóxicos en zonas no tratadas directamente). Una vez que el herbicida entra en contacto con la célula vegetal, pueden producirse diversas reacciones que dependen de factores cómo: la especie vegetal, estado fenológico, tipo de herbicida aplicado, dosis, formulación, condiciones edafoclimáticas, etc.

1.1.3.1 MECANISMO DE ACCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS HERBICIDAS

El mecanismo de acción de un herbicida (también conocido como diana o sitio de acción) hace referencia al primer lugar de acción del mismo, al proceso primario, bioquímico o biofísico, que es bloqueado o destruido con la menor dosis de herbicida (Abell, 1996). La mayoría de las dianas objetivo de los herbicidas son enzimas involucrados en rutas metabólicas primarias o proteínas que llevan a cabo funciones fisiológicas esenciales (Dayan *et al.*, 2010).

Los herbicidas pueden clasificarse en función de numerosos criterios: estructura química, toxicidad, método de aplicación, comportamiento en el suelo... La clasificación que se basa en el mecanismo de acción del herbicida, proporciona gran información sobre el efecto fitotóxico que produce, es decir, sobre la interacción específica herbicida-planta y es una herramienta muy útil para la prevención de resistencias.

El Comité de Acción contra la Resistencia a Herbicidas (HRAC) y la Sociedad Norteamericana de Malherbología (WSSA) han desarrollado distintas clasificaciones de los herbicidas de acuerdo a su sitio de acción. La clasificación


desarrollada por WSSA asignaba números a los herbicidas con similar modo de acción, y el HRAC, que agrupaba a los herbicidas de la A a la Z en un total de 25 mecanismos de acción (Tabla 1.1). Ambos sistemas de clasificación se unificaron en 2020, ya que clasificar por letras suponía una serie de inconvenientes; el número de letras es limitado (existiendo 25 mecanismos de acción reconocidos en 2010, pero se esperan de 2 a 4 nuevos en los próximos 10 años), y que hay países que no utilizan el alfabeto latino. Además, el sistema numérico también estaba siendo usado por otros Comités como el Comité de acción de resistencia a fungicidas (FRAC). Por todo ello, la HRAC, mediante un grupo de trabajo decidió, unificarse con la WSSA, y actualizar la clasificación. También estableció una agrupación de orden superior en tres apartados principales; herbicidas que afectan al metabolismo celular, herbicidas que afectan a la división celular y al crecimiento y herbicidas relacionados con la activación de luz de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Figura 1. suplementaria).

En este estudio, se han utilizado herbicidas del grupo 2 (anteriormente de la familia B) y del grupo 9 (anteriormente de la familia G). Ambos afectan a la biosíntesis de aminoácidos en las plantas. Los que pertenecen al grupo 2, son herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (IBAR) o también llamados inhibidores del enzima acetolactato sintasa (ALS). El del grupo 9, inhibe el enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), enzima que participa en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (IBAA).

Tabla 1.1. Clasificación de los herbicidas según su mecanismo de acción utilizando el sistema de clasificación numérico WSSA & HRAC. En la tabla también aparece la antigua clasificación por letras del HRAC. (Modificado de HRAC, 2021; WSSA, 2021).

GRUPO WSSA & HRAC	Antigua clasificación HRAC	MECANISMO DE ACCIÓN
1	A	Inhibidores del enzima acetil CoA carboxilasa (ACCasa)
2	В	Inhibidores enzimáticos de la acetolactato sintasa (ALS)
3	K1	Inhibidores de la unión de microtúbulos
4	0	Auxinas sintéticas
5	C1, 2	Inhibidores del fotosistema II-Serina 264

8

6	C3	Inhibidores del fotosistema II-Histidina 215
9	G	Inhibidores de la EPSPS sintasa
10	Н	Inhibidores de la glutamina sintetasa (GS)
12	F1	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)
13	F4	Inhibidores de la 1-deoxy-d-xilulosa 5-fosfato sintasa (DOXP)
14	E	Inhibidores del protoporfirinógeno oxidasa (PPO)
15	К3	Inhibidores de VLCFAs
18	I	Inhibidores de la dihidropterato sintasa (DHP sintasa)
19	Р	Inhibidores del transporte de auxinas (AIA)
22	D	Desviación del flujo electrónico del fotosistema l
23	К2	Inhibidores de la organización de microtúbulos
24	М	Desacopladores
27	F2	Inhibición de la 4-hidroxifeinl-piruvato-dioxigenasa (4- HPPD)
29	L	Inhibidores de la síntesis de la pared celular (celulosa)
30	Q	Inhibición de la tioesterasa de ácidos grasos
31	R	Inhibición de serina treonina proteína fosfatasa
32	S	Inhibición de solanesil difosfato sintasa
33	Т	Inhibición de homogentisato solanesiltransferasa
34	F3	inhibición de la licopeno ciclasa
0	Z	Modo de acción desconocido

1.1.3.2 MODO DE ACCIÓN DE LOS HERBICIDAS

Una vez que el herbicida alcanza la diana, se desencadenan una serie de consecuencias fisiológicas antes de que ocurra la muerte de la planta, es lo que se conoce como modo de acción de un herbicida. Los mecanismos de acción de los herbicidas que se comercializan normalmente están bien descritos, pero no así su modo de acción, el proceso que origina la toxicidad en las plantas. De



manera general, se han propuesto tres razones que podrían explicar los procesos que conducen a la muerte de las plantas después de que los herbicidas aplicados alcancen su diana o mecanismo de acción. La primera, puede deberse a la falta de productos de la vía metabólica donde se encuentra el enzima objetivo como consecuencia de la inhibición de dicha vía. La segunda, puede ser por la acumulación de sustratos o de metabolitos en las etapas anteriores al enzima inhibido en la ruta metabólica. Y, por último, debido a reacciones secundarias provocadas después de la inhibición de la diana por parte del herbicida (Siehl, 1997).

Conocer qué procesos metabólicos generan finalmente la muerte de las plantas es fundamental para encontrar nuevos mecanismos de acción herbicida, y de esta forma evitar el desarrollo de resistencias entre las poblaciones de malas hierbas. Además, analizar esta respuesta de las plantas a los herbicidas puede servir de modelo para diseñar nuevas moléculas de origen natural con efecto herbicida. Todo ello, supondría además la posibilidad de aplicar estos inhibidores de una forma más eficaz y sostenible, disminuyendo a su vez, el impacto ambiental asociado a los usos agrícolas.

1.1.4. CONTEXTO HISTÓRICO Y SITUACIÓN ACTUAL DE LOS HERBICIDAS

El primer herbicida sintético fue descubierto a principios de la década de 1940 (Sterling, 1997) y su eficacia y selectividad causaron un cambio de paradigma en las prácticas de manejo de malas hierbas (Figura 1.2). Desde principios de los años 50 hasta mediados de los 80, se fueron descubriendo herbicidas con nuevos mecanismos de acción, a un ritmo relativamente constante (Dayan, 2019) (Figura 1.2). Cabe señalar como hito importante, la década de los 70 estuvo marcada por el descubrimiento del herbicida más utilizado históricamente, el glifosato, que permitió a su vez nuevas técnicas de cultivo como la siembra directa (Figura 1.2). Al mismo tiempo, en Estados Unidos (y posteriormente extendida por numerosos países) estaba ocurriendo la famosa "Revolución Verde" que consistió en utilizar variedades mejoradas de grano, fertilizantes y fitosanitarios, principalmente herbicidas, sobre la base de una producción extensiva de gran escala y muy mecanizada (Figura 1.2). En los años 80, se empezaron a sintetizar compuestos químicos pertenecientes a la familia de los herbicidas inhibidores del enzima acetolactato sintasa (ALS) (Figura 1.2).



En la década de los noventa se descubrió la primera biomolécula herbicida, el glufosinato y se desarrollaron los cultivos genéticamente modificados resistentes a herbicidas (Figura 1.2). A partir del año 2000, se fueron introduciendo nuevos herbicidas, pero con los mismos mecanismos de acción (Figura 1.2). Entre los años 1980 y 2009, Gerwick (2010) informó de 137 ingredientes activos nuevos de herbicidas, pero todos tenían el mismo mecanismo de acción de los herbicidas introducidos antes de 1990. La facilidad de gestión de los cultivos resistentes al glifosato, su rápida eficacia combinada con la simplicidad de operación, llevó a la industria agroquímica a invertir menos en el desarrollo de nuevos principios activos, en concreto en aquellos con nuevos mecanismos de acción (Larran, 2018).

Dada la creciente preocupación por la problemática ambiental y social en el contexto europeo, los organismos legislativos de la Unión Europea (UE) redujeron progresivamente las autorizaciones de materias activas herbicidas, basándose en características (eco) toxicológicas. La Directiva 91/414/CEE por la que se disponía de una lista única de sustancias activas autorizadas en los productos fitosanitarios, marcó un antes y un después, ya que no se renovaron 22 sustancias activas, 8 de ellas herbicidas. El reglamento (CE) Nº 1107/2009, da un paso más y garantiza un alto grado de protección de la salud humana y animal además del medio ambiente (Figura 1.2). Como resultado, el mercado de herbicidas europeo se redujo a tan sólo seis tipos de mecanismos de acción diferentes. En el caso de España, la legislación referente es el Real Decreto 1311/2012 y el Plan de Acción Nacional (PAN) (2018-2022) en el gue se establecen los objetivos para conseguir un uso sostenible de productos fitosanitarios, tal y como indica la Directiva de uso sostenible de productos fitosanitarios 128/2009 (Figura 1.2). Del total de las 316 materias activas reconocidas internacionalmente con propiedades herbicidas (Heap, 2021), sólo están autorizadas en España unas 79 aproximadamente, para su uso como herbicida (MAPA, 2021).

En el caso de los herbicidas inhibidores de ALS, aunque a nivel de la UE se han registrado numerosos ingredientes activos pertenecientes a las 6 clases químicas, en España solo está permitido el uso de algunos de ellos, por ejemplo, de la familia química de los piridiminil benzoatos, solo se puede utilizar el bispiribac sodio o en el caso de las imidazolinonas, sólo está permitido el uso del imazamox en los cultivos (Reglamento (CE) Nº 1107/2009).



Esta intensificación de las legislaciones medioambientales está incrementando los costes en el desarrollo y registro de nuevos herbicidas (Roma-Burgos *et al.*, 2019). Si se van autorizando cada vez menos materias activas en el mercado, los agricultores se enfrentan a una pérdida potencial de los herbicidas como herramientas eficaces y económicas, y como problemática añadida, siguen utilizando una misma sustancia activa de forma habitual, por lo que la presión de selección sobre las poblaciones de malas hierbas incrementa, con el consecuente riesgo de desarrollo de resistencias, contaminaciones ambientales y desequilibrios ecológicos.





ACTUALIDAD

Figura 1.2 Breve cronología sobre la historia del control químico de las malas hierbas.



1.1.4.1 CONTEXTO HISTÓRICO DEL HERBICIDA GLIFOSATO

Después de que se identificase la actividad herbicida del glifosato en 1970 (Franz *et al.*, 1997), se realizó su patente por parte de la empresa Monsanto, y a los cuatro años comenzó su comercialización como un producto formulado de uso final llamado Roundup®, un herbicida total. Antes de la llegada de los cultivos resistentes al glifosato, su función era similar a otros herbicidas totales como el paraquat y diquat, comercializados una década antes que el glifosato (Duke, 2018). Se usaba ampliamente como herbicida total en situaciones de pre-siembra y en sistemas de siembra directa. También en usos no agrícolas para controlar malas hierbas en carreteras, caminos, líneas de ferrocarril, etc. (Duke, 2018).

El glifosato no podía ser usado sobre cultivos, aunque se hicieron intentos de utilizarlo en cultivos en hileras evitando el contacto con el cultivo con diversos avances en la tecnología de aplicación. Sin embargo, su carácter sistémico y altamente fitotóxico impedía su uso sobre cultivos. La biotecnología aportó la solución: cultivos genéticamente modificados para resistir al glifosato (Duke, 2018). En 1996, el mismo año que se descubrió la primera mala hierba resistente al glifosato se desarrollaron y se introdujeron los cultivos modificados genéticamente resistentes al glifosato (Duke & Powles, 2008). La soja resistente al glifosato fue el primer cultivo lanzado y comercializado bajo la marca Roundup Ready en los EE.UU. (Dill, 2005). Hoy en día hay seis cultivos principales resistentes a glifosato: soja [Glycine max (L.) Merr.], Maíz (Zea mays L.), algodón (Gossypium hirsutum L.), canola (Brassica napa L.), alfalfa (Medicago sativa L.) y remolacha azucarera (Beta vulgaris L.) (Green, 2018). Estos cultivos Roundup Ready contienen un gen derivado de Agrobacterium sp. cepa CP4, que codifica un enzima tolerante al glifosato, denominado CP4 EPSP sintasa (Padgette et al., 1995; Barry et al., 1997) y que fue transferido al genoma de la planta y sobreexpresado confiriéndole así la característica de tolerancia al herbicida (Windels et al., 2001).

Estos avances en biotecnología permitieron el cambio en el patrón de uso de glifosato, aplicándolo en post-emergencia del cultivo como un herbicida selectivo, con el fin de eliminar todas las malas hierbas sin dañar el cultivo (Powles, 2008). Las ventajas fueron beneficiosas sobre todo para los agricultores, con efectos económicos significativos en la agricultura, desde el remplazo de los mercados de herbicidas anteriores (Nelson & Bullock, 2003; Gianessi, 2008), hasta el ahorro de costos para los agricultores en el manejo de



malas hierbas (Barfoot, 2008; Gianessi, 2008). La adopción de esta biotecnología de cultivos, también aportó beneficios ambientales, ya que contribuyó a una reducción en el nivel de emisiones de gases de efecto invernadero de la agricultura (Brookes & Barfoot, 2018). Este ahorro en las emisiones de dióxido de carbono fue debido a una reducción en el uso de combustible asociado a cambios en los sistemas de labranza (Brookes & Barfoot, 2018).

Desafortunadamente, la evolución de estos cultivos con esta tecnología también fue acompañada de riesgos y problemas, el principal de ellos; la aparición de malas hierbas resistentes, por presión masiva de selección (Carpenter & Gianessi, 2010). Año tras año, los productores abusaron de la utilización de glifosato en las grandes extensiones de monocultivo (Gaines *et al.*, 2010) y adoptaron rápidamente los cultivos resistentes al glifosato. Paralelamente, las compañías cambiaron sus presupuestos de búsqueda de nuevos herbicidas con nuevos mecanismos de acción, (Vila-Aiub *et al.*, 2012; Duke, 2018) por inversiones en el desarrollo de semillas transgénicas (Green, 2018) ya que económicamente era más rentable.

En el año 2000, Monsanto perdió la patente de glifosato, permitiendo así la entrada de productos genéricos, ya que docenas de empresas comenzaron a formular productos de glifosato (Figura 1.2). Como resultado, las superficies tratadas con glifosato ya fueran para usos agrícolas como no agrícolas, aumentaron rápidamente. Los agricultores de todo el mundo, pasaron de aplicar alrededor de 51,3 millones de kg de glifosato en 1995 (Benbrook, 2016) a aplicar 826 millones de kg de glifosato en 2014, un aumento de casi cien veces desde el año 1974 (Malkanthi *et al.*, 2019). Ningún pesticida en la historia de la agricultura había sido utilizado tan ampliamente. La situación en Europa difiere de estos datos generales puesto que no está autorizado el cultivo de OMG resistentes a glifosato, por lo que su uso es solamente como herbicida total.

A pesar de sus ventajas, el glifosato siempre ha estado en el punto de mira. En los años 80, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) empezó a estudiar su posible peligrosidad y potencial carcinogénico. En el año 1991, se consideró un herbicida con baja toxicidad aguda y crónica para mamíferos. En el 2002, cuando la UE concedió la renovación de la aprobación al glifosato, se evaluaron sus efectos sobre organismos y ecosistemas, pero los análisis fueron limitados a estudios de laboratorio con dosis muy altas y un pequeño número de especies, un enfoque que fue bastante criticado. Entre el año 2012 y 2015, los estados miembros, la EPA, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria



(EFSA) evaluaron más exhaustivamente los efectos de este herbicida. Después de esta evaluación, se publicó que: si se utiliza según las indicaciones de la etiqueta, "es improbable que el glifosato constituya un riesgo carcinógeno para los seres humanos" (EFSA, 2015), informe que fue contrario al elaborado ese mismo año por la IARC, que lo clasificó como "probable carcinógeno en seres humanos", empezando así un debate mundial, legal, político y científico entorno a sus usos y a sus riesgos (IARC, 2015) (Figura 1.2).



Imagen 1.1. Cartelería crítica en contra del uso del glifosato.

Bajo el contexto de este debate, y a pesar de que asociaciones en defensa del medio ambiente, colectivos ecologistas e iniciativas ciudadanas se posicionasen a favor de la prohibición del glifosato (Imagen 1.1), en el año 2017, tras una evaluación científica exhaustiva, la UE llegó a la conclusión de que no existe ningún vínculo entre esta sustancia y el cáncer en los humanos y se adoptó la renovación de su uso en la UE por cinco años más (Figura 1.2), por lo que a día de hoy se encuentra autorizado como materia activa en la UE, con todos los informes favorables. Sin embargo, en el año 2019, países como Francia, Italia, Bélgica, Dinamarca, República Checa y Portugal emitieron declaraciones sobre restricciones parciales en su uso, y Austria, se ha convertido en el primero en prohibir totalmente el uso de glifosato en todo el territorio nacional (Figura 1.2).

En España también se está procediendo a revisar y evaluar los productos fitosanitarios autorizados que contengan esta sustancia activa, emitiendo prohibiciones sobre su uso en el sector doméstico. En la actualidad, no existen razones científicas ni jurídicas que justifiquen la prohibición definitiva de glifosato en España, pero ciudades como Barcelona, Madrid y Zaragoza, entre otras, han decidido prohibirlo en el uso urbano y están probando otras



alternativas basadas en la agricultura ecológica. Dichas prohibiciones o restricciones han sido resultado de la presión ejercida por la ciudadanía y de los partidos políticos, actuando en nombre del principio de precaución de la salud de las personas y de los ecosistemas.

1.1.4.2 FUTURO DE LOS HERBICIDAS

Para el año 2050 se espera que la población humana alcance los 9 mil millones de habitantes, forzando la capacidad global de abastecer la enorme demanda de energía, agua dulce y alimentos que se pronostica (Figura 1.3) (Alexandratos & Bruinsma, 2012). Los niveles actuales de producción de cultivos no satisfacen la demanda prevista para alimentar a los niveles de población proyectados (Westwood *et al.*, 2018). Además, la carga de satisfacer estas necesidades se verá agravada por el cambio climático, la pérdida de recursos hídricos y la reducción de la tierra cultivable (Westwood *et al.*, 2018). Dentro de este contexto, las malas hierbas continuarán evolucionando y persistiendo, reduciendo rendimientos e incrementando los costes de la producción de cultivos. Si no se controlan, pueden producir pérdidas enormes en los cultivos. Por ello, el manejo de las malas hierbas es esencial para la producción agrícola y junto con el manejo de los paisajes y del medio ambiente, jugará un papel determinante para cumplir o no los requisitos futuros de producción de alimentos (Westwood *et al.*, 2018).

Esta problemática, ha puesto en relieve la utilidad y perspectivas futuras de los herbicidas, y las innovaciones agronómicas se presentan no sólo como una opción, sino más bien como una necesidad. A pesar de la cantidad de sitios potenciales como destino molecular herbicida que existen en las plantas como potencial objetivo de nuevos herbicidas, en las tres últimas décadas no se han descubierto mecanismos de acción nuevos (Figura 1.4) y aquellos en los que se está investigando actualmente, como la cinmetilina, que se une a la acil-ACP tioesterasa e inhibe la biosíntesis de ácidos grasos vegetales (Campe *et al.*, 2018; Dayan, 2019) o el azúcar 7-deoxy-sedoheptulosa (7dSh) que inhibe la 3-deshidroquinato sintasa, enzima clave de la ruta del siquimato (Dayan, 2019) se encuentran aún en revisión y están al menos a 5 años de su comercialización o incluso podrán no alcanzarla, ya que es un proceso muy lento, costoso y con pocas probabilidades de encontrar un herbicida tan exitoso como el glifosato (Green, 2018; Dayan, 2019).





Figura 1.3. Crecimiento de la población humana mundial y de la producción agrícola necesaria para satisfacer la creciente demanda. Estos datos y proyecciones están basados en estimaciones del Banco Mundial (Westwood *et al.*, 2018).



Figura 1.4. Fechas de introducción de nuevos sitios de acción herbicida (códigos WWSA) (Heap, 2021).

Al ritmo actual de evolución de resistencias en algunas especies de malas hierbas, un solo herbicida nuevo no sería suficiente y perdería rápidamente su utilidad si no se adoptase junto con prácticas integradas de manejo (Green, 2018). Integrar soluciones sostenibles, basadas en el conocimiento básico sobre biología, ecología, adaptación y evolución de las poblaciones de malas hierbas



en respuesta a la presión de selección y a los factores ambientales, unido a los avances en ciencia y a las nuevas investigaciones, (Fernández-Quintanilla *et al.*, 2008) supone un verdadero desafío actual y futuro.

1.2 LAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS E INHIBIDORES DE LAS RUTAS

1.2.1 LA INHIBICIÓN DE LAS RUTAS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS Y RAMIFICADOS COMO DIANA HERBICIDA

La biosíntesis de aminoácidos tiene gran relevancia en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los aminoácidos se diferencian entre sí por la estructura de su grupo "R" o cadena lateral unida a un carbono en el que también van un grupo carboxilo (COOH), un grupo amino (NH₂) y un hidrógeno. En los aminoácidos aromáticos: tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp), la cadena lateral es un compuesto aromático, grupo indol o anillo bencénico. En los aminoácidos de cadena ramificada, o ramificados: leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile), la cadena lateral es un compuesto alifático ramificado. Ambos tipos de aminoácidos son sintetizados por la propia planta en rutas metabólicas con actividades enzimáticas estrictamente controladas.

La mayoría de los herbicidas para el control de malas hierbas están basados en la inhibición proteica o enzimática de las plantas. Y hay tres grupos de herbicidas según su mecanismo de acción que afectan a la biosíntesis de aminoácidos de distintos grupos: inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (IBAR), inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (IBAA) e inhibidores de la biosíntesis de glutamina (Ray, 1989). En este trabajo, nos centraremos en comprender previamente las rutas BAA y BAR, y de esta forma entender los complejos mecanismos que se desencadenan en una planta después del tratamiento con herbicidas que afectan a la biosíntesis de aminoácidos.

En el caso de los inhibidores de la biosíntesis de glutamina, cabe resaltar que la glutamina sintetasa (GS) es la segunda proteína más abundante en las hojas de las plantas, donde desempeña un papel fundamental en la asimilación del nitrógeno de la planta al catalizar la condensación de glutamato y amoniaco para producir glutamina (Bernard & Habash, 2009). El glufosinato es un herbicida de contacto, de amplio espectro y no selectivo, encargado de inhibir este enzima de manera irreversible, desencadenando una acumulación de amoniaco y formación de especies reactivas de oxígeno, que provocan la inhibición de la fijación fotosintética de carbono y la disrupción de la síntesis de aminoácidos (Duke & Dayan, 2011; Dayan, 2019; Takano *et al.*, 2019; Takano



et al., 2020). El efecto del glufosinato es mucho más rápido que el observado en otros inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos como el glifosato (Duke & Powles, 2008) y en los inhibidores de ALS (Whitcomb, 1999), por lo que el agotamiento de aminoácidos no es la causa principal de la rápida lesión inducida por este herbicida (Padilla, 2012). Se han propuesto varias hipótesis que explican la relación entre la inhibición de la actividad GS y la reducción de la asimilación de carbono fotosintético en relación a los efectos rápidos producidos en las plantas. De manera reciente se ha demostrado que la rápida fitotoxicidad no se relaciona con la acumulación de amoníaco o la inhibición de la asimilación de carbono, sino que se debe a la acumulación masiva de ROS (en condiciones de alta intensidad de luz) que conduce a la muerte celular rápida observada en las plantas. Estos experimentos se realizaron en distintas especies de malas hierbas, como A. palmeri o Kochia scoparia (Takano et al., 2019, 2020). Sin embargo, es necesario seguir investigando estos efectos, ya que quedan muchos aspectos por dilucidar en la comprensión del mecanismo de generación de ROS en plantas tratadas con glufosinato.

<u>1.2.1.1 RUTA DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS (BAA)</u> <u>Y GLIFOSATO</u>

1.2.1.1.1 RUTA DEL SIQUIMATO

Los aminoácidos aromáticos son; tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp), y su biosíntesis ocurre en plantas, bacterias y hongos, pero no en mamíferos por lo que se les considera aminoácidos esenciales para su dieta; aunque en el caso de la Tyr, puede sintetizarse en los animales a partir de la Phe, catalizada por el enzima fenilalanina hidroxilasa (Fitzpatrick, 2003). En plantas estos aminoácidos no solamente son componentes de proteínas, sino que también son precursores de una amplia variedad de metabolitos secundarios. La Tyr es precursora de alcaloides, plastoquinonas, glucosinolatos, además de hormonas vegetales como las auxinas. El Trp es precursor de fitoalexinas, terpenoides y pigmentos y la Phe es un precursora común de compuestos fenólicos como flavonoides, ligninas, derivados del benceno, antocianinas y fenilpropanoides volátiles (Sato *et al.*, 2006; Vogt, 2010). Todos estos metabolitos secundarios juegan un papel crucial en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas, incluidas las respuestas al estrés biótico y abiótico (Tohge *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).



La ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos o también denominada ruta del siguimato, es de suma importancia en las plantas, va que, bajo condiciones normales, el flujo de carbono que pasa por la vía varía entre un 20 y un 50% del carbono incorporado por la planta (Tohge et al., 2013). Esta ruta, localizada en los plastidios, (Délye et al., 2013) se divide en dos partes diferenciadas (Figura 1.5): la primera, denominada ruta pre-corismato, va desde la combinación de fosfoenolpiruvato (PEP, que proviene de la glucólisis), y eritrosa 4-fosfato (que proviene de la ruta de las pentosas fosfato), hasta la formación de corismato, precursor común de los aminoácidos aromáticos (Tzin & Galili, 2010a). Esta síntesis del corismato está catalizada por 7 enzimas que actúan secuencialmente (Figura 1.5): 3-desoxi-D-arabino-heptulosanato 7fosfato sintasa (DAHPS), dehidroquinato sintasa (DHQS), 3-dehidroquinato deshidratasa (DHD), siquimato deshidrogenasa (SDH), siquimato kinasa (SK), 5enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) y corismato sintasa (CS). Los enzimas DHD y SDH forman un dímero bifuncional (DQSD) en las plantas (Maeda & Dudareva, 2012) y en este trabajo dicho complejo se trata como un complejo enzimático y se denominará cómo DQSD.

La segunda parte, denominada ruta del post-corismato, comprende las dos rutas terminales específicas que utilizan el corismato como sustrato hasta la biosíntesis de Tyr y Phe por un lado, catalizada en primer lugar por el enzima corismato mutasa (CM), y por otro lado la biosíntesis Trp, que empieza con la reacción catalizada por el enzima antranilato sintasa (AS) (Herrmann & Weaver, 1999; Maeda & Dudareva, 2012; Tohge *et al.*, 2013).





Figura 1.5. Esquema de la ruta biosintética de BAA, con los principales enzimas en la ruta precorismato: 3-desoxi-D-arabino-heptulosanato 7-fosfato sintasa (DAHPS), dehidroquinato sintasa (DHQS), 3-dehidroquinato deshidratasa (DHD), siquimato deshidrogenasa (SDH), estas dos últimas funcionan como el dímero DQSD, siquimato kinasa (SK), 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) y corismato sintasa (CS). Y los enzimas que pertenecen a la ruta post-corismato: corismato mutasa (CM), y el enzima antranilato sintasa (AS). En la figura también aparece el mecanismo de acción del glifosato en la ruta de BAA. El efecto del glifosato se traduce en la inhibición de la acción del EPSPS por competir con el PEP por el sitio de unión a la EPSPS.



1.2.1.1.2 ENZIMA EPSPS

El funcionamiento del enzima EPSPS (EC 2.5.1.19), es clave en la ruta del siquimato y primordial para la supervivencia de las plantas (Funke *et al.*, 2006). Este enzima cataliza el penúltimo paso de la ruta del siquimato (en la etapa precorismato), la formación de 5-enolpiruvilsiquimato 3-fosfato (EPSP). En esta reacción reversible, el enzima condensa S3P y PEP, para producir EPSP y fosfato inorgánico (Figura 1.5.). El carbono 3 de la unidad enolpiruvil formará parte de la cadena lateral de los aminoácidos aromáticos Phe y Tyr, y se elimina durante la biosíntesis de Trp. Cuando actúa el glifosato reemplaza competitivamente la molécula PEP, es decir, el sitio de unión para el glifosato se superpone estrechamente con el sitio de unión de PEP, y se combina más fuertemente al complejo EPSPS-S3P de lo que lo hace el PEP, formando un complejo muy estable, con una tasa de disociación muy lenta, que acaba bloqueando la actividad enzimática (Figura 1.5) (Schönbrunn *et al.*, 2001; Dill, 2005) e inhibiendo la biosíntesis de los tres aminoácidos aromáticos.

En función de la sensibilidad del enzima EPSPS al glifosato, los enzimas se han clasificado en dos tipos: EPSPS I sensibles al glifosato y EPSPS II enzimas que son relativamente resistentes al glifosato y están presentes en algunas bacterias. Todas las plantas tienen EPSP sintasas de la clase I, sensibles al glifosato (Maeda & Dudareva, 2012).

1.2.1.1.3 REGULACIÓN DE LA RUTA DEL SIQUIMATO

A pesar de que todos los enzimas involucrados en la ruta del siquimato y sus genes correspondientes han sido caracterizados e identificados en plantas (Figura 1.6.), la regulación de esta vía todavía sigue siendo poco conocida en plantas (Maeda & Dudareva, 2012) y llegar a su comprensión es fundamental para conocer las funciones biológicas de los aminoácidos aromáticos y otros aspectos como los orientados a conocer los relacionados con la resistencia al herbicida que la inhibe, el glifosato.

A continuación, se detallan los aspectos básicos de la regulación transcripcional y post-transcripcional de la ruta del siquimato:



A) REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

Existen diversas señales de desarrollo, estímulos ambientales, como infecciones o patógenos y otras perturbaciones y estreses, que inducen las vías de señalización y la expresión de muchos genes vegetales que codifican enzimas en la vía de BAA (Zhao & Last, 1996). Cuando los niveles de los enzimas biosintéticos no son lo suficiente como para mantener el flujo de carbono a través de la vía, en situaciones de respuesta a estos estreses, se estimula la expresión de los genes (Less & Galili, 2008). En estudios llevados a cabo con poblaciones de *Amaranthus palmeri* (Fernández-Escalada *et al.*, 2017; Zulet-González *et al.*, 2020), *Eleusine indica* (Baerson *et al.*, 2002) y en plantas de tabaco (Garg *et al.*, 2014) se observó que después de la aplicación de glifosato, se indujo la expresión de la mayoría de los genes de la ruta de BAA.

La expresión de los genes vegetales también está co-regulada directa o indirectamente por factores de transcripción (Figura 1.6) (Maeda & Dudareva, 2012). Algunos de estos factores que participan en la ruta del siguimato se han llegado a aislar y estudiar sus funciones. Gran parte de los resultados indican que la expresión de los genes que codifican los enzimas en esta ruta y vías posteriores, están reguladas de manera coordinada, a menudo por el mismo factor de transcripción (Maeda & Dudareva, 2012), aunque todavía queda mucho por investigar al respecto. En el caso de Arabidopsis thaliana L., los factores de transcripción pertenecientes a la familia MYB activan genes que codifican el enzima DAHPS (Bender & Fink, 1998) y el enzima AS (Gigolashvili et al., 2007). En Petunia hybrida, existen tres factores de transcripción que controlan los genes en esta ruta: epidermal patterning factor 1 (EPF1) (Takatsuji et al., 1992) y dos que forman parte de la familia mieloblastosis: MYB; ODORANT1 (ODO1) y EMISSION OF BENZENOIDS II (EOBII) (Verdonk, 2005; Spitzer-Rimon et al., 2010). Se ha demostrado que el factor EPF1 tiene un patrón de activación similar al patrón de activación de la EPSPS. Esta característica común, fue propuesta como evidencia de una regulación específica, en la que el factor EPF1 se une directamente al promotor EPSPS y controla su desarrollo (Takatsuji et al., 1992). Los factores ODO1 y EOBII regulan el enzima CM y la supresión de ambos factores de transcripción conduce a una expresión reducida de CM (Figura 1.6). Además, EOBII es capaz de unirse a ODO1 y activarlo (Van Moerkercke et al., 2011), pero si se suprime EOBII da lugar a una regulación negativa parcial (partial downregulation) de ODO1 (Figura 1.6)



(Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). Sin embargo, si se suprime el factor ODO1, la expresión de la DAHPS y EPSPS se ve afectada (Verdonk, 2005).

Además de los factores de transcripción, se han propuesto otros mecanismos de regulación transcripcional; los niveles reducidos de aminoácidos o de sus productos posteriores, actuarían de señal para aumentar la expresión de los genes de la ruta del siquimato y restaurar el flujo de carbono a través de la vía en las plantas (Maeda *et al.*, 2010).

A pesar de que se han descrito los efectos generales de algunos factores de transcripción, principalmente de aquellos que involucran enzimas en la ruta pre-corismato y se han estudiado algunos otros mecanismos relacionados, la información todavía es limitada, y se necesitan más investigaciones para comprender de manera integral los mecanismos moleculares subyacentes y las redes reguladoras transcripcionales de BAA en las plantas (Maeda & Dudareva, 2012).

B) REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL

Además de la regulación transcripcional, la BAA está regulada por complejos mecanismos post-transcripcionales que controlan el flujo de carbono a la ruta del siquimato y la distribución a cada uno de los aminoácidos aromáticos principalmente a través de la regulación en el punto de ramificación de la ruta para formar Trp por un lado y Phe y Tyr por otro (Maeda & Dudareva, 2012).

REGULACIÓN A LA ENTRADA DE LA RUTA

El enzima DAHPS cataliza la primera reacción de la ruta del siquimato, se encarga de condensar una molécula de PEP y una eritrosa 4-fosfato produciendo 3-desoxiarabino-heptulosanato 7-fosfato (DAHP) (Figura 1.5) (Shumilin *et al.*, 2003). El flujo de carbono dentro de la ruta del siquimato está específicamente regulado, en concreto por este enzima DAHPS, y a través de esta primera reacción, puede aumentar o disminuir esta entrada de carbono por toda la vía (Sato *et al.*, 2006; Maeda & Dudareva, 2012).

A nivel de microorganismos, la regulación de la expresión de este enzima está muy bien estudiada. En plantas, se ha descrito que la expresión del enzima DAHPS está regulada por diferentes mecanismos en respuesta a los niveles celulares de aminoácidos aromáticos, aunque la información que existe todavía es limitada. Parece que la actividad DAHPS no está inhibida por los aminoácidos



aromáticos (Huisman & Kosuge, 1974; Herrmann, 1995) aunque hay unas pocas excepciones en estudios *in vitro*: Trp y Tyr produjeron la inhibición de la actividad DAHPS en brotes de maíz (*Zea mays* L.) (Graziana & Boudet, 1980), y en hojas de guisante (Reinink & Borstlap, 1982). Por el contrario, en estudios *in vitro* con zanahoria y patata, se observó la activación de la actividad DAHPS cuando los niveles del aminoácido Trp aumentaron (Suzich *et al.*, 1985; Pinto *et al.*, 1986). Esta inhibición o activación de DAHPS por mecanismos *feedback* o retroalimentación por parte de los productos finales de la vía de BAA, presenta controversias que deberán seguir estudiándose.

Por último, cabe destacar que la inhibición del enzima EPSPS al aplicar glifosato, incrementó la actividad enzimática y el nivel de proteína DAHPS en plantas de patata (Pinto *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 2008), resultado que también se detectó en un incremento dosis-dependiente en la cantidad de enzima en plantas de *Amaranthus palmeri* (Fernández-Escalada *et al.*, 2017).

REGULACIÓN EN EL PUNTO DE RAMIFICACIÓN (AS/CM)

Dentro de la ruta, la bifurcación hacia la formación de Trp por un lado y Phe y Tyr por otro, está controlada a nivel de dos enzimas; antranilato sintasa (AS) y corismato mutasa (CM), que utilizan corismato como sustrato (Maeda & Dudareva, 2012). La preferencia del flujo de carbono hacia una rama u otra puede estar relacionado con las diferentes señales de la vía, con las funciones reguladoras de cada aminoácido y con qué mecanismos transcripcionales y post transcripcionales tienen lugar (Tzin & Galili, 2010b; Maeda & Dudareva, 2012).

Algunos autores han propuesto que una aceleración o disminución en el flujo de carbono dentro de la ruta está provocado por mecanismos *feedback* o retroalimentación, que ocurren cuando los niveles de aminoácidos libres varían debido a situaciones de estrés. Estos mecanismos *feedback*, como mecanismos post-traduccionales han sido observados en los tres aminoácidos aromáticos, la síntesis de Phe y Tyr se incrementa cuando Trp es abundante, y se suprime cuando el suministro de estos aminoácidos es el adecuado (Benesova & Bode, 1992; Eberhard *et al.*, 1996).

En muchas plantas, la actividad CM tiene lugar con dos tipos de isoenzimas, CM1 y CM2 (Maeda & Dudareva, 2012) que están regulados de diferente forma. CM1, localizado en el plastidio, contiene un péptido de tránsito hacia los



plastidios, que permite que este isoenzima esté sujeto a una regulación alostérica. CM1 es inhibido mediante la regulación *feedback* por los aminoácidos Phe y Tyr, y es activado por Trp, redirigiendo así el flujo de carbono desde el Trp hacia la biosíntesis de Phe/Tyr (Kuroki & Conn, 1988; Tzin & Galili, 2010a; Maeda & Dudareva, 2012; Buchanan *et al.*, 2015; Galili *et al.*, 2016; Lopez-Nieves *et al.*, 2017) (Figura 1.6). Cabe destacar que el genoma de *A. thaliana L.* contiene un gen adicional que codifica para otro isoenzima: CM3 (Kuroki & Conn, 1988). Análogamente a CM1, CM3 también contiene este péptido de tránsito. En cambio, la isoforma CM2, ubicada en el citosol, es usualmente insensible a la regulación alostérica por los aminoácidos aromáticos (Benesova & Bode, 1992; Eberhard *et al.*, 1996) ya que no posee ese péptido de tránsito. Se desconoce su función, pero se cree que podría tener un rol crítico en las interacciones entre plantas, nematodos y hongos (Buchanan *et al.*, 2015). Por último, cabe señalar que el Trp inhibe la actividad enzimática del enzima AS (Romero *et al.*, 1995; Bohlmann *et al.*, 1996).



Figura 1.6. Regulación de la ruta de BAA con los principales enzimas: DAHPS, DHQS, dímero DQSD, SK, EPSPS, CS, CM y AS. Las flechas en azul indican la regulación transcripcional producida por los factores de transcripción. Dichos factores están señalados en círculos azules: ODORANT1 (ODO1), EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 (EPF1), EMISSION OF BENZENOIDS II (EOBII) y factores de la familia mieloblastosis (MYBs). Las flechas de color verde, rojo y naranja indican la regulación post-transcripcional. Las flechas en rojo señalan los mecanismos de inhibición, en verde los que activan y en naranja los que tienen un patrón de comportamiento discutible.



1.2.1.1.4 GLIFOSATO

El glifosato (N-(fosfonometil) glicina) es un herbicida total (no selectivo), sistémico, que pertenece a la familia de las glicinas (Clasificación 9, antigua familia G, tabla 1.1). Es un sólido cristalino blanco e inodoro que tiene un grupo amino básico y tres sitios ácidos ionizables (Motharasan *et al.*, 2018). El glifosato es el ingrediente activo en muchos productos herbicidas (por ejemplo, *Roundup*®) y está disponible comercialmente en sus diversas formas de sal, como sal de isopropilamina, monoamónica, potásica etc.

Este herbicida puede ser utilizado en pre-emergencia y post-emergencia de los cultivos, para controlar más de 150 especies de malas hierbas, incluyendo plantas mono y dicotiledóneas anuales o perennes (Rodrigues & Almeida, 2005). Actúa como inhibidor competitivo del segundo sustrato (PEP) y no competitivo del siquimato-3-fosfato resultando en una acumulación de siquimato y con un bloqueo de la síntesis de los aminoácidos aromáticos (Devine *et al.*, 1993).

El glifosato se ha considerado un compuesto relativamente seguro en el medio ambiente debido a que es una sustancia química no volátil (por lo que no produce contaminación atmosférica en ese aspecto (Duke & Powles, 2008), que no sufre degradación fotoquímica y es estable en el aire. Sin embargo, debido a su uso extensivo y expandido a áreas urbanas y naturales, pastos, bosques y áreas acuáticas, están aumentando las preocupaciones y los estudios sobre el comportamiento del glifosato en las plantas y el medio ambiente (Kanissery *et al.*, 2019).

El glifosato tiene afinidad para unirse a las partículas del suelo y se acumula principalmente en la capa superior del suelo, pero a pesar de su alta tendencia a unirse al suelo, presenta una movilidad relativamente alta y cuando es aplicado por aspersión foliar para controlar las malas hierbas, puede terminar en diferentes depósitos de suelo y sitios no objetivo, ya que, mediante procesos como la escorrentía superficial, lixiviación, deriva de la pulverización y el transporte vertical en el suelo, pueden transportarlo a las aguas superficiales, subterráneas y sedimentarias (Kjær *et al.*, 2003; Annett *et al.*, 2014). En un estudio en aguas superficiales se detectó glifosato en el 36% de un total de 154 muestras de agua recolectadas en EE.UU., donde el glifosato se usa ampliamente en cultivos de maíz, sin embargo, la concentración de glifosato en



las muestras analizadas estaba muy por debajo del nivel máximo de contaminante para este herbicida (USEPA, 2009).

La principal ruta de degradación del glifosato en el suelo es la degradación o biodegradación mediada por microbios (Sprankle *et al.*, 1975; Franz *et al.*, 1997; Gimsing *et al.*, 2004). Aunque las bacterias son las principales impulsoras de la degradación en el suelo, también se han encontrado hongos que desempeñan un papel relevante en este proceso (Singh & Walker, 2006). Numerosos estudios han analizado su potencial efecto contaminante en los suelos, por alterar el equilibrio de la comunidad de bacterias y hongos (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005; Zobiole *et al.*, 2011). Algunos autores han demostrado que la tasa de degradación y adsorción del glifosato depende en gran medida de las propiedades del suelo junto con otros factores químicos, físicos y biológicos (Gimsing *et al.*, 2004). En la mayoría de suelos, se degrada e inactiva a un ritmo relativamente rápido, con una vida media estimada entre 7 y 60 días (Quinn *et al.*, 1988; Giesy *et al.*, 2000). Sin embargo, todavía existe mucha controversia sobre sus efectos en las comunidades microbianas y las actividades en la rizosfera (Hungria *et al.*, 2014; Wolmarans & Swart, 2014; Allegrini *et al.*, 2015).

En cuanto a la toxicidad animal, cómo los animales carecen de esta ruta bioquímica (incorporan los aminoácidos en la dieta), hipotéticamente estarían libre de riesgos al menos sobre esa diana, pero el uso de este herbicida comercial requiere añadir compuestos tensioactivos y surfactantes a la formulación comercial, para aumentar la adhesión a la superficie de las hojas y a la absorción por las plantas (Annett *et al.*, 2014). Este sería el caso del surfactante polioexietileno amina (POEA), que incrementa la toxicidad del herbicida (Sawada *et al.*, 1988; Tsui & Chu, 2003), y algunos animales acuáticos, anfibios, microalgas, bacterias y protozoos (Tsui & Chu, 2003; Sihtmäe *et al.*, 2013; Rodriguez-Gil *et al.*, 2017) parecen ser más sensibles al POEA que los animales terrestres (Giesy *et al.*, 2000; Solomon & Thompson, 2003). En cualquier caso, el glifosato no tiene la capacidad de bioacumularse o biomagnificarse en la cadena trófica.

En general, aunque se sabe que el glifosato se degrada con relativa rapidez en el suelo después de su aplicación, este herbicida y sus metabolitos podrían persistir en el suelo, agua y en los tejidos de las plantas en determinadas condiciones (Kanissery *et al.*, 2019). A pesar de que estas exposiciones se consideran subletales, es necesario analizar los suelos para determinar si los contenidos residuales de glifosato están por encima de los umbrales



permitidos, principalmente en suelos con baja capacidad de adsorción y con tasas muy altas de aplicación de herbicidas, y así, analizar los riesgos de exposición al medio ambiente, con las consiguientes implicaciones para los animales y los seres humanos (Kanissery *et al.*, 2019).

En el apartado 1.1.4.1 de este trabajo se presenta un apartado sobre el contexto legal, histórico y la problemática actual del glifosato.

1.2.1.2 RUTA DE LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS (BAR) E INHIBIDORES DE ALS

1.2.1.2.1 RUTA DE BAR

Los aminoácidos de cadena ramificada son valina (Val), leucina (Leu) e isoleucina (IIe), y se denominan así debido a sus esqueletos de carbono ramificados (Chen *et al.*, 2010). Están sintetizados por plantas, bacterias y hongos. En las plantas, la ruta de BAR está localizada a nivel subcelular en los plastidios (Wittenbach & Abell, 1999). Todos los órganos de una planta pueden sintetizar aminoácidos ramificados, pero es en los tejidos jóvenes donde ocurre preferentemente esta biosíntesis. Estos aminoácidos son esenciales para los mamíferos, ya que carecen de la capacidad de sintetizarlos y, deben adquirirlos a través de su dieta (Harris *et al.*, 2005; Brosnan & Brosnan, 2006; Binder *et al.*, 2007).

Esta ruta está compuesta por dos secuencias de reacciones paralelas que comparten un conjunto de cuatro enzimas (Galili *et al.*, 2016), donde lle es sintetizada por un lado y Val y Leu por otro (Figura 1.7). El primer paso común en la ruta de síntesis es catalizado por el enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS, EC 2.2.1.6) o también conocido como acetolactato sintasa (ALS), que cataliza, por un lado, la condensación de dos piruvatos para formar acetolactato (precursor de valina y leucina) y por otro, la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para producir 2-aceto-2-hidroxibutirato (precursor de isoleucina) (Figura 1.7 y Figura 1.8) (Singh & Shaner, 1995a; Chipman *et al.*, 2005; Duggleby *et al.*, 2008). El compuesto 2-cetobutirato es sintetizado a partir de la treonina (Thr) y catalizado por el enzima treonina desaminasa (TD) que lleva a cabo una desaminación de la Thr dando lugar a una molécula de 2-cetobutirato y otra de amonio (Figura 1.7) (Halgand *et al.*, 2002). El siguiente paso común está catalizado por el enzima acetohidroxiácido isomero reductasa (AHAIR) que



cataliza la isomerización reducida del acetolactato a 2.3-dihidroxi-3-Isovalerato o la conversión de 2-aceto-2-hidroxibutirato a 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato (Figura 1.7) (Durner et al., 1993). Los dihidroxiácidos producidos son transformados en derivados del ácido valérico por la actividad del siguiente enzima que se denomina dihidroxiácido deshidratasa (DHAD). Este enzima cataliza la transformación de 2,3-dihidroxi-3-isovalerato o de 2,3-dihidroxi-3metilvalerato a 2-oxo ácidos; 3-metil-2-oxobutanoato (3MOB) o 3-metil-2oxopentanoato (3MOP). Estos dos 2-oxo ácidos pueden ser convertidos en los tres aminoácidos ramificados; el primero (3MOB) sirve como substrato para la biosíntesis de Val y Leu, y el segundo es substrato para la biosíntesis de lle (Binder, 2010). El último paso en la ruta biosintética de los 3 aminoácidos necesita de la acción de una transaminasa (TA, transaminasa de aminoácidos ramificados), que cataliza la transaminación, desde glutámico, de los 2-oxo ácidos mencionados en sus correspondientes aminoácidos: 4-metil-2oxopentanoato a leucina, 3-metil-2-oxobutanoato a valina y 3-metil-2oxopentanoato a isoleucina (Figura 1.7) (Singh, 1999).



Figura 1.7. Ruta biosintética de los tres aminoácidos ramificados: valina (Val), leucina (Leu) e isoleucina (Ile) en plantas con los principales enzimas: treonina desaminasa (TD), acetolactato sintasa (ALS) o también conocido como acetohidroxiácido sintasa (AHAS), acetohidroxiácido isomero reductasa (AHAIR), dihidroxiácido deshidratasa (DHAD) y transaminasa de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (TA). El mecanismo de acción de los inhibidores de ALS es la inhibición del primer enzima común de la ruta, la acetolactato sintasa (ALS).





Figura 1.8. Reacciones que cataliza el enzima acetolactato sintasa (ALS).

1.2.1.2.2 ENZIMA ALS

Este enzima presenta diferentes formas en los distintos organismos estudiados. Aunque la mayoría de estudios se han realizado en enzimas de origen microbiano, también hay estudios en plantas: se ha caracterizado en extractos celulares de *Brassica napus* (colza) (Bekkaoui *et al.*, 1993), *Hordeum vulgare* (Durner & Boger, 1988) y *Zea mays* (Mazur *et al.*, 1987; Singh *et al.*, 1988), entre otras. La mayoría de las ALS caracterizadas son definidas como un heterodímero formado por dos subunidades diferentes; una subunidad catalítica grande denominada AHASL con un tamaño entre 59 y 66 kDa y con un péptido N-terminal que posteriormente se elimina para dirigir la proteína a los cloroplastos (McCourt & Duggleby, 2006) y con dos pequeñas subunidades reguladoras AHASS1 y AHASS2, cuyo tamaño varía entre los 9 y los 54 kDa, dependiendo de la especie (McCourt & Duggleby, 2006) y que se encargan de estimular la actividad de la subunidad catalítica grande AHASL.

La subunidad catalítica de ALS requiere de tres cofactores para la actividad: difosfato de tiamina (TPP también conocido como ThDP) como cofactor esencial, ión magnesio (Mg²⁺) y flavín adenín dinucleótido o dinucleótido de flavina (FAD) como tercer factor (Duggleby *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2017). De estos tres, el cofactor más importante para el mecanismo catalítico es ThDP, pues interviene en la reacción con el piruvato. Todos los miembros de la familia de enzimas dependientes de ThDP (Frank *et al.*, 2004) son capaces de catalizar



varias reacciones, incluyendo la descarboxilación oxidativa y no oxidativa de dos cetoácidos (McCourt & Duggleby, 2006).

Este cofactor requiere la presencia de un ion metal divalente como el Mg²⁺ que sirve para anclar ThDP al enzima y coordinar el grupo difosfato (Umbarger & Brown, 1958; Hawkins *et al.*, 1989). A diferencia de otros enzimas de esta familia, ALS requiere de FAD como tercer factor, aunque al principio se desconoció la función de FAD ya que la reacción catalizada no implica oxidación ni reducción (Stormer & Umbarger, 1964; Duggleby *et al.*, 2008) pero posteriormente se descubrió que la presencia de FAD en la actividad ALS es un vestigio ancestral de la subfamilia de los enzimas dependientes de ThDP (McCourt & Duggleby, 2006).

1.2.1.2.3 REGULACIÓN DE LA RUTA DE BAR

Los principales factores reguladores que determinan los flujos en la ruta metabólica de los aminoácidos ramificados se presentan a continuación:

A) INHIBICIÓN FEEDBACK DE LOS PRODUCTOS FINALES

Los mecanismos de regulación principales a nivel post-transcripcional consisten en regulación *feedback* de enzimas de la ruta por los productos finales de la ruta: los aminoácidos de cadena ramificada (Less & Galili, 2008). Si estos aminoácidos ramificados se acumulan en exceso, puede conducir a varios efectos tóxicos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, tal y como se ha comprobado en plantas de *A. thaliana* L. (Phillips *et al.*, 1981; Zhu & Galili, 2003; Angelovici *et al.*, 2009).

Esta regulación *feedback* ha sido bien documentada en experimentos *in vitro* en plantas y microorganismos (Lee & Duggleby, 2001; Curien *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; de Kraker & Gershenzon, 2011) pero se sabe muy poco acerca de cómo los aminoácidos influyen en la homeostasis de los enzimas *in vivo* (Xing & Last, 2017). Dos de los enzimas que están bajo control alostérico y que son inhibidos por los productos finales de la ruta serían; treonina desaminasa (TD) y acetolactato sintasa (ALS) (Singh & Shaner, 1995a; Binder *et al.*, 2007). El enzima TD, que se expresa principalmente en hojas y flores jóvenes, es inhibida por altos niveles de lle (Singh, 1999) (Figura 1.9), efecto que se antagoniza por la presencia de Val (Halgand *et al.*, 2002; Garcia & Mourad, 2004) (Figura 1.9). En el caso del enzima ALS, las dos pequeñas subunidades reguladoras que lo



forman, AHASS1 y AHASS2, son las encargadas de mediar su regulación *feedback* por Val, Leu y/o lle (Lee & Duggleby, 2001; Weinstock et al., 1992). Ensayos *in vitro* revelaron que la isoforma AHASS1 es sensible al incremento en los tres aminoácidos ramificados (Lee & Duggleby, 2001) (Figura 1.9) y la isoforma AHASS2 es sensible a Val (Chen *et al.*, 2010), sin embargo, no se conocen los efectos de Leu e lle en AHASS2 (Xing & Last, 2017).

De forma general, en la mayoría de estudios realizados en bacterias, hongos y algas el inhibidor más potente del enzima ALS es el aminoácido Val (Duggleby & Pang, 2000). En plantas, la inhibición producida por Leu está ampliamente documentada (Wittenbach & Abell, 1999; De Kraker *et al.*, 2007) pero la intensidad de la inhibición parece variar sustancialmente de una especie a otra (Curien *et al.*, 2008).



Figura 1.9. Regulación de la ruta de BAR con los principales enzimas: treonina desaminasa (TD), acetolactato sintasa (ALS) o también conocido como acetohidroxiácido sintasa (AHAS), acetohidroxiácido isomero reductasa (AHAIR), dihidroxiácido deshidratasa (DHAD) y transaminasa de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (TA). Las flechas de color verde y rojo indican la regulación post-transcripcional. Las flechas en rojo señalan los mecanismos de inhibición y en verde los que activan.



B) EXPRESIÓN GÉNICA

Los genes que codifican los enzimas de la ruta, se expresan en función del tejido y del órgano. En el caso del enzima ALS, es un enzima plastidial que se codifica en el núcleo, cuyos genes han sido clonados y secuenciados en diferentes plantas para analizar su nivel de expresión. En todas las especies vegetales examinadas, al menos un gen ALS es expresado de manera constitutiva, aunque dicho nivel de expresión puede variar entre los tejidos y los estados fenológicos (Keeler et al., 1993). Comparativamente, se sabe muy poco sobre la regulación en plantas de los otros enzimas que participan en la ruta; AHAIR, DHAD (Zhang et al., 2015) y TA. En el caso del enzima TA, ha sido estudiado solo en unas pocas especies de plantas (Maloney et al., 2010). Se han identificado 6 genes que regulan la actividad TA en A. thaliana L. (Diebold et al., 2002) y en Solanum lycopersicum (Maloney et al., 2010). La función de este enzima, así como su ubicación, es altamente variable (Diebold et al., 2002; Binder et al., 2007; Maloney et al., 2010). En general, se sabe menos sobre la importancia de la regulación genética de los enzimas biosintéticos de la ruta de BAR que acerca de la regulación feedback por productos finales de esta ruta (Less & Galili, 2008; Pratelli & Pilot, 2014).

C) LA ESPECIFICIDAD POR EL SUSTRATO

La regulación de la ruta de BAR está estrictamente controlada por la especificidad por el sustrato en plantas, bacterias y hongos (Singh & Shaner, 1995a; Duggleby & Pang, 2000). Los cuatro enzimas que intervienen en la ruta catalizan dos reacciones con dos sustratos diferentes. Cualquier diferencia en la afinidad de cada uno de ellos por uno de los dos sustratos afectará al flujo de carbono a través de la ruta.

1.2.1.3 HERBICIDAS INHIBIDORES DE ALS

Los herbicidas inhibidores de ALS pertenecen al grupo 2 de acuerdo a la clasificación WSSA & HRAC (Tabla 1.1.). Estos herbicidas se agrupan en 5 familias químicas: sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TPs) o también denominadas sulfonanilidas, ácidos pirimidinil benzoatos (PTB) y sulfonilaminocarbonil triazolinonas (SCT) (Figura 1.10). El mecanismo de acción es la inhibición del primer enzima común de la ruta, el enzima ALS (Figura 1.7) (Tan *et al.*, 2006; Binder, 2010). La inhibición en un proceso complejo que depende del tiempo (Shaner *et al.*, 1984; Gerwick *et al.*, 1990) y se presenta



en dos fases, una primera que consiste en la formación de un complejo débil enzima-inhibidor, y una segunda que consiste en un cambio conformacional que lleva a otro complejo con mayor afinidad de la unión.

Todos los inhibidores de ALS tienen sitios de unión al enzima ALS diferentes pero que se solapan parcialmente (Duggleby & Pang, 2000). Así, el sitio catalítico de la ALS está situado al fondo de un canal, y los herbicidas no se unen a ese sitio de acción, sino a un dominio más superficial que bloquea la entrada al canal impidiendo que los sustratos del enzima accedan al sitio activo en la subunidad catalítica (McCourt & Duggleby, 2006; Powles & Yu, 2010; Garcia *et al.*, 2017; Lonhienne *et al.*, 2017). Las mutaciones que afecten a los aminoácidos del sitio de unión del herbicida, podrían tener como consecuencia la ineficacia del herbicida sin afectar a la eficiencia catalítica del enzima.



Figura 1.10. Herbicidas inhibidores de acetolactato sintasa, pertenecientes a cinco familias químicas diferentes: sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TPs) o también denominadas sulfonanilidas, ácidos pirimidinil benzoatos (PTB) y sulfonilaminocarbonil triazolinonas (SCT) (HRAC, 2021).

Los esfuerzos para desarrollar herbicidas comerciales a partir de otros enzimas de esta ruta no han tenido demasiado éxito, como es el caso de los inhibidores de DHAD (Dayan & Duke, 2020) o a partir del enzima AHAIR. En este último caso, el enzima establece una unión reversible con los herbicidas y se presenta en mayor cantidad que la ALS, con lo que se necesitan mayores concentraciones de herbicida para obtener los mismos resultados (Durner *et al.*, 1993; Dumas *et al.*, 1994), y limitando su desarrollo como herbicidas comerciales.

Después del glifosato, los inhibidores de ALS son los herbicidas más utilizados a nivel mundial para el manejo de malas hierbas en una gran variedad de



cultivos. Los primeros herbicidas inhibidores de ALS en desarrollarse fueron las SU, a mediados de los 70 (Levitt, 1983) y la primera introducción en el mercado, fue en el año 1982, con el herbicida clorsulfuron, seguido por las IMI, también en la misma década. Las TPs y los PTB, fueron comercializados con posterioridad. En general, las 5 familias químicas de inhibidores de ALS son de gran importancia en la agricultura, no sólo por su alta eficacia para el control de una gran variedad de malas hierbas a dosis bajas y por su selectividad en numerosos cultivos, sino también por su baja toxicidad en mamíferos (Yu *et al.*, 2012; Yu & Powles, 2014). La aplicación de estos herbicidas puede realizarse en pre-emergencia o en post-emergencia, ya que son absorbidos por hojas y raíces, y transportados por el xilema y floema, aunque el método de aplicación recomendado es específico para cada tipo de herbicida dependiendo de su actividad residual (Rosales-Robles, 2006).

1.2.1.3.1 PIRIMIDINIL BENZOATOS (PTB)

Esta familia química de herbicidas fue desarrollada conjuntamente a finales de la década de 1980 por las firmas *DuPont* y *Kumiai Chemical Industry* Co., Ltd (fusionada con *Ihara Chemical Industry Co.*, Ltd) (Shimizu *et al.*, 1994). La estructura general de los PTB consiste en una pirimidina unida por un átomo de azufre o un átomo de oxígeno a un anillo de benceno sustituido (Garcia *et al.*, 2017). La inhibición del enzima ALS de la planta por parte de esta familia herbicida es bastante potente y se caracteriza por no ser competitivo con respecto al piruvato (Shimizu *et al.*, 1994) de igual forma que las SU y TPs. En la figura 1.11 se pueden ver dos ejemplos de estructuras químicas de esta familia, piritiobac y bispiribac, dentro de los cuales el piritiobac ha sido utilizado para el desarrollo de este trabajo.

PIRITIOBAC

El herbicida piritiobac (2-cloro-6-(4,6-dimetoxi-2-pirimidiniltio)-benzoato de sodio) (Figura 1.11.A) se registró por primera vez en 1995 con el nombre comercial Staple^m y fue utilizado para el manejo de malas hierbas principalmente en cultivos de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en Estados Unidos. Este herbicida se puede aplicar en el suelo o foliar, tanto en preemergencia como en post-emergencia para controlar varias malas hierbas de hoja ancha como *Salvia reflexa*, *Amaranthus* spp., *Eleusine indica*, *Xanthium spinosa*, etc (Bose & Hemantaranjan, 2005).





Figura 1.11. Ejemplos de las estructuras químicas de dos de los herbicidas; (A) piritiobac y (B) bispiribac sodio, que pertenecen a la familia química de pirimidinil benzoatos (PTB) (Garcia *et al.*, 2017).

Las principales propiedades físico-químicas de este herbicida son: alta solubilidad acuosa, semi-volatilidad, alta movilidad y moderada persistencia en los suelos (Guerra *et al.*, 2011) en función de la velocidad de degradación por vía microbiana y fotoquímica, aunque esta varía según el tipo de suelo (por ejemplo, su vida media en un suelo limo-arenoso es de 60 días). Sin embargo, a pesar de que no es persistente en los sistemas acuáticos, tiene un alto potencial de lixiviación hacia aguas subterráneas. Presenta además un nivel de toxicidad de bajo a moderado para la mayoría de la biodiversidad, y puede bioacumularse. Todas estas características son importantes para evitar la contaminación por herbicidas. Dentro de la familia de los PTB el piritiobac no se encuentra actualmente aprobado por los reglamentos en materia de fitosanitarios de la Unión Europea. Por el contario, otro herbicida de la misma familia, como es el bispiribac sodio (Figura 1.11.B), está autorizado hasta 2022 en España (MAPA, 2021).

1.2.2 MODO DE ACCIÓN COMÚN DEL GLIFOSATO E INHIBIDORES DE ALS

A pesar de que los mecanismos de acción de los herbicidas IBAA, como el glifosato, y de herbicidas IBAR, como el piritiobac, están bien estudiados (Figura 1.5 y 1.7, respectivamente), se desconoce en profundidad cuál son los modos de acción de ambos (Gomes *et al.*, 2014). Se ha observado que cuando se aplica glifosato no sólo se ven efectos en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, sino también en la de los ramificados. Lo mismo sucede cuando se aplican inhibidores de ALS. De ahí que algunos autores hayan defendido una



estrecha regulación cruzada entre ambas rutas (Noctor et al., 2002; Orcaray et al., 2010; Pratelli & Pilot, 2014) y se ha identificado la ruta biosintética BAR como la más cercana a la ruta de BAA (Noctor et al., 2002; Orcaray et al., 2010) (Figura 1.12), habiéndose descrito diferentes interacciones entre ellas (Guver et al., 1995; Zhao et al., 1998; Mohapatra et al., 2010; Pratelli & Pilot, 2014). Esta aparente regulación cruzada entre las rutas, podría ser consecuencia de una respuesta al estrés o de una respuesta a perturbaciones que modifican los niveles normales de aminoácidos (Hey et al., 2010). En experimentos realizados con un inhibidor de aminotransferasa en Lemna minor mostraron una acumulación simultánea de los aminoácidos ramificados y de dos aromáticos (Tyr y Phe) (Brunk & Rhodes, 1988). En plantas de A. palmeri tratadas con glifosato y con un inhibidor de ALS no se confirmó la existencia de una regulación cruzada entre las rutas de BAA y BAR, a nivel transcripcional (Fernández-Escalada et al., 2019). Para otras especies sí se ha propuesto que estas interacciones cruzadas puedan tener lugar a nivel transcripcional (Pratelli & Pilot, 2014).

Los efectos fisiológicos comunes de los inhibidores de BAA y de BAR observados en plantas, sugieren que los modos de acción de ambos herbicidas, pueden tener muchos puntos en común, induciendo la muerte de las plantas de forma similar. Se han realizado numerosos estudios para conocer los modos de acción de ambos herbicidas, que han incluido métodos moleculares como comparaciones transcripcionales (Zhu *et al.*, 2008), enfoques proteómicos (Ahsan *et al.*, 2008) y análisis de los perfiles metabolómicos (Trenkamp *et al.*, 2009; Maroli, 2017) pero hasta la fecha siguen sin estar nada claros. Por otro lado, también ha sido propuesto que estas respuestas compartidas podrían ser parte de una respuesta general de la planta al estrés inducido por ambos herbicidas (Dyer, 2018).





Figura 1.12. Ruta biosintética de aminoácidos aromáticos (BAA) (ubicada en el lado derecho) con los principales enzimas: DAHPS, DHQS, DQSD, SK, EPSPS y CS, CM y AS. Ruta biosintética de los tres aminoácidos ramificados (BAR) (ubicada en el lado izquierdo) con los principales enzimas: ALS, AHAIR, DHAD, TA y TD (Modificado de (Tan *et al.*, 2006).

A continuación, se describen los principales efectos fisiológicos comunes que se han descrito después de la aplicación de glifosato e inhibidores de ALS.

1.2.2.1 DISMINUCIÓN DEL CRECIMIENTO Y MUERTE LENTA DE LA PLANTA

Un efecto común tras la aplicación de ambos tipos de herbicidas es la inhibición del crecimiento. En ambos casos, los síntomas fitotóxicos aparecen con lentitud y pueden pasar días e incluso semanas hasta producir la muerte de las plantas. Tras la aplicación de inhibidores de ALS, los tejidos meristemáticos son los que presentan los primeros síntomas. Los tejidos maduros también se ven afectados, pero pueden permanecer verdes y turgentes durante un largo periodo de tiempo, lo cual conlleva que la planta esté en un estado de reposo



de crecimiento durante semanas antes de morir. En relación al glifosato, este es un herbicida móvil en el floema y, aunque se transporta por toda la planta, tiende a acumularse en las regiones meristemáticas. Además, su aplicación provoca clorosis y posterior necrosis en las hojas y en los meristemos (Gruys & Sikorski, 1999).

La caída en la tasa de crecimiento con ambos herbicidas y el mayor efecto en zonas meristemáticas podrían explicarse por el hecho de que la biosíntesis de aminoácidos es especialmente activa en tejidos meristemáticos.

1.2.2.2 ACUMULACIÓN DE SUBSTRATOS E INTERMEDIARIOS

A) EFECTO DEL GLIFOSATO

Una de las consecuencias de la inhibición del enzima EPSPS por parte del herbicida glifosato es la acumulación masiva de siguimato en tejidos vegetales (Lydon & Duke, 1988; Orcaray et al., 2010; Gaines et al., 2011; Fernández-Escalada et al., 2016, 2017). Esta acumulación se produce como consecuencia directa de la inhibición de la actividad EPSPS, y su magnitud se incrementa probablemente debido la disminución de la regulación feedback de la actividad DAHPS, la entrada en la vía, ya que la falta de productos finales de la misma, provoca un incremento descontrolado en el flujo de carbono (Jensen, 1986; Siehl, 1997; Zabalza et al., 2017). Este efecto, es un destacado marcador de estrés en plantas tratadas con glifosato. Sin embargo, en nódulos de lupino se observó que la acumulación de siguimato mediada por una inhibición de la PEPC podría resultar tóxica (de María et al., 2006) aunque no se ha demostrado in vivo. Otros metabolitos que se acumulan tras la aplicación de este herbicida, pero a menor escala que el siguimato, serían; S3P (Siehl, 1997), el ácido protocatechuico y el ácido gálico, estos dos últimos derivados del 3dehidrosiquimato (Lydon & Duke, 1988; Becerril et al., 1989; Hernandez et al., 1999; de María et al., 2006; Zabalza et al., 2017). Los inhibidores de ALS no tienen efecto sobre el contenido de estos compuestos de la vía del siguimato (Zulet et al., 2013).

B) EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE ALS

El piruvato, producto final de la glucólisis, es un metabolito clave en múltiples procesos biosintéticos y vías catabólicas. Puesto que la actividad ALS tiene piruvato como sustrato, su inhibición por herbicidas conlleva mayor


disponibilidad de piruvato. Los efectos que tiene esta mayor disponibilidad de piruvato, se tratan en el apartado 1.2.2.3.

C) ACUMULACIÓN DE QUINATO

Otro efecto común tras la aplicación de inhibidores de ALS y de EPSPS es la acumulación de quinato, metabolito formado en una ramificación lateral de la ruta del siquimato (Orcaray *et al.*, 2010). La acumulación de otros metabolitos como fenoles totales y antocianinas, son indicadores de que dichos herbicidas activan el metabolismo secundario (Orcaray *et al.*, 2011). Sin embargo, no ha sido posible correlacionar la acumulación de estos metabolitos con la respuesta tóxica de la planta.

1.2.2.3 EFECTO EN EL METABOLISMO DEL CARBONO

La letalidad de las plantas también podría estar asociada con varias reacciones secundarias desencadenadas después de la inhibición de la diana herbicida (Zabalza et al., 2013) y que pueden tener efectos en diferentes rutas metabólicas que estén a su vez relacionadas con la ruta biosintética afectada (Maroli et al., 2015). Ambos herbicidas alteran el metabolismo del carbono en plantas tratadas. Un efecto fisiológico es la acumulación de carbohidratos en respuesta a tratamientos con glifosato (Orcaray et al., 2012; Maroli et al., 2015; Zulet et al., 2015; Fernández-Escalada et al., 2016) y en respuesta a inhibidores de ALS (Zabalza et al., 2004; Zulet et al., 2015). Esta acumulación, detectada tanto en las hojas como en las raíces de plantas tratadas, puede ser utilizada como marcador fisiológico de la toxicidad del herbicida. La explicación fisiológica de esta acumulación de azúcares es similar para ambos herbicidas (Zabalza et al., 2004; Orcaray et al., 2012). La acumulación de carbohidratos no utilizados en los sumideros sugiere que la sacarosa se transporta desde las hojas a estos sumideros a una velocidad mayor que a la que puede ser utilizada en los mismos. La falta de demanda de fotosintetizados sería la responsable del menor transporte, y la causante de que los azúcares se acaben acumulando también en las hojas de las plantas tratadas (Devine, 1989; Bestman et al., 1990; Gaston et al., 2002; Zabalza et al., 2004; Orcaray et al., 2012). De esta forma, a pesar de que la planta dispone de energía y carbohidratos disponibles, se estaría produciendo una desregulación metabólica bajo la acción de estos herbicidas (Zulet et al., 2013).



Otros efectos secundarios comunes en el metabolismo del carbono son la inducción de la fermentación y de la oxidasa alternativa (AOX) (Gaston *et al.*, 2003; Zabalza *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2008; Zulet *et al.*, 2015).

En el caso de la fermentación, ambos herbicidas inducen la actividad de los enzimas fermentativos como piruvato descarboxilasa (PDC), alcohol deshidrogenasa (ADH) en la fermentación etanólica y lactato deshidrogenasa (LDH) en la fermentación láctica, bajo condiciones aeróbicas (Gaston et al., 2002; Zabalza et al., 2005). El incremento de estas actividades fermentativas tras la aplicación de herbicidas inhibidores de ALS podría contribuir al consumo del exceso de piruvato generado por inhibición de la actividad ALS. En plantas de guisante tratadas con glifosato, también se observó esta inducción de las actividades fermentativas ADH y PDC (Orcaray et al., 2012). En el caso de la fermentación inducida después del tratamiento con glifosato, se observó que no estaba relacionada directamente con una mayor disponibilidad de piruvato, ya que este herbicida no inhibe ninguna enzima que consuma piruvato (Zulet et al., 2015). Se desconoce exactamente qué desencadena este efecto del flujo de carbono alterado después de la inhibición del enzima EPSPS o ALS (Armendáriz et al., 2016), y la inducción fermentativa podría considerarse una adaptación metabólica originada por una condición de estrés.

La oxidasa alternativa (AOX) es un enzima que forma parte de la cadena respiratoria mitocondrial en la respiración de las plantas. Se sabe que el contenido en piruvato tiene un efecto estimulante en la actividad de la AOX (Millar *et al.*, 1993; Vanlerberghe *et al.*, 1995) y se ha demostrado que aumentos en el contenido de piruvato están relacionados con los aumentos tanto en los niveles de proteína AOX como en su estado de activación (Gaston *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2008; Dinakar *et al.*, 2010). En estudios realizados en plantas de guisante, se observó una relación clara entre la acumulación y fermentación de piruvato y la inducción de AOX bajo los tratamientos herbicidas con glifosato y un inhibidor de ALS (imazamox), efectos que fueron independientes del lugar de aplicación del tratamiento (Armendáriz *et al.*, 2016). La activación de rutas fermentativas y de rutas relacionadas con la respiración alternativa, no sólo podría estar relacionada con cambios en el contenido de piruvato, sino también con diversos estreses ambientales, entre los cuales puede incluirse la actividad herbicida.



1.2.2.4 EFECTOS EN EL METABOLISMO DEL GLUTATION

El glutation (GSH) es un compuesto tiólico formado por tres aminoácidos, y que se ha descrito que participa en procesos de tolerancia a diferentes estreses (Zagorchev *et al.*, 2013) actuando como un potente antioxidante intracelular en todos los compartimentos celulares. El GSH actúa gracias a las actividades de varios enzimas como GSTs, glutation peroxidasa (GPX) y glutation reductasa (GR).

Se ha descrito que la inhibición de los enzimas diana EPSPS y ALS puede resultar en efectos tóxicos, induciendo un cierto nivel de estrés oxidativo (Caverzan *et al.*, 2019), a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como respuesta a una situación de estrés abiótica. Sin embargo, no está establecido en cómo estos son generados: vía directa como consecuencia de la inhibición de la diana o por ser una respuesta secundaria al afectar a otra vía o una respuesta general a una situación de estrés (Gomes & Juneau, 2016; Caverzan *et al.*, 2019).

En el caso del glifosato, se ha comprobado que provoca un incremento en la producción de ROS en diferentes especies de plantas tratadas (Sergiev *et al.*, 2006; Ahsan *et al.*, 2008; Miteva *et al.*, 2010; Gomes & Juneau, 2016; Tani *et al.*, 2020). En relación a los inhibidores de ALS, hay evidencias contradictorias, indicando por un lado que el estrés oxidativo no estaría relacionado con la respuesta tóxica (Zabalza *et al.*, 2007) o, por el contrario, que sí es un efecto secundario tóxico causado por los herbicidas y mediado por una acumulación de H_2O_2 (Pan *et al.*, 2017).

Frente a este daño oxidativo o frente a estos niveles de ROS altos, se han descrito incrementos en los sistemas antoxidantes correspondientes, entre ellos, se observó una acumulación de GSH en respuesta al glifosato en diversas especies de plantas (Uotila *et al.*, 1995; Jain & Bhalla-Sarin, 2001; de Freitas-Silva *et al.*, 2017), además de una inducción de la actividad GST (Jain & Bhalla-Sarin, 2001). En raíces de guisante tratadas con un inhibidor de ALS también se acumuló GSH (Zabalza *et al.*, 2008) y ambos tipos de herbicidas provocaron acumulación de glutation total en raíces de Arabidopsis (Zulet *et al.*, 2015).



1.2.2.5 DÉFICIT DE PRODUCTOS FINALES

El bloqueo provocado en la ruta de BAA, cuando se aplica glifosato, y el bloqueo en la ruta de BAR cuando se aplican los inhibidores de ALS, sería esperable que provocase una disminución en los niveles de aminoácidos que se sintetizan en estas rutas: aminoácidos aromáticos (AAA) y/o aminoácidos ramificados (AAR). Si estos niveles son insuficientes para mantener la síntesis de proteínas necesaria, se puede desencadenar una carencia de compuestos esenciales para la planta, que podría llevar a la muerte de la planta (Duke & Powles, 2008).

No obstante, en estudios realizados sobre el efecto de la aplicación de glifosato e inhibidores de ALS en el contenido de aminoácidos libres, no siempre se observa una disminución. En los estudios iniciales se detectó un aumento del contenido en aminoácidos libres totales y una disminución de la proteína soluble (Haderlie et al., 1977) efecto que ha sido corroborado por estudios posteriores (Zabalza et al., 2006; Orcaray et al., 2010; Zulet et al., 2013; Fernández-Escalada et al., 2016; Zabalza et al., 2017) tanto con inhibidores de ALS como con glifosato. Este incremento podría estar relacionado con la existencia de un sistema de control homeostático entre diferentes reservas (pools) de aminoácidos, que se autorregularía, de forma que estos herbicidas al anular la síntesis de novo de proteínas, la síntesis proteica en las plantas tratadas podría realizarse mediante la utilización de aminoácidos provenientes de la degradación (proteólisis) y aumento del recambio de proteínas (turnover) en las proteínas ya existentes, aumentando así el pool de aminoácidos libres y disminuyendo los niveles de proteína soluble (Zulet et al., 2013). La degradación de proteínas ocurre fundamentalmente por la acción de las proteasas que se describen con más detalle en el siguiente apartado, 1.3.



1.3 PROTEASAS EN PLANTAS

Las proteasas (también conocidas como peptidasas o enzimas proteolíticas) son enzimas que catalizan la degradación de proteínas hidrolizando enlaces peptídicos y generando péptidos más pequeños. Estos enzimas están presentes en todos los organismos vivos, cumpliendo diversas funciones a nivel celular. Se han identificado las funciones biológicas de un mínimo de 40 proteasas mediante estudios genéticos (van der Hoorn, 2008). En las plantas, las proteasas son reguladoras clave en respuesta a las señales ambientales y de desarrollo y desempeñan un papel importante en diferentes procesos biológicos a lo largo del ciclo de vida de las plantas: crecimiento, desarrollo, reproducción, respuesta inmune, senescencia, abscisión, homeostasis celular, respuesta al estrés sistémico y muerte celular programada (PCD) (Grudkowska & Zagdańska, 2004; Liu *et al.*, 2018a; Tornkvist *et al.*, 2019; Fanourakis *et al.*, 2020).

En las plantas las proteasas se encargan de degradar las proteínas defectuosas, mal plegadas y no funcionales. Los tres residuos de aminoácidos específicos que trabajan juntos en el centro del sitio activo de la proteasa, se conocen como tríada ácido-base-nucleófilo o tríada catalítica (Figura 1.13). El ácido suele ser un residuo de aspartato (Asp) o glutamato (Glu) que alinea y polariza el residuo básico. El residuo básico es una histidina (His) que polariza y desprotoniza al nucleófilo para aumentar su reactividad. El grupo nucleófilo, formado por un residuo de cisteína (Cys) o serina (Ser) o por otros, es la especie neutra o anión del sitio activo del enzima capaz de ceder electrones y atacar a una secuencia específica del sustrato formando un intermediario covalente (Dunn, 2001). Todas las proteasas polarizan el grupo carbonilo del enlace peptídico del sustrato, estabilizando el oxígeno en un hueco de oxianión, lo que hace que el átomo de carbono sea más vulnerable al ataque de un nucleófilo.

Las proteasas se pueden dividir en diferentes clases según el lugar de ruptura, estructura química o mecanismo catalítico. Según el lugar de ruptura las proteasas se pueden clasificar en endopeptidasas, que cortan los enlaces peptídicos internos, y en exopeptidasas, que cortan los enlaces peptídicos terminales. Estas a su vez se pueden dividir en amino y carboxipeptidasas según la posición de la escisión del enlace peptídico. Las aminopeptidasas cortan en los enlaces terminales amino (NH₂) (N-terminal), mientras que las carboxipeptidasas cortan en los enlaces terminales carboxilo (COOH) (C-terminal).





Figura 1.13. Tríada catalítica nucleófilo-base-ácido en el sitio activo del enzima.

La clasificación en función del mecanismo catalítico del nucleófilo, se basa en la naturaleza del grupo funcional de los sitios activos que realizan la hidrólisis, generalmente selectiva, de los enlaces peptídicos. Según la base de datos MEROPS las proteasas vegetales se clasifican en 9 grupos, los 5 primeros son los grupos de proteasas principales: Ser, Cys, Asp, Thr, metaloproteasas (MMPs), y el resto corresponden a asparagina (Asn), Glu, y proteasas mixtas con un sitio catalítico desconocido (Fanourakis *et al.*, 2020; MEROPS, 2021). Las proteasas de serina, de cisteína, y de treonina usan un residuo de Cys, Ser o Thr, respectivamente, como nucleófilo en el sitio activo (Figura 1.14). Las MMPs y las proteasas aspárticas usan agua como nucleófilo, activado por las interacciones electrostáticas con el ión metálico o aspártico (Figura 1.14.C.D) (van der Hoorn, 2008).

La base de datos MEROPS (http://www.ebi.ac.uk/merops/) es una fuente integrada de información sobre las proteasas en plantas, clasificadas jerárquicamente en base a su estructura. Cada peptidasa se asigna a una familia sobre la base de similitudes estadísticamente significativas en la secuencia de aminoácidos, y las familias que se cree que son homólogas, y que comparten una proteína ancestral común, se agrupan en un clan (Rawlings *et al.*, 2018). Además, en la base de datos MEROPS también se pueden encontrar subfamilias, cada una de ellas representa un grupo dentro de una familia que resulta de una divergencia antigua (calculada a partir de un árbol filogenético que ocurrió hace 2.500 millones de años). Una subfamilia en MEROPS suele ser



el resultado de la fusión de lo que habían sido familias separadas (Rawlings *et al.*, 2018).

En relación con la nomenclatura, para un clan se usa un identificador que consta de dos letras: la primera indica el tipo de residuo catalítico (A para Asp, C para Cys, G para Glu, I para inhibidores que son proteínas, M para MMPs, P para peptidasas de tipos catalíticos mezcla, S para Ser, T para Thr, N para Asn y U para peptidasas de tipo catalítico desconocido), y la segunda letra se asigna secuencialmente a medida que se identifica cada clan (Rawlings *et al.*, 2018). Para una familia, el identificador consta de una letra inicial, correspondiente al aminoácido del sitio activo que realiza la hidrólisis, seguida de un número característico (Rawlings *et al.*, 2018).



Figura 1.14. Mecanismos de escisión de las 4 clases catalíticas principales de proteasas. A) Proteasas de serina. B) Proteasas de cisteína. C) Proteasas aspárticas. D) Metaloproteasas.

Los genomas vegetales codifican un gran número de proteasas. El genoma de *Arabidopsis thaliana* L. contiene más de 800 proteasas, que se distribuyen en 60 familias y pertenecen a 30 clanes diferentes (van der Hoorn, 2008). Las proteasas más numerosas son las proteasas de serina (45% del total), seguido de las proteasas de cisteína (25%), metaloproteasas (15%), aspartato proteasas (11%), y, por último, treonina proteasas (4%) (Lallemand *et al.*, 2015). Sin



embargo, en la base de datos MEROPS no se encontraron proteasas conocidas en *A. palmeri* (la especie objeto de este estudio). En la búsqueda tan solo se encontró en esta especie un homólogo no peptidasa que podría hidrolizar enlaces peptídicos (MEROPS, 2021).

Los principales sistemas proteolíticos conocidos en plantas se presentan a continuación, son dos: proteasas de cisteína (nombradas en adelante como CysProt, que incluyen a las papain-like cisteín-proteasas (PLCPs) y a los enzimas de procesamiento vacuolar (VPEs)), y las serinas hidrolasas (SHs).

1.3.1 PROTEASAS DE CISTEÍNA (CysProt)

La principal característica molecular de estas proteasas es la Cys catalítica que actúa como nucleófilo para la proteólisis (Figura 1.14.B). Las CysProt están altamente representadas en plantas, incluyendo más de 140 miembros agrupados en 5 clanes que incluyen a 15 familias (Rawlings, 2010). Las estructuras de las CysProt son distintas en cada clan. Por ejemplo, los clanes CA y CE contienen proteasas con un pliegue similar a la papaína, una enzima proteolítica vegetal cuya estructura única ayuda a entender como funcionan las enzimas proteolíticas (Amri & Mamboya, 2012). Las proteasas CD tienen un pliegue similar a la caspasa, una clase de CysProt específicas que son altamente selectivas para la escisión después de residuos específicos: Asp para caspasas animales, asparagina (Asn) para VPEs y arginina (Arg) para metacaspasas (van der Hoorn, 2008).

En las plantas, las CysProt están involucradas en la regulación de la PCD (Sueldo & van der Hoorn, 2017), en la resistencia frente a patógenos (Zhang *et al.*, 2020) y frente a los ataques de plagas (McLellan *et al.*, 2009). Otras CysProt regulan, entre otros procesos, el destino de las células epidérmicas, el tiempo de floración o el desarrollo del polen (van der Hoorn, 2008).

1.3.1.1 PAPAIN-LIKE CISTEIN-PROTEASAS (PLCPs)

Estas proteasas pertenecen al clan CA, familia C1. Son las únicas de esta familia presentes en las plantas y las más estudiadas entre las CysProt (Martínez *et al.*, 2012). En *A. thaliana* L., se han encontrado 30 PLCPs (van der Hoorn, 2008) y también se han identificado en otras especies como cebada, trigo o tomate (Liu *et al.*, 2018a).



Todas las PLCPs presentan puentes disulfuro que determinan su estructura funcional, y contienen residuos de la tríada catalítica en el orden Cys-His-Asn. El ataque nucleofílico se lleva a cabo a través del grupo tiol reactivo de la Cys en el sitio activo (Rao *et al.*, 1998) y se localizan en vesículas, vacuolas o en el apoplasto (van der Hoorn, 2008).

Las PLCPs participan en muchos procesos biológicos y fisiológicos tan importantes como la PCD en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Zamyatnin, 2015), en procesos relacionados con el tiempo de floración (Shahid *et al.*, 2014), senescencia y movilización de reservas de semillas (van der Hoorn, 2008; Martínez *et al.*, 2012).

1.3.1.2 ENZIMAS DE PROCESAMIENTO VACUOLAR (VPEs)

Los VPEs, también conocidas como asparagina endopeptidasa (AEP) o leguminas (Yamada *et al.*, 2020) son el tipo de CysProt más estudiadas pertenecientes a la familia C13 (clan CD), y se localizan en la vacuola (Hara-Nishimura *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 1999; Prabucka & Bielawski, 2004; Martinez & Diaz, 2008; van der Hoorn, 2008; Shi & Xu, 2009; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011; Szewińska *et al.*, 2016). Los VPEs contienen residuos de Cys en el sitio activo y sitios de corte seleccionados en residuos de Asn y ocasionalmente, residuos de Asp (Kinoshita *et al.*, 1999; Morimoto & van der Hoorn, 2016).

En general, los VPEs son relevantes en varios procesos biológicos como la defensa contra insectos (Yamada *et al.*, 2020) o el procesamiento de enzimas hidrolíticas (Hatsugai *et al.*, 2006, 2015; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011).

Los VPEs vegetales se distribuyen ampliamente en muchos tipos de plantas (Yamada *et al.*, 2020). Por ejemplo, en *A. thaliana* L. se han identificado hasta 4 isoformas funcionales: α -VPE, β -VPE, γ -VPE y δ -VPE (Kinoshita *et al.*, 1995; Gruis *et al.*, 2002; Hatsugai *et al.*, 2015; Vorster *et al.*, 2019; Yamada *et al.*, 2020) (Figura 1.15). La isoforma funcional β -VPE, se expresa específicamente en el embrión, endospermo y polen, con un papel importante en la maduración del polen y en la movilización de proteínas de almacenamiento de semillas (Kinoshita *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2018a) (Figura 1.15). Las isoformas α -VPE y γ -VPE hacen referencia a un tipo vegetativo (Kinoshita *et al.*, 1995, 1999), que se expresa en embriones en *A. thaliana* L. y participa en el procesamiento de proteínas de almacenamiento de semillas (Kanoshita *et al.*, 1995, 1999), que se expresa en embriones en *A. thaliana* L. y participa en el procesamiento de proteínas de almacenamiento de semillas (La sectiona de almacenamiento de semillas (La sectiona de almacenamiento de semillas de almacenamiento de proteínas de almacenamiento de semillas con β -VPE (Figura 1.15). En angiospermas, la



isoforma γ -VPE aumenta en tejidos sometidos a PCD inducida por estrés biótico y abiótico (Figura 1.15) (Yamada *et al.*, 2020). La isoforma δ -VPE todavía no está caracterizada en profundidad, pero se sabe que una de sus funciones importantes es el desarrollo de la cubierta de la semilla y la emergencia de la radícula (Yamada *et al.*, 2020).



Figura 1.15. Funciones de los enzimas de procesamiento vacuolar (VPEs) en el ciclo de vida de *A. thaliana* L. Los círculos centrales muestran los niveles de expresión de α -VPE, β -VPE, γ -VPE y δ -VPE (Yamada *et al.*, 2020)

1.3.2 PROTEASAS DE SERINA HIDROLASA (SHs)

La clase de las serinas hidrolasas (SHs) es la clase más grande de proteasas en plantas. Se divide en 14 familias e incluye más de 200 miembros (van der Hoorn, 2008). La mayoría de estos enzimas tienen un mecanismo catalítico similar al de CysProt, caracterizado por presentar una tríada catalítica compuesta por el residuo Ser (nucleófilo del mecanismo catalítico) (Liu *et al.*, 1999; Kidd *et al.*, 2001; Gershater *et al.*, 2007) por el residuo His y por Asp, aunque también se han descrito diferentes tríadas como His-Ser-His o Ser-His-Glu (Hedstrom, 2002). Los SHs están involucrados en una amplia gama de procesos fisiológicos (Dolui *et al.*, 2020) como PCD, desarrollo de semillas, regulación de la densidad estomática, respuestas inmunes, metabolismo secundario, procesos de



desintoxicación y un papel crucial durante la maduración y germinación de las semillas (Figura 1.16) (Gruis *et al.*, 2004; Kaschani *et al.*, 2012; Tan-Wilson & Wilson, 2012; Dolui *et al.*, 2020).

Se sabe que los efectos tóxicos de los agroquímicos herbicidas (por ejemplo, anilofos, un herbicida inhbidor de la elongación de los ácidos grasos, actual grupo 15), fungicidas e insecticidas organofosforados (OP), carbamatos, fosfonatos y sus derivados a menudo no pueden correlacionarse completamente con la toxicidad causada en la diana objetivo, lo que indica que puede haber objetivos secundarios toxicológicamente relevantes, aunque estos efectos están poco investigados en mamíferos (Nomura & Casida, 2011; Kaschani *et al.*, 2012) y mucho menos en plantas. Para la identificación de estos objetivos secundarios, se ha estudiado la familia de las SHs utilizando técnicas proteómicas (Evans & Cravatt, 2006; Li *et al.*, 2007; Kaschani *et al.*, 2012).



Figura 1.16. Clasificación de 55 proteínas identificadas como SHs según su proceso biológico celular. Las SHs han sido clasificadas según distintas categorías de ontología génica (Dolui *et al.*, 2020).

1.3.3 ACTIVITY-BASED PROTEIN PROFILING (ABPP) EN PLANTAS

Analizar las funciones de miles de proteínas codificadas por los genomas vegetales es fundamental para avanzar en su conocimiento y comprender la complejidad de la proteómica en plantas. El perfil de actividades proteasas en plantas puede ser estudiado utilizando sondas basadas en actividad y se conoce como activity-based protein profiling (ABPP). Se trata de una poderosa



tecnología proteómica funcional que ayuda a mostrar las actividades de las proteínas en los proteomas (Morimoto & van der Hoorn, 2016) y se basa en el uso de pequeñas sondas de moléculas reactivas que marcan solo proteínas funcionalmente activas y cuyos sitios catalíticos están disponibles (Figura 1.17.A) (Cravatt *et al.*, 2008). La reacción funciona de una manera dependiente de la actividad, resultando en un enlace estable, covalente e irreversible entre la proteína y la sonda (Kołodziejek & van der Hoorn, 2010). Las proteínas marcadas pueden detectarse e identificarse en geles de proteínas (SDS-PAGE) y visualizarse en un escáner de fluorescencia (figura 1.17.B), aunque mediante espectrometría de masas también pueden purificarse e identificarse proteínas.



Figura 1.17. A) Principio de ABPP. Marcaje específico del proteoma activo con sondas. **B)** Detección de proteínas marcadas. Los proteomas marcados con sondas fluorescentes se separan en geles de proteínas y se escanean con geles de fluorescencia (Morimoto & van der Hoorn, 2016).

En la técnica ABPP se encuentran tres elementos funcionales:

 Cabeza o *warhead*, y forma el grupo reactivo basado en un inhibidor irreversible y específico para cada tipo de enzima. El *warhead* actúa como un sustrato electrofílico para formar un enlace covalente, estable e irreversible con el residuo del sitio activo de la proteína objetivo (Figura 1.18) (Baruch *et al.*, 2004). El grupo reactivo puede tener diferentes quimiotipos, que pueden ser (Figura 1.18):



• Inhibidores *mechanism-based*. La mayoría de las sondas utilizadas son de este tipo y se basan en inhibidores covalentes que marcan el sitio activo de una manera dependiente de la actividad (Cravatt *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2010; Niphakis & Cravatt, 2014).

• <u>Sondas de foto-afinidad o marcaje por foto-afinidad (PAL).</u> Este tipo se basa en el uso de una sonda química que puede unirse covalentemente al sitio activo en respuesta a la activación por luz. Esto es posible mediante la incorporación de un grupo fotorreactivo que se une de forma reversible (Sadakane & Hatanaka, 2006).

• Sondas suicide substrate. Este tipo de sondas que actúan como sustrato, son activadas por enzimas, dando como resultado un intermediario hiperreactivo que reacciona rápidamente con el nucleófilo dentro del enzima (Morimoto & van der Hoorn, 2016).

• <u>Sondas unbiased reactivity</u>. Estas sondas consisten únicamente en un grupo reactivo que carece de un grupo de unión y que marca residuos intrínsecamente hiperreactivos sin selectividad para ciertas clases de enzimas (Morimoto & van der Hoorn, 2016).

- 2. El reporter o tag, que permite una detección rápida y una purificación sencilla (Cravatt et al., 2008). Hay diferentes tipos, el primero denominado affinity tag está formado por una biotina o destiobiotina, que es indispensable para el aislamiento de las proteínas objetivo. El segundo tipo es un reporter fluorescente, que puede ser un compuesto químico de tipo bodipy, rodamina o cianina Cy2/ 3/5), que permite una mejor visualización y cuantificación de las señales de marcaje. Los últimos tipos son un reporter radioactivo o de tipo químico (azida o un mini reporter de alquino) que se puede acoplar a un affinity o fluorescente tag usando "química de clic" (Figura 1.18) (Morimoto & van der Hoorn, 2016).
- 3. El último elemento es el *linker*, una cadena de hidrocarburos diseñada para conectar el warhead y el *reporter* o *tag*, y las mantiene a una distancia adecuada (Figura 1.18).





Figura 1.18. Elementos funcionales de la técnica ABPP: *warhead* incluyendo cuatro tipos de sonda, el *linker* y 4 tipos de *reporter tag* (Morimoto & van der Hoorn, 2016).

La primera sonda introducida investigación con plantas fue DCG-04, enfocada al marcaje de PLCPs en los proteomas de las hojas de la planta modelo *A. thaliana* L. (Van Der Hoorn *et al.*, 2004). Desde entonces se ha incrementado considerablemente el uso de ABPP en estudios con plantas sobre la actividad de cientos de proteínas, ya que ABPP es una herramienta de información poderosa, única, robusta y que proporciona un alto contenido de información. Esta técnica se puede utilizar para comparar actividades de diferentes proteomas (ABPP comparativa), y así poder ver, por ejemplo, el efecto de un tratamiento relacionado con estreses bióticos y abióticos sobre las actividades proteolíticas. Por otro lado, en la ABPP competitiva se identifican las posibles bandas de proteínas mediante la incubación del extracto con inhibidores específicos (Kaschani *et al.*, 2012).

A través de la técnica ABPP comparativa se estudió el efecto del glifosato y los inhibidores de ALS sobre el perfil proteolítico de raíces de guisante. En las plantas tratadas con ambos tipos de herbicidas se había descrito un incremento del pool de aminoácidos libres y un descenso del contenido soluble, con lo que era esperable detectar un incremento generalizado de las actividades proteolíticas (Zulet *et al.*, 2013). Se detectaron cambios en la mayoría de las actividades proteasas, pero algunas fueron inducidas, como la actividad PLCPs, mientras que otras fueron inhibidas; VPEs, CysProt y metacaspasas (Zulet *et al.*, 2013). Sin embargo, es de destacar que los cambios en cada proteasa en particular fueron comunes tras ambos tipos de tratamientos herbicidas (Zulet *et al.*, 2013).



1.4 RESISTENCIAS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA A HERBICIDAS EN MALAS HIERBAS

La enorme presión de selección que se ejerce sobre las poblaciones de malas hierbas con el uso continuado de herbicidas con el mismo de mecanismo de acción, ha dado lugar a la evolución de resistencias (Beckie, 2006; Yu *et al.*, 2010). La resistencia es la capacidad heredable de una planta de una determinada especie, para sobrevivir y reproducirse después de recibir un tratamiento herbicida, que, en condiciones normales, a una determinada dosis para esa especie la hubiese controlado.



Figura 1.19. Evolución de la resistencia a los herbicidas en una población de malas hierbas.

La resistencia a los herbicidas es el resultado de la selección natural, de mutaciones que ocurren naturalmente y de procesos evolutivos (Roma-Burgos *et al.*, 2019). Los individuos o biotipos resistentes a los herbicidas están presentes de forma natural dentro de la población de malas hierbas, pero a frecuencias muy bajas. Después de aplicar herbicida, estos individuos resistentes sobreviven, se reproducen y en años posteriores, y si se siguen usando herbicidas con el mismo mecanismo de acción, dan lugar a poblaciones de malas hierbas resistentes (Figura 1.19).

Además, como problema añadido, nos encontramos con algunas poblaciones de malas hierbas con resistencia múltiple y con resistencia cruzada. El fenómeno de la resistencia múltiple se define como la expresión (dentro de individuos o poblaciones) de más de un mecanismo de resistencia; una planta resistente puede poseer de dos a muchos mecanismos de resistencia distintos y puede presentar resistencia a algunos o muchos herbicidas (Powles & Preston, 1995). La resistencia cruzada hace referencia a biotipos resistentes a dos o más herbicidas por un único mecanismo de resistencia (De Prado *et al.*, 2000).



La resistencia herbicida es un proceso evolutivo y su dinámica e impacto son dependientes de una serie de factores clasificados como factores antropológicos y factores biológicos. Los factores antropológicos están relacionados principalmente con las prácticas agronómicas seleccionadas para el manejo de las malas hierbas (Figura 1.20). Los factores biológicos por su parte, hacen referencia a la ecología, genética y otras características relacionadas con la reproducción de la mala hierba (Figura 1.20). Por ejemplo, el carácter anual/perenne de la mala hierba: las resistencias son más frecuentes en anuales por su dependencia de la reproducción sexual y menor tiempo de generación, lo que resulta en una mayor variación genética y en una evolución de la resistencia más rápida (Moss *et al.*, 2019). También es de importancia el carácter autógamo/alógamo, obligado/facultativo (la variabilidad de la especie es mucho mayor en alógamas, y el flujo de genes vía polen contribuye a la expansión de la resistencia) y la elevada producción de semillas (puesto que conlleva mayor número de cruzamientos).



FACTORES ANTROPOLÓGICOS

PRÁCTICAS AGRONÓMICAS

- Elección del herbicida (estructura química de cada principio activo, acción residual, analogía con otros herbicidas).
- Frecuencia y dosis en campo.
- Factores operacionales: maquinaria, habilidades del operador.
- Factores del agro-ecosistema; rotación de cultivos, prácticas no químicas y condiciones medioambientales.

(Powles & Yu, 2010)



FACTORES BIOLÓGICOS

- Ecología.
- Genética (frecuencia, número, dominancia y fitness cost de los genes de resistencia pre-existentes a la aplicación de un herbicida).
- Capacidad de producción y de movimiento de las semillas y polen, longevidad en el banco del suelo, % de autogamia y alogamia.

(Jasieniuk et al., 1996; Busi et al., 2008; Powles &Yu, 2010)

Figura 1.20. Factores antropológicos y biológicos de los que depende la resistencia a los herbicidas.



A continuación, se muestra en la figura 1.21 una simplificación de los mecanismos de resistencia y su vinculación con los pasos de la acción herbicida. En la parte superior de la figura aparecen representados los pasos consecutivos de la acción herbicida para que ejerza efectos fitotóxicos sobre una planta. Después del tratamiento con el herbicida, este debe ser absorbido, penetrar en la planta, translocarse (o no, si se trata de un herbicida de contacto) y alcanzar la diana celular del mismo, a una cierta concentración. Hasta aquí el proceso puede verse alterado en caso de que la planta tenga capacidad de secuestrarlo y/o metabolizarlo a compuestos no tóxicos. Si el herbicida alcanza la diana a suficiente concentración ejercerá su efecto inhibitorio, lo que tendrá una serie de consecuencias metabólicas y fisiológicas (modo de acción) que conducirán a la muerte de la planta o a la reducción de su crecimiento (Délye *et al.*, 2013).



Figura 1.21. Resumen de los mecanismos de resistencia *target-site* y *non-target site*. En la figura aparecen resumidos los pasos consecutivos de la acción herbicida. En letras mayúsculas y negrita (A, B y D) se muestran los cambios en los procesos que intervienen en la acción herbicida (*non-target site*) y en letras mayúsculas en azul (E y F) se muestran los mecanismos que modifican el sitio de acción (*target-site*). Los números del 1 al 5 indican los pasos de la acción herbicida (modificado de (Délye *et al.*, 2013).



La resistencia a un herbicida supone que la planta ha absorbido el herbicida, pero éste no llega a tener las consecuencias tóxicas esperadas en esa especie. Los mecanismos fisiológicos que pueden proporcionar esta resistencia se clasifican en dos grupos: mecanismos *non-target site resistance (NTSR*, aquellos que no están basados en la diana) y mecanismos *target-site resistance (TSR*, basados en la diana) (Powles & Preston, 1995; Powles & Yu, 2010; Délye *et al.*, 2013; Tétard-Jones *et al.*, 2018). Los mecanismos *TSR*, implican cambios en el sitio de acción o diana del herbicida y los mecanismos *NTSR*, implican modificaciones de otros procesos que intervienen en la acción del herbicida (absorción, transporte o metabolización).

1.4.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA NON-TARGET SITE (NTSR)

Este mecanismo de resistencia puede ser debido a uno o a la combinación de diferentes mecanismos que dificultan que el herbicida alcance la proteína objetivo, o minimizan la cantidad de herbicida activo que alcanza el *target* (Figura 1.21). En general son poligénicos, inespecíficos, poco conocidos en comparación con los mecanismos basados en la diana (Délye, 2012) y son independientes de los mecanismos de acción (Sabbadin *et al.*, 2017), aunque su evolución depende del tipo de herbicida, uso e intensidad, de la diversidad genética de las plantas (Yu & Powles, 2014) y de las condiciones ambientales (Ramesh *et al.*, 2017; Matzrafi, 2019). Se sospecha que los mecanismos *NTSR* se desarrollan gradualmente en respuesta a estreses bióticos y abióticos, lo que les permite adaptarse a las condiciones de crecimiento (Ou *et al.*, 2018).

Además, un mecanismo *NTSR* puede afectar más fácilmente a más de un grupo de herbicidas, confiriendo resistencia cruzada. Sin embargo, sus determinantes genéticos siguen siendo poco conocidos. Por ello, seguir investigándolos desde un enfoque molecular, con herramientas como la transcriptómica, pueden ayudar a su detección antes y después de aplicar herbicida (Délye, 2012).

Los herbicidas son absorbidos por las células vegetales ya sea a través de las raíces (con herbicidas aplicados al suelo) o de las hojas (herbicidas foliares). Esta absorción dependerá de la cantidad de herbicida que se adhiera a la superficie vegetal y de las propiedades físicas y químicas de la cutícula foliar. Las ceras epicuticulares que forman la cutícula pueden determinar su comportamiento hidrófilo, controlando así la adhesión del herbicida. Mediante la reducción en la penetración o por los procesos de absorción/translocación alterada se



producen cambios en los procesos que intervienen en la acción del herbicida y pueden conducir a la resistencia (Powles & Yu, 2010). La resistencia asociada a la absorción alterada o reducida de herbicidas foliares, se debe más a estructuras foliares alteradas que a mecanismos de naturaleza bioquímica (Rigon *et al.*, 2020). En general, es un proceso poco estudiado (Délye, 2012), y apenas se conocen casos de resistencia asociada exclusivamente a la menor absorción (Rigon *et al.*, 2020).

En muchas situaciones, se ha encontrado que el mecanismo *NTSR* de absorción alterada, coexiste con los mecanismos *NTSR* de translocación reducida o metabolismo (Rigon *et al.*, 2020). Estudios bioquímicos realizados por Vila-Aiub *et al.*, 2012, en plantas de *Sorghum halepense* demostraron que dentro de una sola planta podían encontrarse varios mecanismos *NTSR*, como la absorción reducida por parte de las hojas (Figura 1.21.A) y la translocación reducida de glifosato (Figura 1.21.B). En estudios con *Lolium rigidum* también se observó una reducción de la translocación de glifosato, quedando retenido dentro de la punta de las hojas tratadas en plantas resistentes (Wakelin *et al.*, 2004). Esta translocación alterada implica una restricción en el movimiento del herbicida dentro de la planta y/o su compartimentación (Figura 1.21.B), quedando secuestrado en la pared celular o en la vacuola (Délye, 2012).

También encontramos como mecanismo *NTSR*, la degradación metabólica del herbicida (Figura 1.21.C), que hace referencia a un conjunto de procesos biológicos complejos que transforman las moléculas fitotóxicas en compuestos inocuos permitiendo a las plantas resistentes evitar daños por la acción herbicida, Este tipo es el principal mecanismo *NTSR* en malas hierbas resistentes, y puede proporcionar la capacidad de metabolizar diversas moléculas con el mismo o diferentes modos de acción (Jugulam & Shyam, 2019).

En general, el proceso de metabolización sigue tres fases diferenciadas: conversión, conjugación y deposición (Figura 1.22). En la primera fase, el herbicida es transformado en metabolitos relativamente hidrofílicos con fitotoxicidad reducida, mediante la oxidación, hidroxilación, desaminación o desalquilación. Los principales enzimas que pueden estar implicados en este tipo de reacciones son: las citocromo P450 monooxigenasas (P450) (Gaines *et al.*, 2020), esterasas (Feng *et al.*, 1995), el enzima aldo-ceto reductasa (AKR) (Pan *et al.*, 2019), y el enzima aril acilamidasa (Hirase & Hoagland, 2006), entre otros. El herbicida o su producto obtenido en la fase I, puede ser conjugado



(fase II) con metabolitos como glutation, azúcares o aminoácidos. Algunos de los enzimas que pueden participar en esta fase II, son: glutation S-transferasas (GST), glicosil transferasas (GT), aminoácidos transferasas (AT) o malonil transferasas (MT) (Rigon *et al.*, 2020). Finalmente, en la fase III los metabolitos pueden ser compartimentalizados (vacuola), o exportados a la pared celulares (Yuan *et al.*, 2007). Esta última fase puede estar catalizada por distintos transportadores celulares entre los que destacan los transportadores ABC (*cassette* de unión a ATP), localizados en el tonoplasto (Rigon *et al.*, 2020). Los metabolitos obtenidos a partir de los herbicidas por una o varias de las fases descritas, normalmente tienen una movilidad muy baja y pierden cualquier actividad inhibidora, y esto es lo que proporciona resistencia a las plantas capaces de metabolizarlos.



Figura 1.22. Resumen del mecanismo *NTSR* de degradación metabólica del herbicida en una célula vegetal. Los herbicidas normalmente se degradan a través de las tres fases del metabolismo; en la fase l se introducen pequeños grupos funcionales en la estructura del ingrediente activo, en la fase II la molécula herbicida es transformada en un metabolito más hidrofólico usualmente vía oxidativa a través de la acción de varios tipos de transferasas, y en la fase III los metabolitos conjugados se mueven a la vacuola (o la pared celular) para la compartimentación y una mayor degradación. El transporte activo a veces requiere transportadores ABC (u otros tipos de transportadores) para mover los metabolitos del herbicida a través de las membranas (Rigon *et al.*, 2020).

Como último mecanismo *NTSR*, está la neutralización, compensación o protección de los efectos provocados por el herbicida (Figura 1.21.D). En algunas situaciones, la acción del herbicida sobre la diana tiene como



consecuencia la generación de ROS, y se han encontrado plantas resistentes capaces de neutralizarlos protegiendo a las células y dando tiempo a la planta resistente a degradar el herbicida (Délye, 2012).

1.4.1.1. METABOLISMO DEL GLUTATION EN LA RESISTENCIA A HERBICIDAS

Los enzimas GSTs (EC.2.5.1.18) son una familia de enzimas presente en plantas y también en organismos como bacterias y hongos (Frova, 2006; Perperopoulou *et al.*, 2018) cuya función principal es la defensa de la planta en respuesta a estreses abióticos desempeñando un papel crucial en el metabolismo de los herbicidas en las malas hierbas (Miteva *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2007; Kawahigashi, 2009; Katerova & Miteva, 2010).

Los GSTs catalizan la desintoxicación directa de los xenobióticos a través de su conjugación con GSH (Dixon *et al.*, 2002, 2010; Anderson & Davis, 2004). En el caso de la desintoxicación de los herbicidas, no todos los herbicidas dentro de un grupo químico determinado son igualmente susceptibles a la conjugación mediada por GSTs, sino que depende de la estructura química del herbicida. Además, estas reacciones de conjugación pueden ocurrir directamente con el herbicida activo o después de la actividad de otros enzimas, como P450. Las GSTs en plantas fueron identificadas por primera vez en maíz en el año 1970, caracterizándose el mecanismo presente de detoxificación del herbicida atrazina (Shimabukuro *et al.*, 1971). Se conocen por establecer conjugados con GSH las triazinas (Shimabukuro *et al.*, 1971; Hatton *et al.*, 1996) y las cloroacetamidas, entre otros. Recientemente, se ha descrito una GST (AmGSTF1), capaz de catalizar la acción sobre múltiples herbicidas: clortolurón, alacloro y atrazina (Cummins *et al.*, 2013).

Esta conjugación enzimática se ha descrito como un tipo de mecanismo *NTSR* de metabolismo mejorado (Nematalla *et al.*, 2008; Katerova & Miteva, 2010). En el caso del glifosato, las modificaciones en el contenido de GSH y/o en la actividad GST tras tratamientos con este herbicida (Vivancos *et al.*, 2011; Piasecki *et al.*, 2019) podrían mostrar que está teniendo lugar una compartimentación y/o degradación del herbicida, si bien dicha posibilidad no ha sido abordada en profundidad en la fisiología de las plantas resistentes a este tipo de herbicida. En el caso de los inhibidores de ALS, la mayoría de las



resistencias *NTSR* involucran enzimas de la familia de citocromos P450 (Jugulam & Shyam, 2019), pero también se ha descrito la implicación de los GSTs y de los transportadores ABC (Yang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018b).

1.4.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA TARGET-SITE (TSR)

Los mecanismos *TSR* basados en la modificación de la diana son los que se encuentran con mayor frecuencia en las malas hierbas resistentes (Kohrt *et al.*, 2017). Pueden ser de dos tipos: el primero, la sobreexpresión de la diana (Figura 1.21.E), que se puede producir por un incremento en el número de copias del gen (amplificación génica) o por cambios en la regulación a nivel transcripcional. La sobreexpresión de la diana implica una respuesta mucho menor a una dosis concreta del herbicida, como si se hubiera diluído. El mecanismo de amplificación génica se ha comprobado que es heredable (Powles & Yu, 2010) y que no conlleva costes asociados en la aptitud biológica (Vila-Aiub *et al.*, 2014). Fue identificado por primera vez en biotipos resistentes al glifosato en *A. palmeri* (Gaines *et al.*, 2010) y en los últimos años, se han registrado numerosos casos de este mecanismo en otras especies.

Y el segundo tipo de mecanismo *TSR*; es la modificación genética que conlleva cambios estructurales en la diana haciéndola menos sensible o insensible al herbicida (Figura 1.21.F). Estas modificaciones, son mutaciones genéticas puntuales que confieren un cambio de aminoácidos en el enzima objetivo que evita la unión del herbicida. Las mutaciones pueden dar lugar a diferentes niveles de reducción de la sensibilidad a los herbicidas a nivel de proteína (Délye *et al.*, 2013).

1.4.3 RESISTENCIAS, UN PROBLEMA GLOBAL

Entre los años 1950 y 1970, el uso de herbicidas fue clave como instrumento fundamental para controlar las malas hierbas, pero a pesar del éxito inicial, no sólo no se han erradicado, sino que, debido a la aplicación constante de los mismos herbicidas, algunas poblaciones desarrollaron resistencias. La primera población descrita, data del año 1970 y fue de la especie *Senecio vulgaris*, con una resistencia a los inhibidores de PS II (atrazina y simazina) (Ryan, 1970).

Algunas especies de malas hierbas parecen mostrar mayor facilidad para desarrollar resistencia, según los datos de poblaciones resistentes que se



describen: *Lolium rigidum, Poa annua, Alopecurus myosuroides, Echinochloa colona, Eleusine indica, Amaranthus* spp. (Vrbničanin *et al.*, 2017). De entre ellas, *Lolium rigidum*, ha mostrado el mayor número de casos de resistencia a herbicidas de diferentes mecanismos de acción. En *Amaranthus palmeri*, nuestra especie objeto de estudio, se han registrado resistencias a 8 mecanismos de acción herbicida diferentes (Heap, 2021).

En el año 1980, solo 50 especies de malas hierbas mostraron al menos una población con resistencia, mientras que hoy en día aparecen en 152 especies dicotiledóneas y 111 especies monocotiledóneas. Las malas hierbas han desarrollado resistencia a 23 de los 26 sitios de acción de herbicidas conocidos y a 164 herbicidas diferentes. Se han descrito también malas hierbas resistentes a los herbicidas en 94 cultivos en 71 países. En el caso de España, se han identificado hasta 43 especies de malas hierbas en las que al menos se ha identificado una población con resistencia a herbicidas (Heap, 2021).

Los grupos de herbicidas en los que se han descrito más casos de resistencias son los inhibidores de ALS (grupo 2), inhibidores de la fotosíntesis (grupos 5 y 6) y los inhibidores de la ACCasa (grupo 1). El caso más preocupante es el de los inhibidores de ALS (Figura 1.23). Desde su introducción en el mercado en el año 1982 en EE.UU. (Shaner, 1999), han sido utilizados ampliamente en muchos cultivos debido a su alta potencia, bajo costo, baja toxicidad y flexibilidad de uso (Shaner, 1999). La llegada del primer caso de resistencia a estos herbicidas, fue tan solo 6 años después, ya que entre 1988 y 1989 se encontraron poblaciones de *Kochia scoparia* y *Salsola iberica* resistentes al clorsulfuron (Shaner, 1999). A partir de entonces, el elevado uso de estos herbicidas ha dado lugar a una evolución exponencial de genotipos resistentes.





Figura 1.23. Aumento cronológico de la resistencia a numerosos sitios de acción de herbicidas. Las letras se refieren al código de la WSSA (Heap, 2021).

Cabe destacar, el incremento lento pero constante de resistencias al glifosato (grupo 9) (Figura 1.23). Cuando se presentó en 1974, era un herbicida relativamente caro y tenía un uso muy limitado, pero en 1996, a partir de la introducción de los cultivos resistentes al glifosato, se empezó a usar como producto químico de post-emergencia, lo que llevó asociado el aumento de las malas hierbas resistentes por presión de selección (Nandula, 2010).

1.4.3.1 RESISTENCIAS MÚLTIPLES A HERBICIDAS

En agricultura, la dependencia de herbicidas que afecten a un mismo mecanismo de acción, sin alternar con otros mecanismos es la principal causa de la selección de resistencias simples. Si después de tener este problema se sustituye o se añaden además productos con otros mecanismos, pero también de forma intensiva, es cuando pueden aparecer las resistencias múltiples, de manera que, en la misma planta, o población se encuentran varios mecanismos de resistencia.

Si las resistencias simples suponen un motivo de preocupación, el fenómeno de las resistencias múltiples, es un problema más grave que incrementa los costes y provoca grandes pérdidas económicas en la agricultura (Powles & Preston, 1995). Conocer si una población de malas hierbas presenta



mecanismos de resistencia *NTSR* o *TSR*, es crucial para el desarrollo de estrategias de manejo de las poblaciones con resistencia múltiple (Larran, 2018). La mayoría de biotipos con resistencia múltiple descritos, presentan mecanismos de resistencia *TSR*, pero también hay descripciones con diferentes mecanismos *NTSR*. La detección de estos mecanismos, requiere de una mejor comprensión de los mismos, por ello es necesario seguir investigándolos.

Actualmente, se han descrito alrededor de 60 especies de malas hierbas en las que se ha encontrado al menos una población con resistencia a dos sitios de acción. Pero incluso se ha identificado una especie con poblaciones en las que al menos un individuo presenta resistencia a 7 mecanismos de acción distintos (Heap, 2021) (Figura 1.24).



Figura 1.24. Evolución cronológica del número de especies de malas hierbas en las que al menos una población ha desarrollado resistencia múltiple a más de un sitio de acción (Heap, 2021).

La rápida evolución de mecanismos de resistencia múltiple en estas últimas décadas, tiene un impacto tanto en la producción de cultivos como en el medio ambiente, y representa un gran desafío para los agricultores, los científicos y el sector de la agroindustria, ya que es un verdadero reto para la seguridad alimentaria global (Délye *et al.*, 2013; Tétard-Jones *et al.*, 2018). Este problema ha obligado a mejorar los conocimientos de la biología de las distintas especies de malas hierbas (Sans & Fernández-Quintanilla, 1997) y a un mejor conocimiento de los herbicidas. Pero si la tendencia de uso sigue basándose en



aplicar aquellos herbicidas que pertenecen a los grupos de principios activos para los que ha habido una mayor evolución de la resistencia, el número de biotipos con resistencia múltiple seguirá aumentando de manera drásticamente exponencial (Larran, 2018).

1.4.3.2 HERRAMIENTAS PARA LA GESTIÓN DE LAS RESISTENCIAS

La búsqueda de soluciones efectivas al problema de las resistencias (simples y múltiples), requiere de estrategias basadas en el manejo integrado, ya que por sí solo ningún método es capaz de controlarlas adecuadamente y de forma sostenible (Storrie, 2006). Estas prácticas de control integrado incorporan métodos culturales, mecánicos y químicos, que si se aplican de forma conjunta a corto plazo reducen la presión de selección y disminuyen el uso de los herbicidas, y a largo plazo las ventajas son mayores, reduciendo la severidad de las malas hierbas resistentes e incrementando la calidad medioambiental (Mortensen *et al.*, 2012).

Estos métodos también deben basarse en la fenología de las malas hierbas, porque permitirá desarrollar métodos de control más específicos al estimar con precisión el momento adecuado para su tratamiento y los efectos de la competencia de las malas hierbas en el rendimiento de los cultivos (Ghersa & Holt, 1995). Dentro de las prácticas relacionadas con el control químico, la diversificación de los principios activos es clave (Tuesca *et al.*, 2016). Se recomienda la rotación de herbicidas con distinto mecanismo de acción y el uso de dosis recomendadas (Larran, 2018) para conseguir que los alelos de resistencia disminuyan en frecuencia al eliminar la presión de selección que los favorece (Meagher *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha desarrollado una herramienta muy útil para evaluar y cuantificar el riesgo de resistencia que plantea el uso de un herbicida específico en una situación determinada. Dicha herramienta es una matriz de riesgo basada en el supuesto de que la evolución de la resistencia a los herbicidas depende de manera crítica de la interacción de tres factores: las prácticas de manejo (incluyendo los tratamientos químicos), el riesgo inherente del herbicida (específico de ese compuesto) y el riesgo inherente de las especies de malas hierbas de las que se trata (Figura 1.25) (Vencill *et al.*, 2014; Moss, 2017; Moss *et al.*, 2019).





Figura 1.25. Componentes que se incluyen en cada uno de los tres principales factores de riesgo de la resistencia a herbicidas (Moss *et al.*, 2019).

Esta matriz de riesgo presenta un enfoque cuantitativo para la evaluación del riesgo, centrando la atención en los recursos necesarios para desarrollar estrategias que reduzcan ese riesgo y para monitorizar la situación de resistencia posterior a la autorización del herbicida (Moss et al., 2019). Los ingredientes activos de los herbicidas y las principales especies de malas hierbas se clasifican en una escala de riesgo de resistencia bajo a alto, de esta forma, la matriz produce evaluaciones realistas de los riesgos de resistencia a herbicidas asociados a cuatro escenarios; alto riesgo del herbicida y alto riesgo de la mala hierba, alto riesgo del herbicida y bajo de la mala hierba, medio riesgo en ambos factores y mezcla de herbicidas en la que hay alto y bajo riesgo, unido a un alto riesgo de la especie de mala hierba (Moss et al., 2019). Todos los datos necesarios para las puntuaciones de riesgo, se basan en artículos científicos ya publicados, en la información del Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas (HRAC) y en la Base de Datos Internacional de Malas Hierbas Resistentes a Herbicidas (HEAP). El objetivo es armonizar la evaluación del riesgo en toda Europa y que sirva de referencia en otras partes del mundo donde el uso extensivo de herbicidas es relativamente reciente, y en donde actualmente el conocimiento y la experiencia sobre las resistencias, son limitados (Moss et al., 2019).



1.4.4 RESISTENCIA A GLIFOSATO E INHIBIDORES DE ALS

1.4.4.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA A GLIFOSATO

Desde la comercialización de los cultivos Roundup Ready de soja (Glycine max (L.) Merr.), maíz (Zea mays L.), y algodón (Gossypium hirsutum L.) en el año 1996, el uso de glifosato como herbicida selectivo en post-emergencia, domina prácticamente todo el mercado de los herbicidas (Nandula, 2010; Duke, 2018). Frente a esta excesiva dependencia generalizada del glifosato, el uso de otros métodos de control de malas hierbas quedó relegado a un segundo plano, dando como resultado una alta presión de selección que condujo a la evolución de malas hierbas resistentes a este herbicida (Küpper et al., 2017). En 1996 se identificó en Australia una población de Lolium rigidum como el primer caso de resistencia a glifosato, aunque en este caso no estaba relacionado con los cultivos resistentes al glifosato, sino que había desarrollado resistencia después de 15 años de tratamientos repetidos con glifosato (Powles et al., 1998; Pratley et al., 1999). Desde entonces, se han descrito en todo el mundo cientos de poblaciones resistentes a glifosato, pertenecientes en la actualidad a un total de 53 especies (Figura 1.26 y 1.27) (Heap, 2021) y debidas en gran parte al incremento en el uso de glifosato como herbicida selectivo sobre cultivos MG (Heap & Duke, 2018). De entre estas especies, las más problemáticas son: Amaranthus palmeri, Amaranthus tuberculatus, Ambrosia artemisiifolia, Ambrosia trífida, Conyza canadensis, Lolium rigidum, Lolium perenne ssp. multiflorum y Kochia scoparia (Heap, 2021).

Los mecanismos por los que estas poblaciones de malas hierbas han desarrollado resistencia a glifosato son diversos. Básicamente son los descritos en las secciones 1.3.1 y 1.3.2: mecanismos *non-target site (NTSR)* y mecanismos *target-site (TSR)*. Es importante puntualizar que ambos pueden coexistir dentro de un individuo o población (Bostamam *et al.*, 2012; Morran *et al.*, 2018). Identificarlos permite comprender mejor el modo de acción del herbicida, desarrollar métodos para su detección y tomar conciencia sobre la rápida propagación de la resistencia entre las distintas especies de malas hierbas (Shaner *et al.*, 2012).





Figura 1.26. Evolución del número de especies de malas hierbas en las que al menos una población ha desarrollado resistencia a glifosato (Heap, 2021).



Figura 1.27. Mapa de distribución global de las especies de malas hierbas en las que al menos una población ha desarrollado resistencia a glifosato (Heap, 2021).

1.4.4.1.1 RESISTENCIA NON-TARGET SITE (NTSR) A GLIFOSATO

La comprensión general de los mecanismos *NTSR* al glifosato todavía están en pleno desarrollo, pero se los considera el tipo predominante de resistencia a los grupos de herbicidas 1 y 9 (Délye *et al.*, 2013). Además, se sabe que podrían aportar información esencial acerca de la evolución de los mecanismos de resistencia en las malas hierbas (Yuan *et al.*, 2007).





Figura 1.28. Resumen de la resistencia NTSR (Rigon et al., 2020).

Estos mecanismos involucran diferentes modos de exclusión del herbicida, y pueden estar basados en 1) una disminución en su absorción, 2) alteración de su translocación, basados y/o en el secuestro, 3) desarrollo de una rápida necrosis del follaje tratado (fenómeno *Phoenix*) o 4) metabolizando la degradación del ingrediente activo herbicida (Figura 1.28).

Se describen con más detalle algunos de ellos a continuación:

A) ABSORCIÓN, TRANSLOCACIÓN Y SECUESTRO DEL HERBICIDA

La alteración en la translocación y/o absorción de glifosato, es el principal mecanismo *NTSR* que ha sido descrito para el herbicida glifosato (Powles & Yu, 2010). Este potente herbicida es absorbido por las plantas a través de las hojas y se transloca en la sección longitudinal de tallos y raíces por vía floemática (Sprankle *et al.*, 1975; Amrhein *et al.*, 1980).

Algunos biotipos de malas hierbas resistentes a glifosato han sido descritos con este mecanismo: *Lolium rigidum*, en el que el glifosato se translocó tres veces menos (Lorraine-Colwill *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2009), *o A. palmeri*, en la que además se demostró que la absorción reducida de glifosato implicaba un nivel de resistencia bajo (Nandula *et al.*, 2012; Palma-Bautista *et al.*, 2019).

Esta reducción de la translocación de glifosato en plantas resistentes, podría deberse a la evolución de un transportador que secuestra rápidamente el glifosato dentro de la vacuola de las células de las hojas tratadas, impidiendo que este herbicida llegue al cloroplasto (Shaner, 2009; Ge *et al.*, 2010, 2012,



2013). Se ha propuesto que este transportador podrían ser proteínas transportadoras ABC (Shaner, 2009; Yuan *et al.*, 2010). A pesar de que se detectó en plantas de Conyza resistentes una mayor expresión de varios genes de transportadores ABC en comparación con la población sensible (Ge *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010), todavía se desconoce la existencia de un gen específico o una familia de genes que medien el secuestro de glifosato dentro de estos mecanismos *NTSR* (Jugulam & Shyam, 2019).

B) CAPACIDAD METABÓLICA

La degradación del glifosato por parte de los microorganismos del suelo, principalmente bacterias, ha sido extensamente investigada, sobre todo en cepas aisladas de Pseudomonas (Kishore & Jacob, 1987) y también en miembros de la familia Rhizobiaceae (Mcgrath et al., 1998). En esta degradación glifosato enzimática. la molécula de se transforma en ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glioxilato por acción del enzima glifosato oxidorreductasa (GOX) capaz de romper el enlace C-N (Barrett & McBride, 2005; Pizzul et al., 2009; Pan et al., 2019).

A pesar de que la mayoría de las especies de plantas no pueden metabolizar significativamente el glifosato, (Pan et al., 2019) en algunas, especialmente en las plantas leguminosas, se ha detectado cierta capacidad de metabolizarlo pero sin correlación con su nivel de tolerancia al mismo (Reddy et al., 2008; Duke, 2011; Nandula et al., 2019). Esta metabolización ocurre de manera similar a lo observado en microorganismos, donde el glifosato es metabolizado a glioxilato y a AMPA (Reddy et al., 2008; Duke, 2011; Nandula et al., 2019), probablemente catalizado por una actividad GOX-like vegetal o que provenga de microorganismos por transferencia horizontal. Hasta la actualidad no se han descrito enzimas análogos de GOX en plantas o genes que los codifiguen (Duke, 2011). En el año 2019 se describió la capacidad metabólica en un biotipo resistente al glifosato en Echinochloa colona (Pan et al., 2019) como mecanismos NTSR. En dicho trabajo se identificó una mayor expresión y actividad del enzima AKR (aldo-ceto reductasa), debido a la regulación positiva de dos genes AKR, dando lugar a un metabolismo más rápido que oxidaba el glifosato a AMPA y a glioxilato (Pan et al., 2019; Gaines et al., 2020). Sin embargo, no se llegó a determinar si los enzimas AKR eran enzimas GOX, ni se identificó con profundidad el enzima y el gen de la GOX, por lo que todavía



quedan muchos aspectos por revelar acerca de las bases moleculares (Gaines *et al.*, 2020).

C) OTROS MECANISMOS

Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de resistencia *NTSR* en la especie de mala hierba, *Ambrosia trífida* (Van Horn *et al.*, 2018). Este mecanismo, denominado "fenómeno "*Phoenix*" (Figura 1.28), involucra una rápida necrosis del tejido expuesto a glifosato evitando así la translocación de las moléculas herbicidas a los meristemos. Posteriormente, la planta vuelve a crecer a partir de estos meristemos no afectados y mueren los tejidos que contienen glifosato (Duke, 2019; Gaines *et al.*, 2020).

1.4.4.1.2 RESISTENCIA TARGET-SITE (TSR) A GLIFOSATO

A pesar de que los avances en la compresión de los mecanismos *NTSR* han aumentado en los últimos años, se conocen a un nivel más profundo los mecanismos *TSR* (Salas *et al.*, 2012; Nandula *et al.*, 2014; Sammons & Gaines, 2014; Wiersma *et al.*, 2015; Malone *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2018b). Estos mecanismos *TSR* pueden clasificarse a su vez en dos tipos; mutaciones en el sitio de acción (Baerson *et al.*, 2002; Powles & Yu, 2010) producidas por una alteración de un solo par de bases o por una alteración de múltiples pares de bases (Heap & Duke, 2018) y mecanismo *TSR* por amplificación génica del sitio de acción del herbicida (Gaines *et al.*, 2010; Salas *et al.*, 2012; Malone *et al.*, 2016). Ambos mecanismos pueden existir o coexistir dentro de la misma población y en individuos, como es el caso de *Eleusine indica*, se encontraron mutaciones simples y dobles en el gen *EPSPS*, así como el mecanismo *TSR* de amplificación génica (Chen *et al.*, 2015).

A) MUTACIONES EN EL GEN EPSPS

Dada la naturaleza de inhibidor competitivo del glifosato por el sitio catalítico de unión al enzima EPSPS del PEP, existen pocas mutaciones que confieran resistencia a este compuesto sin afectar a la actividad catalítica normal del enzima, disminuyendo su actividad e incluso produciendo cambios en el metabolismo de la planta que podrían resultar letales (Sammons & Gaines, 2014; Vila-Aiub *et al.*, 2019). En concreto, estas mutaciones producen cambios estructurales en el sitio activo de EPSPS que reducen e incluso impiden la unión



eficiente tanto del glifosato como del PEP, y, por lo tanto, confieren resistencia a glifosato (Figura 1.29) (Vila-Aiub *et al.*, 2019). Estos cambios conformacionales del enzima EPSPS se han observado con las sustituciones del aminoácido prolina en la posición 106, glicina en la posición 101 y treonina en la posición 102 (Powles & Yu, 2010). En el caso de la sustitución Pro-106, las propiedades físico-químicas del enzima cambian provocando un ligero estrechamiento de la cavidad del sitio de unión del glifosato/PEP, lo que confiere resistencia a glifosato porque este no se puede unir, pero se conserva la funcionalidad del enzima EPSPS (Healy-Fried *et al.*, 2007) (Figura 1.29), sin embargo con las sustituciones Gly-101 y Thr-102, el estrechamiento en el sitio de unión es tan grande, que ni el glifosato ni el PEP pueden unirse, lo que implica que el enzima EPSPS pierde su funcionalidad (Powles & Yu, 2010).



Figura 1.29. Un gen de resistencia es causado por una mutación de nucleótidos en el ADN que conduce a una sustitución de aminoácidos en el enzima objetivo del herbicida, por ejemplo, la sustitución del aminoácido Pro-106-Ser. Esta sustitución de aminoácidos conduce a su vez a un cambio de conformación estructural en el enzima objetivo, en este caso, se producen cambios estructurales en el enzima EPSPS, que minimiza o impide la unión del herbicida, en el ejemplo se impide la unión eficiente del glifosato (modificado de (Gaines *et al.*, 2019).

Las mutaciones en el gen *EPSPS* que confieren resistencia al glifosato se han descrito tanto en mono como en dicotiledóneas (García *et al.*, 2020). El primer caso identificado que presentó este mecanismo, fue un biotipo de *Eleusine indica* (Lee & Ngim, 2000) que tenía una prolina sustituida por una Ser en la posición 106 (Baerson *et al.*, 2002; Powles & Yu, 2010). Esta misma mutación ha sido descrita en otras muchas especies, incluyendo nuevas sustituciones de aminoácidos individuales por una treonina (Pro-106-Thr) en *Eleusine indica* (Baerson *et al.*, 2002) y en *Lolium rigidum* (Wakelin & Preston, 2006), sustituciones por una alanina (Pro-106-Ala) en *Lolium* (Yu *et al.*, 2007) y sustituciones por serina (Pro-106-Ser) y leucina (Pro-106-Leu) en otras especies (Ngo *et al.*, 2018a). Cabe destacar la sustitución de treonina en la posición 102 por una serina (Thr-102-Ser) que ha sido recientemente asociada a la resistencia



a glifosato en una población de *Tridax procumbens* (Li *et al.*, 2018). Todas estas mutaciones simples en el gen *EPSPS* usualmente confieren bajos niveles de resistencia a glifosato (Powles & Yu, 2010), a menos que se combinen con otros mecanismos de resistencia, aunque en algunos casos se ha observado que estos bajos niveles de resistencia (de 2 a 3 veces) son suficientes para que las malas hierbas sobrevivan a la dosis de glifosato habituales (Jasieniuk *et al.*, 2008).

También se han identificado varias mutaciones dobles que confieren altos niveles de resistencia a glifosato en plantas (García et al., 2020). Las alteraciones de dos pares de bases del gen EPSPS que producen dos cambios de aminoácidos en EPSPS pueden dar como resultado un nivel mucho más alto de resistencia a glifosato que el proporcionado por las mutaciones simples en Pro106 (Heap & Duke, 2018) o en Thr102 (Sammons & Gaines, 2014). Inicialmente estas dobles mutaciones fueron utilizadas de forma artificial para obtener cultivos transgénicos RG. Así, por ejemplo, en variedades comerciales transgénicas de maíz, el gen EPSPS presentaba la doble mutación Thr-102-Ile + Pro-106-Ser (TIPS) (Spencer et al., 2000). Desafortunadamente, debido a la presión de selección continua del glifosato en los biotipos resistentes por mutaciones simples, esta doble mutación TIPS ha evolucionado de forma natural en poblaciones como *Eleusine indica* (Chen et al., 2015; Yu et al., 2015) y Bidens pilosa (Alcántara-de la Cruz et al., 2016) confiriendo altos niveles de resistencia a glifosato, incluso mayores que los niveles de resistencia de los cultivos RG (Nandula et al., 2008; Yu et al., 2015; Heap & Duke, 2018).

Una publicación reciente ha descrito una población de *Amaranthus hybridus* RG con una mutación triple que involucra las siguientes sustituciones Thr-102-Ile, Ala-103-Val y Pro-106-Ser, que confieren un alto nivel de resistencia (García *et al.*, 2019; Perotti *et al.*, 2019).

En relación al costo en la aptitud biológica (o también denominado *fitness cost*), algunas investigaciones sugieren que este tipo de mecanismos basados en mutaciones, sobretodo la mutación TIPS, podrían implicar altos niveles en el *fitness cost* de las plantas (Vila-Aiub *et al.*, 2019).

B) AMPLIFICACIÓN GÉNICA DE EPSPS

En la resistencia al glifosato el mecanismo de amplificación génica es mucho más frecuente que aquellos que ocurren por mutaciones (Sammons & Gaines, 2014) y proporciona un factor de resistencia significativamente mayor que una



mutación simple. La amplificación o duplicación génica de *EPSPS* es un proceso heredable, que se basa en el incremento del número de copias génicas que codifica el enzima EPSPS, lo que se traduce y correlaciona directamente con un aumento en la expresión de los transcritos de *EPSPS* y de la cantidad y actividad proteica EPSPS, confiriendo altos valores de resistencia a glifosato (Figura 1.30) (Gaines *et al.*, 2010; Powles & Yu, 2010; Ngo *et al.*, 2018b).



Figura 1.30. Resistencia a glifosato resultante de la amplificación génica. **A)** El individuo sensible al glifosato tiene un número de copias del gen *EPSPS* muy bajo (representados con puntos amarillos en los cromosomas), y cuando actúa el glifosato a una dosis normal (representado con los puntos rojos) acaba inhibiendo todo el enzima EPSPS que hay en los cloroplastos, provocando la muerte de la planta. **B)** El individuo resistente presenta en los cromosomas múltiples un número de copias del gen *EPSPS* amplificadas. Cuando se aplica el glifosato a una dosis recomendada, éste no puede inhibir todas las EPSPS disponibles, algunas funcionan correctamente y el glifosato no puede matar la planta (Powles, 2010).

La correlación entre el número de copias de *EPSPS* y la resistencia a glifosato a nivel de toda la planta, generalmente es buena, y por consiguiente es necesario aumentar la dosis de este herbicida para llegar a inhibir el enzima EPSPS al completo y llegar a ser letal para la planta (Gaines *et al.*, 2010; Heap & Duke, 2018). Un aumento de 90 veces en el número de copias del gen provocó un incremento de hasta 12 veces en la cantidad de proteína EPSPS en una población de *A. palmeri* RG, lo que implicó a su vez, un aumento de seis a ocho veces en la dosis efectiva de glifosato, dosis que no es ni económica ni ambientalmente viable (Gaines *et al.*, 2010). Por este motivo, es importante analizar estos mecanismos ya que el incremento en el número de copias del gen objetivo del herbicida, puede ser crítico para determinar si el herbicida es viable o no (Dayan & Duke, 2020).

Los beneficios y desventajas de estos mecanismos de resistencia a glifosato en el *fitness cost* de la planta varían según la especie, y todavía quedan muchas



dudas de si esto afecta a la supervivencia, crecimiento y fecundidad de las plantas. Algunos autores demostraron que en poblaciones de *Amaranthus palmeri* RG no existe correlación o posible correlación negativa entre el número de copias de *EPSPS* y el *fitness cost* en ausencia de glifosato (Giacomini *et al.*, 2014; Vila-Aiub *et al.*, 2014; Heap & Duke, 2018). Otros estudios han determinado que en el caso de que sea neutral o beneficiosa, es posible que estas características fenotípicas puedan persistir en las poblaciones de manera indefinida (Yang *et al.*, 2017), o por el contrario, si tiene un costo de aptitud negativo, en términos de gasto de energía celular en forma de ATP, gastos de carbono y de nitrógeno, (Vila-Aiub *et al.*, 2019) se podría esperar que este rasgo genético se acabe perdiendo, después de que se suspenda la exposición al glifosato (Neve, 2008; Vila-Aiub *et al.*, 2009).

Este mecanismo de resistencia a glifosato se describió por primera vez en *Amaranthus palmeri*, con una variación del número de copias entre 30 y 50 veces mayor en poblaciones resistentes (RG) que en poblaciones sensibles (S) (Gaines *et al.*, 2010). Desde este primer informe en el año 2010, este mecanismo *TSR* ha sido descrito también en otras especies de malas hierbas (Tabla 1.2).

El descubrimiento de este mecanismo, permitió el desarrollo de una RT-qPCR que permite dilucidar los niveles de amplificación del gen (Gaines *et al.*, 2010), técnica que se ha convertido en rutinaria en los laboratorios que estudian la resistencia a herbicidas en malas hierbas. Recientemente, el acceso a estos recursos genómicos, combinado con técnicas de citogenética, ha proporcionado evidencia crítica para nuestra comprensión de los mecanismos moleculares de la duplicación de genes (Jugulam & Gill, 2018).


Especie de mala hierba	Rango del nº copias relativas del gen <i>EPSPS</i>	Referencia
Amaranthus palmeri	2-160	(Gaines <i>et al</i> ., 2010)
Amaranthus tuberculatus	2-8	(Lorentz <i>et al.</i> , 2014; Chatham <i>et al</i> ., 2015)
Amaranthus spinosus	26-37	(Nandula <i>et al.</i> , 2014)
Hordeum glaucum	9–11	(Adu-Yeboah <i>et al</i> ., 2020)
Lolium multiflorum	15-25	(Salas <i>et al</i> ., 2012)
Kochia scoparia	2,9-5,6	(Wiersma <i>et al</i> ., 2015)
Eleusine indica	28	(Chen <i>et al</i> ., 2017)
Chloris truncata	32-48	(Ngo <i>et al.</i> , 2018b)

 Tabla 1.2. Duplicación del gen EPSPS reportados en especies de malas hierbas resistentes al glifosato.

1.4.4.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE ALS

Los herbicidas inhibidores de ALS se han utilizado ampliamente desde su introducción a principios de la década de 1980, debido a su efectividad en el control de las malas hierbas (Yu & Powles, 2014). Sin embargo, la resistencia a estos herbicidas surgió rápidamente debido a su uso generalizado y a la fuerte presión de selección que ejercen (Tranel, Patrik J. and Wright, 2002). Las primeras poblaciones resistentes descritas fueron: *Lolium rigidum* en Australia en 1982 (Heap & Knight, 1986) y *Lactuca serriola* en 1987 en Estados Unidos (Mallory-Smith *et al.*, 1990). Los herbicidas inhibidores de ALS son los más propensos a seleccionar resistencias (Heap, 2021). Actualmente, las especies en las que se han encontrado más casos son: *Amaranthus palmeri, Amaranthus tuberculatus, Avena fatua, Kochia scoparia, Lolium perenne ssp. multiflorum* y *Stellaria media* (Heap, 2021).

A continuación, se presentan los dos mecanismos *TSR* y *NTSR*, que producen resistencia a inhibidores de ALS. La mayoría de los casos de resistencia que han sido descritos son mecanismos de resistencia *TSR* debidos a mutaciones puntuales en el gen *ALS* (Liu *et al.*, 2015b).



1.4.4.2.1 RESISTENCIA NON-TARGET SITE (NTSR) A INHIBIDORES DE ALS

Comparado con los numerosos estudios acerca de la resistencia *TSR* en malas hierbas, los mecanismos de resistencia *NTSR* se han identificado y estudiado con mucha menos frecuencia, especialmente en especies de malas hierbas dicotiledóneas (Veldhuis *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2015a). Esto puede deberse al hecho de que los estudios *NTSR* son difíciles de realizar y a menudo requieren el uso de métodos con ¹⁴C, mientras que en los mecanismos *TSR*, la secuenciación del gen *ALS* es simple y directa (Yu & Powles, 2014). A pesar de que ambos tipos de mecanismos pueden coexistir en una misma población (Bai *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020), en la mayoría de casos los estudios se han basado en identificar la resistencia *TSR* ya que proporciona un mayor nivel de resistencia y consecuentemente, se subestima la importancia de los mecanismos *NTSR*, quedando enmascarados y sin llegar a examinarse, dando por hecho que la resistencia es únicamente *TSR* (Délye *et al.*, 2011; Yu & Powles, 2014).

En las plantas que presentan mecanismos *NTSR*, la cantidad de herbicida que alcanza el enzima objetivo ALS se reduce por debajo del nivel de letalidad, permitiendo la supervivencia de la planta (Yu & Powles, 2014). Dentro de todos los mecanismos *NTSR* a inhibidores de ALS, tanto la absorción foliar como la translocación diferencial del herbicida no se han identificado como un mecanismo frecuente en poblaciones resistentes, ni se ha demostrado que desempeñe un papel claro en la resistencia (White *et al.*, 2002; Riar *et al.*, 2013). Sin embargo, aquellos basados en la mejora de las tasas de degradación metabólica del herbicida son los más frecuentes en malas hierbas y han sido descritos en *Echinochloa crus-galli* (Riar *et al.*, 2012), *Amaranthus tuberculatus* (Shergill *et al.*, 2008), *Lolium rigidum* (Collavo *et al.*, 2017b) y *Echinochloa phyllopogon* (Fischer *et al.*, 2000; Iwakami *et al.*, 2014, 2019).

Esta mayor degradación metabólica puede presentarse con una frecuencia inicial relativamente alta, pero generalmente proporciona niveles de resistencia de bajos a moderados. Este mecanismo ha sido relacionado con la actividad citocromo P450 (Yun *et al.*, 2005) y se ha encontrado en varias malas hierbas, especialmente en gramíneas y en malas hierbas de hoja ancha (Jugulam & Shyam, 2019). En un estudio reciente, diversas poblaciones de *Papaver rhoeas* con resistencia múltiple a inhibidores de ALS y a herbicidas de auxina sintética



(SAH) presentaron un metabolismo mejorado común, basado principalmente en la P450 (Torra *et al.*, 2021).

Sin embargo, su control a nivel genético es complejo; existen numerosos estudios que han dilucidado la base molecular de esta resistencia, identificando múltiples genes *CYP450* que se expresan constitutivamente o se regulan positivamente después de la aplicación del inhibidor de ALS (Iwakami *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018b; Zhao *et al.*, 2019). Se han encontrado varios genes CYP450 que median la *NTSR* a inhibidores de ALS en *Myosoton aquaticum* (Liu *et al.*, 2018b), *Lolium perenne* (Duhoux *et al.*, 2015), y *Alopecurus myosuroides* (Délye *et al.*, 2011; Gardin *et al.*, 2015). Las investigaciones futuras deberían profundizar en la identidad de los genes involucrados en el metabolismo mejorado, particularmente de la P450, ayudando así en la predicción de patrones de resistencia cruzada en diferentes familias químicas de herbicidas (Torra *et al.*, 2021).

1.4.4.2.2 RESISTENCIA TARGET-SITE (TSR) A INHIBIDORES DE ALS

A) MUTACIONES EN EL GEN ALS

Este tipo de resistencia puede ocurrir por mutaciones puntuales del gen ALS, que resultan en cambios de aminoácidos en el enzima objetivo, lo que previene o reduce la unión del herbicida (Yu & Powles, 2014). En individuos no resistentes, el substrato se une al sitio catalítico del enzima, y la planta sigue su desarrollo vegetativo normal, sin embargo, cuando actúan los herbicidas inhibidores de ALS, estos no se unen directamente al sitio catalítico de este enzima, se unen y bloquean un canal de acceso dentro del enzima por el cual se mueven los substratos de ALS (Figura 1.30.A) (McCourt & Duggleby, 2006) y la planta acaba muriendo al tiempo. En individuos resistentes, las mutaciones que confieren resistencia a inhibidores de ALS, no ocurren en el sitio de unión del sustrato, sino en dominios más superficiales formado por varios residuos de aminoácidos (Figura 1.30.B) (McCourt & Duggleby, 2006) consecuentemente, el herbicida no puede unirse y el substrato de ALS sí, por lo que la planta acaba sobreviviendo (Figura 1.30.B). Por esta razón bioguímica, las mutaciones en el enzima ALS, generalmente, tienen poco efecto sobre la actividad catalítica normal, a diferencia de las mutaciones que ocurren en otros genes que afectan significativamente a la función bioquímica normal del enzima, como es el caso del gen psbA (Gaines et al., 2020), ubicado en el cloroplasto y que codifica para



determinadas proteínas blanco de herbicidas inhibidores de la fotosíntesis, especialmente del fotosistema II (PSII) (Mazur & Falco, 1989).



Figura 1.30. Resistencia a inhibidores de ALS. **A)** En individuos no resistentes, los herbicidas se unen y bloquean un canal de acceso dentro del enzima por el cual se mueven los substratos de ALS, por lo que estos no pueden unirse y la planta acaba muriendo. **B)** En individuos resistentes, se producen mutaciones puntuales que alteran el sitio de acople del enzima y el herbicida no puede unirse, el substrato se une y la planta vive (Beckie, 2009, adaptado por https://agro.basf.ca/).

Existe una gran variedad de mutaciones potenciales que pueden ocurrir en el gen *ALS*, y por ende una alta frecuencia de aparición de resistencia a estos compuestos químicos (Tranel, Patrik J. and Wright, 2002). La primera mutación descrita fue en el año 1994 (Saari & L., 1994) en las especies *Kochia scoparia y Lactuca serriola*; el residuo de aminoácido P197 podía sustituirse con Thr e His, respectivamente para cada especie (Guttieri *et al.*, 1992; Broster & Pratley, 2006). Desde esa fecha, se han identificado un sorprendente número de mutaciones que otorgan resistencia a esta familia química de herbicidas, actualmente hay 29 sustituciones de aminoácidos en 8 sitios del gen *ALS*; A122 (Ala), P197 (Pro), A205 (Ala), A376 (Asp), W574 (Trp), S653 (Ser), A377 (Arg) y G654 (Gly) (Tabla 1.3) (Heap, 2021). Los números corresponden a posiciones aminoacídicas de la secuencia de referencia de *A. thaliana* L. (Larran, 2018). De entre todas ellas, las mutaciones en P197 y W574 son las más frecuentes. En el caso de la P197, hasta 11 sustituciones de aminoácidos en este residuo pueden dotar de resistencia a herbicidas inhibidores de ALS (Powles & Yu, 2010), en



INTRODUCCIÓN

concreto, la sustitución Pro-197-Ser, es una mutación particularmente común si se compara con las otras posibles sustituciones de resistencia en P197 (se ha encontrado en poblaciones de 21 especies de malas hierbas), y se ha comprobado que confiere resistencia a los herbicidas inhibidores de ALS, sin ningún impacto en la funcionalidad del enzima (Powles & Yu, 2010). Algunas de las mutaciones del gen ALS confieren un nivel de resistencia muy alto, y el espectro de resistencia a través de las familias químicas varía según la mutación (Gaines et al., 2020). Se han observado patrones de resistencia cruzada entre diferentes clases de inhibidores de ALS, dependiendo de la posición de la mutación y el aminoácido reemplazado (Shaner, 1999) y que son transversales a poblaciones en distintas especies de malas hierbas. Algunos de estos patrones que son: la mutación W574 confiere resistencia a SU e IMI, las mutaciones A122 o S653 confieren resistencia a IMI pero no a SU o con un nivel muy bajo (Patzoldt et al., 2001) y la mutación P197 confiere resistencia a SU pero su resistencia cruzada es baja o nula a IMI (Guttieri et al., 1992; Gaines et al., 2020).

Es necesario seguir investigando a nivel molecular y estructural, el dominio de unión al herbicida, el sitio catalítico del enzima y el efecto que tienen las mutaciones, para avanzar en el conocimiento de la evolución de muchas mutaciones que confieren la resistencia a inhibidores de ALS.



Tabla 1.3. Mutaciones puntuales descritas en ocho posiciones del gen *ALS*, que confieren resistencia a distintas familias de inhibidores de ALS y algunos ejemplos de especies de malas hierbas en las que se han detectado dichas mutaciones. El número de los aminoácidos está estandarizado en función de la secuencia de *A. thaliana* L.

Posición en el gen ALS	Nº especies de malas hierbas		
P197	91 (Kochia scoparia, Amaranthus palmeri, Papaver rhoeas, Lolium rigidum, Conyza canadensis, Senecio vulgaris).		
W574	41 (A. palmeri, A. retroflexus, A. powellii, A. hybridus, A. tuberculatus, Kochia scoparia, Ambrosia trífida, Papaver rhoeas, Lolium rigidum)		
A376	13 (A. hybridus, A. powellii, A. retroflexus, Lolium perenne, Kochia scoparia, Sinapis arvensis)		
S653	 14 (A. tuberculatus, A. hybridus, A. palmeri, A. retroflexus, Setaria viridis, Avenua fatua) 		
A122	12 (A. palmeri, A. retroflexus, A. powellii, A. hybridus, Echinochloa crus-galli var. crus- galli)		
A205	6 (Xanthium strumarium, A. retroflexus, Conyza canadensis, Poa annua)		
G654	2 (Oryza sativa var. Sylvatica Setaria viridis)		
A377	1 Apera spica-venti		



B) AMPLIFICACIÓN GÉNICA DE ALS

El número de copias de genes que codifican los objetivos de los herbicidas también tiene un efecto sobre la evolución de la resistencia al herbicida. Sin embargo, el incremento en el número de copias del gen *ALS* como mecanismo de resistencia es raro de encontrar en las distintas especies de plantas (Singh *et al.*, 2018)

Anteriormente se utilizaba el gen *ALS* como gen de referencia o gen de control para los análisis RT-qPCR, ya que se pensaba que el número de copias de *ALS* era estable entre los individuos (Iwakami *et al.*, 2017). Estudios realizados en una población S y en otra RM en *Amaranthus hybridus*, no se observaron cambios significativos en el número de copias del gen *ALS* relativo al gen actina (García *et al.*, 2020). Sin embargo, en otros estudios realizados con la especie de mala hierba *Alopecurus aequalis* se observó que el número de copias de *ALS* era inestable, los individuos mostraron entre 2 y 4 copias de *ALS* relativas a un segundo gen de control interno (gen de la cinnamoil-CoA reductasa) (Salas *et al.*, 2012, 2015; Iwakami *et al.*, 2017). En la mayoría de casos, estos incrementos en el número de copias del gen *ALS* son tan pequeños como para contribuir al nivel de resistencia (Singh *et al.*, 2018). En estudios iniciales con células cultivadas, también se comprobó que la amplificación en el gen *ALS*, contribuía a la resistencia pero a niveles inferiores a los observados en la resistencia causada por mutaciones (Odell *et al.*, 1990).



1.5 AMARANTHUS PALMERI

Amaranthus palmeri S. Watson (Imagen 1.2 y 1.3) es una especie C₄, anual, diploide, nativa del extremo sur-occidental de América del Norte, desde el sur de California hasta Texas y norte de México (Sauer, 1957; Recasens *et al.*, 2011). Pertenece a la familia *Amaranthaceae*, que contiene aproximadamente 75 especies del género Amaranthus distribuidas por todo el mundo (Ward *et al.*, 2013).



Imagen 1.2. Población de Amaranthus palmeri en Lleida.

Se la considera una mala hierba muy problemática para los cultivos y difícil de controlar eficazmente debido a sus características morfológicas, biológicas y ecológicas. Es una especie de rápido crecimiento, puede llegar a alcanzar una altura de 2 m y ocasionalmente llegar hasta los 3 m (Imagen 1.2) (Ward *et al.*, 2013). Debido a su naturaleza dioica, es una especie de obligado cruzamiento, permitiendo el intercambio genético entre las plantas a través de la polinización por el viento. Las inflorescencias femeninas poseen brácteas espinosas al tacto (Figura 1.3.A), y las masculinas son suaves y desprenden grandes cantidades de polen al moverse (Imagen 1.3.B y 1.3.C). La fecundidad de esta planta es elevada y cada hembra puede producir de 200.000 a 600.000 semillas en condiciones ideales de crecimiento y sin competencia (Keeley *et al.*, 1987). Estas semillas son de color marrón-rojizo y tienen un tamaño de aproximadamente 1-1,2 mm de diámetro pudiendo sobrevivir periodos prolongados incluso enterradas profundamente (Sosnoskie *et al.*, 2013).





Imagen 1.3. A) Inflorescencia femenina en desarrollo de *A. palmeri*. **B)** Inflorescencia masculina. **C)** Polen sobre las hojas de un individuo macho de A. palmeri

Amaranthus palmeri presenta un sistema radicular de gran longitud que favorece la tolerancia frente a las condiciones de sequía y frente a las escasas e impredecibles precipitaciones, además de ser resistente a las altas temperaturas, siendo el rango óptimo para la germinación de sus semillas, entre los 25 - 35 °C (Guo & Al-Khatib, 2003). La interferencia de esta especie en cultivos de soja, algodón, maíz y sorgo reduce su biomasa y provoca numerosas pérdidas de rendimiento de entre el 60 y el 91 % (Massinga *et al.*, 2001; Bensch *et al.*, 2003; Burke *et al.*, 2007; Klingaman & Oliver, 2018).



Se espera que, en un contexto de cambio climático, en el que la frecuencia de eventos climáticos extremos y la temperatura global incremente, sus características biológicas deriven en una ventaja competitiva de esta especie haciéndola más dañina para los cultivos (Figura 1.32) (McDonald *et al.*, 2009; Ziska *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2015; Kistner & Hatfield, 2018).



Figura 1.32. Mapa con un modelo de idoneidad climática global para la especie *Amaranthus palmeri*, basado en proyecciones climáticas futuras en el año 2050 (Kistner & Hatfield, 2018).

Se espera que la amenaza de especies invasoras de plantas llegue a países en los que anteriormente estaban ausentes y aumente con la globalización y la conexión a través del comercio mundial (Torra *et al.*, 2020). En el caso de *A. palmeri*, esta mala hierba comenzó a expandirse más allá de su área nativa por causa antrópica, con la manipulación de semillas y productos vegetales comerciales (Recasens *et al.*, 2011), y con la creación de nuevos hábitats a través de la expansión agrícola (Ward *et al.*, 2013). Por esta razón y unido a todas estas características biológicas y ecológicas propias de la especie, actualmente *A. palmeri* está presente en gran parte de América del Norte, y ha invadido Brasil y Argentina en América del sur, y en el caso de Europa, está presente en el sur y centro, y en territorios costeros e insulares mediterráneos como Chipre, Israel y Portugal (Madeira) (Torra *et al.*, 2020). En el año 2014, la Unión Europea la incluyó en la lista de alerta de plantas invasoras, teniendo en cuenta el impacto económico potencial que puede llegar a causar en los sistemas agrícolas (EPPO, 2021).



INTRODUCCIÓN

En España, existen registros efímeros de la presencia de esta especie por identificación de ejemplares de herbario en 1927 y un individuo en Sevilla en 1979, según resume (Carretero, 1990) y no la incluye en la Flora Ibérica. En el año 2007, se observaron individuos en los márgenes de caminos y cunetas de carreteras en un par de localizaciones de la provincia de Lleida (Verloove & Sánchez Gullón, 2008; Recasens et al., 2011). En el año 2010, se observó y registró una población en Binéfar (Huesca), a tan solo 50 km de las anteriores (Torra et al., 2020). A día de hoy, estas tres poblaciones están presentes en varios campos de maíz, donde han encontrado un ambiente compatible con sus requisitos para desarrollarse y naturalizarse. En 2018, se estimó que unas 70 hectáreas de maíz estaban afectadas, y en 2019 más de 200 ha (Recasens, 2020). Si no se implementan las medidas legislativas adecuadas para prevenir, contener y erradicar, o si no se evalúa el riesgo de esta especie, es muy probable que estas poblaciones se acaben extendiendo e incluso sean capaces de desarrollar resistencia a diferentes sitios de acción herbicida, poniendo en peligro la sostenibilidad de los cultivos y de los ecosistemas naturales (Torra et al., 2020).

1.5.1 RESISTENCIA A HERBICIDAS EN A. PALMERI

A. palmeri es considerada como una de las especies más agresivas para los cultivos a nivel mundial, habiéndose confirmado la presencia de poblaciones con resistencia a distintos mecanismos de acción herbicida diferentes, pertenecientes a los grupos 2, 3, 4, 5, 9, 14, 15 y 27 (Tabla 1.1) (Heap, 2021). En el año 1989 se detectó el primer caso de resistencia a herbicidas en esta especie: resistencia a un herbicida del grupo 3 (Inhibidores de la unión de microtúbulos en la mitosis) en Estados Unidos. El primer caso registrado de resistencia a inhibidores de ALS, fue en 1993 (Horak & Peterson, 1995) y para entonces, *A. palmeri* ya empezaba a considerarse como una de las malas hierbas más problemáticas en el sur de Estados Unidos (Webster & Coble, 1997) pero fue en 2004 cuando el problema empeoró, ya que se describió el primer caso de resistencia de esta mala hierba al glifosato, en Georgia (EE.UU.) (Culpepper *et al.*, 2006).

Actualmente se han documentado por todo el mundo, hasta 27 poblaciones de *A. palmeri* que presentan resistencia a inhibidores de ALS y 45 poblaciones resistentes a glifosato (Heap, 2021). Los principales países donde se han encontrado son Estados Unidos, Brasil, Argentina y México, incluyendo



poblaciones con resistencias múltiples a ambos tipos de herbicidas. Además, se encontraron poblaciones resistentes a inhibidores de ALS en Israel, en 2008, en el norte de Italia se identificaron 3 poblaciones resistentes a inhibidores de ALS en 2018 y 2019 (Milani *et al.*, 2021) y en España, 3 poblaciones resistentes a inhibidores de ALS (Torra *et al.*, 2020).

<u>1.5.1.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA DE A. PALMERI A GLIFOSATO E</u> INHIBIDORES DE ALS

A) MECANISMOS DE RESISTENCIA A GLIFOSATO

El mecanismo de resistencia a glifosato más común en *A. palmeri*, es un mecanismo *TSR* basado en la sobreexpresión de la diana por amplificación del gen *EPSPS* (Gaines *et al.*, 2010; Chandi *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014; Patterson *et al.*, 2018). Este mecanismo de resistencia a glifosato no se debe a duplicaciones del genoma completo, sino a un aumento del número de copias del gen *EPSPS* y a su vez, está correlacionado positivamente con un aumento en la expresión de este enzima EPSPS, un incremento en la expresión de la transcripción de *EPSPS* y un aumento en el nivel de proteína de EPSPS (Gaines *et al.*, 2010).

El grado de amplificación génica es muy variable en las poblaciones resistentes entre 5 y hasta más de 160 copias comparado con una población sensible (Gaines *et al.*, 2010). La primera población de *A. palmeri* descrita cómo resistente al glifosato presentó el gen *EPSPS* amplificado más de 100 veces, lo que resultaba en una sobreexpresión de aproximadamente 40 veces (Gaines *et al.*, 2010). Otra población de esta especie, presentó 47.5 veces más copias del gen *EPSPS* que la población sensible al glifosato (Fernández-Escalada *et al.*, 2016).

Los primeros estudios indicaban que el amplicon de EPSP contenía al menos 30kb de longitud y también contenía elementos transponibles repetidos (MITEs), y se propuso que estos amplicones estaban dispersos por todos los cromosomas en las poblaciones resistentes (Gaines *et al.*, 2010, 2013). Posteriormente se propuso que la longitud del amplicón era de 297kb y se le denominó "*cassete* EPSPS" (Molin *et al.*, 2017). En 2018, se encontró que los amplicones eran parte de moléculas de ADN circular extracromosómico de replicación autónoma (ADNecc) (Koo *et al.*, 2018).



INTRODUCCIÓN

Este ADNecc se hereda de forma biparental en la meiosis, pero no en proporciones iguales entre los gametos, y, además, al estar unido a los cromosomas por una proteína estructural, permite la transmisión de una célula a otra durante la mitosis y la meiosis (Gaines *et al.*, 2020). Como resultado de la inestabilidad de este ADNecc, en la herencia se puede mostrar una segregación transgresiva del número de copias de *EPSPS* (Gaines *et al.*, 2020) dando lugar a la formación de fenotipos más extremos a los definidos por sus parentales.

En cuanto al mecanismo *TSR* de mutación del gen de EPSPS, los casos identificados en *A. palmeri* son muy escasos (Sammons & Gaines, 2014). En el año 2017 se detectó por primera vez la sustitución en la posición Pro-106 en la secuencia de este gen en *A. palmeri* (Dominguez-Valenzuela *et al.*, 2017), a pesar de que las mutaciones puntuales P106S, T102I o A103V ya habían sido detectadas en otras especies del género *Amaranthus* (Heap, 2021).

Los mecanismos *NTSR* a glifosato en *A. palmeri* son muy poco frecuentes, y en ningún caso se incluye la degradación del herbicida. En un estudio con 7 poblaciones resistentes de México se encontró que 4 de ellas presentaban mecanismo *NTSR* con menor absorción y translocación del glifosato, y las otras 3 restantes, presentaban tanto mecanismos *TSR* de mutación a nivel Pro-106 como el mismo mecanismo *NTSR* (Dominguez-Valenzuela *et al.*, 2017). También en una población de Argentina, se encontró una baja absorción y una importante alteración de la translocación del glifosato como principales mecanismos de resistencia (Palma-Bautista *et al.*, 2019).

B) MECANISMOS DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE ALS

La resistencia a inhibidores de ALS en *A. palmeri* está muy extendida, principalmente por EE.UU., y abundantemente descrita (Kohrt *et al.*, 2017; Heap, 2021). En la mayoría de casos, el mecanismo primario de resistencia es *TSR* debido a mutaciones puntuales en el gen *ALS*. Hasta el momento, se han registrado en esta especie las siguientes sustituciones: A122T, P197S/A, W574L, S653A, A205V, A282D y D376E (Molin *et al.*, 2016; Küpper *et al.*, 2017; Nakka *et al.*, 2017b; Singh *et al.*, 2018; Palmieri, 2019) que pueden conferir resistencia a imidazolinonas, sulfonilureas, sulfonanilidas y ácidos pirimidinil benzoatos (Heap, 2021).



Otro mecanismo de resistencia *TSR* a inhibidores de ALS, podría ser la amplificación del gen *ALS*. Aunque *A. palmeri* ha sido descrita como una especie diploide con una única copia del gen *ALS* (Ferguson *et al.*, 2001), debido a la presión de selección que ejercen estos herbicidas y la alogamia obligada, también podrían aislarse genotipos con sobreexpresión del gen *ALS*, dando lugar a individuos con fenotipos resistentes (Singh *et al.*, 2018). En Mississippi (EE.UU.), se han identificado individuos de una población de *A. palmeri* que presentaron entre 4 y 7 copias del gen (Singh *et al.*, 2018).

En relación a los mecanismos *NTSR*, para esta especie sólo se ha descrito de un tipo: la degradación metabólica del herbicida (Nakka *et al.*, 2017b) mediada por el citocromo P450. En un estudio de resistencia *NTSR* al trifloxysulfuron, se encontró implicación tanto del citocromo P450 como de los enzimas glutation S-transferasas, tanto a nivel de expresión génica como de respuesta a inhibidores de estas actividades (Salas-Perez, 2018). Nakka *et al.*, 2017b demostraron por primera vez en una población de *A. palmeri* la presencia de mecanismos de resistencia *TSR* y *NTSR* a inhibidores de ALS.

1.5.1.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA MÚLTIPLE (RM) EN A. PALMERI

En los últimos años, la presencia de especies de *Amaranthus* se ha vuelto más preocupante debido a la evolución de biotipos con RM a herbicidas (Heap, 2021). Se han descrito poblaciones de *A. palmeri* resistentes a más de dos mecanismos de acción herbicida diferentes, principalmente aquellas que son resistentes al glifosato y a otro herbicida con un sitio de acción distinto, incrementando así la problemática en el control de esta especie (Küpper *et al.*, 2017). Dos de las primeras descripciones de RM a glifosato y a un inhibidor de ALS (piritiobac) fueron en 2008, en cultivos de algodón en Georgia y Mississippi (EE.UU.) (Tabla 1.4) (Heap 2021), aunque esta RM ya había sido observada previamente en el género *Amaranthus* (Sosnoskie *et al.*, 2011). También se han registrado resistencias múltiples en Brasil (Sosnoskie *et al.*, 2011) e incluso se han descrito poblaciones con resistencia múltiple a hasta 5 sitios de acción herbicida diferentes (Tabla 1.4) (Heap, 2021).

Los mecanismos de resistencia múltiple a glifosato e inhibidores de ALS más frecuentes en *A. palmeri*, son respectivamente, aumento de número de copias del gen *EPSPS* y mutaciones en el sitio objetivo en el gen *ALS*. Ambos



mecanismos confieren altos niveles de resistencia a estos herbicidas (Küpper *et al.*, 2017).

La resistencia múltiple en *A. palmeri*, se ve favorecida por su exitosa adaptación, competitividad, potencial de dispersión rápida y por el intercambio de genes al que se ven sometidas estas especies dioicas, incrementándose la variabilidad genética. Pero a medida que se va haciendo más común la RM, la capacidad de controlarla de manera sostenible, se ve amenazada (Sosnoskie *et al.*, 2011). Es por eso, que deben adoptarse prácticas de manejo integradas, utilizando herbicidas con distintos mecanismos de acción y métodos de control alternativos no químicos, como la rotación de cultivos, labranza o los acolchados y cultivos de cobertura (Kohrt *et al.*, 2017). Se trata de asegurarse de que las plantas de *A. palmeri* no alcancen la madurez reproductiva en los campos de cultivo y así evitarán la propagación local y a larga distancia mediante semillas y polen, de estos rasgos de resistencia (Sosnoskie *et al.*, 2011).

	ORIGEN	AÑO	RESISTENCIA MÚLTIPLE (RM)
1	EE.UU. (Mississippi)	2008	Inhibidores de ALS y EPSPS
2	EE.UU. (Georgia)	2008	Inhibidores de ALS y EPSPS
3	EE.UU. (Tennessee)	2009	Inhibidores de ALS y EPSPS
4	EE.UU. (Kansas)	2009	Inhibidores de ALS, fotosistema II y HPPD
5	EE.UU. (South Carolina)	2010	Inhibidores de ALS y EPSPS
6	EE.UU. (Georgia)	2010	Inhibidores de ALS, fotosistema II y PPO
7	EE.UU. (Arkansas)	2011	Inhibidores de ALS y PPO
8	EE.UU. (Arizona)	2012	Inhibidores de ALS y EPSPS
9	EE.UU. (Illinois)	2013	Inhibidores de ALS y EPSPS
10	EE.UU. (Florida)	2013	Inhibidores de ALS y EPSPS
11	EE.UU. (Delaware)	2014	Inhibidores de ALS y EPSPS
12	EE.UU. (Maryland)	2014	Inhibidores de ALS y EPSPS
13	EE.UU. (Nebraska)	2014	Inhibidores de fotosistema II y HPPD.
14	EE.UU. (Wisconsin)	2014	Inhibidores de ALS y HPPD
15	EE.UU. (Tennessee)	2015	Inhibidores de PPO y EPSPS
16	EE.UU. (Kansas)	2015	Inhibidores del fotosistema II, de ALS, EPSPS, HPPD, auxinas sintéticas,
17	EE.UU. (Nebraska)	2016	Inhibidores del fotosistema II y de EPSPS
18	EE.UU. (Illinois)	2016	Inhibidores de PPO y EPSPS
19	EE.UU. (Arkansas)	2016	Inhibidores de ALS, PPO, EPSPS, Micro túbulos y Amino ácidos de cadena larga
20	Brasil	2016	Inhibidores de ALS y EPSPS
21	EE.UU. (Connecticut)	2019	Inhibidores de ALS y EPSPS

Tabla 1.4. Casos de resistencia múltiple en poblaciones de *Amaranthus palmeri* (modificado de Heap, 2021).



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La enorme presión de selección que se ejerce sobre las poblaciones de malas hierbas con el uso continuado y abusivo de herbicidas con el mismo mecanismo de acción, ha llevado a un rápido aumento global de las poblaciones con resistencia simple y resistencia múltiple. Este trabajo se plantea en el marco de la necesidad de profundizar en el conocimiento de la fisiología de las plantas resistentes a herbicidas, lo que requiere, no solo identificar y dilucidar las bases moleculares de las resistencias, sino también abordar el plano fisiológico, analizando la respuesta a nivel de metabolismo a la aplicación de estos herbicidas. La utilización de plantas que ya han desarrollado resistencia múltiple a estos herbicidas es una buena herramienta para desarrollar métodos para su detección, aportar claves para su manejo y prevenir su aparición. Además, el establecimiento de la acción herbicida en plantas resistentes permite comprender cómo y por qué son letales estos herbicidas (conocimiento del modo de acción herbicida), ayudando a que su utilización sea más racional y sostenible.

Desde el uso masivo de glifosato en cultivos OMG, el número de poblaciones de malas hierbas de distintas especies con resistencia a este herbicida se ha ido elevando exponencialmente por todo el mundo. Por otro lado, el grupo de herbicidas para el que se han desarrollado más resistencias y más rápidamente entre las malas hierbas, es el grupo de los inhibidores de ALS. La especie objeto de este estudio, *Amaranthus palmeri*, una mala hierba nativa de Norteamérica, muy problemática para los cultivos, principalmente por su alta variabilidad genética, y donde se han detectado poblaciones que han desarrollado resistencia a glifosato y a inhibidores de ALS, simples y múltiples. Se trabajará con varias poblaciones, incluyendo una con resistencia múltiple al herbicida glifosato y a herbicidas inhibidores de ALS, debido a mecanismos relacionados con la diana (*TSR*).

Así, el objetivo general de este trabajo es profundizar en la fisiología de una población de la mala hierba *Amaranthus palmeri* con resistencia múltiple a los herbicidas glifosato e inhibidores de ALS y en los efectos fisiológicos de estos herbicidas. Para ello, se han caracterizado a nivel molecular los mecanismos de resistencia y se ha estudiado la respuesta fisiológica a diferentes niveles tras el tratamiento con glifosato, piritiobac o la



mezcla de ambos. Este objetivo general se aborda de manera secuencial a través de dos objetivos específicos:

- Caracterizar los mecanismos de resistencia múltiple a glifosato e inhibidores de ALS y en valorar el nivel de resistencia de los individuos de una población RM. Para ello:
- Se han analizado las bases moleculares y bioquímicas de la resistencia a glifosato evaluando los niveles de sobreexpresión génica de *EPSPS* y cantidad de siquimato.
- Se ha caracterizado la resistencia a piritiobac, para determinar si el mecanismo de resistencia era *TSR* por mutaciones puntuales en el gen *ALS* mediante estudios de secuenciación, genotipado y actividad ALS *in vitro*.
- 2. Estudiar la respuesta fisiológica de la población RM tras la aplicación individual de glifosato y piritiobac, o la mezcla de ambos herbicidas, a nivel de metabolismo del carbono y nitrógeno, y de los principales indicadores relacionados con la acción de estos herbicidas. Se ha utilizado, además, una población con resistencia simple a glifosato. Para ello:
- Se han analizado los efectos en las rutas especificamente inhibidas por estos herbicidas, a nivel de expresión de los genes y contenido de enzimas y actividades enzimáticas. Con ello se ha abordado también la existencia de una posible regulación cruzada transcripcional entre ambas rutas.
- Se ha estudiado el efecto de los herbicidas en el metabolismo del carbono (contenido de azúcares), metabolismo del nitrógeno (aminoácidos libres) y se ha valorado la implicación de la proteólisis (actividades proteolíticas VPEs, PLCPS, y SHs mediante la técnica ABPP) en la respuesta de las plantas a los herbicidas.
- Se han analizado los efectos en el contenido de glutation y en la actividad del enzima glutation S-transferasa (GST), ya que han sido pocos los estudios que han abordado y caracterizado esta sistema de la detoxificación de los herbicidas en malas hierbas resistentes.





MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Para desarrollar los experimentos, se utilizaron semillas de *Amaranthus palmeri* originarias de Carolina del Norte (CN, EE.UU.) y de Arizona (AR, EE.UU.). Todas las semillas fueron amablemente suministradas por el Dr. Todd Gaines (Colorado State University, Fort Collins, Colorado, EE.UU.) y se corresponden con tres poblaciones que se describen a continuación.

3.1.1 POBLACIÓN SENSIBLE

La población sensible (S) al glifosato y a inhibidores de ALS es originaria de CN. Esta población ha sido utilizada para comparar los resultados con las otras dos poblaciones RM y RG, confirmar la resistencia a ambos herbicidas en la población RM, y continuar profundizando en el estudio de la respuesta fisiológica a la aplicación herbicida. Se trata de una población representativa de la especie que ya ha sido caracterizada fisiologicamente en trabajos previos del grupo de investigación (Fernández-Escalada *et al.*, 2016, 2017, 2019; Zulet-González *et al.*, 2020).

3.1.2 POBLACIÓN RESISTENTE AL GLIFOSATO (RG)

Las semillas de *A. palmeri* de la población resistente al glifosato (RG) proceden también de CN, y son resistentes por amplificación génica de *EPSPS*. La población fue caracterizada con anterioridad (Chandi *et al.*, 2012), se detectó que presentaba 47,5 copias más del gen *EPSPS* respecto al número de copias de la población S (Fernández-Escalada *et al.*, 2016), y se han descrito diversos aspectos fisiológicos de la misma (Fernández-Escalada *et al.*, 2017, 2019).

3.1.3 POBLACIÓN RESISTENTE MÚLTIPLE (RM)

La población RM, correspondiente al biotipo resistente múltiple al glifosato y a inhibidores de ALS es originaria de Arizona. Para disminuir la variabilidad y conseguir homogeneidad en la caracterización de la resistencia múltiple y en los resultados correspondientes a los efectos fisiológicos después de los tratamientos herbicidas, todas las semillas utilizadas en este estudio provienen de un mismo individuo hembra. De un grupo numeroso de plantas obtenidas



del lote de semillas facilitado, primero se trataron con glifosato (DR: 0,84 Kg/ha) y se comprobó la resistencia midiendo la acumulación de siquimato como indicador de la actividad EPSPS *in vivo* en discos de hoja (Fernández-Escalada *et al.*, 2016). Los individuos que presentaron mayor resistencia a glifosato (menor contenido en siquimato con altas concentraciones de glifosato), se trataron posteriormente con piritiobac (DR: 89 g ai/ha). De los supervivientes, se eligió una hembra muy prolífica (Imagen 3.1), que días después del tratamiento herbicida, presentó visualmente un buen estado en su desarrollo vegetal. Esta hembra se polinizó manualmente con individuos machos también resistentes a glifosato y supervivientes al tratamiento con piritiobac. Es decir, las hembras fueron polinizadas con machos resistentes a ambos herbicidas, pero no se pudo identificar el origen del polen a nivel de individuo. Los progenitores no fueron caracterizados a nivel de copias génicas de *EPSPS* ni de mutaciones en el gen *ALS*.



Imagen 3.1. Individuo hembra seleccionado para la obtención de semillas y selección del biotipo final RM.



3.2 CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS Y TRATAMIENTOS

3.2.1 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Las semillas se esterilizaron en superficie según el método de Labhilili *et al.*, (1995). Para ello, se sumergieron en una mezcla de 1 % (p/v) de hipoclorito de sodio y 0,01 % (p/v) de dodecilsulfato sódico (SDS) durante 40 minutos. Tras ser aclaradas con numerosos lavados de agua desionizada para eliminar restos de la solución anterior, se mantuvieron otros 10 min en una disolución 0,01 N de HCl, tras lo cual se aclararon de nuevo.

Posteriormente fueron colocadas, una a una, en unas pequeñas piezas de plástico rellenas de 0,65 % (p/v) agar al denominadas *Seedholders* (Araponics SA, Bélgica) (Figura 3.1.A), y éstas en contenedores de plástico con las tapas adaptadas, rellenos de agua desionizada y envueltos con film de plástico para mantener la humedad (Figura 3.1.B).



Figura 3.1. A) Seedholder utilizado para colocar las semillas. **B)** Plántulas de *A. palmeri* germinando en *Seedholders* rellenos de agar y sumergidos parcialmente en agua desionizada.

Para su germinación se colocaron en una cámara frigorífica a 4 °C en oscuridad durante 7 días. Tras ello, se incubaron durante 48 h en un ciclo de luz/oscuridad de 16 h/8 h, a una temperatura de 28/18 °C (Tabla 3.1).

	Período de tiempo (días)	Temperatura (°C) (Día/noche)	Fotoperiodo (h) (día/noche)
Pre-germinación	7	4	oscuridad
Germinación	2	28/18	16/8

Tabla 3.1.	Condiciones	de	germinación	de	A. palmeri.
			9		· · · · · · · · · · · · · · ·



3.2.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Una vez germinadas las plántulas, se retiró el film de plástico que envolvía los contenedores y se colocaron dentro de la cámara de crecimiento, (Figura 3.2) con el fin de mantener una temperatura próxima a 30 °C y amortiguar el estrés que sufren las plántulas al cambiar de condiciones. Transcurrida una semana aproximadamente, las plántulas estabilizadas fueron trasplantadas (junto con seedholders) contenedores menor densidad los а con una (7 plantas/contenedor) y una capacidad de 2,7 L, donde crecieron en un cultivo hidropónico puro con aireación forzada (Figura 3.2.A). Diez días después, los tangues hidropónicos de 2,7 L fueron reemplazados por tangues de 4,7 L (Figura 3.2.B).

El crecimiento de las plantas se produjo en una cámara bajo las siguientes condiciones controladas:

- Fotoperiodo: 18 h luz / 6 h oscuridad
- Temperatura: 22 °C día / 18 °C noche
- Humedad relativa: 60 % día / 70 % noche
- Radiación fotosintéticamente activa (PAR): 500 μmol s⁻¹ m⁻²



Figura 3.2. A) Cultivo hidropónico puro de *A. palmeri* en contenedores de 2,7 L con aireación forzada en la cámara de crecimiento. **B)** Cultivo hidropónico puro de *A. palmeri* en contenedores de 4,7 L. con aireación forzada. Estado de las plantas justo antes de la aplicación de los tratamientos.

El mismo día que los tanques hidropónicos de 2,7 L fueron reemplazados por tanques de 4,7 L, el agua de los contenedores se cambió por solución nutritiva, y a partir de ese momento, fue reemplazada por solución nutritiva fresca cada semana. La solución nutritiva empleada fue la establecida por Hoagland & Arnon (1950) enriquecida con una concentración 15 mM de KNO₃. La composición final de la solución nutritiva fue la siguiente: 3 mM Ca (NO₃)₂4H₂O;



2 mM MgSO₄7H₂O; 1,6 mM KH₂PO₄, 0,1 mM Na₂Fe EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); 43,3 μ M H₃BO₃, 9,1 μ M MnCl₂4H₂O, 0,3 μ M CuSO₄5H₂O, 0,8 μ M ZnSO₄7H₂O, 0,1 μ M Na₂MoO₄2H₂O y 15 mM KNO₃.

3.2.3 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON HERBICIDAS

Todos los tratamientos con herbicidas fueron aplicados cuando las plántulas de las tres poblaciones (S, RG y RM) contaban con aproximadamente 21 días desde su colocación en la cámara de crecimiento, y eran homogéneas en tamaño y altura. Se aplicaron dos herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos (IBA): glifosato y piritiobac.

El <u>glifosato</u> es un herbicida inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (IBAA) perteneciente a la familia química de las glicinas (familia G, clasificación HEAP, Tabla 1.1). El producto comercial utilizado se presenta en forma líquida como sal de isopropilamina (fórmula comercial, 360 g a.e. L⁻¹; FORTIN Green, KEY, Lleida, España). La dosis aplicada de glifosato, fue la dosis recomendada (DR) para el control de *A. palmeri* en campo, 0,84 kg/ha (Tabla 3.2) (Culpepper *et al.*, 2006).

El herbicida <u>piritiobac</u> es un inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (IBAR) perteneciente a la familia química de los pirimidinil benzoatos (Tabla 1.1). El producto químico utilizado fue piritiobac puro (Dr. Ehrenstorfer LGC, Augsburg, Alemania). La dosis aplicada de piritiobac fue la recomendada para el control de *A. palmeri* en campo, DR 89 g ai/ha (Tabla 3.2) (Wise *et al.*, 2009).

Para mejorar la solubilidad del producto técnico piritiobac, se aplicó junto a la solución herbicida, 0,25 % (p/v) del adyuvante Biopower, formado por óxido de alquil fenol etileno (fórmula comercial, Agral, 20 % (p/v), Syngenta, Madrid, España) y 60 % de ácido parafínico, 24 % de oleato de Polioxietilensorbitano y 12 % de alcohol tridecilico etoxilado (fórmula comercial, Canplus, Bayer CropScience, Madrid, España). Este adyuvante fue elegido por no provocar fitotoxicidad y mejorar la humectabilidad tal y como se había observado en estudios anteriores del grupo (Zulet, 2013).

Las plantas de las tres poblaciones de *A. palmeri*, también fueron tratadas conjuntamente con ambos herbicidas. Primero se aplicó el glifosato, y unos minutos después, una vez que las hojas estuvieron completamente secas, se



aplicó el inhibidor de ALS, manteniendo las mismas dosis recomendadas en campo y utilizadas en las aplicaciones individuales de los herbicidas (Tabla 3.2).

En las tres poblaciones se utilizaron como control plantas a las que no se les aplicó ningún tratamiento herbicida, pero sí fueron pulverizadas con agua mezclada con adyuvante (Tabla 3.2).

Poblaciones S, RG, RM			
TRATAMIENTOS			
Control	Agua + Adyuvante		
Glifosato	0,84 kg/ha		
Piritiobac	89 g ai/ha + adyuvante		
G + P	0,84 kg/ha + 89 ai g/ha (+ adyuvante)		

Tabla 3.2. Tratamientos aplicados en las tres poblaciones; S, RG y RM de A. palmeri.

Las aplicaciones se realizaron sobre la superficie de los contenedores de 504 cm² (28 x 18 cm), aplicando un volumen de 2,52 mL de caldo por cada contenedor, mediante un aerógrafo (Modelo Junior Start, Definik, Sagola, España) (Figura 3.3) conectado a un compresor (Modelo Werther one, Breverrato, 60 W; 10 Lm⁻¹; 2,5 bar) (Figura 3.3). Los tratamientos se pulverizaron directamente sobre las hojas de las plantas en una cabina de flujo. Después de absorber el tratamiento o los tratamientos, cuando las hojas de las plantas estuvieron completamente secas, fueron devueltas a la cámara de crecimiento.



Figura 3.3. Aplicación de herbicida sobre las hojas de las plantas mediante un aerógrafo.



3.3 MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se designó como día 0 el momento en el que las plantas fueron tratadas con los herbicidas, y tres días después se muestrearon, para que fuese un periodo de tiempo suficientemente largo para comprobar los efectos de los tratamientos sobre los parámetros fisiológicos a estudiar, pero sin llegar a provocar la muerte de las plantas. Para el estudio de las tres poblaciones de *A. palmeri* se procedió de la misma manera; se muestrearon hojas en viales de 6 mL, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron conservadas a -80 °C hasta su utilización en las posteriores determinaciones analíticas.

Para el análisis del contenido en siquimato, el día del muestreo se obtuvieron discos de hoja de 4 mm de diámetro en fresco con la ayuda de un microperforador Harris uni-core[™] (Healthcore, Bucks, Reino Unido) (Figura 3.4.A). Para ello, de cada planta se tomaron 3 discos de la hoja más joven totalmente expandida, evitando la nervatura de las hojas en la escisión. Se almacenaron en microtubos de 2 mL, se congelaron en nitrógeno líquido y fueron almacenados a -80 °C hasta los posteriores ensayos de siquimato.

Las muestras de hojas contenidas en los viales, se pulverizaron utilizando un micro-desmembrador Retsch (MM200, Retsch ®, Hann, Alemania) (Figura 3.4.B) y manteniendo en todo momento la temperatura de congelación con nitrógeno líquido. Una vez trituradas se realizaron alícuotas del peso deseado y se conservaron a -80 °C para su posterior utilización en las determinaciones analíticas.



Figura 3.4.A) Micro-perforador Harris uni-core[™] utilizado para obtener discos de hoja. **B)** Molino mezclador o micro-desmembrador usado para triturar y homogeneizar las muestras de hoja.



3.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.4.1 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.4.1.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS RELATIVO DEL GEN EPSPS Y DEL GEN ALS

3.4.1.1.1 EXTRACCIÓN

La extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó como Fernández-Escalada et al., (2016). El ADNg se extrajo de alícuotas de hojas jóvenes de la población RM y de la población S de *A. palmeri*. Aunque el ADN puede ser extraído de todo tipo de material vegetal (por ejemplo, hojas, raíces, tallos, semillas, tejido conservado), las hojas jóvenes, recién emergidas son a menudo las mejores para la extracción porque son más fáciles de triturar que el tejido maduro y pueden contener menores cantidades de polisacáridos, polifenoles, y otros metabolitos secundarios que pueden interferir con el aislamiento del ADN (Délye *et al.*, 2015).

El material vegetal (0,1 g) fue homogeneizado en 375 µL de lysis buffer 2x (0,6 M NaCL, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 40 mM EDTA (pH 8,0), 4 % de sarcosyl, 1 % de SDS y en 375 µL de 2 M de urea). Posteriormente, se añadió a la mezcla un volumen de 750 µL de fenol/cloroformo/isoamyl alcohol (25:24:1) y se agitó vigorosamente. El homogeneizado fue centrifugado a 19,200 g durante 10 min a temperatura ambiente. Para precipitar el ADN, se añadió al sobrenadante un volumen de 525 µL de isopropanol frío y se centrifugó a 19,200 q durante 15 min a 4 °C. La pastilla de ADN se lavó dos veces con 1 mL de 70 % etanol, se dejó secar al aire en la campana de flujo laminar y posteriormente se resuspendió en 25 µL de buffer de resuspensión (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), conteniendo 30 µg mL⁻¹ de RNAsa A). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 5 min para degradar los RNAsas que pudiesen llegar a contaminar las muestras. El ADN extraído se cuantificó usando un módulo BioTek® para microplacas (BioTek® Instruments, Vermont, EE.UU.) utilizando una placa micro-volúmenes Take3 (Figura 3.6) y con el programa informático software Gen5.1.11. La lectura de cada muestra se hizo a una densidad óptica de 260 nm y seguidamente para analizar la pureza de la muestra, se tomó una segunda lectura a 280 nm. La calidad e integridad de la muestra del ADN se comprobó mediante electroforesis en 1 % de gel de agarosa. Las muestras de ADN diluido corrieron en el gel a 75 mA durante 35 min. Los geles se visualizaron usando



un Gel Doc 2000 system (Laboratorios Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EE.UU.). Las concentraciones de ADN se ajustaron a 5 ng $\mu L^{-1}.$



Figura 3.6. Placa micro-volúmenes Take3 utilizada para cuantificar el ADN extraído de las muestras.

3.4.1.1.2 PCR CUANTITATIVA

Mediante la técnica PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se determinó el número de copias del gen *EPSPS* en 71 individuos de la población RM y en 60 individuos de la población S, y del gen *ALS*, en 71 individuos de la población RM y en 53 individuos de la población S. Tanto el número de copias del gen *EPSPS* como del gen *ALS*, se calculó relativo al gen de referencia *CPS* (Ma *et al.*, 2013) en la población RM y en la población S de *A. palmeri*. Para analizar la resistencia a los herbicidas, los genes de referencia deben consistir en genes cuya expresión se ha demostrado estable antes y después de la aplicación de herbicidas, y entre plantas resistentes y sensibles (Délye *et al.*, 2015). Además, deben participar en diferentes vías metabólicas, bajo regulaciones de expresión independientes, para reducir el riesgo de un efecto similar de la aplicación del herbicida. Este gen de referencia *CPS*, codifica la subunidad grande de la carbamoil fosfato sintetasa y se utilizó por ser un gen de copia única.

La medición de la RT-qPCR se realizó tal y como fue descrito por (Gaines *et al.*, 2010) con algunas modificaciones. El set de cebadores o *primers* utilizados se especifican en la Tabla 3.3. Para determinar la eficiencia de los *primers*, se usó una curva estándar con las siguientes diluciones seriadas de ADNg de la población RM; 1, 1/5, 1/25, 1/125, y 1/500 (Fernández-Escalada *et al.*, 2016).



GEN	FORWARD	REVERSE	Referencia
EPSPS	atgttggacgctctcagaactcttggt	tgaatttcctccagcaacggcaa	Gaines <i>et al.,</i> 2010
ALS	gctgctgaaggctacgct	gcgggactgagtcaagaagtg	Gaines <i>et al.,</i> 2010
CPS	attgatgctgccgaggatag	gatgcctcccttaggttgttc	Ma et al., 2013

Tabla 3.3. Secuencias nucleotídicas de los *primers* utilizados en la RT-qPCR para la amplificación génica de *EPSPS*.

La RT-qPCR se llevó a cabo en una placa óptica de 96 pocillos usando un termociclador Bio-Rad CFX Connect TM Real-Time System (Laboratorios Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EE.UU.) (Figura 3.7). Cada reacción se llevó a cabo usando 10 ng de ADNg en un volumen total de 20 μ L que contenían 1x SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japón), 300 nM de *primer forward* o cebador hacia adelante y 300 nM de *primer reverse* o cebador reverso. El perfil térmico usado para la RT-qPCR fue el siguiente: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 1 min y 40 ciclos de: 95 °C durante 30 s y 60 °C durante 1 min. La curva de desnaturalización o también denominada *melting curve*, fue conducida con una desnaturalización final de 52 °C durante 5 s y 95 °C durante 15 s (Figura 3.8).



Figura 3.7. Preparación placa de 96 pocillos para la realización de la RT-qPCR.



Figura 3.8. Perfil térmico usado para la RT-qPCR tomado de VHIR (modificado de Vall d'Hebron Instituto de Recerca).



El parámetro específico de la RT-qPCR es el Ct o Cq (*Threshold of Quantitative cycle*), que indica el ciclo de la reacción de amplificación en la cual la fluorescencia procedente de la muestra se eleva significativamente por encima de la fluorescencia inespecífica del fondo. Para calcular los valores finales de Ct, se realizaron dos réplicas técnicas por cada réplica biológica en cada una de las dos poblaciones. La media del incremento en el número de copias de *EPSPS* y de *ALS* relativo a *CPS* y la desviación estándar se calcularon para cada muestra. El incremento se expresó como $2^{\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct$, *EPSPS* - Ct, *CPS* (incremento en el número de copias de *EPSPS* y (Livak & Schmittgen, 2001).

3.4.1.2 SECUENCIACIÓN DEL GEN ALS

A partir de la extracción de ADNg del tejido foliar, desarrollada en el apartado 3.4.1.1.1 se llevó a cabo la secuenciación del ADN de 115 individuos de la población RM. También se secuenciaron 12 individuos de la población S para confirmar la ausencia de mutaciones. La zona secuenciada correspondía a los dominios CAD y BE del gen *ALS* donde se encuentran las mutaciones que confieren resistencia a inhibidores de ALS en *A. palmeri* (Torra *et al.*, 2020).

Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron utilizando el kit de limpieza de PCR Speed tools (Biotools, B&M Laboratorios, Madrid, España). La secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados purificados fue realizada por el STAB (Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias) de la Universidad de Extremadura (España). Los fragmentos del gen ALS que incluían las regiones de esos codones se amplificaron usando dos pares de primers (Tabla 3.4) diseñados a partir de la secuencia de ALS número de acceso KT833339 del Genbank (A. palmeri) usando el software PRIMER 3 PLUS. La mezcla de cada reacción contenía: 10 ng de ADNg, 3 µL de tampón de reacción (10x), 2,4 µL de 2,5 mM dNTP, 1,125 μ L de *primer* (10-pmol μ L⁻¹) y 0,3 μ L de Tag polimerasa (5 unidades μL^{-1}) en un volumen final de 30 μL . La amplificación se realizó con un programa de 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 36 ciclos de 40 s a 94 °C, 4 s a 57 °C y 50 s y 8 min a 72 °C y un ciclo final de 8 min a 72 °C. La separación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en 1,3 % (p/v) de gel de agarosa y se tiñeron con Red Safe 20000X (Intron) y se registraron las imágenes con fotografía en gel (Torra et al., 2020).



GEN ALS					
Nombre primer	er FORWARD REVERSE		Referencia		
Ama BE	TGCTATTGGAGCTGCTGTTG'	TTGGAGCTGCTGTTG' CCTTCTTCCATCACCCTCTG			
Ama CAD	CGCCCTCTTCAAATCTCATC	CAATCAAAACAGGTCCAGGTC	2020		

Tabla 3.4. Pares de *primers* (*forward* y *reverse*) utilizados para la amplificación por PCR de los dominios CAD y BE del gen de la acetolactato sintasa (*ALS*).

3.4.1.3 ENSAYO dCAPS

Con el objetivo de analizar las bases moleculares de la resistencia a inhibidores de ALS y llevar a cabo la genotipificación de los individuos de la población RM que presentaron mutaciones puntuales en el gen *ALS*, se llevó a cabo el ensayo dCAPS (digestión diferencial de las secuencias polimórficas amplificadas). Este ensayo se usa habitualmente para detectar el cambio de un nucleótido en una posición particular. Mediante PCR se crea un sitio de reconocimiento para un enzima de restricción en una secuencia donde no existe detección de polimorfismos de nucleótidos (secuencia sin mutación, salvaje o también llamada secuencia *wild-type*) (Figura 3.9) (Délye & Boucansaud, 2008).

Las mutaciones puntuales para las cuales se desarrolló este ensayo fueron las siguientes;

<u>Mutación A122</u>: la secuencia original o secuencia sin mutación produce una única banda digerida (D) de 217 bp, mientras que la mutación puntual en los nucleótidos codificantes del gen *ALS* produce la pérdida del sitio de restricción y la visualización de una única banda no digerida (ND) de tamaño 246 bp (Tabla 3.5) en el caso de individuos homocigotos y las dos bandas, ND y D, 217 y 246 bp, en el caso de los individuos heterocigotos.

<u>Mutación S653</u>: la secuencia sin mutación produce una única banda D de 214 bp, mientras que la mutante en la posición 653, cuando es homocigota produce una banda ND de 241 bp, pero cuando es heterocigota, se pueden observar dos bandas, una ND de 241 bp y una D de 214 bp (Tabla 3.5).

<u>Mutación W574</u>: la secuencia sin mutación produce una única banda D de 230 bp, mientras que la mutante en la posición 574, cuando es homocigota produce



una banda ND de 256 bp, pero cuando es heterocigota, se pueden observar dos bandas, una ND de 256 bp y una D de 230 bp (Tabla 3.5).

A partir de alícuotas de la extracción de ADNg (ver apartado 3.4.1.1.1) con una concentración final de 0,1 μ g/ μ L, se realizaron las PCR para así amplificar la secuencia deseada y crear la zona de reconocimiento del enzima de restricción correspondiente a cada mutación. Se diseñaron cebadores para detectar las mutaciones puntuales en el gen *ALS* que producen la sustitución en A122, W574 y S653 (Tabla 3.5). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ L, conteniendo: 0,2 mM dNTPs mezcla, 10 μ M de los *primers forward y reverse* (Tabla 3.5), buffer de amplificación 10x Taq buffer con KCl, 1,5 mM de MgCl, 1,25 U del enzima Taq ADN polimerasa y el resto de agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen total. Para validar la fidelidad del test, se utilizaron como control muestras de ADN previamente secuenciadas y sin mutación, correspondientes a la población S.

Tabla 3.5 Secuencias nucleotídicas de los primers utilizados en la PCR, longitud, temperatura de
anillamiento y amplicon para la detección de las mutaciones en los aminoácidos A122, W574 y
S653. Las temperaturas de anillamiento se eligieron haciendo un gradiente de temperaturas por
cada pareja de cebadores.

CEBADORES		Longitud	Temp. Anillamiento	Amplicon	
A122	Fwd 5'-3'	CGCCGCCCTCTTCAAATCTC	20bp	61 °C	246bp
	Rv 5'-3'	AGTAAGAGCTTGATGGATTTCCATGCAT	28bp		
W574	Fwd 5'-3'	CAATCAACATTTAGGTATGGTTGTTCCA	28bp	60 °C	256bp
	Rv 5'-3'	AGGCAGCACATGCTCCTGAT	20bp		
S653	Fwd 5'-3'	CCGGGCACATACATACCTCGGGAATCCT	28bp	74 °C	241bp
	Rv 5'-3'	TGTGATGGTGTCCTTGAAGGCGGCAGC	27bp		'

Para comprobar la correcta amplificación de los fragmentos de ADN seleccionados, se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa utilizando un equipo Bio-Rad Sub-Cell®GT (Laboratorios Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EE.UU.). Se prepararon los geles de agarosa al 3 % y se corrieron durante una hora a 100 mA. El producto de la PCR utilizado para la digestión, fue ADN a una concentración de 5 µg. Las digestiones se realizaron a 37 °C durante 150 min, utilizando unos enzimas de restricción (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,


EE. UU.) (Tabla 3.6 y Figura 3.9) diseñados para reconocer y cortar específicamente las secuencias nucleotídicas. Si existe un polimorfismo nucleotídico, el sitio de restricción no se genera y el patrón de digestión es diferente. Para completar la digestión se utilizó *green* buffer y agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen total de 30 μL de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las bandas se visualizaron en gel de agarosa al 3%, teñido con tinción de gel de ADN SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) durante 1 h 15 min a 130 mA con tampón TAE 1x. Los geles de electroforesis resultantes se visualizaron bajo luz ultravioleta en un Gel Doc 2000 system (Laboratorios Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EE.UU.) El perfil de digestión de cada población se comparó con su respectivo perfil de control no digerido, así como el perfil de digestión de control sensible.

Mutación puntual	Enzima de restricción	Referencia (Thermo Scientific)
A122	Pael	FD0604
W574	Ncol	FD0574
S653	Eco47III	FD0324

Tabla 3.6. Características de los enzimas de restricción utilizados para el ensayo dCAPs.



Figura 3.9. Posiciones de los *primers*. Las posiciones de los nucleótidos en el gen *ALS* en *A. palmeri* están por encima de la secuencia. Los *primers forward* están encima de la cadena de ADN y los *primers reverse* están por debajo de la cadena de ADN. Los codones objetivos o *target* están encuadrados y se indican en azul, los nucleótidos desajustados de los *primers* están encuadrados, y los sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción se indican en naranja y la posición de los sitios de corte está marcada con una flecha roja.



3.4.1.4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TRÁNSCRITOS

Se determinó el nivel de transcripción relativa de todos los enzimas de 9 genes de la ruta de BAA y de 4 genes de la ruta de BAR, como ya se había descrito previamente (Fernández-Escalada *et al.*, 2017) en la población RM y en la población S de *A. palmeri*. Cómo esta especie no está secuenciada, los cebadores fueron diseñados usando una especie casi secuenciada de la familia de las Amarantáceas; *Amaranthus hypochondriacus*, y cruzada con la secuencia de *A. thaliana* L. (Fernández-Escalada *et al.*, 2017). Para desarrollar los cebadores específicos de los genes *CM1* y *CM2* correspondientes a la ruta de BAA, las secuencias de alineamiento se obtuvieron de los genes de *Amaranthus hypochondriacus* (Zulet-González *et al.*, 2020). Se realizaron mínimo 2 y máximo 4 réplicas biológicas por tratamiento en cada población.

3.4.1.4.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y SÍNTESIS DE ADNC

Se aisló el ARN total de muestras de hojas de *A. palmeri* utilizando el kit de extracción NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, GmbH, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la cantidad de ARN aislado en cada muestra se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 260 / 280 nm con el programa Gen5.1.11. (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.). La calidad del ARN se midió mediante electroforesis en 1 % gel de agarosa (tal y como se realizó para medir la calidad del ADN, apartado 3.4.1.1.)

La extracción de ADNc (ADN complementario) se realizó a partir de 2,75 μ g de RNA libre de ADN, utilizando el kit Bio-Rad iScriptTM cDNA Synthesis, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para un volumen final de 10 μ L por reacción, se añadieron 2 μ L de la mezcla de reacción iScript (5X), 0,5 μ L de enzima transcriptasa reversa, 2 μ L de ARN total y 5,5 μ L agua libre de nucleasas. Esta concentración fue calculada para obtener 0,5 μ g de RNA por μ L de muestra. Posteriormente, la reacción se incubó 5 min a 25 °C, 30 min a 42 °C, 15 min a 48 °C, 5 min a 85 °C y se mantuvo a 10 °C hasta su almacenamiento a -20 °C.

3.4.1.4.2 PCR CUANTITATIVA

La qRT-PCR se realizó utilizando un termociclador Bio-Rad CFX Connect TM Real-Time System (Laboratorios Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EE.UU.) con capacidad para placas de 96 pocillos. Para la reacción qPCR, el kit utilizado fue



PowerUPTM SYBRTM Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Lithuania). En cada pocillo se cargaron 10 μ L de la siguiente mezcla de reacción: 1 μ L de ADNc, (1-10 ng/ μ L), 5 μ L de PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix y 4 μ L de una solución con los *primers reverse* y *forward* (Tabla 3.7) a la concentración 1 μ M, en agua libre de nucleasas.

El programa utilizado para todas las qRT-PCR consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y una temperatura de 52 - 61 °C durante 20 s para el anillamiento y la extensión. La temperatura óptima para el anillamiento de cada cebador fue determinada usando un gradiente PCR. Todos los oligonucleótidos utilizados junto con sus temperaturas óptimas de anillamiento se describen en la tabla 3.7. El análisis de la curva de disociación (*melting curve*) se realizó para verificar la amplificación de productos de PCR individuales.

Para comparar los datos de las diferentes placas de PCR o muestras de ADNc, los valores Ct de todos los genes fueron normalizados con el valor Ct promedio del gen β -tubulina obteniendo un valor para cada gen en cada muestra. El nivel de transcritos relativos al control para cada individuo en cada población, fue calculado usando el método de cuantificación relativa 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} (Livak & Schmittgen, 2001). Para ello, se emplean valores de CT (cycle threshold) correspondiente al número de ciclo de PCR en el cual la fluorescencia detectada se puede diferenciar del ruido de fondo. El método 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} permite comparar la CT de los genes a analizar con la CT del gen de referencia, mediante la siguiente ecuación dónde:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{gen interés} - Ct_{gen referencia}) - (Ct_{gen interés} - Ct_{promedio control gen interés})$$
Proporción de expresión relativa = 2^{- $\Delta\Delta Ct$}

Se realizaron 2 réplicas técnicas y entre 2 y 4 réplicas biológicas en cada tratamiento y por cada una de las dos poblaciones analizadas. Se incluyó un control negativo por cada mezcla de reacción para descartar posibles contaminaciones cruzadas entre muestras.



MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.7. Las secuencias nucleotídicas de los *primers* utilizados en la PCR a tiempo real y su temperatura de anillamiento se tomaron de Zulet-González *et al.*, (2020). Los cebadores utilizados corresponden a genes de enzimas de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos: *DAHPS*, *DHQS*, *DQ/SD*, *SK*, *EPSPS*, *CS*, *CM* y *AS*. También se utilizaron cebadores que corresponden a genes de enzimas de la ruta de biosíntesis de aminoácidos: *AHAS*, *AHAIR*, *DHAD* y *TA*. El gen de normalización seleccionado para este estudio fue: β-tubulina.

GEN	FORWARD	REVERSE	Temp. Anillamiento			
			(-C)			
	Ruta de BAA					
DAHPS	cctcataggatgataagggc	ctttgcatggcagcataacc	55			
DHQS	gcattgttggctagggatcc	aacctcggccttgttttcac	61			
DQSD	ggtgtactcaagcaaggagc	tgtggactcttactatggcc	57			
SK	gattctgaagcacaaagcagc	cagttgttttcccagagccc	55			
EPSPS	aatgctaaaggaggccttcc	tcaatctccacgtctccaag	61			
CS	cttgatagaaggaggcctgg	gtttctttcctaggagtagtg	61			
AS	tttggagggaaggttgtgcg	ctggtgagctttttccatgc	52			
СМ1-3	gaatccaagcccgcgtataa	cttcaatccaatcgtctcaacaag	59			
СМ 2	aagggtactgaagctgttcaag	tgtgctaatgaaggcggtaag	59			
Ruta de BAR						
AHAS	cttcctcgacatgaacaagg	attagtagcacctggacccg	57			
AHAIR	atggctcagattgagatcttg	ccacggcttcaatcacactc	52			
DHAD	taccatggcatcagctatcg	ggtgttgacgagctgtaagg	55			
TA	gtgaagatgatcttcgtcggc	tcacaatcagacttgaaagatg	52			
Genes de normalización						
B- TUBULINA	gatgccaagaacatgatgtgt	tccacaaagtaggaagagttc	61			



3.4.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ALS in vitro

3.4.2.1 EXTRACCIÓN, RESUSPENSIÓN Y DESALADO

Se prepararon los extractos enzimáticos a partir de 1 g aproximadamente de hojas congeladas. Se realizó la determinación de ALS *in vitro* en 37 individuos de la población RM que habían presentado mutaciones y de 6 individuos de la población S. El medio de homogeneización fue el descrito por (Singh *et al.*, 1988) con alguna modificación. El volumen de homogeneización fue de 10 mL de un tampón ajustado a pH 7,5 que contenía 100 mM K₂HPO; 5 mM piruvato sódico; 5 mM MgCl₂; 5 mM EDTA y 10 % (v/v) de glicerol y añadido en fresco: 2 % de polivinilpirrolidona (PVPP), 100 µM flavín adenín dinucleótido (FAD) y 0,5 mM tiamina difosfato (TPP).

El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de Miracloth® (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania) y se centrifugó a 14,878 *g* durante 20 min (Singh *et al.*, 1988). El sobrenadante fue sometido a fraccionamiento salino con sulfato amónico (25 - 50 %). Para ello, se recogió y se midió su volumen, y mediante el programa Encorbio (Ammonium Sulfate Calculator from EnCor Biotechnology Inc.), se calculó la cantidad de sulfato amónico a añadir. Una vez obtenida la cantidad, se fue añadiendo lentamente a la muestra durante 30 min en agitación con hielo y centrifugándolo posteriormente a 14,878 *g* durante 20 min. Se recogió el sobrenadante y otra vez se precipitó con sulfato amónico siguiendo el paso previamente descrito. Tras la tercera centrifugación, se descartó el sobrenadante y se guardó la pastilla obtenida.

Dicha pastilla se resuspendió en 2,5 ml de un tampón que contenía 100 mM K₂HPO₄ (pH 7,5); 0,5 mM MgCl₂ y 20 mM de piruvato sódico (Ray, 1984). Esta suspensión se desaló en una columna SephadexTM G-25M (PD-10 Columns, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), previamente equilibrada con el medio de suspensión. El extracto desalado se utilizó inmediatamente para los ensayos de actividad enzimática y se determinó su contenido de proteína según Bradford (1976) (ver apartado 3.4.3.3 contenido de proteína soluble). Todas las operaciones fueron realizadas a 4 °C.

Las columnas se reutilizaron tras hacer dos lavados con 2,5 mL de 50 mM NaOH y 20 mL del medio de suspensión y un último lavado con agua destilada.



3.4.2.2 ENSAYO DEL ENZIMA ALS

La reacción enzimática se llevó a cabo según el método descrito por Singh *et al.*, (1988) con modificaciones. De los 2,5 mL de extracto enzimático desalado, se añadieron 90 μ L a tubos *eppendorfs* de 2 mL que contenían 30 μ L del herbicida piritiobac para conseguir las siguientes concentraciones finales: 0,01 μ M, 0,1 μ M, 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M (Figura 3.10). También se añadieron 90 μ L del extracto enzimático desalado a tubos *eppendorf* control, que contenían 30 μ L de agua.

Posteriormente, a cada uno de los tubos se le añadió 180 µL de un tampón de reacción que contenía 50 mM K₂HPO₄ (pH 7); 100 mM piruvato sódico; 10 mM MgCl₂ y 10 µM FAD y 1 mM TPP (añadido en fresco). Esta mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora tras lo cual la reacción enzimática se detuvo por la adición de 30 µL de 6 N H₂SO₄. Esta nueva mezcla se incubó a 60 °C durante 15 min para permitir que, en condiciones ácidas, el acetolactato (producto de la reacción enzimática) se descarboxilara hasta acetoína (Tabla 3.8). Transcurrido ese tiempo, se determinó la cantidad de acetoína como producto final de la actividad enzimática. La acetoína se determinó colorimétricamente (525 nm) después de añadir a cada una de las muestras problema 0,3 mL de 0,6 % de creatina (0,15 g en 25 mL agua) y 0,3 mL de 6 % naftol (1,5 g en 25 mL de NaOH 2,5 N), y tras incubarse en oscuridad durante 30 min a 37 °C. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 1000 g. Se tomaron alícuotas de 220 µL del sobrenadante de cada muestra y se añadieron a una microplaca de 96 pocillos, para la medición de la absorbancia a 525 nm en el lector de microplacas Sinergy[™] HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.) (Figura 3.11.A) y utilizando como estándar una recta patrón de acetoína en un rango de 2 a 20 µg mL⁻¹ (Figura 3.11.B).





Figura 3.10. Primera parte de la reacción. A los tubos *eppendorf* que contenían 90 μ L de extracto enzimático desalado, se les añadió 30 μ L de diferentes concentraciones herbicidas. Conteniendo los tubos finales 120 μ L (muestra + herbicida).



Figura 3.11. A) Microplaca de 96 pocillos con la recta patrón y las alícuotas de cada concentración de herbicida justo antes de la lectura de absorbancia. **B)** Recta patrón de acetoína después de añadir la creatina y el naftol y dejarlo incubar en oscuridad a 37 °C.

En el extracto enzimático pudimos encontrar cierta cantidad de acetoína no formada directamente de la actividad ALS, sino debida a otros procesos de descarboxilación. Esta acetoína se determinó llevando a cabo una serie paralela de reacciones en las cuales la reacción enzimática se detuvo añadiendo 30 µL de 4 M NaOH, evitando así que en este medio básico el acetolactato (producto de la actividad ALS) pudiese descarboxilarse hasta acetoína. De esta forma, la acetoína que se produjo será debida exclusivamente a otros procesos y no a la actividad ALS, mientras que la acetoína que se mide tras detener la reacción



con H_2SO_4 es la debida a la suma de la actividad ALS y la procedente de otros procesos.

Cada uno de los dos tipos de series de reacciones tuvo su blanco a tiempo cero respectivo. El blanco utilizado en el ensayo de se obtuvo con una muestra que había seguido el mismo proceso de reacción y en el que el 6 N H₂SO₄ o 4 M NaOH, utilizados para detener la reacción, se añadieron junto con el medio de reacción y el extracto enzimático desde el primer momento de la reacción (Tabla 3.8). Para cada una de las concentraciones de herbicida, se realizó una réplica técnica de la muestra añadiendo a tiempo final el H₂SO₄.

La actividad específica del enzima ALS se calculó como la diferencia existente entre la acetoína total producida (deteniendo con H_2SO_4) y la acetoína procedente de otras vías (deteniendo con NaOH), habiendo sido corregidos previamente ambos valores con su blanco a tiempo cero respectivo (Tabla 3.8). La actividad ALS se expresó como ng acetolactato mg⁻¹ prot h⁻¹.

La inhibición enzimática fue expresada a través del parámetro I_{50} , que representa la concentración de herbicida requerida para producir una inhibición de la actividad enzimática del 50 %. Para el cálculo del parámetro I_{50} en cada individuo, primero se calcularon los porcentajes de la actividad específica ALS para cada concentración herbicida con respecto a los controles sin herbicida que representaban el 100 % de la actividad específica ALS. A partir de estos valores obtenidos en %, se desarrollaron curvas de dosis-respuesta. Se representaron los datos de la actividad ALS en % frente al logaritmo de la dosis de herbicida para un mejor ajuste a una recta de ecuación y = ax +b, utilizando el paquete Excel. La ecuación de dicha recta se utilizó para calcular el valor I_{50} . El factor de resistencia (FR) se calculó a partir del cociente entre el valor del I_{50} de cada individuo de la población RM y el valor I_{50} promedio de los individuos de la población S (I_{50} RM/ I_{50} S).



90 μL extracto enzimático 30 μL herbicida Cf: 0,01 μΜ, 0,1 μΜ, 1 μΜ, 10 μΜ, 50 μΜ y 100 μΜ 180 μL tampón de reacción	90 μL extracto enzimático 30 μL herbicida Cf: 0,01 μΜ, 0,1 μΜ, 1 μΜ, 10 μΜ, 50 μΜ y 100 μΜ 180 μL tampón de reacción		
Tiempo 0: 30 μ L de 6 N H ₂ SO ₄	Tiempo 0: 30 μL de 4 M NaOH		
Incubación: 37 ºC 1 hora			
Tiempo F (1 h): 30 μ L de 6 N H ₂ SO ₄	Tiempo F (1 h): 30 μL de 4 M NaOH		
Incubación: 60 °C 15 min			
Determinación del contenido en acetoína			
Acetoína formada a T.F – Acetoína	Acetoína formada a T.F – Acetoína		
formada a T.O = Acetoína total	tal formada a T.O = Acetoína sir		
producida (basal + que viene de	e actividad ALS, que proviene de		
otras vías de descarboxilación de otras vías.			
acetolactato).			
Acetoína total producida (deteniendo con H2SO4) - acetoína procedente			
de otras vías (deteniendo con NaOH) = Actividad ALS			

Tabla 3.8. Esquema de la reacción en el ensayo enzimático de ALS in vitro.

3.4.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GST

3.4.3.1 EXTRACCIÓN

Se prepararon los extractos enzimáticos a partir de alícuotas de hojas previamente pulverizadas, correspondientes a las 3 poblaciones de *A. palmeri*, S, RG y RM. Se realizaron 4 réplicas biológicas por tratamiento en cada población. La extracción se realizó según Peragón & Amores-Escobar (2018), con alguna modificación. El tampón de extracción, añadido en una proporción de 3 mL por cada gramo de muestra, contenía 0,1 M Tris HCI (pH 7,5), 2 mM EDTA y se añadió en fresco: PVPP al 7,5 %, 2 mM de ditiotreitol (DTT), 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) y 14 mM de mercaptoetanol. Los extractos se centrifugaron a 27,000 g durante 25 min y se recogió el sobrenadante posteriormente para la determinación de la actividad GST.



3.4.3.2 ACTIVIDAD GST

La reacción enzimática se llevó a cabo según el método descrito por Peragón & Amores-Escobar (2018) con modificaciones. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 25 °C en tampón de reacción que contenía 100 mM fosfato de potasio (pH 6,5) y 1 mM GSH y con 28,6 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) como sustratos. En cada pocillo de la microplaca, se añadieron 8 μ L de sobrenadante de la muestra, 185 μ L del tampón de reacción con GSH y 7 μ L de CDNB. La lectura cinética se realizó a una absorbancia de 340 nm durante 30 min con una incubación de 10 min. El blanco utilizado en el ensayo contenía tampón de reacción sin GSH. La conjugación del CDNB se estimó usando una absortividad molar de 9,6 OD/ (mM*cm).

3.4.3.3 CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE

El contenido de proteína soluble se determinó en según el método propuesto por Bradford (1976). Los extractos de proteína se diluyeron con agua desionizada (1:60), se tomaron 60 µL de muestra diluida y se mezclaron por agitación con 200 µL del reactivo Bradford Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent, (Laboratorios Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EE.UU.). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se determinó la absorbancia en un lector de microplacas SinergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.) a 595 nm frente a una recta patrón de 0 µg a 6 µg de seroalbúmina bovina (BSA).

3.4.4 MEDICIONES DEL CONTENIDO DE LOS ENZIMAS EPSPS Y DAHPS

3.4.4.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

La extracción de proteínas se llevó a cabo usando alícuotas de hojas de *A. palmeri* ya trituradas de la población RM y en la población S. Se realizaron 4 réplicas biológicas por tratamiento en cada población. Se homogeneizaron añadiendo un volumen según la relación 1:4 (0,1 g PF: 0,2 mL) de tampón de extracción 100 mM MOPS, 5 mM EDTA, 1 % de Tritón-X 100, 10 % de Glicerina, 50 mM KCl, 1 mM benzamidina, 100 mM iodoacetamida, 5 % de PVPP y 1 mM



de PMSF (pH 7). Posteriormente se centrifugó la muestra a 20,000 *g* durante 30 min a 4 °C. La pastilla fue descartada y el sobrenadante se utilizó para la electroforesis e inmunodetección, una vez determinado el contenido de proteína soluble.

3.4.4.2 CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE

El contenido de proteína soluble se determinó según el método propuesto por Bradford (1976) tal y como se indica en el apartado 3.4.3.3.

<u>3.4.4.3 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE SDS-PAGE E</u> INMUNODETECCIÓN

Las proteínas fueron separadas utilizando geles homogéneos de poliacrilamida (SDS-PAGE) formados por dos partes; 4,6 % (p/v) de un gel concentrador o también conocido como *stacking gel* y 12,5 % (p/v) de un gel separador o también denominado *resolving gel*. Para la electroforesis se empleó un sistema Mini Protean 3 (Laboratorios Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EE.UU.) y se utilizó un tampón de electroforesis que contenía: 10 % (v/v) de Tris-Glicina, 1 % (v/v) de SDS y H₂O Mili-Q. Se mantuvo la electroforesis durante 15 min a 120 V y transcurrido ese tiempo, se subió el voltaje a 150 V hasta que finalizó la migración de proteínas a través de los geles.

Para la transferencia de proteínas se utilizaron membranas GE Healthcare Life Science (Amersham[™], Arlington Heights, IL, EE.UU.) de tipo PVDF (polifluoruro de vinilideno) con un tamaño de poro de 0,45 µm que habían sido previamente activadas con metanol puro. Los geles se sometieron a una corriente continua de 100 V durante 75 min en una celda de transferencia electroforética Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell (Laboratorios Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EE.UU.). El tampón de transferencia (TBS) contenía 20 % (v/v) de etanol absoluto, 10 % (v/v) de Tris-Glicina y H₂O Mili-Q. Tras la transferencia, las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada diluida en un tampón salino TTBS (10 % (v/v) de TBS y 0,05 % de Tween-20) y se dejaron durante toda la noche a 4 °C.

Una vez terminada la transferencia, los geles se tiñeron con un reactivo colorante *coomassie* denominado Gel code[™] blue safe protein stain (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.UU.) (Figura 3.12), para garantizar que la transferencia y el contenido de proteína fuesen homogéneos.





Figura 3.12. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE teñido con reactivo colorante coomassie.

Posteriormente se realizaron tres lavados de las membranas, durante cinco minutos cada uno, con el mismo tampón TTBS y se incubaron con sus anticuerpos primarios correspondientes para cada enzima. Las características de cada incubación de las membranas con los anticuerpos primarios, se detallan más adelante en el apartado 3.4.4.4 para el enzima EPSPS y en el apartado 3.4.4.5 para el enzima DAHPS.

Terminada la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las membranas tres veces con el tampón TTBS y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado *anti-rabbit* AP (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, EE.UU.) a una dilución 1:20000. Tras el posterior lavado de las membranas en TTBS, la detección de las bandas se llevó a cabo usando un kit de revelado BCIP / NBT para la detección de la actividad fosfatasa alcalina en membranas, formado por 1 % (v/v) de reactivo de color A y 1 % (v/v) de reactivo de color B, 4 % (v/v) de desarrollador de color 25x y agua Mili-Q (Laboratorios Bio-Rad Inc., Hércules, CA, EE.UU.).

Las membranas se escanearon usando un densitómetro GS-800, y la intensidad de las bandas de proteínas se cuantificó usando el *software* Quantity One (Laboratorios Bio-Rad, Inc., Hercules, CA, EE.UU.).

3.4.4.4 PARÁMETROS ESPECÍFICOS DEL ENZIMA EPSPS

Para el enzima EPSPS, en la población S se cargaron 80 µg de proteína y en la población RM 15 µg de proteína en cada pocillo. El anticuerpo primario EPSPS fue producido a partir de una construcción personalizada de péptidos (Agrisera AB, Vännäs, Suecia) frente a una secuencia de residuos (números 193 - 206) del gen *EPSPS* de *A. palmeri* (adhesión GenBank nº. FJ861242) (Fernández-Escalada et al., 2016). La dilución utilizada para este anticuerpo primario fue de 1:2000.



3.4.4.5 PARÁMETROS ESPECÍFICOS DEL ENZIMA DAHPS

Para la DAHPS, en ambas poblaciones S y RM, se cargó 40 µg de proteína en cada pocillo. El anticuerpo primario DAHPS fue producido por la empresa Biogenes (Berlin, Alemania) a partir de una construcción personalizada de péptidos usando un péptido corto conjugado como un antigen (C-QFAKPRSDS-FEEEKN). La dilución utilizada para este anticuerpo primario fue de 1:1000 (Orcaray *et al.*, 2011).

3.4.5 CONTENIDO DE METABOLITOS

3.4.5.1 EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE SIQUIMATO

El contenido en siquimato se determinó en discos de hojas de plantas tratadas según Fernández-Escalada *et al.*, (2016), de la población RM y en los individuos de la población S. Se realizaron al menos 4 réplicas biológicas por tratamiento en cada una de las poblaciones. Para ello, se utilizaron los discos de hoja almacenados previamente a -80 °C en microtubos de 2 mL. La extracción de siquimato se realizó tal y como había sido descrita con anterioridad (Koger *et al.*, 2005). A cada *eppendorf* se le añadió 100 μ L de 0,25 N HCl por disco de hoja y se dejó hora y media en agitación a temperatura ambiente. Después de la incubación, las muestras se congelaron a -20 °C durante 24 horas como mínimo.

Posteriormente, determinó la concentración se de siguimato espectrofotométricamente (Cromartie & Polge, 2000). Para ello, se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y se centrifugaron durante un minuto a 1000 q. De cada muestra se tomaron alícuotas de 25 µL que fueron transferidas a una microplaca de 96 pocillos. A cada pocillo que contenía esos 25 µL de muestra, se añadieron 100 µL de una disolución de ácido periódico (0,25 %) y peryodato potásico (0,25 %) (p/v). Transcurrida una hora de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se añadieron 100 µL de NaOH/sulfito de sodio (0,6 M/ 0,22 M) a cada pocillo. Se determinó la absorbancia a 380 nm en el lector de microplacas Sinergy[™] HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.).

La recta patrón estándar de siquimato se realizó aplicando el mismo protocolo a 25 μ L de concentraciones conocidas de siquimato (3, 6, 12, 25, 50 y 100 μ g mL⁻¹). La concentración de siquimato se expresó como μ g siquimato disco hoja⁻¹.



3.4.5.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES SOLUBLES Y ALMIDÓN

El contenido de azúcares solubles se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando dos procedimientos de extracción distintos, uno para carbohidratos solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) y otro para almidón. Las determinaciones se realizaron en tejidos de hojas de la población RM en comparación con las determinaciones obtenidas para los individuos de la población S de *A. palmeri*. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por tratamiento en cada una de las poblaciones.

3.4.5.2.1 EXTRACTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES

El contenido en carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) fue determinado en extractos solubles de etanol y el residuo insoluble de etanol fue extraído para el análisis de almidón. Para ello, se tomaron alícuotas pulverizadas y se hirvieron 3 veces con 1,5 mL de 80 % (v/v) de etanol durante 30 segundos y tras cada lavado se centrifugaron a 7,500 *g* y a 4 °C durante 5 min. Después se realizó otro lavado en frío con 80 % de etanol. El sobrenadante de cada uno de los lavados, se fue recogiendo en un tubo especial Turbovap® (Figura 3.13). El etanol de las muestras fue eliminado completamente del extracto obtenido mediante la evaporación a 40 °C y con aire comprimido a una presión de 1-1,2 bar en un Turbovap® LV evaporator (Zymark Hopkinton, MA, EE.UU.). El resto de material insoluble fue secado en la estufa a 65 °C durante 24 h y después depositado en el desecador, para su posterior utilización en la determinación del contenido de almidón.

Cuando toda el agua y el etanol se evaporaron, la muestra seca se resuspendió en 1 mL de agua desionizada y se dejó 10 min en el sonicador en un baño de ultrasonidos. Finalizado ese tiempo, se vertió el sobrenadante en un tubo de plástico de centrífuga y se volvió a echar otro mililitro de agua desionizada al tubo Turbovap, vortexeando vigorosamente y añadiéndolo al tubo, para el posterior centrifugado de las muestras a 2,300 *g*, a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se almacenó en *eppendorfs* de 2 mL a -20 °C para la posterior determinación de azúcares solubles por cromatografía de intercambio iónico.





Figura 3.13. Tubos Turbovap[®] con el sobrenadante de las muestras después de los lavados con etanol.

3.4.5.2.2 EXTRACTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALMIDÓN

La preparación de las muestras para la determinación de almidón se realizó según lo descrito por MacRae (1971) con algunas modificaciones.

Los extractos para la determinación de la concentración de almidón se obtuvieron de la siguiente manera; el material vegetal insoluble en etanol se secó en una estufa de circulación de aire a 65 °C durante 24 h, fue pesado y depositado en un desecador hasta su uso.

El material seco fue resuspendido directamente en el mismo *eppendorf* donde se secó con 1 mL de agua desionizada. Una vez homogeneizado el material vegetal, se vertió el contenido en un tubo de centrífuga y se repitió la operación añadiendo otro mL de agua desionizada. Las muestras se hirvieron a 100 °C durante 1 hora y se dejaron enfriar. Para catalizar la hidrólisis de almidón a glucosa y así medir los monómeros de glucosa, se añadieron a cada muestra 500 µL de una solución de amiloglucosidasa con tampón acetato. La solución de amiloglucosidasa se preparó con 5,1 mg de enzima amiloglucosidasa en 50 mL de tampón acetato, ajustando el pH a 4,5 con ácido acético.

Para asegurar la completa hidrólisis del almidón a glucosa, la mezcla se dejó incubando en un baño a 50 °C en agitación y oscuridad durante toda la noche. Una vez terminada la incubación, las muestras se agitaron en el vórtex y se centrifugaron a 4,450 *g*, a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se almacenó a -20 °C en tubos *eppendorf* de 2 mL para su posterior determinación por



cromatografía de intercambio iónico. El contenido en almidón fue expresado como mg glucosa g⁻¹ PS.

3.4.5.2.3 DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES Y ALMIDÓN

Tanto para la determinación del contenido de carbohidratos solubles como para la determinación del contenido de almidón, se utilizó el cromatógrafo de intercambio iónico 930 Compact IC Flex (930 Compact IC Flex, Metrohm AG, Herisau, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante (Instrumentación científica Gomensoro, Madrid, España). Para preparar las muestras, el eluyente usado fue 300 mM NaOH/1 mM acetato sódico en solución de agua Mili-Q. Las diluciones de las muestras usadas fueron de 1:20 para la determinación de carbohidratos solubles y de 1:50 para la determinación de almidón. La corriente aplicada para la detección amperométrica fue de 200 - 500 mA, con una presión de 1000 - 2000 psi y una temperatura de entre 30 y 35 °C.

3.4.5.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS LIBRES Y DEL CONTENIDO EN GLUTATION

3.4.5.3.1 EXTRACCIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES Y GLUTATION

Se determinó el contenido de aminoácidos libres y glutation de individuos procedentes de las poblaciones RG y RM en comparación con el contenido que presentaron los individuos de la población S de *A. palmeri*. Se realizaron al menos 4 réplicas biológicas por tratamiento en cada población.

Las muestras vegetales (0,1 g) almacenadas a -80 °C, fueron homogeneizadas en un volumen de 1,5 mL de 1 M HCl. El homogeneizado, se dejó reposar en hielo durante 10 minutos, y a continuación fue centrifugado a 12,000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se recogió 1 mL del sobrenadante en tubos *eppendorf* nuevos y fue neutralizado hasta pH 7 - 8 con NaOH y HCl. Los extractos se conservaron a -20 °C hasta su utilización en la determinación de aminoácidos libres.



3.4.5.3.2 DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS LIBRES

Las muestras se derivatizaron con una solución 1 mM FITC (isotiocianato de fluoresceína) en acetona con tampón 20 mM borato a pH 10. Se incubaron durante 15 horas a temperatura ambiente en oscuridad hasta la determinación del contenido de aminoácidos (Orcaray *et al.*, 2010).

Después de la derivatización con FITC, el contenido en aminoácidos libres de los extractos fue determinado mediante un equipo de electroforesis capilar Sciex MDQ+ B (Sciex LLC. 500 MA, EE.UU.) con un detector de fluorescencia inducido por láser a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión (Laser de Argón a 488 nm). El tampón utilizado para la separación fue una solución de 80 mM de bórax y 45 mM α -ciclodextrina a pH 9,2 (Arlt *et al.*, 2001). La electroforesis se realizó a un voltaje de +30 kV y a 20 °C.

3.4.5.3.3 DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL CONTENIDO DE GLUTATION

Las muestras se derivatizaron con 5-IAF (iodoacetamidofluoresceina) en dimetil sulfóxido (DMSO) con tampón 300 mM fosfato a pH 12,5. La solución se agitó en el *thermomixer* a 25 °C durante 15 min.

Después de la derivatización con 5-IAF, el contenido en glutation de los extractos fue determinado mediante un equipo de electroforesis capilar Sciex MDQ+ B (Sciex LLC. 500 MA, EE.UU.) con un detector de fluorescencia inducido por láser a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión (Laser de Argón a 488 nm). El tampón utilizado para la separación fue una solución de 20 mM ácido bórico, 16,5 mM fosfato tríbasico de sodio y 100 mM N-Metil-N-glucamina a a pH 11,4 (Zinellu *et al.*, 2005). La electroforesis se realizó a un voltaje de +30 kV y a 25 °C.

El glutatión reducido (GSH) se determinó directamente mediante la inyección de una alícuota en el CE. El glutatión oxidado (GSSG) se redujo con tributilfosfina al 10% y luego se analizó el GSH total mediante CE. El GSSG se determinó como la diferencia entre los valores de GSH total y reducido.



3.4.6 ACTIVITY-BASED PROTEIN PROFILING (ABPP)

3.4.6.1 DETECCIÓN DE ACTIVIDADES PROTEASAS POR ABPP

El ensayo ABPP se realizó en el departamento de *Plant Sciences* (Universidad de Oxford, Reino Unido). Para realizar el *labeling* o marcaje de proteasas, se llevó a cabo el estudio de la actividad ABPP comparativa a partir de alícuotas de hojas previamente pulverizadas, correspondientes a las tres poblaciones de *A. palmeri.* Se realizaron 4 réplicas biológicas por tratamiento en cada población.

La concentración de proteína fue determinada mediante el kit RC/DC Protein Assay (Laboratorios Bio-Rad, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Para todos los marcajes con las sondas (Tabla 3.9), se utilizó el tampón de extracción 50 mM MES 1-hidrato (pH 5,0) y 5 mM DTT y se añadió la cantidad de tampón correspondiente a 6 veces su peso, siempre manteniendo en frío las muestras para evitar la degradación de las proteínas. Una vez añadido el tampón, se dejaron las muestras en un agitador en frío durante 15 min y se centrifugaron durante 5 min a 12,000 g a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y luego se volvieron a centrifugar durante 5 min a 10,625 g a 4 °C para volver a transferir el sobrenadante a tubos nuevos.

Para todas las actividades proteasas, las mezclas de ensayo consistieron en la sonda de marcaje específica y el extracto de proteína a una concentración de 1,5 mg/mL en un cóctel de reacción 50 mM MES 1-hidrato (pH 5,0) y 5 mM (DTT). Las actividades proteasas se midieron con sustratos fluorogénicos específicos como se indican en la tabla 3.9. Para los controles negativos que no contenían sonda de marcaje, se añadieron volúmenes iguales DMSO.



Figura 3.14. Sonda FP 1800 para el marcaje de la proteasa Serine hydrolases (SHs). El grupo reactivo es un fluorofosfonato y la subunidad de marcaje es un fluoróforo (bodipy) (http://www.bsaz.com).





Figura 3.15. Sonda JOPD1 para el marcaje de la proteasa Vacuolar Processing Enzymes (VPEs). El grupo reactivo es una aciloximetilcetona (AOMK) y la subunidad de marcaje es un fluoróforo (bodipy) (Lu *et al.*, 2015).



Figura 3.16. Sonda E64-Cy5 para el marcaje de la proteasa Papain-Like Cysteine Proteases (PLCPs). El grupo reactivo es el inhibidor E64 y la subunidad de marcaje es un fluoróforo Cy5 (Figura cedida por Maria Font).

Tabla 3.9 Características de las sondas para cada una de las actividades protesasas determinadas.

Actividad proteasa	Sonda	Concentración Sonda	Concentración Proteína	Tiempo de reacción
Hidrolasas de Serina (SHs) (Fig. 3.14)	Sonda FP 1800 Fluorofosfonato + fluoróforo (<i>bodipy</i>)	0,5 μM	1,5 mg/mL	90 min (oscuridad + agitación)
Enzimas de Procesamiento Vacuolar (VPEs) (Fig. 3.15)	Sonda JOPD1 AOMK+ fluoróforo (<i>bodipy</i>)	0,25 μM	1,5 mg/mL	3 h (oscuridad + agitación)



Papain-Like	Sonda E64-Cy5			3 h
Cysteine				(oscuridad
Proteasas	E64 + fluorótoro	2,5 μM	1,5 mg/mL	+
(PLCPs)	Cy5			agitación)
				-
(Fig. 3.16)				

Transcurrido los tiempos de incubación con las sondas, la reacción se paró añadiendo 200 μL de acetona y se dejó 30 min a 4 °C, para provocar la precipitación completa de las proteínas. Una vez precipitadas todas las muestras, se eliminó la acetona y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 50 μL de 1x SDS electroforesis gel *loading* buffer (280 mM SDS, 400 mM Tris, 40 % de glicerol, 3 mM β-mercaptoetanol y 0,6 mM azul Bromofenol, pH 6,8). Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12 %. La electroforesis se mantuvo a 90 V durante hora y media y los últimos 15 min a 120 V. Los geles se lavaron 3 veces con agua destilada y las actividades se midieron por fluorescencia en un escáner Amersham™ Typhoon™ Biomolecular Imager (GE Healthcare, Munich, Alemania). La emisión fue medida usando un filtro TAMRA (580 nm). Para la cuantificación de las bandas se utilizó el *software* ImageJ.

Para confirmar la identidad de las bandas de proteínas, se realizó un ensayo competitivo de ABPP en el que se usaron inhibidores de VPEs y de PLCPs. Para ello, se prepararon varios mix representativos de todas las muestras control y de las muestras tratadas con los herbicidas, y se pre-incubaron con los inhibidores durante 30 minutos a temperatura ambiente, antes de proceder con el marcaje de las sondas. Los inhibidores y sus concentraciones finales fueron las siguientes; 200 μ M inhibidor E-64 para PLCPs y 100 μ M inhibidor YVADasa para VPEs.



3.4.6.2 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATION S- TRANSFERASA (GST) POR ABPP

La detección de la actividad GST por ABPP se determinó tal y como se indica en el apartado 3.4.6.1, pero con algunas modificaciones. Para el marcaje de glutatión S-transferasa (GST) con la sonda GST-G (Figura 3.18), se tomaron 0,25 mg/mL de proteína en 50 μ L de tampón 4 mM PBS (pH 7,5), 3 mM β -mercaptoetanol y 1 % (p/v) de PVPP. La sonda GST-G formada por un grupo fotoquímico benzofenona y una subunidad de marcaje química de tipo alquino, se utilizó a una concentración 4 μ M (Figura 3.18).



Figura 3.18 A) El sitio activo de los enzimas GST está compuesto por un "sitio G" de unión al glutation reducido (GSH) y un "sitio H" de unión a sustrato. **B)** Sonda GST-G, su target es el sitio G del enzima GST, que es al que se une el GSH durante la reacción de conjugación. Esta sonda mimetiza al GSH y se une al sitio G del GST. El grupo reactivo o *warhead* es el grupo fotoquímico benzofenona y la subunidad de marcaje es un grupo alquino, necesario para el "click químico" Adaptado de Stoddard et al., (2017).





Figura 3.19. Irradiación de las muestras con luz para establecer la unión covalente entre el grupo fotoquímico de la sonda y las GST.

Las muestras se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 10 min. Para que la unión covalente entre la sonda y las GST se estableciese, las muestras se pasaron a una microplaca y esta se irradió con luz a 365 nm durante 45 min en frío (Figura 3.19). Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras se pasaron a sus tubos correspondientes y se añadió 200 μ L de acetona, dejándolas a 4 °C durante una hora. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos y medio a 12.500 *g* y se eliminó la acetona que contenían, dejándolas secar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Para la realización del click químico, se preparó el siguiente mix añadiendo los componentes en el siguiente orden: tampón 4 mM PBS con 1 % de SDS (pH 7,4), 2,5 µM FAM picolil azida (fluoróforo Cy5), 100 µM Tris [(1-benzyl-1 H -1, 2,3-triazol-4-yl) methyl (TBTA), 2 mM Tris (2-carboxyethyl) fosfina clorhidrato (TCEP) y 1 mM CuSO₄. Una vez preparado, se añadió a cada uno de los pellets secos de las muestras, se agitaron durante 10 min y se hirvieron a 90 °C 1 min. Las muestras se dejaron durante una hora en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación para el establecimiento del click químico, se paró la reacción añadiendo 200 µL de acetona y se dejó media hora a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, se procedió de igual forma que en el apartado anterior 3.4.6.1, separación de las proteínas por electroforesis, lavado de los geles y posterior visualización con el escáner Amersham[™] Typhoon[™] Biomolecular Imager (GE Healthcare, Munich, Alemania).



3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos los análisis se realizaron mínimo 2 experimentos y se utilizaron al menos 2 réplicas biológicas con muestras de diferentes plantas individuales para cada tratamiento en cada población. Para la evaluación de los resultados, se compararon los diferentes parámetros entre las plantas no tratadas de cada población (RG o RM frente a S) mediante la prueba t de Student y la diferencia se confirmó como significativa cuando p \leq 0,05.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA de una vía) simple se evaluaron el resto de resultados en cada población por separado, utilizando como variable el tratamiento. Para confirmar la homocedasticidad de las varianzas, se usó el test de Levene. La comparación de medias se realizó con la prueba del Test de Tukey HSD y con la prueba T3 Dunnet y se aplicaron pruebas estadísticas *post hoc* a la homogeneidad y no homogeneidad de los casos de varianzas, respectivamente. Cuando los resultados se expresaron en porcentajes, los datos fueron previamente transformados de acuerdo a la siguiente fórmula: $arcsin\sqrt{x}/100$. En todos los casos, los análisis estadísticos fueron realizados a un nivel de significancia del 5 % (p ≤ 0.05). Los resultados significativamente diferentes se indican en las gráficas con letras diferentes para cada tratamiento.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa IBM SPSS statistics 27 (IBM, Corp., Armonk, NY, EE.UU.). Para la elaboración de las gráficas se utilizó el programa Sigma Plot 14.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EE.UU.).





RESULTADOS





4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio se dividen en dos grandes secciones; en la primera se presentan los resultados correspondientes a la caracterización de la resistencia múltiple (RM) en una población de *A. palmeri* (véase sección 3.1.3) en comparación con la población sensible de referencia (S) (véase sección 3.1.1) En la segunda parte se presentan los resultados del estudio de la respuesta fisiológica a la aplicación individual de los herbicidas, glifosato (G) y piritiobac (P), y con la mezcla de ambos (GP), en la población RM y en la población S. Algunos estudios específicos se llevaron a cabo también en la población de *A. palmeri* solo resistente al glifosato (RG) (véase sección 3.1.2), para así dar una visión más completa.

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA EN LA POBLACIÓN CON RM

La población RM, objeto de estudio en este trabajo, había sido previamente caracterizada como resistente a G, ya que la mayoría de individuos sobrevivieron a la dosis recomendada (DR) de glifosato en estudios previos. Para obtener semillas de esta población RM que fuesen también resistentes a los inhibidores de ALS, se pulverizaron los individuos con P a la dosis recomendada (DR), y al cabo de los días, se seleccionaron tanto las plantas hembra como los individuos machos que sobrevivieron al tratamiento. Para obtener las semillas con las que desarrollar los experimentos fisiológicos y las mediciones analíticas, se eligió, de entre los individuos hembra supervivientes, una hembra muy prolífica y con buen estado fisiológico días después del tratamiento herbicida. Esta hembra se polinizó manualmente con varios individuos macho supervivientes al piritiobac, ubicados en la misma cámara de crecimiento que la hembra y se obtuvieron las semillas maduras. Previo a la caracterización de la RM, se determinaron las dosis herbicidas utilizadas para el estudio y se realizó un seguimiento visual en el crecimiento de las plantas.

4.1.1 EFECTOS VISUALES EN EL CRECIMIENTO Y LETALIDAD DE LAS DOSIS RECOMENDADAS DE G Y/O PIRITIOBAC

La dosis de aplicación de G fue la misma para ambas poblaciones y se decidió en función de estudios preliminares. Esta dosis fue de 0,84 kg /ha, DR en campo para el control de plantas de *A. palmeri* cuya altura no superase los 46 cm (Culpepper



et al., 2006). Para la elección de esta DR también se tuvo en cuenta los estudios previos realizados por (Fernández-Escalada *et al.*, 2016), en las poblaciones S y RG de acuerdo con los efectos dosis-respuesta en la biomasa y en el contenido en siguimato.

La elección de la DR de P se realizó teniendo en cuenta la referencia de los trabajos de investigación realizados con este herbicida en plantas de *A. palmeri*. Esta dosis fue de 89 g ai/ha, dosis utilizada con frecuencia para el control de poblaciones de *A. palmeri* en campos de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Wise *et al.*, 2009).

Para la aplicación conjunta de ambos herbicidas, GP, se utilizaron las mismas cantidades que para las aplicaciones individuales, pulverizando primero el G y una hora después P. El orden de pulverización de los herbicidas se decidió en función de criterios propios de visualización del estado de las plantas durante el trabajo de laboratorio.

Se realizó un seguimiento visual para determinar los efectos producidos sobre el crecimiento vegetal 3 días después de la aplicación de los tratamientos herbicidas. La especie objeto de estudio, *A. palmeri*, presentó un desarrollo vegetal heterogéneo con alta variabilidad entre las plantas, tanto en los individuos control (C) como en los tratados, en las dos poblaciones, S y RM (Imagen 4.1).



Imagen 4.1. Ejemplo de la variabilidad en el crecimiento vegetal de las plantas C de la población S en *A. palmeri,* 3 días después de la aplicación de los tratamientos.

En ambas poblaciones, las plantas C mostraron un crecimiento bastante heterogéneo, como muestra su aspecto 3 días después de la aplicación de los tratamientos, que en el caso de los controles es agua (Figura 4.1.A). El desarrollo vegetal de los individuos de la población S se vio claramente afectado por los tres tratamientos (Figura 4.1). Por el contrario, en la población RM las plantas



apenas presentaron síntomas destacables en el crecimiento bajo ninguno de los tratamientos (Figura 4.1).

Al tercer día de tratamiento, las plantas tratadas con G de la población S mostraron rápidamente una reducción importante en el crecimiento vegetal comparado con el resto de tratamientos (Figura 4.1.B). También se observaron daños foliares visibles como clorosis, arrugamientos y quemaduras en hojas nuevas y viejas (Imagen 4.2.A y 4.2.B). Las plantas tratadas con G en la población RM, fueron las menos afectadas en su desarrollo vegetal, en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 4.1.B).

El tratamiento con P y con GP, produjo en ambas poblaciones daños fisiológicos comunes como amarillamientos y quemaduras foliares (Figura 4.1.C y 4.1.D), (Imagen 4.2.C), además de un gran desarrollo de las ramificaciones en las hojas (Imagen 4.3). Estos efectos fueron más visibles en la población S, que en la población RM (Figura 4.1.C y 4.1.D). Asimismo, en los individuos de la población S la reducción en el crecimiento vegetal producida por estos dos tratamientos, no estuvo tan marcada a corto plazo como lo observado en las plantas tratadas con G.





Figura 4.1. Efectos de la aplicación de G (**B**), P (**C**), y la mezcla GP (**D**) en plantas de *A. palmeri* de la población S y RM, a los 3 días de tratamiento herbicida. Los tratamientos se compararon con plantas C (**A**) en cada población.



Para la evaluación visual de la resistencia a G y P de la población RM y del momento de la muerte de las plantas S, se dejaron algunos individuos durante más tiempo. Prácticamente todos los individuos S tratados con G murieron a los 7 - 10 días. Sin embargo, la letalidad provocada por P y por GP fue más variable y algunas plantas tardaron más de 10 días en morir. En el caso de la población RM, transcurridos 20 días desde la aplicación de los tratamientos, las diferencias con respecto a los controles fueron muy evidentes, especialmente en el caso de las plantas tratadas con P y con GP, cuyo crecimiento se vio mucho más afectado (Imagen 4.4) pero en ninguno de los casos las plantas llegaron a morir (Imagen 4.4).



Imagen 4.2. Efectos de la aplicación de G y P en plantas de *A. palmeri* de la población S a glifosato e inhibidores de ALS a los 3 días de tratamiento en el momento del muestreo. **A)** Clorosis en las hojas producido por G. **B) y C)** Quemaduras foliares producidas por G y por P respectivamente.



Imagen 4.3. Efectos de la aplicación de P en plantas de *A. palmeri* de la población S y RM, 20 días después de la aplicación de los tratamientos.





Imagen 4.4. Efectos de la aplicación de G, P y GP en plantas de *A. palmeri* de la población RM, 20 días después de la aplicación de los tratamientos.

4.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A GLIFOSATO

<u>4.1.2.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS RELATIVO DEL GEN</u> <u>EPSPS</u>

Con el objetivo de determinar el número de copias del gen *EPSPS* y confirmar si el mecanismo de resistencia a G era *target site resistant* (*TSR*) por amplificación génica en la población RM, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando como referencia un gen de copia única, *CPS*, y comparando los resultados con los individuos de la población S.



Figura 4.2. Número de copias relativas del gen 5-enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintasa (*EPSPS*) relativo al gen carbamoil fosfato sintasa (*CPS*) en individuos de la población S (blanco) y de la población RM (negro) de *A. palmeri* (Media \pm ES; n=58, para la población S y n=71, para la población RM). En el gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre cada población (*p* value <0.05, *t*-Student test).



Los individuos de la población S mostraron un número muy bajo de copias, con un promedio de 0,80 \pm 0,04 copias relativas de *EPSPS* frente a *CPS* (Figura 4.2). Sin embargo, todos los individuos de la población RM presentaron amplificación génica con un mínimo de 30 copias, e incluso se encontraron individuos con más de 90 copias relativas del gen *EPSPS*. El valor promedio fue de 58,1 \pm 2,21 (Figura 4.2). Estos resultados confirmarían que el mecanismo de resistencia al glifosato en la población RM era *TSR* por amplificación génica de *EPSPS*.

4.1.2.2 CONTENIDO EN SIQUIMATO

El contenido en siquimato fue medido espectrofotométricamente después de extraerlo de los discos de hojas de plantas tratadas con G, P y con GP. En cada población, los resultados obtenidos para cada tratamiento herbicida se compararon con los controles.

En primer lugar, se observó que el contenido en siquimato de las plantas C fue muy bajo en las dos poblaciones, con una media de 0,3 µg/disco (Figura 4.3). El tratamiento con G resultó en un incremento significativo observado en ambas poblaciones (Figura 4.3), sin embargo, este aumento fue 5 veces mayor en los individuos de la población S que en los de la población RM. Tal y como se esperaba, la aplicación individual de P no modificó el contenido en siquimato en ninguna de las dos poblaciones (Figura 4.3).

En la población S, el tratamiento con G provocó un incremento de más de 20 veces el contenido en siquimato observado en las plantas control (Figura 4.3), y el tratamiento GP provocó una acumulación similar e incluso superior (Figura 4.3). En la población RM, el G provocó un incremento mucho menor (apenas 6 veces) y con el tratamiento GP la acumulación fue de apenas 3 veces (Figura 4.3).



148



Figura 4.3. Contenido en siquimato en hojas de *A. palmeri*; población S (barras blancas) y población RM (barras negras). Las plantas fueron tratadas con G (0,84 kg/ha), con P (89 g/ha), la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n=22-27 para la población S, n=11-21 para la población RM). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value \leq 0.05).

<u>4.1.2.3 CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN EPSPS</u> <u>Y EL CONTENIDO EN SIQUIMATO</u>

Para complementar la caracterización de la resistencia a G en la población RM, se correlacionó el número de copias del gen *EPSPS* con el contenido en siquimato en los individuos tratados con G y GP, y se compararon con los datos obtenidos para los individuos de la población S tratados también con G y GP (Figura 4.4).

Se pudo establecer una relación inversa entre la amplificación del gen *EPSPS* y el contenido en siquimato. Todos los individuos de la población S tratados con G o con GP, presentaron un número de copias muy bajo (entre 0,4 y 1,5 copias relativas del gen *EPSPS*) que se correlacionaron con una alta acumulación en el contenido en siquimato (entre 3 y 14 µg/disco), mientras que los individuos de la población RM acumularon menos siquimato con más copias de EPSPS (Figura 4.4).

Sin embargo, no fue posible detectar una correlación directa entre el nivel de siquimato y el número de copias génicas, ya que independientemente del número de copias del gen, algunos individuos RM acumularon una cantidad modesta de siquimato y otros mostraron niveles de siquimato solo ligeramente por encima del resto.





Figura 4.4. Relación entre el número de copias génicas del gen *EPSPS* relativo al gen *CPS* y acumulación de siquimato después del tratamiento con G y con la mezcla GP. Plantas de la población S (círculos grises, n= 26) y plantas de la población RM (círculos negros, n= 31).

4.1.3 CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A INHIBIDORES DE ALS

Una vez caracterizado el mecanismo de resistencia *TSR* a G en los individuos RM por amplificación génica, se procedió a la caracterización de la resistencia a inhibidores de ALS, para determinar qué tipo de mecanismos *TSR* estaban involucrados. Para ello se estudiaron los mecanismos moleculares de amplificación génica y de análisis de la presencia de mutaciones en el gen *ALS*. Por último, para complementar el estudio de la sensibilidad al herbicida P, se evaluó *in vitro* la actividad enzimática ALS.

<u>4.1.3.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS RELATIVO DEL GEN</u> <u>ALS</u>

Se analizó el número de copias del gen *ALS* de los individuos de la población RM, para comprobar si el mecanismo de resistencia a inhibidores de ALS era *TSR* por amplificación génica. Los resultados se compararon con los individuos de la población S. Al igual que el estudio del gen *EPSPS*, la amplificación del gen *ALS* fue estudiada por RT-qPCR y se tomó el gen *CPS* como gen de referencia o gen de control. Nuestros resultados revelaron que los individuos analizados de la población S tenían un promedio de 1,52 ± 0,05 copias del gen (Figura 4.5). Los individuos de la población RM presentaron resultados similares con valores promedio 1,57 ± 0,03 copias del gen *ALS*.





Figura 4.5. Número de copias relativas del gen acetolactato sintasa (*ALS*) relativo al gen *CPS* en individuos de la población S (barra blanca) y de la población RM (barra negra) de *A. palmeri* (Media \pm ES; n=53, para la población S y n=71, para la población RM). En el gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre cada población (*p* value <0.05, *t*-Student test).

En base a estos resultados, al no encontrarse diferencias significativas entre ambas poblaciones, se descartó este mecanismo de resistencia *TSR* a inhibidores de ALS en la población RM.

4.1.3.2 IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN ALS

Se analizó la presencia de posibles mutaciones en los individuos de la población RM, que confiriesen resistencia al herbicida P, para así poder confirmar que el mecanismo de resistencia a inhibidores de ALS en esta población fuera *TSR* por modificaciones de la diana. Se comparó con la presencia de posibles mutaciones en individuos de la población S, para confirmar la ausencia de resistencia a inhibidores de ALS. Estos resultados, obtenidos mediante secuenciación, se muestran en la Tabla 4.1 y en la figura 4.6.

Conforme a lo esperado, la secuenciación del gen *ALS* reveló que en la población S, el 100 % de los individuos analizados no presentaron mutaciones, ni simples ni dobles (Tabla 4.1). En la población RM, del total de 115 individuos analizados, un 31 % de los individuos analizados no presentó polimorfismos de nucleótidos y un 69 % sí presentaron mutaciones puntuales; simples o dobles (Figura 4.6.A), localizadas en 5 sustituciones de aminoácidos en la (s) región (es) conservada (s) de la secuencia de *ALS*, en concreto en las posiciones 574, 653, 122, 205 y 654, confirmando así el mecanismo de resistencia *TSR* a P en esta población RM.


Del total de individuos RM con mutaciones, un 40,18 % presentaron una mutación simple, y un 28,82 % contaron con mutaciones dobles (Figura 4.6.B). Entre los individuos RM con una sola mutación; el 19,22 % de los individuos mostraron una mutación en el codón 574, que contenía el cambio de TGG a TTG, causando la sustitución de triptófano (Trp) por leucina (Leu), W574L (Tabla 4.1 y Figura 4.6.D). En el 13,10 % de los individuos RM que presentaron una mutación simple en la posición 653, se detectó que la mayoría de ellos contenían el cambio AGC a AAC, sin embargo, en dos individuos el cambio pudo ser de AGC a AAT, causando la sustitución de Ser por Asn o de Ser por Thr, S653N/T (Tabla 4.1 y Figura 4.6.D). Con menos frecuencia se detectó la mutación en el codón 122, tan sólo un 7,86 % de los individuos RM contenían el cambio en la secuencia de nucleótidos de GCA a ACA, causando la sustitución del aminoácido alanina (Ala) por Thr, A122T (Tabla 4.1 y Figura 4.6.D).

En los individuos RM con mutación doble se encontraron sustituciones en los cinco sitios de la secuencia aminoacídica del gen *ALS*. De entre todas ellas, la mutación W574L estuvo presente en todos los individuos analizados. Esta mutación junto con la sustitución S653N (W574L + S653N) fue la más frecuente, detectada en un 20,96 % del total de los individuos (Tabla 4.1 y Figura 4.6.C). Menos común fue la mutación W574L + A122T, detectada en tan solo un 6,11 % (Tabla 4.1 y Figura 4.6.C). Solo dos individuos presentaron otras mutaciones menos comunes; uno con la doble mutación W574L + A205D y otro con W574L + G654S. La mutación A205D ocurre en el codón 205, con el cambio de GCT a GAT, causando la sustitución 654 del gen *ALS*, provoca el cambio de GGT a AGT, sustituyéndose el aminoácido glicina (Gly) por Ser (Tabla 4.1 y Figura 4.6.C).



Tabla 4.1. Identificación del tipo de mutación y de las sustituciones en el gen *ALS* en individuos de la población S y en individuos de la población RM de *A. palmeri*. Las sustituciones en el gen *ALS* están numeradas de acuerdo de la secuencia de referencia de *A. thaliana* L.

Población	Tipo de mutación	Posición en el gen <i>ALS</i>	Cambios en el codón	Sustitución de AA	Nomenclatura Mutación	% de individuos
S	-	-	-	-	-	100%
RM	Simple	574	TGG/TTG	Trp/Leu	W574L	19,22 %
RM	Simple	653	AGC/AAC o AGC/AAT	Ser/Asn o Ser/Thr	S653N/T	13,10 %
RM	Simple	122	GCA/ACA	Ala/Thr	A122T	7,86 %
RM	Doble	574+653	TGG/TTG + AGC/AAC o AGC/AAT	Trp/Leu + Ser/Asn	W574L + S653N	20,96 %
RM	Doble	574+122	TGG/TTG + GCA/ACA	Trp/Leu + Ala/Thr	W574L + A122T	6,11 %
RM	Doble	574+205	TGG/TTG + GCT/GAT	Trp/Leu + Ala/Asp	W574L + A205D	0,87 %
RM	Doble	574+654	TGG/TTG + GGT/AGT	Trp/Leu + Gly/Ser	W574L + G654S	0,87 %





Figura 4.6. A) Porcentaje de individuos RM de *A. palmeri* sin mutación y con mutación simple o doble. **B)** Porcentaje de individuos de la población RM que presentaron mutación simple o mutación doble en el gen *ALS.* **C)** Porcentaje de individuos con los distintos tipos de mutación simple; W574L, S653N/T y A122T, con respecto al total de individuos analizados de la población RM. **D)** Porcentaje de individuos con los distintos tipos de mutación doble; W574L + S653N, W574L + A122T y W574L + G654S y T574L + A205D, con respecto al total de individuos analizados de la población RM.



4.1.3.3 GENOTIPADO DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL GEN ALS

La secuenciación del gen *ALS*, indicó que las plantas resistentes con mutaciones que dotaban de la resistencia a P, presentaron picos simples o dobles en los cromatogramas de secuenciación, lo que indicaba homocigosidad y heterocigosidad. Para comprobar el genotipo por medio de ensayos dCAPs, se diseñaron cebadores después de identificar las posiciones de los polimorfismos de nucleótidos. No se realizaron ensayos para los codones 205 y 654 debido a su escasa aparición entre los individuos RM.

Todos los ensayos dCAPS se realizaron utilizando la mayoría de los individuos de la población RM que presentaron mutaciones puntuales en el gen *ALS;* mutaciones simples (W574L, A122T y S653N/T) o dobles (W574L + S653N y W574L + A122T), y así poder clasificar los individuos como resistentes homocigotos (RR) o resistentes heterocigotos (RS). Los individuos de la población RM seleccionados para el genotipado, aparecen identificados con cada número. Como control, se genotiparon individuos de la población S que no presentaron cambios en ningún codón y cuyo genotipo era homocigoto (SS).

Los resultados obtenidos se muestran en los geles de agarosa (Figura 4.7), donde aparecen reflejados los distintos patrones de digestión (amplicón digerido, D, y amplicón no digerido, ND). Además, en la tabla 4.2 (apartado 4.1.3.4), se presentan también los resultados del genotipado junto con los resultados del ensayo de evaluación *in vitro* de la actividad enzimática ALS, y así poder dar información completa acerca de las características de resistencia a piritiobac de cada uno de los individuos.

El ensayo dCAPS indicó que todos los individuos RM analizados que contenían la mutación simple S653N/T resultaron ser homocigotos (RR) (Tabla 4.2) y todos los individuos que presentaron la mutación simple W574L o A122T, resultaron ser heterocigotos (RS) (Tabla 4.2). La mayoría de los individuos RM con la mutación doble W574L + S653N, resultaron ser RS para ambos codones (Tabla 4.3). Los dos individuos que mostraron la mutación doble W574L + A122T resultaron ser RS para ambas (Tabla 4.3). El único individuo en el que se encontró la mutación W574L + A205D, sólo se analizó la mutación W574L, que resultó ser RS (Tabla 4.3). Independientemente de si la mutación W574L fue simple o doble, siempre estuvo presente en heterocigosis (RS).





Figura 4.7. Ensayo dCAPS desarrollado para las sustituciones en las posiciones W574, S653 y A122 del gen *ALS* en individuos RM (numerados) e individuos S (indicados con la letra S) de *A. palmeri*. ND: Muestra no digerida; D: Muestra digerida. Círculo blanco; individuos con mutación simple;



Círculo negro; individuos con mutación doble. **A)** A122: la secuencia salvaje (WT) produce una única banda D de 217 bp, mientras que la mutante cuando es homocigota (RR) produce una banda ND de 246 bp, pero cuando es heterocigota (RS), se pueden observar dos bandas, una ND de 246 bp y una D de 217 bp. **B)** S653: secuencia WT: banda D de 214 bp, mutante RR: banda ND de 241 bp, mutante RS; banda ND de 241 bp y banda D de 214 bp. **C)** W574: secuencia WT: banda D de 230 bp, mutante RR: banda ND de 256 bp, mutante RS: banda ND de 230 bp.

4.1.3.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ALS IN VITRO EN PRESENCIA DEL HERBICIDA PIRITIOBAC

Se realizaron ensayos de inhibición de la actividad ALS a partir de extractos enzimáticos de hojas de plantas de individuos de la población RM, para determinar los niveles basales de la actividad, la sensibilidad del enzima ALS, y el nivel de resistencia a P y con ello correlacionarlos con las mutaciones observadas (4.1.3.2).

Respecto a la actividad del extracto enzimático ALS a nivel basal, los valores en los individuos de la población RM con mutaciones simples fueron muy similares a la media del valor basal encontrado en los individuos de la población S (Figura 4.8). En cambio, los individuos de la población RM con la mutación doble W574L + S653N, mostraron un nivel basal de ALS significativamente superior, con una media de 0,044 ng acetolactato*mg⁻¹ prot h⁻¹ (Figura 4.8). Entre los individuos RM analizados, los dos únicos individuos con la mutación doble W574L + A122T y el único individuo con la mutación doble W574L + A205D, mostraron valores basales de ALS similar a los encontrados en los individuos con mutación simple, entre 0,015 y 0,023 ng acetolactato*mg⁻¹ prot h⁻¹.

Para obtener el factor de resistencia (FR), se realizó una incubación *in vitro* de los extractos con un rango del herbicida P de 0 a 100 μ M. Primero se calcularon los porcentajes de la actividad específica ALS para cada concentración herbicida, con respecto al extracto sin herbicida que representaban el 100 % de la actividad. A partir de estos valores obtenidos en %, se desarrollaron curvas de inhibición de la actividad ALS para cada individuo. En el presente trabajo aparecen reflejadas varias curvas de inhibición representativas de individuos de las poblaciones S y RM (4.9.A y 4.9.B). De cada curva, y a partir de la ecuación, se calculó el parámetro I₅₀ ([herbicida] que causa una inhibición del 50 % de la actividad). Los resultados de este parámetro de la curva junto con el parámetro R² (coeficiente de determinación del ajuste utilizado), aparecen especificados en la tabla suplementaria 1. para cada uno de los individuos.





Figura 4.8. Actividad basal del enzima ALS en los individuos RM con mutaciones simples (barras de color gris) y con mutación doble (barra de color negro), comparándolo con la actividad basal en los individuos de la población S, sin mutaciones presentes (barra de color blanco) (Media ± ES; n=6 para la población S y n = 3-9 para la población RM). Las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).

Analizando las curvas de actividad enzimática, se observó que en los individuos representativos de la población S la inhibición de la actividad ALS fue notable a partir de la concentración de herbicida: 0,01 μ M (Figura 4.9.A y B). La actividad ALS del individuo RM representativo de la mutación simple W574L, empezó a inhibirse a partir de la concentración 10 μ M, pasando de valores del 63 % a valores del 20 % con la concentración más alta; 100 μ M. Sin embargo, en los individuos RM representativos de las mutaciones simples S653N y A122T, la inhibición de la actividad ALS fue notable a partir de 0,1 μ M (Figura 4.9.A). En los dos individuos RM representativos de la mutación doble W574L + S653N, la actividad ALS se mantuvo en valores superiores al 70 % con 1 μ M (Figura 4.9.B), a partir de ahí, se produjo una inhibición, pero en ningún caso alcanzó valores menores al 20 % con la concentración más elevada de herbicida (Figura 4.9.B).





Figura 4.9. Efecto de la incubación *in vitro* con P en los extractos de hojas sobre la actividad ALS. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad ALS relativa a los extractos no tratados. **A)** Curvas de actividad enzimática de 3 individuos RM representativos de las mutaciones simples; W574L (cuadrado negro), S653N (círculo negro) y A122T (rombo negro) comparado con un individuo de la población S (círculo blanco). **B)** Curvas de actividad enzimática de 2 individuos RM representativos de la mutación doble W574L + S653N (círculo y cuadrado negro), comparado con un individuo de la población S (círculo blanco).





Figura 4.10. Valores promedio del FR para los individuos de la población RM con mutaciones simples (barras de color gris) y con la mutación doble (barra de color negro). Los valores del FR representan el cociente I₅₀ RM/ I₅₀ S. (Media ± ES; n = 3-9). Las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre cada tipo de mutación (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).

En relación al parámetro FR, este se calculó a partir del cociente entre el valor del I50 de cada individuo de la población RM y el valor I50 promedio de los individuos de la población S (0,038 µM, n=6). En la tabla 4.2 aparecen especificados los valores del FR para cada uno de los individuos analizados, además del tipo de mutación presente y su genotipo correspondiente, tal y como se describe en el apartado anterior (4.1.4.3). Para facilitar la clasificación y la interpretación de los resultados del FR, se utilizaron los siguientes rangos (Tabla 4.2): los individuos con un FR entre 1 y 50, se consideró un FR bajo, aquellos individuos con un FR entre 50 y 100 se consideró como moderadoalto y un FR mayor de 100 se consideró alto. En el caso de los individuos con un nivel mayor de 500, el FR fue muy alto. La mayoría de los individuos con las mutaciones simples, A122T presentaron un FR bajo, menor de 10, sin embargo, también se detectaron algunos individuos con un FR muy alto (Figura 4.10) comprobándose una vez más la variabilidad en la resistencia a P. De igual forma que lo observado para A122T, la mayoría de los individuos con la mutación simple S653N, también presentaron un FR bajo, a excepción de un individuo que presentó un FR alto, de 250 (Tabla 4.2). Los individuos con la mutación simple W574L presentaron valores de FR muy heterogéneos, menores de 50 y hasta muy altos con valores hasta de 600 (Tabla 4.2). Los que tenían la mutación doble W574L + S653N presentaron valores de FR altos y muy altos (mayores de 100), sin embargo, estos incrementos observados no fueron significativos en



ninguno de los casos debido a la gran variabilidad de los datos obtenidos (Figura 4.10).

En base a los valores de dichos parámetros y a los valores del FR (Figura 4.10. y Tabla 4.2) se puede determinar que la resistencia al herbicida piritiobac en los individuos de la población RM estuvo asociada a mecanismos *TSR* por mutaciones en el gen *ALS*, pero esta resistencia fue muy heterogénea y dependiente en todo caso, del tipo de mutación presente.

Tabla 4.2. Caracterización de la resistencia a P en los individuos de la población RM. Los datos sobre las mutaciones se obtuvieron a partir de la secuenciación de los individuos, los datos sobre los genotipos, se obtuvieron a partir del ensayo dCAPS desarrollado para las sustituciones A122T, S653N/T y W574L en el gen *ALS* y los datos de los FR, se obtuvieron a partir las curvas de actividad enzimática. Los resultados se presentan en función del tipo de mutación, simple o doble y están organizados de menor a mayor FR. Las líneas – en la columna genotipo indican los individuos en los que no se realizó el ensayo dCAPS.

Población	Individuo	Tipo de mutación	Mutación	Genotipo	FR
S	2	Sin mutación	Sin mutación	SS	-
RM	85		W574L	RS	2,2
RM	72		W574L	RS	28,4
RM	87		W574L	RS	40,4
RM	66		W574L	RS	61,7
RM	107		W574L	RS	144,3
RM	44		W574L	-	363,5
RM	25		W574L	RS	521,8
RM	28	SIMPLE	W574L	RS	573,7
RM	61		W574L	RS	591,2
RM	89		S653N	RR	3,23
RM	88		S653N	RR	3,41
RM	1		S653N/T	-	5,2
RM	45		S653N	-	7,87
RM	101		S653N	RR	7,87

RM	51		S653N	RR	8,29
RM	86		S653N	RR	11,33
RM	6		S653N/T	-	11,6
RM	73		S653N	RR	36,84
RM	77		S653N	RR	195,67
RM	27		A122T	RS	4,98
RM	80		A122T	RS	9,44
RM	76		A122T	RS	250,91
RM	29		W574L+S653N	RS+RS	97,31
RM	19		W574L+S653N	RS+RS	109,40
RM	18		W574L+S653N	RS+RS	119,19
RM	56		W574L+S653N	-	380,75
RM	46		W574L+S653N	-	426,20
RM	60	DOBLE	W574L+S653N	RS+RS	476,30
RM	63		W574L+A122T	RS+RS	>500
RM	112		W574L+A205D	RS+ -	>500

Una vez caracterizada la resistencia a inhibidores de ALS, **se concluye** que los mecanismos *TSR* involucrados estaban relacionados con la presencia de mutaciones en el gen *ALS*, siendo la mutación puntual W574L la más común observada entre los individuos con mutación simple y presente en todos los individuos con mutación doble. Los estudios de sensibilidad a P ayudaron a completar esta caracterización y los niveles de resistencia fueron mayores en los individuos que tenían la mutación simple W574L o la mutación doble más frecuentemente encontrada; W574L + S653N.



4.2 EFECTO DE LOS HERBICIDAS GLIFOSATO Y/O PIRITIOBAC EN LAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS Y RAMIFICADOS

Una vez caracterizadas las bases moleculares de la resistencia a glifosato y a inhibidores de ALS, se profundizó en el estudio del perfil fisiológico de los individuos RM que tenían ambos mecanismos *TSR* y de los individuos de la población S, tras la aplicación individual de los herbicidas y de la mezcla. Es decir, las determinaciones fisiológicas se realizaron solo en individuos RM en los que se había detectado un nivel de amplificación génica de *EPSPS* significativo (superior a 30 copias) y alguna mutación en el gen *ALS*.

Mediante la técnica qPCR-RT, se estudió la expresión génica de 9 enzimas de la ruta de BAA y de 4 enzimas de la ruta BAR, en la población RM, y en la población S, en plantas de *A. palmeri*. La abundancia relativa de transcritos fue normalizada para cada individuo usando el gen β -tubulina (usado como house keeping). Además, mediante la técnica analítica inmunoblotting o inmunotransferencia, se midió el contenido de dos enzimas fundamentales de la ruta de BAA; EPSPS, proteína objetivo del herbicida glifosato y DAHPS, proteína encargada de regular la entrada de carbono en la vía del siquimato. En cada población, los resultados obtenidos para cada tratamiento herbicida se compararon con los controles.

4.2.1 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS (BAA)

En ausencia de tratamiento, las plantas de la población RM mostraron valores de expresión diferentes y estadísticamente significativos con respecto a los valores de la población S, con la excepción de los niveles de transcritos de los genes *DHQS* (Tabla 4.3.A) y *CS* y *AS* (Tabla 4.3.B). Estos cambios significativos detectados en la mayoría de transcritos fueron leves, de 2-3 veces más en la población RM que en la población S, excepto para el nivel de transcritos del gen *EPSPS*, que incrementó 130 veces más en la población RM (Tabla 4.3.B), coherente con la amplificación génica descrita en el apartado 4.1.2 y similar a los resultados de Fernández-Escalada *et al.*, (2017), con una población resistente a G por el mismo mecanismo. *SK* fue el único gen que presentó un nivel de expresión más bajo en la población de RM que en la de S.



En la población S se observó una inducción generalizada bajo el tratamiento individual con G (Figura 4.11 y Figura 4.12) aunque este aumento sólo fue significativo en el gen *DAHPS* en la parte de la ruta de BAA pre-EPSPS (Figura 4.11.A), en *EPSPS* (Figura 4.12.A) y en *CS* (Figura 4.12.B) en la parte de la ruta BAA post-EPSPS. Por el contrario, el G no afectó a la expresión de los genes de la ruta de BAA en la población RM, salvo un incremento residual observado en el gen *SK* (Figura 4.11.D).

Con la excepción de los niveles de transcritos de los genes CM2 y CM1-3 el tratamiento P provocó en la población S un incremento significativo del resto de los genes de la ruta de BAA (Figura 4.11 y Figura 4.12). En la población RM el tratamiento herbicida P no afectó a la abundancia de transcritos de la ruta BAA, salvo para el gen *SK* (Figura 4.11.D) en el que se observó un incremento significativo.

El incremento en la expresión detectado en la población S después del tratamiento individual con P, fue atenuado con la mezcla GP, siendo solo significativo el incremento para *DQSD* (Figura 4.11.C). En los genes *CM2* y *CM1-3*, el incremento en la expresión con GP también fue significativo, efecto que no se detectó con las aplicaciones individuales (Figura 4.12.C y D). En la población RM, sólo el aumento en la expresión del transcrito *DAHPS* fue significativo después del tratamiento GP (Figura 4.11.A).

Tabla 4.3. Ratio de abundancia relativa de transcritos de la población RM frente a la población S medida con qRT-PCR y normalizada usando el gen β -*tubulina*. **A**) Abundancia de transcritos en los genes pre-EPSPS. **B**) Abundancia de transcritos en los genes post-EPSPS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*p* value <0.05, *t*-Student test).

A)	Enzima	DAHPS	DHQS	DQSD	SK
	Expresión				
	relativa en las	3 31 * +0 31	0,86±0,13	2 35 * +0 17	0 59*+0 08
	plantas control	5,51 20,51		2,00 20,11	0,00 ±0,00
	R/S				

B)	Enzima	EPSPS	CS	CM2	СМ 1-3	AS
	Expresión					
	relativa en las	130 27 * +14 95	1,09±0,14	2 06 * +0 14	2 93*+0 37	1,18±0,19
	plantas	100,27 211,00		2,00 20,11	2,00 20,01	
	control R/S					





Figura 4.11. Abundancia de transcritos en los genes pre-EPSPS de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (BAA). Los genes analizados fueron: **A**) 3-desoxi-D-arabino-heptulosanato 7-fosfato sintasa (*DAHPS*) **B**) Dehidroquinato sintasa (*DHQS*), **C**) 3-dehidroquinato deshidratasa/siquimato deshidrogenasa (*DQ/SD*), **D**) Siquimato kinasa (*SK*). Las medidas se tomaron en hojas de dos poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 3-11). En cada gráfico, los asteriscos indican diferencias significativas entre los controles (*p* value<0.05, *t*-Student test) y las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).





Uppna Universidad Pública de Navarra Nofermalea Leibertritete Publica **Figura 4.12**. Abundancia de transcritos en los genes post-EPSPS de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (BAA). **A)** 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (*EPSPS*), **B)** Corismato sintasa (*CS*), **C)** Corismato mutasa isoforma 2 (*CM2*) y **D)** Corismato mutasa isoforma 1 y 3 (*CM1-3*) y **E)** Antranilato sintasa (*AS*). Las medidas se tomaron en hojas de dos poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 3-11). En cada gráfico, los asteriscos indican diferencias significativas entre los controles (*p* value<0.05, *t*-Student test) y las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value <0.05).

En general, se observó cómo los tratamientos herbicidas produjeron menos efecto en la expresión de los genes de la ruta de BAA de la población RM que en la población S. El efecto del herbicida P produjo las mayores acumulaciones significativas en los individuos S, que fueron atenuadas bajo el tratamiento GP.

4.2.2 CONTENIDO DE LOS ENZIMAS EPSPS Y DAHPS

En el estudio de los niveles de proteína DAHPS la cantidad de proteína total cargada en el gel fue la misma para ambas poblaciones (40 μ g) y se observó que este enzima estaba en la banda entorno a los 50 kDa (Figura 4.13). A pesar de que todos los tratamientos causaron un aumento de los niveles de DAHPS en comparación con el control para la población S, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En la población RM, tampoco se detectaron diferencias significativas en respuesta a los diferentes tratamientos herbicidas" (Figura 4.13).



Figura 4.13. Cantidad del enzima DAHPS. Se normalizó la intensidad de las bandas con respecto al control de cada población; sensible (S, barras blancas) y resistente múltiple (RM, barras negras). En la parte de abajo aparece una inmunotransferencia representativa. Las muestras se tomaron 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas



sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value \leq 0.05).

Debido al diferente nivel basal de enzima EPSPS de cada población, se cargó 15 µg de proteína total por pocillo en el gel para la población RM y 80 µg de proteína total por pocillo en el gel para la población S. Se detectó una banda a 50 kDa para el enzima EPSPS (Figura 4.14).



Figura 4.14. Cantidad del enzima EPSPS. Se normalizó la intensidad de las bandas con respecto al control de cada población; sensible (S, barras blancas) y resistente múltiple (RM, barras negras). En la parte de abajo aparece una inmunotransferencia representativa. Las muestras se tomaron 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).

En el estudio de los niveles de proteína EPSPS, a pesar de que todos los tratamientos causaron un aumento en comparación con el control para la población S, no se detectaron diferencias significativas bajo ninguno de los tratamientos (Figura 4.14). Sin embargo, en la población RM el contenido del enzima EPSPS únicamente incrementó de manera significativa bajo el tratamiento con P (Figura 4.14).



4.2.3 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS (BAR)

En ausencia de herbicida, los resultados mostrados en este estudio indican que la población RM presentaba un incremento bastante importante en los niveles de transcritos de dos de los cuatro enzimas de la ruta de BAR; *AHAIR* y *TA* (Tabla 4.4).

Cuando el G se aplicó individualmente, tan solo se detectaron cambios significativos en la expresión de *TA* en la población S (Figura 4.15.D). En la población RM no se detectaron cambios en la expresión de ninguno de los genes (Figura 4.15).

No se observaron cambios significativos en la expresión de los genes de la BAR en la población S, después de la inhibición de ALS con la aplicación de P. Sin embargo, en la población RM, los niveles de expresión del gen *TA* incrementaron de manera significativa (Figura 4.15.D).

Con la mezcla GP se observó un aumento significativo de la expresión de *TA* (Figura 4.15.D) en ambas poblaciones. Cabe señalar, que en la población RM, también se observó un aumento significativo de *DHAD* con la mezcla (Figura 4.15.C), al contrario que el nivel de expresión del gen *AHAIR*, que disminuyó de manera significativa (Figura 4.15.B).

Tabla 4.4. Ratio de abundancia relativa de transcritos entre los individuos control de la población RM frente a la población S medida con qRT-PCR y normalizada usando el gen β -tubulina. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (p value <0.05, t-Student test).

Enzima	AHAS	AHAIR	DHAD	ТА
Expresión relativa en las plantas control R/S	1,01±0,09	10,69*±0,66	1,11±0,15	6,58*±0,72





Figura 4.15. Abundancia de transcritos en los genes de la ruta de biosíntesis de aminoácidos ramificados (BAR). **A)** Acetohidroxiácido sintasa (*AHAS*), **B)** Acetohidroxiácido isomero reductasa (*AHAIR*), **C)** dihidroxiácido deshidratasa (*DHAD*) y **D)** transaminasa de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (*TA*). Las medidas se tomaron en hojas de dos poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media ± ES; n = 3-11). En cada gráfico, los asteriscos indican diferencias significativas entre los controles (*p* value<0.05, *t*-Student test) y las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).

En general, el nivel basal de la expresión de los genes de BAR muestra una importante inducción en la expresión de la mitad de los genes en la población RM. No se observaron efectos significativos de los tratamientos herbicidas en la expresión de la mayoría de genes de BAR en la población S, a excepción de *TA*. En la población RM, la mayoría de cambios detectados fueron bajo el tratamiento GP, principalmente en el gen *AHAIR* y en *TA*.

4.3 EFECTO DEL HERBICIDA GLIFOSATO Y/O PIRITIOBAC EN EL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

Para continuar profundizando en el estudio del perfil fisiológico de las poblaciones RM y S de *A. palmeri*, se midió en hojas el contenido de los carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), su suma; carbohidratos solubles totales (CHST) y el contenido de almidón, a los tres días después del tratamiento herbicida con G, P y la mezcla GP.

Se comparó el contenido de carbohidratos solubles y de almidón en los controles de ambas poblaciones. En ausencia de herbicida, no se observaron diferencias en la suma de CHST, ni en el contenido individual de cada carbohidrato soluble, ni en el contenido en almidón.

En la población S, se detectó un incremento general en el contenido de CHST que fue significativo para cada uno de los tres tratamientos (Figura 4.16.A). En la población RM, la acumulación de CHST fue muy pequeña en comparación con lo observado en la población S, y sólo el tratamiento con P provocó un incremento significativo (Figura 4.16.A).

El tratamiento con G, provocó un aumento significativo de glucosa y sacarosa en la población S (Figura 4.16.D), cambios que no se detectaron en la población RM.

Después de la aplicación de P y GP, los tres azúcares se acumularon de manera significativa en la población S (Figura 4.16.B.C.D). Sin embargo, en la población RM, unicamente se observó un aumento significativo en la sacarosa (Figura 4.16.D), si bien fue mucho menor al observado en la población S.



171



Figura. 4.16. A) Contenido de carbohidratos solubles totales (CHST; suma de glucosa, fructosa y sacarosa). **B)** Glucosa, **C)** Fructosa y **D)** Sacarosa. Las medidas se tomaron en hojas de dos poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media ± ES; n = 5-13). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).

Ambos herbicidas aplicados de manera individual, indujeron la acumulación de almidón en plantas de la población S y en plantas de la población RM (Figura 4.17). La mezcla de ambos herbicidas atenuó la acumulación observada, pero aún y todo este aumento también fue significativo en ambas poblaciones (Figura 4.17).



Figura 4.17. Contenido de almidón. Las medidas se tomaron en hojas de dos poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 5-13). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value \leq 0.05).

En general, se detectó una acumulación de carbohidratos solubles en la población S con todos los tratamientos herbicidas. En la población RM todos los efectos fueron mucho menores, siendo significativo solamente una pequeña acumulación de sacarosa con el herbicida P. Todos los tratamientos provocaron acumulación de almidón en ambas poblaciones.



4.4 EFECTO DEL HERBICIDA GLIFOSATO Y/O PIRITIOBAC EN LOS AMINOÁCIDOS LIBRES Y EN EL PERFIL PROTEOLÍTICO

Una vez conocida la respuesta fisiológica de la ruta de BAA y BAR, y estudiado el efecto en el contenido de azúcares (metabolismo del carbono), se procedió al análisis del metabolismo del nitrógeno. Para ello se analizó su patrón de respuesta en tres poblaciones de *A. palmeri*, S, RM y se añadió en el estudio una población solo resistente a glifosato (RG, ver sección 3.1.2). Se cuantificó la variación en el contenido de los aminoácidos libres proteicos después de los tratamientos con herbicida, poniendo especial hincapié en la variación del contenido de los aromáticos y de los aminoácidos ramificados. La evaluación del perfil de aminoácidos libres es de suma importancia, por su vinculación en el crecimiento y desarrollo de las plantas.



Figura 4.18. Descripción general de la biosíntesis de aminoácidos en plantas (modificado de (Coruzzi & Last, 2000).

En la figura 4.18 se muestra una descripción general simplificada de todas las rutas de biosíntesis de aminoácidos analizadas; ruta de BAA, ruta de BAR, aminoácidos mayoritarios entre los que se incluyen los aminoácidos ácidos (ácido glutámico, Glu, y ácido aspártico, Asp), aminoácidos amidas (glutamina, Gln, y asparragina, Asn), alanina (Ala), serina-glicina (Ser-Gly). Estos dos últimos junto con el aminoácido cisteína (Cys) son derivados del 3-fosfoglicerato. También se determinaron los aminoácidos derivados del ácido aspártico: Thr,



metionina (Met) y lisina (Lys), y los aminoácidos derivados del glutamato: arginina (Arg), histidina (His) y otro aminoácido muy relacionado con los procesos de estrés abiótico, prolina (Pro). Por último, el nivel del aminoácido no proteico, el ácido γ-aminobutírico (GABA) también fue estudiado.

Para completar estos resultados, se estudió la actividad enzimática de las proteasas más representativas; SHs, VPEs y PLCPs, valorando su implicación en la degradación de proteínas y suministro de aminoácidos a la planta, en respuesta a los tres tratamientos herbicidas. Estas enzimas proteoliticas están involucradas en numerosos procesos biológicos altamente regulados, y tienen un papel fundamental en los mecanismos de defensa frente a los distintos estreses bióticos y abióticos.

4.4.1. CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS

4.4.1.1 CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS LIBRES TOTALES

Los aminoácidos libres totales (AAT) se expresaron como la suma de todos los aminoácidos libres cuantificados en hojas de individuos de las tres poblaciones de *A. palmeri*; S, RG y RM. En la población S, los tres tratamientos herbicidas provocaron un incremento significativo en el contenido de aminoácidos libres totales con respecto al control (Figura 4.19). En la población RG, el incremento fue significativo con el tratamiento P y GP (Figura 4.19) y en la población RM, únicamente el tratamiento mezcla GP produjo un aumento significativo (Figura 4.19).



Figura. 4.19. Contenido en aminoácidos libres totales (AAT) en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), RG (barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (Control, C) (Media \pm ES; n = 5-13). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤ 0.05).

4.4.1.2 AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS (AAA)

Se analizó el producto de la ruta de BAA: contenido individual de fenilalanina, tirosina y triptófano; así como el contenido total en aminoácidos aromáticos (AAA). Se determinó este parámetro en los controles de las tres poblaciones, para ver si se detectaban diferencias entre ellos. Las tres poblaciones mostraron valores similares del contenido de AAA en las plantas control.

Se detectó una acumulación de AAA después de la aplicación de G en la población S, menor acumulación en la población RG, y sin efecto en la población RM (Figura 4.20.A). El tratamiento con el inhibidor de ALS, provocó una acumulación de los AAA que sólo fue significativa en la población RG (Figura 4.20.A). La mezcla de herbicidas provocó una acumulación de AAA en la población RG y RM (Figura 4.20.A).

Analizando el contenido de cada uno de los aminoácidos aromáticos, el tratamiento G sólo produjo una acumulación significativa de Tyr en la población S (Figura 4.20.D). En la población RG, esta acumulación fue significativa para Phe (Figura 4.20.C) y en la población RM, el G no produjo efectos significativos en ninguno de los tres AAA (Figura 4.20).

El tratamiento con P provocó un incremento significativo de Trp en la población S (Figura 4.20.B). Sin embargo, en la población RG estos efectos fueron significativos con Phe (Figura 4.20.C) y con Tyr (Figura 4.20.D). El contenido en Phe fue el único AAA que incrementó de manera significativa con P en la población RM (Figura 4.20.C).

Por último, los efectos con la mezcla fueron significativos en la población S para los AAA; Trp (Figura 4.20.B) y Tyr (Figura 4.20.D). Al igual que lo observado para el tratamiento P, con GP se observó un incremento significativo para Phe (Figura 4.20.C) y para Tyr (Figura 4.20.D) en la población RG, y para Phe en la población RM (Figura 4.20.C).





Figura. 4.20. A) Contenido en aminoácidos aromáticos (AAA) (nm g⁻¹ PF), **B)** Triptófano (Trp), **C)** Fenilalanina (Phe) y **D)** Tirosina (Tyr). Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), RG (barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media ± ES; n = 4-6). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).



4.4.1.3 AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS (AAR)

Los aminoácidos de cadena ramificada, valina, leucina e isoleucina, sintetizados en plantas y microorganismos según la ruta de BAR fueron analizados en el presente estudio.

Previo al análisis de los resultados de este apartado, cabe indicar que el contenido de valina de todas las muestras no pudo ser determinado, debido a que, en algunos casos, el pico de valina salía muy próximo al de glutamina, lo que impedía su cuantificación. Por este motivo, este parámetro no aparece en las gráficas. Hay que tener en cuenta que la ausencia de contenido de valina, no significa una ausencia de este aminoácido en las muestras, sino que no fue posible cuantificarlo.

Al contrario de lo observado para los AAA, sí se detectaron diferencias significativas entre los valores de los controles de la población S y de las poblaciones resistentes. Se detectó un incremento significativo de los niveles de AAR en la población RM (Figura 4.21.A)

El tratamiento con G produjo un aumento significativo de los valores de AAR en la población S y RG (Figura 4.21.A). En relación al tratamiento con P y con GP, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las tres poblaciones (Figura 4.21.A).

En cuanto al estudio del contenido individual de los AAR, leucina e isoleucina, únicamente la aplicación de G produjo la acumulación de ambos en la población S y RG (Figura 4.21.B y C). Ni el tratamiento P ni la mezcla GP, provocaron efectos significativos en AAR en ninguna de las tres poblaciones de *A. palmeri* (Figura 4.21.B y C).





Figura. 4.21. A) Contenido en aminoácidos ramificados (AAR) (nm g⁻¹ PF), **B)** Leucina (Leu) y **C)** Isoleucina (Ile). Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), RG (barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4-6). En cada gráfico, los asteriscos indican diferencias significativas entre los controles (*p* value<0.05, *t*-Student test), las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value <0.05).



4.4.1.4 AMINOÁCIDOS ÁCIDOS Y SUS AMIDAS

Para conocer con más detalle los efectos de los herbicidas en el metabolismo del nitrógeno, se cuantificó la variación en el contenido de los aminoácidos ácidos y aminoácidos amidas.

Analizando primero los valores control, no se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de los aminoácidos ácidos: ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), de las tres poblaciones. Después de los tratamientos herbicidas, tampoco se observaron cambios significativos en ninguna de las tres poblaciones (Figura 4.22.A).

En relación al contenido de los aminoácidos amidas, tampoco se detectaron diferencias significativas entre los niveles basales del aminoácido glutamina (Gln) y de asparragina (Asn). En cambio, sí se observaron modificaciones a nivel individual y en su suma con todos los tratamientos herbicidas. El tratamiento con G provocó un incremento significativo de estos aminoácidos en la población S (Figura 4.22.B). El tratamiento P, provocó incrementos significativos en la población S y RG (Figura 4.22.B). La mezcla GP, provocó incrementos significativos en las tres poblaciones (Figura 4.22.B).



Figura. 4.22. A) Contenido en ácido glutámico (Glu, líneas horizontales, parte inferior) y contenido en ácido aspártico (Asp, puntos, parte superior) (µmol g⁻¹ PF). **B)** Contenido en glutamina (Gln, líneas horizontales, parte inferior) y contenido en asparragina (Asn, puntos, parte superior). Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), RG (barras



grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4-6). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value \leq 0.05).

4.4.1.5 OTROS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos analizados aquí corresponden a alguno de los aminoácidos mayoritarios que no se incluyen entre los aminoácidos ácidos o amidas (apartado 4.4.1.3), como son los aminoácidos Ser-gly y Ala. En el caso de Ser-gly, se presentan de manera conjunta en los resultados, ya que en el cromatograma no se separaron.



Figura. 4.23. A) Contenido en Serina-Glicina (Ser-Gly, verde). **B)** Contenido en alanina (Ala, naranja) (nmol g⁻¹ PF). Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), RG (barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media ± ES; n = 4-6). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤ 0.05).





Figura. 4.24. A) Contenido en Treonina (Thr). **B)** Contenido en Metionina (Met). **C)** Contenido en Lisina (Lys) (nmol g⁻¹ PF). Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), RG (barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4-6). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).

Después del tratamiento con G, no se observaron efectos significativos en el contenido de Ser-Gly en ninguna de las tres poblaciones analizadas, pero sí se observaron incrementos significativos después del tratamiento con P y con GP en las tres poblaciones (Figura 4.23.A). Ninguno de los tratamientos herbicidas provocó efectos sobre el contenido en Ala en las tres poblaciones de A. palmeri (Figura 4.23.B).



El tratamiento con G incrementó significativamente el contenido de los aminoácidos Thr (Figura 4.24.A) y Lys (Figura 4.24.C) en la población S. En las poblaciones RG y RM, la aplicación de G no provocó ningún efecto significativo en estos dos aminoácidos.

El tratamiento individual con P solo aumentó el contenido en Thr (Figura 4.24.A) en la población S, pero a diferencia de lo observado con G, en la población RG el P sí produjo un incremento significativo en Lys (Figura 4.24.C).

El tratamiento GP incrementó significativamente el contenido de Thr (Figura 4.24.A) y el contenido de Lys (Figura 4.24.C) en las tres poblaciones, S, RG y RM.

En relación al aminoácido Met, no se observaron efectos significativos en ninguna de las tres poblaciones bajo los tres tratamientos herbicidas.





Figura. 4.25. A) Contenido en Arginina (Arg). **B)** Contenido en Histidina (His). **C)** Contenido en Prolina (Pro). **D)** Contenido en Ácido γ -aminobutírico (GABA) (nmol g⁻¹ PF). Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), RG (barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media ± ES; n = 4-6). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).

El tratamiento con G provocó un incremento significativo de los aminoácidos Arg (Figura 4.25.A), His (Figura 4.25.B) y Pro (Figura 4.25.C) en la población S. Por el contrario, en la población RG y en la población RM, no se observó ningún



cambio significativo en ninguno de los aminoácidos estudiados en este apartado (Figura 4.25).

El tratamiento con P, únicamente provocó un aumento significativo de His (Figura 4.25.B) en la población S. Los aminoácidos Arg (Figura 4.25.A) e His (Figura 4.25.B) incrementaron significativamente en la población RG. Sin embargo, en la población RM tampoco se observaron cambios significativos CON P (Figura 4.25).

El tratamiento GP produjo también incrementos significativos en Arg (Figura 4.25.A), His (Figura 4.25.B) y Pro (Figura 4.25.C) en las tres poblaciones S, RG y RM.

En relación al aminoácido GABA (Figura 4.25.D), no se observaron efectos significativos en ninguna de las tres poblaciones de *A. palmeri* con ninguno de los tres tratamientos herbicidas.

En general, se observó un aumento del contenido de aminoácidos libres con los tres tratamientos herbicidas en la población S, aunque en algunos casos, como en los AAR, no fueron significativos. En la población RG, los efectos en la mayoría de los aminoácidos analizados solo fueron significativos con el tratamiento P y GP, con algunas excepciones como los AAR, en los que el tratamiento G provocó incrementos significativos. Por último, en la población RM el contenido en aminoácidos, en muchos casos, no sufrió cambios significativos tras la aplicación de G o P, aunque si se detectó una acumulación generalizada con la mezcla GP.

4.4.2 ACTIVIDADES PROTEOLÍTICAS

El perfil proteolítico de los individuos correspondientes a las poblaciones S, RG y RM se analizó mediante la técnica ABPP, para evaluar si las actividades de las proteasas vacuolares (VPEs), papain-like cisteín-proteasas (PLCPs) y serina proteasas (SHs) eran diferentes entre las poblaciones y valorar si estaban afectadas por los tratamientos herbicidas. Estas actividades se analizaron con sondas diferentes y específicas basadas en inhibidores covalentes que marcan proteínas vegetales. Estos resultados fueron obtenidos durante la estancia en el laboratorio *Plant Chemetics*, en el Departamento *Plant Sciences* (Universidad de Oxford), bajo la supervisión del profesor Renier van der Hoorn.



4.4.2.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS BANDAS DE PROTEÍNAS VPES Y PLCPS

Previo a la evaluación del papel de las VPEs y PLCPs, en el modo de acción de los herbicidas inhibidores de ALS y EPSPS, se realizaron análisis del tipo ABPP competitivo utilizando inhibidores específicos de VPEs y de CysProt para identificar qué bandas de proteínas correspondían a las proteasas VPEs y a las proteasas PLCPs.

Para ello, se preincubó una mezcla representativa de todos los extractos de hoja de individuos control y con los tratamientos herbicidas, con los inhibidores: E64 (inhibidor de CysProt) y con YVADasa (inhibidor de VPEs). Posteriormente, se realizó el comarcaje utilizando dos sondas cada una con un fluoróforo distinto y específicas de cada grupo de proteasas: E64-Cy5 para el marcaje de las PLCPs y JOPD1, con un fluoróforo Cy3 (*bodipy*) para el marcaje de VPEs. Esta última, es una sonda muy fácil de sintetizar en comparación con otras sondas, y marca las VPEs de manera similar a la sonda AMS101 (Lu *et al.*, 2015).





Figura. 4.26. Marcaje de VPEs. Ensayo competitivo realizado con extractos de hojas preincubados con los inhibidores E64 e YVADasa a una concentración de 100 μ M, durante 30 min. Esta preincubación se realizó antes del marcaje con las sondas JOPD1 para VPEs y E64-CY5 para PLCPs. Cada mix está formado por individuos control y tratados con herbicidas (n = 5). Las proteínas marcadas fluorescentes fueron detectadas en geles utilizando un escáner de fluorescencia. La tinción de *coomassie* corresponde a la rubisco (55 kDa), y se muestra la banda como control de carga, mostrando las cantidades totales de proteínas de entrada.

Los resultados obtenidos para la identificación de las bandas VPEs, mostraron primero una ausencia de señal en la zona donde no había ni sonda ni inhibidor, y se consideró como el control (Figura 4.26). Segundo, en la zona del gel donde no había presencia de inhibidor, pero sí de las dos sondas, se detectaron tres bandas de proteína de entre 35-40 kDa (Figura 4.26). Para confirmar que estas tres bandas correspondían con VPEs, se llevó a cabo la preincubación con el inhibidor de YVADasa, que evitó el marcaje con la sonda JOPD1 y se observó cómo las tres bandas fueron inhibidas (Figura 4.26). Cuando se añadió el inhibidor E64, junto con las dos sondas, se produjo el marcaje con JOPD1, y las tres bandas también se observaron en el gel (Figura 4.26). En estudios previos con sondas específicas para VPEs en *A. thaliana* L. y en plantas de guisante, también se observaron señales consistentes de 40 kDa, correspondientes a VPEs (Misas-Villamil *et al.*, 2013; Zulet *et al.*, 2013). En uno de esos estudios, también se utilizó el inhibidor YVADasa para comprobar la identidad de las bandas (Zulet *et al.*, 2013).

Al igual que lo observado para las VPEs, los resultados en el gel de fluorescencia para la identificación de PLCPs, mostraron primero una zona sin bandas de proteínas, considerada como control, ausente de sondas e inhibidores (Figura 4.27). En segundo lugar, se detectaron dos bandas entre los 25-35 kDa en la zona del gel donde no había inhibidor, pero sí las dos sondas (Figura 4.27). Cuando se preincubó con el inhibidor E64, no se observó ninguna banda de proteínas en el gel, ya que las PLCPs fueron inhibidas (Figura 4.27), confirmando así la identidad de estas dos bandas. Por último, en presencia del inhibidor YVADasa se observó cómo aparecía una sola banda ubicada aproximadamente entorno a los 25 kDa (Figura 4.27). La presencia de una única banda PLCPs en vez de dos, podría deberse a que una de ellas sea sensible al inhibidor YVADasa. Aunque este inhibidor es específico de VPEs, al ser estas proteasas un tipo de CysProt, podría inhibir también algún tipo de PLCPs. En estudios previos, la preincubación con los inhibidores de PLCPs, E64 y MG132, bloqueó el marcaje






Figura. 4.27. Marcaje de PLCPs. Ensayo competitivo realizado con extractos de hojas preincubados con los inhibidores E64 e YVADasa a una concentración de 100 μ M, durante 30 min. Esta preincubación se realizó antes del marcaje con las sondas JOPD1 para VPEs y E64-CY5 para PLCPs. Cada mix está formado por individuos control y tratados con herbicidas (n = 5). Las proteínas marcadas fluorescentes fueron detectadas en geles utilizando un escáner de fluorescencia. La tinción de *coomassie* corresponde a la rubisco (55 kDa), y se muestra la banda como control de carga, mostrando las cantidades totales de proteínas de entrada.

4.4.2.2 EFECTO DE LOS HERBICIDAS EN LAS PROTEASAS EN PLANTAS

4.4.2.2.1 ENZIMAS DE PROCESAMIENTO VACUOLAR (VPEs)

Mediante la técnica ABPP se estudió la actividad VPEs tras la aplicación de los tratamientos herbicidas. Se detectaron las tres bandas de proteína VPEs entre



RESULTADOS

los 35-40 kDa (Figura 4.28.A), tal y como se habían confirmado en el estudio previo de inhibición (Fig. 4.26). De las tres bandas, sólo se han cuantificado las dos superiores (flechas azules), ya que la señal de la banda de menor tamaño (flecha roja), apenas fue perceptible como para obtener resultados objetivos y significativos. Las figuras 4.28.B y 4.28.C muestran la comparativa entre tratamientos de las intensidades de las bandas superior e intermedia, respectivamente.



Figura 4.28. Marcaje de VPEs. Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), resistente a glifosato (RG, barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4-5). La incubación se realizó con sonda JOPD1 [0,25 μ M]



durante 3 h en agitación continua en oscuridad. **A)** Las proteínas marcadas fluorescentes fueron detectadas en geles utilizando un escáner de fluorescencia. En la imagen aparece un gel representativo. La tinción de coomassie corresponde a la rubisco (55 kDa), y se muestra control de carga, mostrando las cantidades totales de proteínas. **B y C)** La intensidad de la señal se cuantificó con un densitómetro y los valores relativos se muestran en los gráficos de barras. **B)** Banda superior VPEs. **C)** Banda intermedia VPEs. El símbolo * indica diferencias significativas entre el control y los tratamientos en cada población (* para la población S y # para la población RG) (ANOVA, prueba HSD Tukey / T3 Dunnet, valor p <0.05).

No se observaron diferencias significativas entre los valores control de las poblaciones en ningún caso. En la población S, se observó cómo la intensidad de las bandas de las proteínas VPEs analizadas fue mayor después de todos los tratamientos con herbicidas, sin embargo, sólo en la primera banda los incrementos fueron significativos con G y con la mezcla GP (Figura 4.28.B). En la población RG, se observó una mayor intensidad de ambas bandas VPEs después de los tratamientos P y GP (Figura 4.28.A), que solo resultó en incrementos significativos en la banda superior (Figura 4.28.BA) y no en la intermedia (Figura 4.28.B). En la población RM no se detectó modificación de la intensidad de las bandas VPEs para ningún tratamiento herbicida (Figura 4.28.B y 4.28.C).

4.4.2.2.2 PAPAIN-LIKE CISTEIN-PROTEASAS (PLCPs)

Se evaluó el perfil de las papain-like cisteín proteasas (PLCPs) mediante la técnica ABPP, para determinar si sus actividades se vieron afectadas por los tratamientos herbicidas. Se detectaron dos líneas de banda de proteína PLCPs entre los 25-35 kDa, que aparecen reflejadas en el gel representativo (Figura 4.29.A). De estas dos líneas, sólo se ha analizado la banda superior de aproximadamente 29 kDa (flecha azul), ya que la señal de la otra, entorno a los 27 kDa (flecha roja), apenas fue perceptible como para obtener resultados objetivos y significativos. En la gráfica 4.29.B aparecen representados los valores relativos promedio correspondientes a la primera línea de bandas de proteína.

El patrón detectado en la respuesta de PLCPs fue similar al detectado para VPEs. En la población S, la actividad de las PLCPs se indujo con el tratamiento con herbicidas G, P y GP, pero la señal solo fue significativa con la mezcla (Figura 4.29.B). En la población RG, se observó un aumento significativo después de P y GP (Figura 4.29). Por el contrario, el patrón proteolítico de PLCPs en la población RM no se modificó con ningún tratamiento herbicida (Figura 4.29.B).





Figura 4.29. Marcaje de PLCPs. Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), resistente a glifosato (RG, barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4-5). La incubación se realizó con sonda E64-Cy5 [2,5 µM] durante 3 h en agitación continua en oscuridad. **A)** Las proteínas marcadas fluorescentes fueron detectadas en geles utilizando un escáner de fluorescencia. En la imagen aparece un gel representativo. La tinción de *coomassie* corresponde a la rubisco (55 kDa), y se muestra control de carga, mostrando las cantidades totales de proteínas. **B)** La intensidad de la banda superior se cuantificó con un densitómetro y los valores relativos se muestran en el gráfico de barras. El símbolo * indica diferencias significativas entre el control y los tratamientos en cada población (* para la población S y # para la población RG) (ANOVA, prueba HSD Tukey / T3 Dunnet, valor p ≤0.05).

4.2.4.2.3 SERINA HIDROLASAS (SHs)

Por último, se analizó el papel de las SHs en el modo de acción de los herbicidas glifosato y piritiobac, con el objetivo de determinar si esta actividad se vio afectada por el tratamiento con herbicidas. Las actividades de estas proteasas se midieron con la sonda FP 1800. Estas sondas reaccionan con el nucleófilo del sitio activo de la Ser (Liu *et al.*, 1999). Las sondas FP son sondas extremadamente potentes que etiquetan fácilmente más de 50 tipos de SHs diferentes en un solo proteoma (Morimoto & van der Hoorn, 2016).



No se observó un patrón claro de respuesta de SHs en el gel representativo ni en ninguna de las tres poblaciones bajo los distintos tratamientos (Figura 4.30). Se detectaron varias bandas de proteínas de 40 kDa aproximadamente, una más marcada entorno de 37 kDa, pero que en algunos casos estaba acompañada de hasta cuatro pequeñas bandas de proteína. También se detectaron otras dos señales de 35 kDa y de 30 kDa, apenas perceptibles en alguno de los tratamientos, y una última banda de 25 kDa, aunque en algunas poblaciones y tratamientos también aparece junto con otras bandas (Figura 4.30). Debido a que no fue posible detectar un patrón de bandas estable en todas las muestras, los valores relativos no se muestran en un gráfico de barras, ya que no fue posible establecer una respuesta clara de las SHs a los diferentes tratamientos herbicidas en ninguna de las tres poblaciones.



Figura 4.30. Marcaje de SHs. Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S), resistente a glifosato (RG) y resistente múltiple (RM) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4-5). La incubación se realizó con sonda FP 1800 [0,5 μ M] durante 90 min en agitación continua en oscuridad. Las proteínas marcadas fluorescentes fueron detectadas en geles utilizando un escáner de fluorescencia. En la imagen aparece un gel representativo. La tinción de *coomassie* corresponde a la rubisco (55 kDa), y se muestra como la banda control de carga, mostrando las cantidades totales de proteínas de entrada.

4.5 ANÁLISIS DE GLUTATION (GSH) Y GLUTATION S-TRANSFERASA (GSTs)

Por último, para completar el análisis de la respuesta fisiológica de las tres poblaciones, se procedió al estudio del metabolismo del glutation. Todas las mediciones se realizaron en hojas de plantas de las tres poblaciones de *A*.



RESULTADOS

palmeri, S, RG y RM, tres días después del tratamiento herbicida con G, P y con la mezcla GP.

Para ello se abordó la actividad enzimática GST mediante espectrofotometría y usando la técnica ABPP (apartado 4.5.1). Posteriormente mediante electroforesis capilar, se estudió el contenido de GSH, glutation oxidado (GSSG) y glutation total (apartado 4.5.2). Estos análisis ayudarían a comprender mejor el metabolismo del glutation en la acción herbicida o si algún aspecto del metabolismo del glutation estaría relacionado con la fisiología de las poblaciones resistentes a glifosato e inhibidores de ALS.

4.5.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GST

La figura 4.31 muestra la actividad enzimática GST *in vitro* en las tres poblaciones S, RG y RM. En ausencia de herbicida, la actividad GST de los individuos de las poblaciones RG y RM fue significativamente superior a la de los individuos de la población S (Figura 4.31).



Figura 4.31. Actividad enzimática GST. Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), resistente a glifosato (RG, barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4-5). En la gráfica, los asteriscos indican diferencias significativas entre los controles (*p* value <0.05, *t*-Student test). En cada gráfica las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤0.05).

No se detectaron diferencias significativas después del tratamiento con G en ninguna de las tres poblaciones estudiadas (Figura 4.31). Sin embargo, cuando se aplicó el tratamiento con P, se observó un incremento significativo de la actividad enzimática GST en los individuos de las poblaciones S y RG (Figura



RESULTADOS

4.31). Por último, la mezcla herbicida GP, no provocó efectos significativos ni en la población S, ni en RG ni en RM (Figura 4.31).

Para completar con más detalle el patrón de respuesta de la actividad enzimática GST, se determinó la actividad mediante la técnica ABPP, utilizada previamente para el estudio de las actividades proteolíticas (apartado 4.4.2) y que permite el marcaje específico de los sitios activos de las enzimas GST. Estos análisis se realizaron con la sonda específica GST-G a una concentración de 4 μ M. Este tipo de sonda fue desarrollada para caracterizar enzimas GST activas en tejidos de mamíferos (Stoddard *et al.*, 2017).





Figura 4.32. Marcaje de GSTs. Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), resistente a glifosato (RG, barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 4-5). La incubación se realizó con la sonda GST-G [4 µM] irradiada con luz ultravioleta a 365 nm durante 45 min en frío. **A)** Las proteínas marcadas fluorescentes fueron detectadas en geles utilizando un escáner de fluorescencia. En la imagen aparece un gel representativo. La tinción de *coomassie* corresponde a la rubisco (55 kDa), y se muestra control de carga, mostrando las cantidades totales de proteínas. **B y C)** La intensidad de la señal se cuantificó con un densitómetro y los valores relativos se muestran en los gráficos de barras. **B)** Banda superior GSTs. **C)** Banda inferior GSTs. (ANOVA, prueba HSD Tukey / T3 Dunnet, valor p ≤0.05).

Después del marcaje con la sonda GST-G, se detectaron dos bandas entre los 25 y los 15 kDa (Figura 4.32.A). La banda superior fue más intensa que la banda inferior, y estuvo presente bajo los tres tratamientos herbicidas y con las muestras control, siendo más intensa bajo el tratamiento GP (Figura 4.32.A). Esta banda superior, a pesar de no presentar una intensidad significativamente diferente (Figura 4.32.B) fue en general, más visible en las bandas de los individuos tratados en las tres poblaciones.

Por el contrario, la banda inferior solo apareció de manera generalizada en los individuos C. En las muestras tratadas solo se detectó bajo el tratamiento G en las poblaciones R y RM, y en la población RM con el tratamiento GP, aunque en todos los casos la señal presentó poca intensidad (Figura 4.32.A y C).

4.5.2 DETERMINACIÓN DE GLUTATION

Se estudió el contenido en glutation reducido (GSH), glutation oxidado o glutation disulfuro (GSSG), glutation total (la suma de GSH y GSSG), y la relación entre el contenido de GSH y GSSG (GSH/GSSG) en plantas de las tres poblaciones. Los cambios en el estado redox producidos durante condiciones adversas o de estrés, donde el GSH pasa a GSSG, cumplen una función protectora en la planta. Analizar los contenidos en GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG, también es fundamental para conocer si la planta está significativamente afectada por las condiciones de estrés abiótico, ya que es un parámetro que nos ayuda tener una visión general de la homeostasis y de los sistemas antioxidantes de la planta.



RESULTADOS



Figura 4.33. A) Contenido de glutation reducido (GSH), **B)** de glutation oxidado (GSSG), **C)** Relación entre glutation reducido y oxidado (GSH/GSSG) y **D)** Contenido de glutation total. Las medidas se tomaron en hojas de tres poblaciones de *A. palmeri*; sensible (S, barras blancas), resistente a glifosato (RG, barras grises) y resistente múltiple (RM, barras negras) 3 días después de los tratamientos herbicidas; 0,84 kg/ha de G, 89 g/ha de P, la mezcla GP y plantas sin tratar (C) (Media \pm ES; n = 3-6). En cada gráfico, las letras diferentes se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey/T3 Dunnet test, *p*-value ≤ 0.05).



RESULTADOS

El contenido de las formas de glutation y su cociente fue similar entre las plantas sin tratar de las tres poblaciones (Figura 4.33). La mayor parte del glutation se encontraba en forma reducida, dando como resultado unos cocientes de la forma reducida/oxidada comprendidos entre 7 y 15 (Figura 4.33.C). El tratamiento con glifosato provocó en la población S un aumento en el contenido de GSH y de GSSG y de contenido total, mientras que el ratio GSH/GSSG no se vio afectado. (Figura 4.33.A y B). Sin embargo, ni en la población RG ni en la población RM se observaron efectos significativos con G en los parámetros relacionados con GSH (Figura 4.33.A), con la excepción de un mayor contenido de GSSG en la población RG (Figura 4.33.B).

El inhibidor de ALS no provocó ningún efecto significativo en el contenido en GSH y GSSG, ni en su relación en ninguna de las tres poblaciones (Figura 4.33.A y B). En la población S se detectó un incremento de GSH y de la relación GSH/GSSG tras el tratamiento con P, pero no fueron significativos. Combinado con G, en la mezcla GP, únicamente se detectó un incremento significativo en el contenido total de glutation en las poblaciones S y RM (Figura 4.33.A).

En resumen, la población S mostró una mayor respuesta fisiológica frente a G que frente a P, que se evidenció en un incremento del contenido de GSH y GSSG y que permitió mantener constante la relación de reducción. En las poblaciones resistentes no se detectaron cambios significativos en los contenidos de glutation.





DISCUSIÓN

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

5.1 LOS MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A G Y P EN LA POBLACIÓN RM

A) CONFIRMACIÓN DE LA RESISTENCIA MÚLTIPLE A G Y P

Los efectos observados sobre los parámetros fisiológicos se determinaron 3 días después de la aplicación de los tratamientos herbicidas. Se eligió ese momento para que fuese un tiempo lo suficientemente corto como para que se apreciasen efectos de los tratamientos, pero que no fuese excesivamente largo como para que apareciesen reacciones secundarias que pudiesen no ser debidas directamente al herbicida, o que incluso las plantas llegasen a la letalidad, o se recuperasen.

La especie objeto de estudio, *Amaranthus palmeri*, es una especie de mala hierba silvestre, y no cultivada, que presentó un desarrollo vegetal muy heterogéneo, con mucha variabilidad dentro de cada población, y en cada tratamiento. Esta variabilidad fue más predominante en los individuos de la población RM, y pudo deberse a que el individuo hembra del que provienen todas las semillas utilizadas en este trabajo, se polinizó con varios individuos macho ubicados en la misma cámara de crecimiento. Tanto la hembra como los machos polinizadores, sobrevivieron a los tratamientos herbicidas, pero a diferencia de la resistencia a glifosato que fue bastante homogénea en los parentales (ningún individuo acumuló siquimato en presencia de glifosato), la resistencia al inhibidor de ALS fue más variable tal y como se comprobó luego en la progenie.

La heterogeneidad observada en el desarrollo vegetal impidió que el crecimiento de las plantas durante el ensayo pudiera ser representado gráficamente y evaluado de forma cuantitativa.

Los dos herbicidas utilizados, glifosato (G) y piritiobac (P) a pesar de que actúan a través de diferentes vías, produjeron efectos comunes en las plantas; inhibiendo su crecimiento y provocando daños foliares como clorosis, arrugamientos y quemaduras (Imagen 4.2 y 4.3). Estos efectos ya habían sido descritos anteriormente en otras especies de plantas (Ray, 1982; Shaner & Reider, 1986, Rubin *et al.*, 1982; Deng, 2005)



En la población S, se observó diferente inhibición del crecimiento según el herbicida aplicado, con unos efectos más evidentes a más corto plazo en el caso de G que de P o GP (Figura 4.1), y comprobándose que los inhibidores de ALS detienen el crecimiento y provocan la muerte de la planta de forma más lenta que el G, como había sido descrito antes (Gruys & Sikorski, 1999; Wittenbach & Abell, 1999). En todos los casos, las plantas llegaron a morir a los 7-10 días.

Por el contrario, en la población RM los efectos de los tratamientos en el desarrollo vegetal fueron visibles a más largo plazo (después de 20 días aproximadamente), y en ningún caso las plantas llegaron a morir. El aspecto de las plantas confirmó su carácter resistente a ambos tipos de herbicidas (Figura 4.1), si bien se detectaron diferencias en la respuesta a ambos herbicidas. Las plantas RM mostraron mayor resistencia y más homogénea al herbicida G y menos nivel de resistencia y más variable entre individuos al herbicida P. Estas diferencias en el crecimiento y desarrollo vegetal observadas en los individuos RM tratados con P a los 20 días, pudieron deberse a que entre todos esos individuos hubiese algunos que no presentasen mecanismos de resistencia (solo un 69 % de los individuos presentaron mutaciones) y la existencia de mutaciones que confieren un menor o mayor nivel de resistencia, tal y como se describe en el apartado C de esta discusión (5.1.C.).

B) LA AMPLIFICACIÓN GÉNICA DE *EPSPS* COMO MECANISMO DE RESISTENCIA A G EN LA POBLACIÓN RM

En la mayoría de los estudios donde se ha determinado el número de copias del gen *EPSPS*, se ha utilizado el gen *ALS* como gen de referencia o control debido a su consistencia de presentar copias únicas o bajas. Sin embargo, se puede plantear que poblaciones con resistencia a inhibidores de ALS puedan tener una duplicación del gen *ALS* tal y como se ha comprobado en una población de *A. palmeri* (Singh *et al.*, 2018). Por este motivo, en este estudio se utilizó como gen de referencia un gen de copia única; *CPS* que codifica la subunidad grande de la carbamoil fosfato sintasa (Ma *et al.*, 2013).

La resistencia a G debida a la amplificación del gen *EPSPS* fue observada por primera vez en una población de *A. palmeri* procedente de Georgia (EE.UU.) en el año 2010 (Gaines *et al.*, 2010). Desde entonces, la sobreproducción del enzima EPSPS debido a su amplificación génica, ha sido identificada como el



mecanismo *TSR* de resistencia a G predominante en esta especie (Gaines *et al.*, 2010; Chandi *et al.*, 2012; Mohseni-Moghadam *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2014) y ya que hasta la actualidad sólo se ha identificado otra población de *A. palmeri* con otro mecanismo de resistencia *TSR* al G: una mutación puntual en el gen *EPSPS* (Dominguez-Valenzuela *et al.*, 2017; Heap, 2021). La sobreexpresión de *EPSPS* como mecanismo de resistencia al G se ha descrito, además, en otras especies tanto gramíneas como dicotiledóneas (Patterson *et al.*, 2018).

Los individuos RM analizados mostraron un número de copias del gen *EPSPS*, en promedio, de 58,1 veces más que la población S (Figura 4.2), confirmando así el mecanismo molecular de resistencia. El genoma de los individuos de la población solo resistente a glifosato (RG) con la que se han realizado los estudios de actividades proteolíticas y aminoácidos, también mostró un aumento en el número de copias del gen *EPSPS*, con un promedio de 47,5 veces más que el genoma de la población S (Fernández-Escalada *et al.*, 2016). Otras poblaciones de *A. palmeri* con RM a G e inhibidores de ALS, mostraron una amplificación dentro del rango 50-179 copias en población originaria de Brasil (Küpper *et al.*, 2017) y entre 47-100 en una población originaria de Michigan (EE.UU.) (Kohrt *et al.*, 2017).

La acumulación de siquimato es un destacado marcador de estrés en plantas tratadas con G, que se usa como parámetro para distinguir entre plantas S y RG (Zhu *et al.*, 2008; Gaines *et al.*, 2010; Orcaray *et al.*, 2010; Whitaker *et al.*, 2013; Lorentz *et al.*, 2014; Dillon *et al.*, 2017). El siquimato es el principal metabolito que da nombre a la ruta donde se localiza el enzima EPSPS. Se ha propuesto que el efecto del G en el metabolismo de la planta se produciría porque al inhibirse el enzima EPSPS, la ausencia de metabolitos posteriores al EPSPS provocaría una disminución en la inhibición por retroalimentación de la actividad DAHPS. La ausencia de regulación en este enzima, provocaría un incremento descontrolado en el flujo de carbono a través de esta vía, causando a su vez, una elevada acumulación de compuestos anteriores al enzima EPSPS (Jensen, 1986; Siehl, 1997; Zabalza *et al.*, 2017).

En la población S tratada con G se observó una elevada acumulación de siquimato, mientras que en la población RM, la acumulación fue mucho más leve, confirmándose así la resistencia a G (Figura 4.3). Esta respuesta también fue observada en estudios previos con *A. palmeri* (Fernández-Escalada *et al.*, 2017) y en otras especies de malas hierbas como *A. tuberculatus* (Nandula *et al.*, 2013). La aplicación individual del herbicida P no modificó el contenido en



siquimato en ninguna de las poblaciones, ya que este efecto es característico del modo de acción de los inhibidores de EPSPS y no de los inhibidores de ALS (Fernández-Escalada *et al.*, 2019). En la población S la mezcla de ambos herbicidas exacerbó ligeramente el efecto producido por la aplicación individual de G, como se había observado al mezclar G junto con el inhibidor de ALS, imazamox (Fernández-Escalada *et al.*, 2019).

Por último, se estableció una correlación entre el número de copias y el contenido de siguimato en los individuos de las poblaciones S y RM tratados con G y con GP (Figura 4.4). En la población S, la única copia relativa del gen EPSPS se correlacionó con una alta acumulación del contenido de siguimato en todos los individuos tras el tratamiento con G, de unas 20 veces. En general, en la población RM se detectó un elevado número de copias del gen EPSPS y una menor acumulación de siguimato tras el tratamiento con G, apenas 4 veces. Sin embargo, la concentración de siguimato fue bastante variable e independientemente del número de copias presentes, con lo que no se pudo establecer una correlación inversa entre el número de copias y la acumulación de siguimato. En la bibliografía hay numerosos casos en los que el nivel de resistencia a G parece aumentar con un mayor número de copias génicas (Gaines et al., 2010; Ribeiro et al., 2014; Vila-Aiub et al., 2014; Salas et al., 2015). Sin embargo, tal y como ocurre en este estudio, existen excepciones en las que no se observa esta correlación, tal y como se observó en una población resistente clonada de A. palmeri en Mississippi (EE.UU.) (Teaster & Hoagland, 2014).

C) LAS MUTACIONES PUNTUALES DEL GEN *ALS* COMO MECANISMO DE RESISTENCIA A P EN LA POBLACIÓN RM

El incremento en el número de copias del gen *ALS* es un mecanismo de resistencia poco habitual en plantas. La mayoría de los casos de resistencia a inhibidores de ALS, y también en la especie de estudio *A. palmeri*, suelen ser debido a cambios en la secuencia de bases del gen *ALS* (Molin *et al.*, 2016; Nakka *et al.*, 2017b; Singh *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos en este estudio descartaron la amplificación génica de *ALS* como mecanismo de resistencia a P en la población RM, ya que no se observó un incremento en el número de copias con respecto a la población S; al mostrar ambas poblaciones un promedio de 1,50 copias relativas (Figura 4.5).



Resultados similares se observaron en individuos susceptibles y resistentes a inhibidores de ALS en una población de *A. palmeri* proveniente de Arkansas (EE.UU.), con un promedio de 1 hasta 2 copias del gen *ALS* relativo al gen *A36* (Singh *et al.*, 2018). Sin embargo, a pesar de que se ha determinado que *A. palmeri* es una especie diploide con una sola copia del gen *ALS* (Ferguson *et al.*, 2001), la presión de selección ejercida con el uso recurrente de los mismos inhibidores de ALS podría aislar genotipos con más de una copia, dando lugar a fenotipos resistentes (Singh *et al.*, 2018) y promoviendo así la evolución de dichas resistencias más rápidamente (Larran *et al.*, 2017). En una población de *A. palmeri* procedente de Mississippi (EE.UU.) se encontraron individuos con 4-7 copias, aunque el principal mecanismo de resistencia fue atribuido a mutaciones en el gen *ALS* (Singh *et al.*, 2018), tal y como se ha detectado en la mayoría de poblaciones resistentes a inhibidores de ALS (Yu & Powles, 2014; Murphy & Tranel, 2019).

Para investigar si las mutaciones en el gen *ALS* contribuían a la resistencia a P en la población RM, se secuenció el gen *ALS* de los individuos, cubriendo los dominios CAD (Loci A122, P197 y A205) y BE (Loci W574, S653 y G654) (Heap, 2021). El estudio de la secuenciación de la población RM, reveló la presencia de mutaciones en un 69% de los 115 individuos analizados y un 31% sin ellas, lo que confirma la variabilidad del efecto de P sobre los diferentes individuos (Sección 4.1).

Las mutaciones se localizaron en 5 posiciones de la secuencia del gen *ALS*; en las posiciones W574, S653, A122, A205 y G654, y se encontraron individuos con solo una mutación o con dos de ellas. Las mutaciones W574L y S653N fueron las más abundantes en las plantas analizadas con una mutación simple, mientras que la sustitución A122T, no fue tan común (Figura 4.6). Estas dos mutaciones ya se habían identificado antes en otras poblaciones de *A. palmeri* como responsables de los mecanismos *TSR* a inhibidores de ALS (Berger *et al.*, 2016; Molin *et al.*, 2016; Larran *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2018; Heap, 2021).

En general, existe una gran diversidad de mutaciones en el gen *ALS*, y dentro de una misma población podemos encontrar individuos con distintas mutaciones en el gen *ALS*, sobre todo en especies de malas hierbas con polinización cruzada (Larran *et al.*, 2017). A nivel de gen del mismo individuo, en un solo alelo del gen *ALS* también puede haber mutaciones dobles e incluso múltiples (Warwick *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Délye *et al.*, 2011). En la población RM se encontraron individuos con las mutaciones dobles; W574L + S653N,



W574L + A122T, y con dos mutaciones dobles más raras de encontrar, que no se habían identificado y caracterizado previamente en *A. palmeri*: W574L + A205D y W574 + G654S. Considerando la presión de selección ejercida por los herbicidas, cuanto menos habitual es una mutación dentro de una población, más tiempo tardará en seleccionarse y que alcance una frecuencia elevada dentro de la población (Gaines *et al.*, 2020).

La mutación W574L, fue la mutación puntual más común encontrada al ser la más abundante en los individuos con mutación simple, y estar presente en todos los individuos con mutación doble (Figura 4.6). En estudios previos con poblaciones de *A. palmeri* resistentes a inhibidores de ALS, ya se había detectado esta mutación como la más frecuente e incluso algunos autores también la identificaron como mecanismo principal *TSR* a inhibidores de ALS (Molin *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2018; Torra *et al.*, 2020). Esta mutación es bastante habitual de encontrar entre las malas hierbas y se ha identificado también en otras especies de Amaranthus como *A. tuberculatus* (Foes *et al.*, 1998; Patzoldt & Tranel, 2007; Crespo *et al.*, 2017), *A. blitoides* (Sibony & Rubin, 2003), *A. retroflexus* L. (McNaughton *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2016), *A. hybridus* (Schmenk *et al.*, 1997) y en *A. powellii* (McNaughton *et al.*, 2005).

Los análisis de genotipado confirmaron que todos los individuos de la población RM que presentaron esta sustitución, tanto simple (W574L) como doble (W574L + S653N) eran heterocigotos (RS) (Figura 4.7, Tabla 4.2). Alguno de los parentales de los que provenían estos individuos, tenían también presente esta mutación, y sería el mecanismo principal *TSR* a inhibidores de ALS en la mayoría de los individuos RM analizados. Sin embargo, al no tener el genotipo de los individuos parentales no puede asegurarse si lo tenían ambos, ni saber si eran homo o heterocigotos.

En otras poblaciones RM de *A. palmeri*, los genotipos observados para esta mutación fueron tanto heterocigotos como homocigotos (Küpper *et al.*, 2017; Spaunhorst *et al.*, 2019). En general, los individuos RM con una sola mutación puntual mostraron valores de actividad ALS basal similares a los observados en la población S, tal y como se había descrito con anterioridad en poblaciones de *A. palmeri* (Larran *et al.*, 2017). Sin embargo, las plantas de la población RM con la doble mutación W574L + S653N mostraron los valores de actividad ALS basal más altos, y no así cuando la mutación W574L aparecía como mutación simple (Figura 4.8), al contrario de la mayor actividad ALS basal descrita en *Lolium rigidum* con la mutación simple W574L (Yu *et al.*, 2010).



A pesar de que los resultados del factor de resistencia (FR) fueron variables dependiendo de cada genotipo, se detectaron diferencias en el rango de los mismos (Figura 4.10, Tabla 4.2). Los individuos RM con la mutación W574L, sola o junto con S653N, mostraron en promedio el FR más elevado en comparación con el de los individuos con otras mutaciones. En otros estudios previos con *Lolium rigidum* (Yu *et al.*, 2010) y con *Poa annua* (Brosnan *et al.*, 2016) también se determinó que la mutación W574L confería los mayores niveles de resistencia. Cabe indicar que hubo individuos con la mutación W574L que, a pesar de tener el mismo genotipo, el FR no fue tan alto, lo que pudo deberse, de forma general, a la alta variabilidad genética detectada en *A. palmeri*, encontrándose predominantemente dentro de las poblaciones y en menor medida entre las poblaciones (Chandi *et al.*, 2013).

La mutación W574L confiere amplia resistencia a inhibidores de ALS y se ha descrito que otorga resistencia cruzada a todas las familias químicas de inhibidores de ALS (Whaley *et al.*, 2007; Beckie & Tardif, 2012; Heap, 2021) siendo más frecuentemente asociada a los herbicidas de la familia SU y a IMI (Tranel, Patrik J. and Wright, 2002; Heap, 2021). En menor medida se ha asociado a la familia TP (Bernasconi *et al.*, 1995; Woodworth *et al.*, 1996) y a la familia PTB, a la cual pertenecen el piritiobac y el bispiribac, al cual se ha descrito un nivel de resistencia de más de 10 veces con dicha mutación (Molin *et al.*, 2016).

La mutación en la posición S653 también se encontró entre los individuos RM analizados (Figura 4.6, Tabla 4.1). Mientras que solo en dos plantas la sustitución fue de Ser por Thr, S653T, en el resto de individuos la sustitución fue de Ser por Asn, S653N, tal y como se había detectado previamente en otras poblaciones de *A. palmeri* (Singh *et al.*, 2018; García *et al.*, 2020). Además, todos los individuos analizados con esta mutación simple fueron homocigóticos, mientras que los individuos que la contenían junto con W574L en la mutación doble W574L + S653N, fueron heterocigotos para ambas posiciones.

La presencia de S653N como mutación doble no afectó significativamente al FR de las plantas, ya que se detectó el mismo rango de FR en las plantas solo con W574L y en las plantas W574L + S653N (Figura 4.10). El FR de las plantas homocigotas con S653N fue el más bajo detectado, a excepción de un individuo con un nivel de resistencia de casi 200, por lo que se propone que la mutación puntual S653N confiere, en general, baja resistencia a la familia del herbicida P (Figura 4.10). A pesar de haber estudios que determinan el nivel de resistencia



de esta mutación a diversas familias de inhibidores de ALS, no hay estudios que hayan determinado el nivel de resistencia a P. La mutación S653N es conocida por conferir alta resistencia a IMI (Patzoldt & Tranel, 2007; Powles & Yu, 2010) pero baja o nula a las familias SU y TP (Bernasconi *et al.*, 1995; Tranel, Patrik J. and Wright, 2002; Powles & Yu, 2010; Tranel *et al.*, 2019). Sin embargo, se han encontrado individuos RM en Brasil con esta mutación en heterocigosis y que mostraron resistencia a SU, por lo que en ese caso se cree que también podían estar involucrados otros mecanismos *NTSR* (Küpper *et al.*, 2017).

La mutación simple A122T resultó ser heterocigota, tanto como mutación simple como mutación doble junto con W574L (Figura 4.7, Tabla 4.2). Esta sustitución descrita por conferir alta resistencia alta a IMI, moderada a TP, pero baja a SU (Powles & Yu, 2010; Heap 2021), ya se había descrito antes en *A. palmeri*, en una población en Argentina (Larran *et al.*, 2017) y en Arkansas (EE.UU.), mostrando resistencia moderada-alta a las distintas familias químicas de inhibidores de ALS, y en concreto con resistencia al herbicida P (Singh *et al.*, 2018). Como hasta el momento, no hay más estudios que relacionen esta sustitución con una alta resistencia a otras familias químicas que no fuesen IMI, no se descarta la posibilidad de que otros mecanismos *NTSR* también pudiesen estar involucrados. En cuanto al FR, el rango de los valores detectados también fueron bajos en la mayoría de individuos, en comparación con la mutación W574L (Figura 4.10), lo que podría sugerir, al igual que para S653N, que A122T confiere baja resistencia al P.

Por último, las mutaciones A205D y G654S (Figura 4.6) no se habían descrito previamente en *A. palmeri* (Heap, 2021), pero si en otras especies, aunque no son muy comunes. La mutación A205D se encontró por primera vez en 1996 en *Xanthium strumarium L.* (Woodworth *et al.*, 1996) y en los últimos años se ha descrito por conferir amplia resistencia a inhibidores de ALS, incluyendo P (Brosnan *et al.*, 2016). Esta mutación solo se detectó en una planta que también contenía la mutación W574L, por lo que el papel de cada mutación en el rasgo de resistencia es difícil de dilucidar. La mutación G654S solo se ha descrito en una población resistente de *Setaria viridis* en 2008 (Laplante *et al.*, 2009).

La caracterización de la resistencia a inhibidores de ALS realizada en la población RM muestra la diversidad en las mutaciones en las poblaciones naturales, y más cuando se trabaja con especies dioicas, de obligado cruzamiento, como es el caso de *A. palmeri*, y que acumulan una gran cantidad de mutaciones en el gen *ALS* (Singh *et al.*, 2018). Normalmente, una población



de malas hierbas no suele estar formada completamente por individuos o todos sensibles o todos resistentes a un herbicida determinado (Cousens & Mortimer, 1995) aunque en general, los genes de resistencia rápidamente se vuelven relevantes en la población en presencia de los herbicidas (Yu & Powles, 2014). A pesar de que exista una gran variabilidad entre los alelos (tanto en homocigosis como en heterocigosis) que componen los genes de resistencia, si la frecuencia de estos genes es inicialmente alta, su herencia es dominante y se continúa ejerciendo una presión de selección con los mismos tipos de herbicidas, se puede producir un cambio hacia genotipos más resistentes incrementando así la problemática del control de las malas hierbas resistentes.

En conclusión, los mecanismos de resistencia detectados en la población RM fueron ambos *TSR*. La resistencia a G fue muy homogénea en todos los individuos analizados, y el mecanismo fue la amplificación génica de *EPSPS*. El mecanismo de resistencia a P fue por mutaciones en el gen *ALS*. Esta resistencia no fue tan generalizada al presentarla solo el 69 % de los individuos RM, ni tan homogénea, ya que se detectaron hasta cinco mutaciones diferentes, siendo la mutación W574L la más común y la que confirió el mayor nivel de resistencia a P.

5.2 IMPLICACIONES DE LA RESISTENCIA MÚLTIPLE EN LAS VÍAS DE BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS ALTERADAS POR LAS RESISTENCIAS Y EN LA FISIOLOGÍA DE LAS PLANTAS RESISTENTES

La evolución de la resistencia a los herbicidas en las plantas proporciona un excelente sistema modelo para estudiar la compensación entre crecimiento y resistencia. Las mutaciones que otorgan resistencia a los herbicidas pueden implicar mecanismos adaptativos, compensatorios, de las plantas con implicaciones en su fenotipo. Así, el cambio de un solo aminoácido en la proteína diana de un herbicida, o la sobreexpresión de dicha proteína, puede influir en múltiples rasgos fenotípicos del organismo (pleiotropía), pudiendo causar efectos perjudiciales en los rasgos de aptitud de la planta, lo que se conoce como el "fitness cost" o coste de la resistencia, que puede ser perjudicial en ausencia del herbicida, aunque siga proporcionando ventaja a los individuos resistentes, en presencia del herbicida. El coste de la resistencia suele



cuantificarse como el efecto en caracteres de crecimiento y desarrollo genéricos: tasas de crecimiento relativo, tasa neta de asimilación de CO₂, capacidad de competencia etc.

Las modificaciones que llevan a la resistencia, como las descritas en este trabajo en la población RM (amplificación génica de *EPSPS* y mutaciones en *ALS*), pueden tener consecuencias adicionales al efecto en la expresión y características del enzima codificado. Hasta la fecha, no se ha estudiado en profundidad la pleiotropía asociada a combinaciones de genes y mecanismos de resistencia múltiple a herbicidas (Délye *et al.*, 2013), ya que casi todos los estudios de pleiotropía se han realizado en poblaciones con resistencias simples. Un estudio sobre población RM de *L. rigidum* mostró que el mecanismo de resistencia *NTSR* basado en mayor degradación del herbicida tenía como resultado el coste fisiológico de reducción en biomasa vegetativa (Vila-Aiub *et al.*, 2005).

En este trabajo no se han observado diferencias en el crecimiento vegetativo de las dos poblaciones de *A. palmeri* S y RM sin tratar (Figura 4.1). En otro estudio también en *A. palmeri*, pero con resistencia simple a G, se mostró que la amplificación génica no provocaba efectos pleiotrópicos sobre el crecimiento de las plantas ni las variables reproductivas (Vila-Aiub *et al.*, 2014). En la misma línea, Bravo *et al.*, (2017) en un trabajo comparativo sobre características vegetativas entre poblaciones, se descartó que el mayor crecimiento detectado en las poblaciones de *A. palmeri* resistentes a G fuese resultado de un efecto pleiotrópico del rasgo de resistencia.

En cuanto a la posible comparación con resistencias simples a inhibidores de ALS, es de destacar que a pesar de que la resistencia a estos herbicidas por mutaciones en el gen *ALS*, está muy extendida en distintas especies de malas hierbas, se han hecho pocos trabajos de evaluación del coste de la resistencia y sus resultados son variables. Tardif *et al.*, (2006) mostraron que en una población de *A. powelli* la mutación puntual W574L en el gen *ALS* parecía tener numerosos efectos pleiotrópicos en el crecimiento y desarrollo, efecto que no se ha detectado en la población RM de este estudio, a pesar de presentar dicha mutación. En poblaciones de *L. rigidum* se mostró que 4 mutaciones distintas del gen *ALS* en la posición P197 y una mutación en W574, en homocigosis, tuvieron efectos insignificantes en el crecimiento de las plantas y en la cinética de ALS, y solo hubo una pequeña reducción en la tasa de crecimiento relativo de la planta en los casos en los que se vieron alteraron ciertos parámetros



cinéticos de ALS como la actividad específica, afinidad de sustrato o regulación *feedback* (Yu *et al.*, 2010). Por otra parte, (Li *et al.*, 2012) mostraron la ausencia de efectos pleiotrópicos de las mutaciones A122Y, P197S, D376E o W574L, analizando el crecimiento vegetativo de *Raphanus raphanistrum*, pese a que esas mutaciones sí que produjeron modificaciones en la actividad ALS basal.

En este trabajo se ha evaluado la fisiología de la población resistente en mayor profundidad que los aspectos generalmente evaluados en los estudios pleiotrópicos (crecimiento, biomasa, ciclo...). Todas las determinaciones analíticas han permitido evaluar en profundidad el metabolismo primario de las plantas que presentan RM, a dos niveles diferentes: 1) se ha estudiado el efecto de la RM en las rutas de biosíntesis de aminoácidos específicamente inhibidas y 2) por otro lado se han estudiado distintos parámetros fisiológicos habitualmente asociados al modo de acción de los herbicidas de estudio (carbohidratos, aminoácidos, actividades proteolíticas).

Respecto al primer aspecto, apenas existen investigaciones sobre los efectos que estos mecanismos de resistencia tienen en otras rutas de biosíntesis de aminoácidos en plantas ya que la mayoría de los estudios han puesto más hincapié en observar el efecto de los mecanismos de resistencia en el crecimiento y en la fecundidad de las plantas. En el presente estudio, las plantas no tratadas de la población RM sí mostraron niveles más altos de expresión de los genes de la ruta de BAA y de BAR, así como del contenido de AAR, evidenciando la existencia de otros efectos. En este trabajo se plantea que sean consecuencia de la amplificación del gen EPSPS y de las mutaciones en el gen ALS observadas. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que estas diferencias no sean consecuencia de los mecanismos TSR identificados, sino que estarían relacionadas con un diferente antecedente genético, si bien no hay estudios al respecto. La población RM provenía de un área geográfica diferente (Arizona) que las poblaciones de estudio S y RG (Carolina del Norte), por tanto, estas poblaciones podrían haber evolucionado en zonas distantes y haberse adaptado a las diferentes condiciones ambientales. Este proceso de adaptación podría haber dado lugar a diferencias interpoblacionales a nivel genético y / o metabólico, siendo aún más relevante para especies como A. palmeri caracterizada por su gran variabilidad genética, debido principalmente a su sistema reproductivo dioico.

La amplificación génica de *EPSPS* presenta, en general, una correlación positiva con la expresión de este gen (García *et al.*, 2020), tal y como se ha descrito para



poblaciones de A. palmeri RG (Gaines et al., 2010, 2011, 2020; Fernández-Escalada et al., 2016, 2017) o en otras especies del género Amaranthus, como A. spinosus (Nandula et al., 2014), y en otras especies de malas hierbas (Chahal et al., 2017). En este estudio, observamos que, la expresión de EPSPS de los individuos RM fue 130 veces mayor que en la población S (Tabla 4.3), debido al mecanismo TSR de amplificación génica. Adicionalmente al incremento en la expresión de EPSPS, en la población RM se detectó un incremento generalizado en la expresión, a nivel de transcritos, de 4 enzimas de la ruta (DAHPS, DQSD, CM1-3 y CM2) que fue 2-3 veces mayor que en la población S (Tabla 4.3). Este efecto de mayor nivel de expresión de la ruta por amplificación del gen EPSPS, no se detectó en el perfil transcripcional de la ruta del siguimato de una población con resistencia simple a G, frente a una población S (Fernández-Escalada et al., 2017), lo que podría sugerir en primer lugar que es un rasgo fisiológico particular de las poblaciones con mecanismos de resistencia adicionales, como sucede en la población de este estudio. Sin embargo, estas diferencias entre poblaciones con el mismo mecanismo de resistencia a G, también podrían derivar de los diferentes antecedentes genéticos. Diversos estudios han mostrado resultados variables entre poblaciones resistentes a glifosato, con casos genéticamente variables (Küpper et al., 2018) y otros más homogéneos (Küpper et al., 2018; Molin et al., 2020; Bravo et al., 2017) mostrando que las diferencias en los rasgos estudiados en 10 poblaciones distintas de A. palmeri no se debían a la distancia genética entre poblaciones ni a la resistencia a G, si no que fueron debidas a las características particulares de los sistemas de cultivo de donde se recogieron (por ejemplo, la rotación de cultivos). Aunque existe información sobre la variación entre poblaciones RG, apenas hay estudios sobre la caracterización de la resistencia y de la resistencia múltiple en poblaciones de A. palmeri provenientes de distintas zonas geográficas, lo que aporta dificultad para sacar conclusiones definitivas sobre las diferencias observadas en nuestro estudio.

La población RM en estudio también mostró un incremento de los niveles de transcritos de dos enzimas de la vía BAR: *AHAIR* y *TA* (Tabla 4.4). Este incremento de la expresión de la mitad de los genes de la ruta de BAR podría estar relacionado con el rasgo de la RM (o ser consecuencia de la mutación en *ALS*), ya que en una población de *A. palmeri* con resistencia simple a glifosato no se vio modificada la expresión de los enzimas de la ruta BAR (Fernández-Escalada *et al.*, 2017).



El contenido en aminoácidos ramificados (AAR) fue el único contenido en aminoácidos diferente entre ambas poblaciones, presentando la población RM mayor contenido (Figura 4.21), y pudiendo estar relacionado con las mutaciones en el gen ALS. En general, estas mutaciones no producen impacto sobre las funciones y propiedades cinéticas del enzima ALS (Gaines et al., 2020). En concreto, las mutaciones en la posición 574 del gen ALS no afectan drásticamente a la funcionalidad del enzima ALS, pero sí pueden alterar la sensibilidad del enzima ALS a la regulación feedback por los AAR, resultando en la acumulación de estos aminoácidos (Yu et al., 2010). En estudios previos se había descrito una acumulación de AAR en poblaciones resistentes de Lactuca serriola, Solanum ptychanthum y en líneas de arroz recombinantes transgénicas con genes ALS mutados (Eberlein et al., 1997; Preston et al., 2006; Endo et al., 2013). En la población RM, el mayor contenido de AAR podría también ser responsable del incremento en la expresión de TA. Se sabe que este enzima cataliza el paso final en la BAR, pero también está involucrado en la degradación de estos tres AAR (Diebold et al., 2002). Por ello, la mayor expresión del gen TA podría venir motivada por los mayores contenidos de AAR, si bien se conoce poco sobre la regulación de los enzimas de la BAR, sobre todo en el caso de TA (Maloney et al., 2010).

Respecto al segundo aspecto de la caracterización fisiológica de la población RM, apenas se detectaron diferencias entre los niveles basales de las poblaciones S y RM.

Los contenidos en carbohidratos y en aminoácidos libres totales (AAT) de las poblaciones S y RM de este estudio fueron muy similares entre las plantas sin tratar (Figuras 4.16 y 4.19), y el contenido en aminoácidos ramificados (AAR) fue el único parámetro diferente entre ambas poblaciones, tal y como se ha discutido en párrafos anteriores.

En relación a las proteasas, no se observó ningún patrón o intensidad de señal diferente en el perfil de PLCPs (Figura 4.27) y de VPEs (Figura 4.28) entre los individuos no tratados de las poblaciones S, RM y únicamente resistente a glifosato (RG). Así, todas estas observaciones sugieren que los mecanismos de resistencia *TSR* de la población RM, no tienen un efecto relevante en los niveles de metabolitos primarios o en el perfil proteolítico.

Hubo una excepción importante en la caracterización fisiológica de la población RM, que fue la actividad enzimática GST (Figura 4.31), y que puede estar



implicada en la fisiología de las poblaciones resistentes por su participación en los mecanismos *NTSR*. Así, los individuos control de la RM (y de la población RG) presentaron mayor actividad de este enzima que los individuos de la población S (Figura 4.31). Estos resultados podrían sugerir la existencia de una actividad GST dentro de los mecanismos *NTSR* en los individuos RG y RM, que complementaría los mecanismos *TSR* ya descritos en estas poblaciones. Se ha descrito la resistencia a atrazina (inhibidor del fotosistema II) a través de un metabolismo mediado por GSTs en varias poblaciones de *A. tuberculatus*, se demostró que el metabolismo rápido de la atrazina mediado por la conjugación de GST confería la resistencia a dicho herbicida (Vennapusa *et al.*, 2018) y en una población de *A. palmeri* (Nakka *et al.*, 2017a), en donde se forma un conjugado atrazina-GST. Sin embargo, no existen estudios en los que se hayan detectado metabolitos formados con la conjugación mediada por GST con inhibidores de ALS o G.

A pesar de la existencia de mayores niveles basales de GST en las poblaciones RM y RG, el estudio de la actividad real de este enzima mediante la técnica ABPP y con la sonda GST-G mostró que no existían diferencias significativas entre los controles de las tres poblaciones (Figura 4.32). Los dos resultados potencialmente contradictorios a nivel actividad espectrofotométrica y de actividad GST activa podrían deberse a la diferente metodología. La superior actividad *in vitro* (Figura 4.31) detectada mostraría una mayor actividad potencial en las plantas resistentes que no está activada en condiciones basales de las plantas sin tratar, tal y como se muestra en la técnica ABPP (Figura 4.32). Este estudio indica la necesidad de profundizar en el comportamiento enzimático de las GSTs en plantas con resistencia y evidencia que las poblaciones de malas hierbas pueden presentar múltiples mecanismos de resistencia.

En conclusión, los efectos adicionales pueden variar mucho con el gen que otorga la resistencia, también pueden variar en función de la especie, del origen y de la historia genética de la población provocada por diferentes condiciones ambientales, produciendo efectos en determinados parámetros fisiológicos, hasta incluso no producir efectos visibles, tal y como se ha observado en nuestra población de estudio. En la población RM se han detectado efectos adicionales a los producidos directamente por la modificación génica de la resistencia múltiple, pero más o menos relacionados con ella: en la expresión génica de los enzimas de las rutas de BAA y BAR, y en el contenido de AAR,



evidenciando efectos muy localizados en las rutas dianas de los herbicidas a los que la población es resistente. La mayoría del resto de parámetros fisiológicos evaluados, carbohidratos, aminoácidos y actividades proteolíticas, no presentó diferencias entre las poblaciones S y RM. Se detectó una mayor actividad enzimática GST potencial en las plantas resistentes, que podría complementar su fisiología resistente como mecanismo *NTSR*.

5.3 EFECTOS DE LOS HERBICIDAS G Y/O P EN LA POBLACIÓN RM Y S

A) EN LA POBLACIÓN RM LOS EFECTOS DEL G ESTÁN MUY ATENUADOS

El tratamiento con G en poblaciones sensibles provoca, en general, una importante acumulación de aminoácidos libres totales (AAT) en las plantas tratadas, lo que ha sido ampliamente descrito (Becerril *et al.*, 1989; Moldes *et al.*, 2008, 2012; Orcaray *et al.*, 2010, 2012; Vivancos *et al.*, 2011; Maroli *et al.*, 2015; Zulet *et al.*, 2015; Fernández-Escalada *et al.*, 2016, 2019).

En la población S la acumulación del contenido de AAT después del tratamiento G fue significativa (Figura 4.19). El contenido en AAT presente en una planta en un momento dado, es el resultado de los aminoácidos aportados por la síntesis de novo y la degradación de proteínas, y de los procesos que los consumen: síntesis de proteínas y degradación de los aminoácidos en vías catabólicas (Singh & Shaner, 1995b). El incremento de AAT en plantas S tratadas con G, podría deberse a que, bajo condiciones de estrés por el herbicida, la utilización de aminoácidos para la síntesis de novo de proteínas se ve generalmente inhibida y se incrementa el catabolismo acelerado de proteínas, con un mayor turnover o recambio proteico (Araújo et al.. 2011; Hildebrandt et al., 2015). Este efecto podría ser una estrategia general de mitigación del estrés o como consecuencia de la inhibición de diferentes rutas por parte de los herbicidas. Para dilucidar con mayor profundidad las posibles causas de la acumulación de AAT, en el apartado 5.3.E, se presentan el efecto que tienen las proteasas en el proceso de recambio proteico o turnover. En las poblaciones resistentes a G (RG y RM) no se observó incremento significativo de los AAT, mostrando falta de efecto cuando existe amplificación génica del EPSPS.



El efecto del G en el contenido específico de aminoácidos aromáticos (AAA) es de especial interés puesto que es la ruta inhibida por este herbicida. En trabajos previos, en especies sensibles se describió que se produce un incremento en el contenido en AAA, mostrándose como un marcador de daño fisiológico del G (Orcaray *et al.*, 2010; Zulet *et al.*, 2015; Fernández-Escalada *et al.*, 2016, 2017), o que no existía un patrón claro en respuesta a la exposición con G (Petersen *et al.*, 2007; Vivancos *et al.*, 2011; Maroli *et al.*, 2015). En la población S de este trabajo se detectó una acumulación de AAA por el tratamiento con G (Figura 4.20), cuyo sentido va en la línea expuesta anteriormente de que la mayor velocidad de *turnover* de proteínas puede ser responsable de que el contenido del producto final de la vía se acumule en presencia de su inhibidor.

El tratamiento con G de la población RG no provocó un incremento significativo, similar a lo descrito en un estudio previo (Fernández-Escalada *et al.*, 2016). En la población RM el tratamiento con G no provocó efecto en el contenido en AAA (Figura 4.20), evidenciando así el bajo nivel de daño por G, debido al mecanismo *TSR* por amplificación génica de *EPSPS*.

El efecto del G en el contenido específico de aminoácidos ramificados (AAR) se ha descrito en poblaciones sensibles en otros estudios pese a que el G no es inhibidor de esta vía (Cooley & Foy, 1992; Orcaray *et al.*, 2010; Fernández-Escalada *et al.*, 2019). En la población S de este trabajo, el tratamiento con G produjo un importante incremento en los niveles de Leu e lle (Figura 4.21). En la población RG también se acumularon estos aminoácidos tal y como se había descrito anteriormente (Fernández-Escalada *et al.*, 2019), pero en la población RM, no se observó este efecto (Figura 4.21), lo que podría indicar que los efectos sobre los AAR se mitigan más en poblaciones con RM a G y a herbicidas inhibidores de ALS, que en poblaciones solo resistentes a G, como RG.

En relación al efecto del G en el contenido en otros aminoácidos individuales, se ha descrito previamente que en poblaciones sensibles se produce un descenso en el contenido de los aminoácidos ácidos (Asp y Glu), simultáneo a un incremento de las amidas (Gln y Asn), indicando un cambio en el modo de almacenamiento de nitrógeno de las formas ácidas a las amidas (Orcaray *et al.*, 2010; Fernández-Escalada *et al.*, 2019). La población S de este trabajo, mostró efectos del G solo en los aminoácidos amidas, pero no en los ácidos (Figura 4.22.A y B). Estas diferencias en la respuesta podrían deberse a que estos compuestos se sintetizan a distinta velocidad o que provienen de la degradación de proteínas, y su contenido depende de la composición de las



proteínas de las que proceden. En las poblaciones RG y RM el G no produjo efectos en el contenido en aminoácidos ácidos o amidas.

Otro efecto fisiológico ya conocido del modo de acción del G, es la acumulación de carbohidratos en hojas (Orcaray et al., 2012; Zulet et al., 2015; Fernández-Escalada et al., 2016), efecto que puede ser usado como marcador de la toxicidad del herbicida. La acumulación significativa de carbohidratos solubles totales (CHST), observada en las hojas de la población S con el tratamiento G (Figura 4.16.A), puede ser explicada por una inhibición del transporte de fotosintetizados por el floema a los sumideros (raíces) de la planta (Devine, 1989; Bestman et al., 1990). La sacarosa es transportada por el floema desde las hojas a estos sumideros a una tasa mayor a la que puede ser utilizada en los mismos. Bajo estas condiciones, el gradiente de azúcares requerido para el transporte a larga distancia se inhibe por una disminución de la demanda del sumidero (Orcaray et al., 2012), es decir, se reduce la capacidad del floema, en la región de los sumideros, para importar estos fotoasimilados que no se utilizan (Wolswinkel et al., 1984). Así, la disminución de la demanda de fotoasimilados en los sumideros, parece ser la causante de que los carbohidratos se acaben acumulando en las hojas de las plantas tratadas (Gaston et al., 2002; Zabalza et al., 2004; Orcaray et al., 2012). En la población RM el efecto del G en el contenido en carbohidratos no fue significativo. Similar resultado se mostró en una población de A. palmeri resistente solo a G por el mismo mecanismo (Fernández-Escalada et al., 2019). En relación a la acumulación de almidón, este fue el único efecto fisiológico que no se atenuó o fue abolido en la población RM (Figura 4.17), al contrario de lo que ocurría en la población RG por G (Fernández-Escalada et al., 2019).

El efecto del G en la expresión de las vías BAA y BAR ha sido muy poco estudiado, si bien en poblaciones sensibles parece que el G induce la expresión de la vía BAA tal y como se ha encontrado en la población S de este estudio (Figura 4.11 y 4.12) (Fernández-Escalada *et al.*, 2017; Zulet-González *et al.*, 2020). La inhibición de la actividad EPSPS es la responsable de esta inducción, ya que en la población RM no se observó que el G indujera la ruta BAA. Sobre los efectos del G en la expresión de la vía BAR en poblaciones sensibles, estudios previos mostraron falta de efecto (Fernández-Escalada *et al.*, 2017, 2019). En línea con ellos, en la población S de este estudio, no se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión del gen *TA*, que aumentó de manera



significativa con G. La implicación del enzima TA en respuesta al estrés en plantas, ya ha sido descrito anteriormente (Lanzinger *et al.*, 2015; Buffagni *et al.*, 2020), incluso especificando su función catabólica más que la anabólica (Vital *et al.*, 2017). Al igual que lo observado al comparar las dos poblaciones en ausencia de herbicida (apartado5.2), los altos niveles de expresión detectados de *TA*, podrían estar relacionados con un incremento de la actividad catabólica de este enzima, en respuesta, en este caso, al herbicida. En la población RM, no se detectó una inducción de la expresión de *TA* después del tratamiento con G.

En conclusión, podemos afirmar que el mecanismo *TSR* de amplificación génica de *EPSPS* alivió la fitotoxicidad provocada por el herbicida G en la población RM, atenuando los efectos observados en la población S para la mayoría de los parámetros analizados.

B) EN LA POBLACIÓN RM LOS EFECTOS DEL P ESTÁN MENOS ATENUADOS QUE LOS EFECTOS DEL G

Se ha descrito que los herbicidas inhibidores de ALS producen un aumento en el contenido de AAT y una disminución de la proteína soluble (Anderson & Hibberd, 1985; Shaner & Reider, 1986; Scarponi *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2007; Zulet *et al.*, 2013). El efecto del P en la población S fue, efectivamente, de un incremento en el contenido en aminoácidos libres, similar al observado por el tratamiento con G. Este efecto ya se había observado con imazamox en *A. palmeri* (Fernández-Escalada *et al.*, 2019), y es un efecto típico de los inhibidores de ALS, ya que estos herbicidas inhiben la incorporación neta de nitrógeno exógeno en la síntesis *de novo* de proteínas (Zabalza *et al.*, 2006), por lo que el incremento de aminoácidos podría venir de procesos de degradación proteica. Como ya se indicó en el apartado anterior con el efecto de G, los procesos de degradación proteica se discuten con mayor detalle en los apartados 5.3.E, F y G. En la población RM el P no provocó un aumento significativo en los AAT, evidenciando así el bajo nivel de daño ocasionado por el herbicida P.

La acumulación de AAA tras la aplicación de inhibidores de ALS, se describió con anterioridad (Anderson & Hibberd, 1985; Singh & Shaner, 1995b; Orcaray *et al.*, 2010) pese a que los AAA no se sintetizan en la vía inhibida por estos herbicidas. El tratamiento con P en la población S, provocó un incremento no significativo de los AAA totales y significativo de Trp (Figura 4.20). El patrón fue



similar en las poblaciones RG y RM (Figura 4.20). Por el contrario, no se produjeron modificaciones importantes en los niveles de AAR después de P, en ninguna de las poblaciones estudiadas (Figura 4.21).

De manera similar al tratamiento con G, el tratamiento con P en la población S presentó un importante incremento en el contenido de amidas, efecto que fue atenuado en la población RM y no en la población RG.

Los efectos de los inhibidores de ALS en otros aminoácidos, ya descritos en otros trabajos (Zulet *et al.*, 2013, 2015), se mostraron también en las poblaciones S y RG tratadas con P. En la población RM los valores de aminoácidos como Ser-Gly, Thr, Arg o His, aumentaron, aunque en muchos casos no fueron significativos evidenciando cierta disminución en la intensidad de los efectos del herbicida P, pero sin ser tan evidente la atenuación como para otros parámetros fisiológicos.

Un efecto fisiológico conocido en respuesta a herbicidas inhibidores de ALS es el incremento del contenido de carbohidratos (Zabalza *et al.*, 2004; Zulet *et al.*, 2015; Fernández-Escalada *et al.*, 2019), igual que con el tratamiento de G. En la población S, el tratamiento con P provocó los incrementos significativos de CHST y del contenido individual de cada uno de los azúcares (Figura 4.16). Este es el primer estudio en el que se observa una acumulación significativa de almidón bajo el efecto de un herbicida inhibidor de ALS para una población S de *A. palmeri* (Figura 4.17). En la población RM, el tratamiento con P no produjo efectos tan marcados como en la población S. Solo produjo una acumulación significativa de los CHST, de sacarosa y de almidón, y se anularon los efectos sobre la glucosa y la fructosa (Figuras 4.16 y 4.17), lo que respalda la idea de que las mutaciones puntuales en el gen *ALS* detectadas en los individuos RM alivian parcialmente los efectos fitotóxicos provocados por el herbicida P.

En ninguna de las tres poblaciones el tratamiento con P modificó el nivel de expresión de *ALS* (Figura 4.15). El resto de los genes de la ruta BAR tampoco se vieron afectados por el P en la población S, en línea con lo observado en estudios previos con imazamox (Fernández-Escalada *et al.*, 2019) o imazapyr (Manabe *et al.*, 2007). Por el contrario, en la población RM sí se detectó un incremento significativo en la expresión del gen *TA* tras el tratamiento con P, que puede relacionarse, al igual que lo descrito para G en la población S, con un incremento de los procesos catabólicos catalizados por este enzima, en respuesta a este herbicida.



Aunque los inhibidores de ALS no afectan a la vía BAA, el estudio de la expresión de esta vía en la población S tratada con P mostró una inducción general de la vía, con la excepción de *CM2* y *CM1-3* (Figura 4.11 y 4.12). Este incremento general no había sido detectado después de la aplicación de otros herbicidas inhibidores de ALS (Fernández-Escalada *et al.*, 2019), lo que sugiere que podría ser un efecto fisiológico específico del P que no está directamente relacionado con la inhibición del sitio diana. Este efecto observado en la población S no se encontró en la población RM tratada con P. Aunque todavía queda mucho por investigar en este tema, una posible causa de este incremento en la expresión, podría ser una co-regulación directa o indirecta de determinados factores de transcripción en respuesta a estreses ya que difícilmente se debería a una disminución en los productos finales de la ruta de BAA, puesto que los AAA no descendieron tras el tratamiento con P (Figura 4.20).

El único cambio detectado en el contenido de las proteínas DAHPS y EPSPS fue que los valores de EPSPS aumentaron significativamente en la población RM tras el tratamiento con P (Figura 4.14). Este incremento podría sugerir la presencia de una regulación post-transcripcional, ya que los niveles de expresión relativa de *EPSPS* no se vieron afectados (Figura 4.12).

En conclusión, en la población RM, el mecanismo de resistencia a inhibidores de ALS presente en estos individuos, contribuyó a que los efectos fisiológicos de P no fuesen tan evidentes como en la población S. En el caso de P, en la población RM se atenuaron los efectos sobre la fructosa, glucosa, AAT y AAA, respecto a los observados en la población S; mientras que los efectos producidos en otros metabolitos (como sacarosa, almidón o ciertos AA) fueron más parecidos a los observados en la población S.

C) LA APLICACIÓN CONJUNTA DE G Y P NO EXACERBÓ LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS PROVOCADOS POR SU APLICACIÓN INDIVIDUAL

Debido a la estrecha vinculación existente entre ambas rutas de biosíntesis de aminoácidos y los efectos fisiológicos comunes provocados por el G y P, resulta interesante valorar los efectos fisiológicos que produce la mezcla de estos herbicidas en las poblaciones de estudio.



Los efectos producidos por una mezcla de herbicidas pueden ser sinérgicos (Joseph *et al.*, 2018) o antagónicos (Rustom *et al.*, 2019). Si la sinergia es la interacción principal, el efecto es mayor que los efectos producidos por la suma de los herbicidas individuales, lo que podría tener implicaciones agronómicas, como la posibilidad de reducir las tasas de aplicación en estas mezclas (Barrett, 1993). Por el contrario, si la mezcla es antagónica, el efecto es inferior a la suma de las aplicaciones individuales de los herbicidas y se necesitaría aplicar la dosis total recomendada de cada uno de los herbicidas para poder controlar las malas hierbas (Barrett, 1993). Cuando el efecto de la mezcla es similar a la suma del efecto de los herbicidas aplicados individualmente, consideramos el efecto neutro o aditivo (Barrett, 1993).

Se evaluaron los cambios fisiológicos producidos por la mezcla GP en los niveles de expresión de las rutas de BAA y BAR y en el contenido de diferentes metabolitos conocidos como marcadores de la toxicidad de los herbicidas: carbohidratos y perfil de aminoácidos.

En relación al contenido de AAT, marcador conocido del efecto de ambos herbicidas, en la población S el efecto de la mezcla GP fue similar al observado con los herbicidas aplicados individualmente, es decir, el incremento significativo del contenido de AAT que se observó tras la aplicación de G o P, se mantuvo con la aplicación de GP (Figura 4.19). Así, podemos determinar que el efecto de la mezcla GP produjo un efecto neutro. En la población RG y RM el efecto de la mezcla fue algo superior al mayor de los efectos individuales o a la suma de los mismos, provocando el único incremento significativo entre los tratamientos (Figura 4.19).

En la población S, el incremento significativo en el contenido total e individual de los AAA detectado con G, no se observó con la mezcla (Figura 4.20), en cuyo caso el efecto fue antagonista. Sin embargo, en la población RG y RM, sí se observó un incremento significativo con GP (Figura 4.20), que en el caso de la población RG, fue similar al incremento significativo detectado con los herbicidas individuales G y P. En la población RM, el incremento significativo detectado con la mezcla a nivel de AAA totales y de Phe, fue igual a la suma de los efectos individuales, por lo que el efecto se consideró como neutro o aditivo.

Por el contrario, la mezcla no provocó efectos significativos en el contenido de AAR en ninguna de las poblaciones (Figura 4.21). En el caso de la población RM, los valores fueron similares a los detectados después de la aplicación individual de herbicidas, pero en la población RG y S, los valores con GP, fueron menores



que los detectados después de la aplicación con G (Figura 4.21). Así, en todos los casos, los efectos fueron antagónicos.

El efecto de GP sobre el resto de aminoácidos en ambas poblaciones fue variable, y se detectaron casos de efectos aditivos o de efecto antagonista, pero en ningún caso se detectó un efecto sinérgico. En el caso de la población RM, el efecto aditivo del tratamiento GP fue el único que provocó acumulación significativa en varios aminoácidos (Thr, Lys, amidas, Ser-gly, Arg y Prolina (Figuras 4.22, 4.23, 4,24 y 4.25) mostrando una mayor sensibilidad de esta población a este tratamiento.

Tanto para el contenido de CHST como para el contenido individual de fructosa y glucosa, el tratamiento GP produjo una acumulación intermedia entre las detectadas tras las aplicaciones individuales de G o P en la población S (Figura 4.16). En la población RM, la mezcla no modificó la poca respuesta inducida por los herbicidas aplicados individualmente sobre los azúcares individuales o su suma (Figura 4.16).

Cabe destacar que la acumulación de almidón fue el único efecto fisiológico provocado por los tres tratamientos herbicidas (G, P ó GP) que no se atenuó o fue abolido en la población RM, ya que los tres tratamientos provocaron una acumulación significativa en ambas poblaciones (Figura 4.17). Este aumento significativo detectado en la población RM, abre la posibilidad de que las características de resistencia múltiple *TSR*, como son la sobreexpresión de EPSPS y las mutaciones en el gen *ALS*, provocan que no se vea atenuado este parámetro fisiológico. Ello plantearía que otros mecanismos no directamente relacionados con la diana de los herbicidas podrían estar involucrados en la acumulación de almidón detectada tanto en S como en RM.

En la población S, la mezcla GP produjo una acumulación de siquimato similar al efecto individual producido por G (Figura 4.3), lo que parece indicar un efecto neutro. Estos efectos también se habían descrito con otras poblaciones de *A. palmeri* RG tratadas con G y con el inhibidor de ALS, imazamox (Fernández-Escalada *et al.*, 2019).

Los efectos de la mezcla GP en la expresión de los genes de la ruta de BAA, fueron en su mayoría menores que la suma de los efectos individuales (Figura 4.11 y 4.12), por lo que el antagonismo puede proponerse como el comportamiento general observado. En el caso de la población S, el aumento de expresión detectado después de P fue mucho menor con GP. Por el



contrario, en la misma población S de *A. palmeri*, se observó una exacerbación del patrón transcripcional después de la mezcla (glifosato e imazamox) en comparación con G solo (Fernández-Escalada *et al.*, 2019).

Curiosamente, la mezcla de herbicidas GP provocó efectos significativos y diferentes en la expresión de la ruta de BAR entre ambas poblaciones: en la población S, solo aumentaron los niveles de transcripción de *TA* (Figura 4.15.D), mostrando un efecto sinérgico frente a la aplicación individual de los herbicidas, pero en la población RM, el aumento detectado en *TA* y en *DHAD* con GP, fue menor que la suma de los efectos individuales de P y G (Figura 4.15.D), por lo que el comportamiento fue antagonista. Cabe señalar la disminución significativa observada en la expresión de *AHAIR* (Figura 4.15.B), también antagonista. Estos resultados necesitan seguir investigándose para establecer patrones claros de respuesta ante la mezcla herbicida, ya que la información sobre algunos de los enzimas de la ruta de BAR es muy escasa (Zhang *et al.*, 2015).

En conclusión, el comportamiento antagonista de la mezcla estuvo presente en la mayoría de los casos estudiados. A pesar de que se hayan descrito efectos aditivos antes (Starke & Oliver, 1998; Li *et al.*, 2002; Nelson & Renner, 2002), el efecto antagonista entre el G y los inhibidores de ALS (en la mayoría de los casos con imidazolinonas) ha sido descrito más comúnmente en estudios dosis-respuesta (Hydrick & Shaw, 1994; Lich *et al.*, 1997; Shaw & Arnold, 2002). Este comportamiento general antagonista detectado en el presente estudio, es un factor esencial a tener en cuenta a la hora de aplicar herbicidas, ya que podría limitar el uso agronómico de las mezclas y habría que poner atención en su uso ya que el riesgo de selección de poblaciones resistentes y con RM podrían aumentar considerablemente.

D) FALTA DE REGULACIÓN CRUZADA TRANSCRIPCIONAL ENTRE LA RUTA DE BAA Y LA RUTA DE BAR

El tratamiento de plantas con herbicidas inhibidores de ALS o de EPSPS (glifosato) produce una serie de efectos fisiológicos comunes, como se ha descrito en los dos apartados anteriores. Además, hay una serie de interacciones en las modificaciones generadas por ambos tipos de herbicidas, que ha llevado a algunos autores a proponer la existencia de una regulación


cruzada entre ambas rutas de BAA y BAR (Noctor *et al.*, 2002; Orcaray *et al.*, 2010; Pratelli & Pilot, 2014).

En este trabajo, el tratamiento con G en la población S no produjo apenas efectos en la expresión de los genes de la ruta de BAR (salvo el gen *TA*, Figura 4.15), pero el tratamiento con P produjo una inducción en la expresión de los genes de la vía de BAA (Figura 4.11). Al realizar el estudio en la población RM no se vieron efectos de ninguno de los dos herbicidas en la expresión génica de la otra ruta, aunque debido a los mecanismos de resistencia era de esperar que se detectara menos efecto. La falta de efectos comunes y paralelos en la expresión de los genes de las rutas BAA y BAR tras el mismo herbicida descartaría la existencia de una regulación cruzada entre las rutas de BAA y BAR, tal y como fue descrito en estudios realizados en otras poblaciones de *A. palmeri*, con G e imazamox en una población resistente a G (Fernández-Escalada *et al.*, 2017, 2019).

Se necesitarían más investigaciones para comprender las señales que regulan positivamente estas rutas después del tratamiento con G o P, ya que las evidencias que respaldan la regulación coordinada de los enzimas de la biosíntesis de aminoácidos son escasas (Foyer *et al.*, 2003).

E) DIFERENTE EFECTO DE LOS HERBICIDAS EN EL PATRÓN PROTEOLÍTICO DE LAS POBLACIONES SENSIBLES Y RESISTENTES

Aunque muy pocos estudios han analizado el papel de las proteasas en la degradación de proteínas en respuesta al tratamiento con herbicidas, su investigación es relevante en la profundización del modo de acción de los herbicidas y por poder estar implicadas en la fisiología de las poblaciones resistentes a los mismos.

La técnica ABPP permitió la señalización con sondas para los diferentes tipos de proteasas. Después del marcaje, se observaron tres señales de proteína VPEs entre 35-40 kDa (Figura 4.28.A) y se detectaron dos bandas PLCPs a 35 y 25 kDa (Figura 4.29.A). En estudios previos de marcaje con ABPP en *A. thaliana* L. (Gu *et al.*, 2010; Misas-Villamil *et al.*, 2013) y en raíces de guisante (Zulet *et al.*, 2013)



también se observaron señales de 40 kDa, correspondientes a VPEs y dos bandas de entre 30 y 40 kDa correspondientes a PLCPs.

En la población S, las bandas de proteasas VPEs (la primera línea de bandas de proteína) y de PLCPs mostraron una señal mayor después de los tratamientos con G y con GP (Figura 4.28.B y 4.29.B, respectivamente), lo que indica que la inducción de VPEs y PLCPs es un efecto común en el modo de acción de ambos herbicidas. Anteriormente, se habían detectado efectos comunes del G y de un inhibidor de ALS, imazamox, sobre el perfil proteolítico de raíces de guisante, aunque, al contrario de lo que sucede en el presente estudio, las actividades proteolíticas de las VPEs disminuyeron después del tratamiento con herbicidas (Zulet *et al.*, 2013).

Las proteasas VPEs son enzimas que han demostrado jugar un papel importante en las respuestas al estrés ambiental (biótico y abiótico) (Christoff & Margis, 2014; Vorster *et al.*, 2019), aunque el conocimiento sobre su biología (clasificación, genómica, procesamiento de proteínas, activación, desarrollo de la planta, expresión bajo estrés, etc.) ha ido aumentando, todavía es bastante limitado (Vorster *et al.*, 2019). Las PLCPs están implicadas en una gran variedad de funciones fisiológicas proteolíticas como la defensa de la planta o la senescencia (Liu *et al.*, 2018a) y también juegan un papel crucial en las interacciones planta-patógeno, ya que las plantas utilizan este tipo de CysProt para protegerse de las diferentes plagas (van der Hoorn, 2008; McLellan *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2012). A pesar de estos estudios, aún no está completamente dilucidado el papel de la respuesta fisiológica de VPEs y PLCPs frente al efecto del estrés abiótico producido por los herbicidas.

En la población RG las señales de VPEs y PLCPs fueron más intensas después de los tratamientos P y GP, y no con G aplicado solo (Figura 4.28.B para VPEs y 4.29.B para PLCPs). Por el contrario, el perfil proteolítico de la población RM no se vio modificado por ningún tratamiento (Figura 4.28.B y 4.229.B). Así, estos resultados confirmarían que el aumento de las actividades proteolíticas en la población S estaría relacionado con la toxicidad producida por los herbicidas, ya que no se detectó en las poblaciones resistentes tratadas. En el caso de la población RG, la resistencia a glifosato aliviaría específicamente el efecto de este herbicida sobre estas actividades.

Los cambios detectados en VPEs y PLCPs en respuesta a la mezcla de herbicidas fueron similares a los detectados después de los tratamientos individuales.



Estos cambios evidenciaron que esta perturbación fisiológica no se exacerbó si ambos herbicidas se aplicaban juntos, de forma similar a lo observado en otros efectos fisiológicos como el contenido de carbohidratos o en aminoácidos (secciones 4.3 y 4.4).

Un aumento en el contenido de aminoácidos y una disminución en el contenido de proteína soluble, son efectos muy conocidos de los herbicidas que inhiben la biosíntesis de aminoácidos (Anderson & Hibberd, 1985; Shaner & Reider, 1986; Gaston et al., 2002; Zabalza et al., 2006, 2011, 2013; Orcaray et al., 2010, 2012) En este estudio también se detectó un aumento en el contenido en AAT (Figura 4.19) y un aumento en el contenido de varios aminoácidos individuales (Sección 4.4) en respuesta a todos los herbicidas de las poblaciones sensibles (S a ambos herbicidas y RG a P). En general los resultados indican una relación entre un mayor contenido de aminoácidos y una mayor actividad proteolítica VPEs y PLCPs. Así, este aumento del pool total de aminoácidos podría deberse a un aumento en la tasa de renovación de proteínas, estando las proteasas involucradas en la degradación de proteínas para proporcionar a las plantas aminoácidos que no se pueden sintetizar, debido a la inhibición producida por los herbicidas. Cabe destacar la excepción de la población RM tratada con la mezcla GP, donde sin verse una activación de VPEs y PLCPs se detectó una acumulación de AA totales y diversos AA individuales.

La función de algunos aminoácidos específicos y la degradación de proteínas se ha abordado en profundidad en diferentes órganos vegetales (Fait *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2010; Riebeseel *et al.*, 2010; Kochevenko *et al.*, 2012; Krüßel *et al.*, 2014). Los estreses abióticos, como la sequía, pueden inducir la actividad de muchos tipos de CysProt (Khanna-Chopra *et al.*, 1999; Cilliers *et al.*, 2018). Bajo estos estreses ambientales, la expresión de genes CysProt está relacionada con la degradación de proteínas dañadas o innecesarias (Martínez *et al.*, 2012). En este contexto se podría encuadrar la activación de las actividades proteolíticas detectadas en este estudio, como respuesta a un estrés abiótico producido por los tratamientos con herbicidas. De hecho, se ha descrito que bajo estrés abiótico producido por infección por oomicetos, el incremento de la actividad VPEs podría ser la responsable del recambio de proteínas y de la liberación de nutrientes (Misas-Villamil *et al.*, 2013). Sin embargo, hay aspectos del catabolismo de proteínas y del papel específico de las proteasas en dicho catabolismo que siguen por establecerse.



La mayoría de las proteasas en plantas pertenecen a la clase catalítica de las serina peptidasas (Schaller et al., 2018), ya gue son la clase más grande de proteasas vegetales. Están implicadas en muchos procesos biológicos, incluyendo el metabolismo o los procesos de desintoxicación (Kaschani et al., 2012). En estudios anteriores con A. thaliana L., utilizando la sonda FP y la técnica ABPP, se identificaron actividades hasta en 45 SHs, incluyendo subtilasas, carboxipeptidasas de serina (SCPLs) y prolipéptidas (Kaschani et al., 2009). Algunas de las SHs detectadas eran conocidas, pero la mayoría no habían sido caracterizadas antes (Morimoto & van der Hoorn, 2016). En nuestro estudio el perfil ABPP de SHs no mostró ningún patrón consistente, ya que se observaron varias señales de entre 25 - 40 kDa que aumentaron o disminuyeron de forma muy heterogénea tras el tratamiento con herbicidas en cada una de las poblaciones. Estas señales podrían representar cualquiera de las proteasas de las SHs, pero se necesitan más experimentos para confirmar la identidad de estas señales. Por el contrario, en estudios anteriores llevados a cabo en plantas de quisante tratadas con G y con el inhibidor de ALS, imazamox, y realizados con sondas FP, específicas para este tipo de proteasas, se observaron tres bandas proteicas de aproximadamente 55-70 kDa, algunas de ellas inducidas tras los tratamientos con herbicidas, pero las señales también fueron bastante heterogéneas (Zulet et al., 2013).

En conclusión, se han observado efectos comunes de ambos herbicidas en las actividades proteolíticas VPEs y PLCPs (pero no en SHs), que aumentaron con G. P y GP en la población S, y con P y GP en la población RG. Los resultados revelaron que la resistencia a G (en la población RG) y a los inhibidores de ALS y EPSPS (en la población RM) aliviaron el efecto de la toxicidad producida por los herbicidas a nivel del perfil proteolítico. De manera mayoritaria, la activación de estas actividades proteolíticas está correlacionada con mayores contenidos de aminoácidos libres. Así, el aumento de estas actividades proteasas provocaría una mayor degradación de las proteínas disponibles y, en consecuencia, el aumento del contenido de aminoácidos detectado.

F) METABOLISMO DEL GLUTATION EN RESPUESTA A LOS HERBICIDAS

La inhibición de los enzimas diana de los herbicidas G y P puede resultar en efectos tóxicos secundarios, como cierto nivel de estrés oxidativo (Caverzan *et*



al., 2019), o alteraciones en los niveles de glutation. Para controlar el estrés oxidativo las plantas pueden modificar su estado redox a través de cambios en el GSH, ya que este compuesto protege a las células mediante la activación de diferentes mecanismos de defensa (Foyer et al., 1997; Szalai et al., 2009; Noctor et al., 2011). El GSH también actúa como un agente eliminador de ROS en cuyo proceso el GSH se oxida a su forma de dímero o disulfuro de glutation oxidado (GSSG). Los cambios en el estado redox de GSH dependen de la concentración total de glutation y de su grado de oxidación (Meyer & Hell, 2005) y son responsables de las funciones protectoras y reguladoras de GSH cambiando durante el crecimiento y desarrollo de las plantas en los diferentes órganos, tejidos, células y compartimentos (Katerova & Miteva, 2010). El GSH también es el sustrato de las GSTs, unas importantes enzimas que han sido relacionadas con la metabolización de ciertos herbicidas e identificadas en los mecanismos NTSR a los mismos. De las tres poblaciones analizadas, la población S presentó una importante alteración de los contenidos de metabolitos de glutation tras el tratamiento con G (Figura 4.33.A y B). Si bien hay algunas referencias contradictorias, con trabajos donde se habían descrito incrementos con G (Vivancos et al., 2011; Zulet et al., 2015; de Freitas-Silva et al., 2017; Gomes et al., 2017; Piasecki et al., 2019) y otros donde se detectaron reducciones o incluso no se llegaron a observar cambios significativos (Smith et al., 1985), son más abundantes las referencias donde se describen aumentos. Dichos aumentos sugieren que se requiere una regulación al alza de esta síntesis de GSH para que tengan lugar las posibles vías de desintoxicación del glifosato (Vivancos et al., 2011) o que es un efecto secundario sobre el estado oxidativo producido por el glifosato. Ambas posibilidades no son excluyentes, y ambas podrían explicar el incremento de los niveles de GSH tras el G. En relación al contenido enzimático GST, no se observaron efectos significativos con G en la población S (Figura 4.31), a diferencia de lo descrito en otros estudios realizados en hojas de cacahuete (Jain & Bhalla-Sarin, 2001), y en trigo, maíz y guisante (Uotila et al., 1995).

Después de la aplicación del inhibidor de ALS en la población S, no se observaron efectos significativos ni en el contenido de glutation ni en el contenido de GSSG (Figura 4.33. A y B). En plantas de *A. thaliana* L. tratadas con otro inhibidor de ALS, imazamox, sí se detectó acumulación de GSH y de sus precursores (Zulet *et al.*, 2015). Sin embargo, en esta misma población, después del tratamiento con P, se observó un aumento significativo en el contenido enzimático GST (Figura 4.31, banda superior en la Figura 4.32.A) y que no se



había descrito con anterioridad en plantas S de *A. palmeri*. Estos resultados podrían sugerir que los enzimas GST tienen una actividad elevada y están catalizando la conjugación del inhibidor de ALS con GSH.

Los resultados del metabolismo de glutation de la población S mostraron que la variación en el contenido de GSH no se correlacionó con una variación de la actividad GST después de la aplicación de G y de P. Los diferentes patrones del contenido de GSH y la actividad GST tras los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos sugieren una diferente respuesta a nivel del metabolismo del glutation según el herbicida, más centrada en una respuesta a estrés oxidativo en el caso del G y más a nivel de detoxificación del herbicida en caso de P.

En las poblaciones RG y RM únicamente se detectaron incrementos puntuales de GSSG en la población RG después del tratamiento con G (Figura 4.33.B), evidenciándose en otro parámetro fisiológico más la fisiología resistente. Bajo el tratamiento con el inhibidor de ALS, tampoco se observaron efectos en el contenido de GSH, GSSG o de glutation total, pero sí se observó un aumento significativo de la actividad GST en la población RG (Figura 4.31) y una mayor intensidad de las bandas superiores también con P aplicado individualmente (Figura 4.32.A). En la población RM, no se observaron efectos en ningún caso después del tratamiento con P. De manera análoga a la respuesta en la población S, el incremento de las GSTs en la población RG podría estar relacionado con una posible detoxificación del herbicida.

El efecto de la mezcla GP provocó solo un incremento significativo en el contenido de glutation total en las poblaciones S y RG (Figura 4.33.D) de los metabolitos de glutation analizados. La banda superior de GSTs en el gel de fluorescencia mostró mayor intensidad después del tratamiento con GP en todas las poblaciones (Figura 4.32.A), si bien no se observaron incrementos significativos en los niveles de GST detectados mediante ABPP (Figura 4.32). Esta mayor intensidad de la banda superior de GST detectada en presencia de ambos herbicidas en las tres poblaciones sugiere su implicación en la fisiología de acción de los dos herbicidas,

Los resultados parecen indicar qué debido a la situación de estrés provocada por los herbicidas, se produjo un incremento moderado de la actividad GST, solo detectado en la actividad en las poblaciones S y RG con P (Figura 4.31) y en la primera de las bandas detectadas con la técnica ABPP tras la mezcla GP



en todas las poblaciones (Figura 4.32.A). Dicho incremento no estaría correlacionado con cambios en el contenido de glutation, que solo fueron detectados en población S tratada G. De hecho, la acumulación de glutation (en todas sus formas) solo detectable en la población S parece ser una respuesta fisiológica relacionada con otros aspectos fisiológicos del glutation más allá de su relación con las GSTs.

Si la mayor actividad GST *in vitro* basal descrita en las plantas RG y RM (Figura 4.31 y apartado 5.2) estuviera implicada realmente en la fisiología resistente de las poblaciones RG y RM, la intensidad de las bandas GST por la técnica ABPP debería ser mayor. En un estudio, se observó como la resistencia *NTSR* al herbicida atrazina estaba relacionada con un aumento de 4 veces la capacidad detoxificadora de los GSTs frente a las plantas sensibles (Anderson & Gronwald, 1991). Nuestros estudios no muestran claramente una mayor activación de las GST en las poblaciones resistentes en presencia de los herbicidas, con lo que se necesitan más estudios para dilucidar o comprobar si la mayor actividad GST basal está completamente relacionada con la existencia de un mecanismo *NTSR*. Sería interesante completar el estudio de estas respuestas con ensayos que utilicen otra familia química de herbicidas inhibidores de ALS, ya que en estudios realizados con otras especies de malas hierbas como *Lolium rigidum* se observaron mayores aumentos de los niveles de proteínas GST en poblaciones resistentes a herbicidas de las fiendas SU (Torra *et al.*, 2021).

Este estudio es una primera aproximación a estos mecanismos *NTSR*, y es importante seguir analizándolos, ya que, la resistencia basada en la mejora del metabolismo también puede conferir resistencia a herbicidas que tienen distinto mecanismo de acción (Rigon *et al.*, 2020) aumentando la complejidad en la gestión de las malas hierbas.

En conclusión, en la población S los resultados obtenidos en glutation estarían relacionados con una respuesta antioxidante frente al estrés oxidativo provocado por el G y los obtenidos en la actividad GST con una posible metabolización del P. Aunque en las poblaciones RG y RM tratadas no se observaron aumentos consistentes de glutation o mayor actividad enzimática GST frente a los herbicidas a los que son resistentes, el etiquetado de las sondas en el ensayo ABPP sugiere mayor actividad sobre todo después del tratamiento combinado GP. Estos resultados no proporcionan una respuesta clara sobre la implicación de la actividad GST como mecanismo *NTSR* o como respuesta



fisiológica al estrés producido por los herbicidas. Todo ello, abre una ventana de posibilidades para seguir profundizando en el papel del glutatión y de los enzimas GST en la fisiología resistente a los herbicidas inhibidores de aminoácidos.



CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

 Se comprobó que la población RM efectivamente era resistente tanto a glifosato como al inhibidor de ALS piritiobac, en ambos casos mecanismos del tipo TSR.

La resistencia a G se detectó en todos los individuos analizados, y el mecanismo fue la amplificación génica de *EPSPS* con un número relativo de copias génicas de 58.

La resistencia a P, no fue tan generalizada al presentarla el 69 % de los individuos RM y se debió a mutaciones en la secuencia del gen *ALS*. Las mutaciones se localizaron en 5 posiciones; W574, S653, A122, A205 y G654, y se encontraron individuos con solo una mutación o con dos de ellas. La mutación W574L fue la más común observada entre los individuos con mutación simple, presente en todos los individuos con mutación doble y fue heterocigótica en todos los individuos. Además, los individuos con esta mutación (tanto simple como combinada con otra) presentaron los valores de resistencia más altos de las diferentes mutaciones encontradas.

 Como efectos adicionales indirectamente relacionados con la modificación génica de la resistencia múltiple solo se detectaron en la expresión génica de los enzimas de las rutas de BAA y BAR, y en el contenido de AAR, evidenciando efectos muy localizados en las rutas dianas de los herbicidas a los que la población es resistente.

El mecanismo *TSR* de amplificación génica de *EPSPS* detectado en la población RM, alivió la fitotoxicidad provocada por el herbicida G, atenuando los efectos observados en la población S para la mayoría de los parámetros analizados (contenido en AAT, AAA, AAR, aminoácidos amidas, acidas, otros aminoácidos, carbohidratos).

 El mecanismo de resistencia a inhibidores de ALS presente en los individuos analizados de la población RM, contribuyó a que los efectos fisiológicos de P no fuesen tan evidentes como en la población S. Sin embargo, la población RM mostró mayor respuesta fisiológica a P que a G, mostrando que el nivel de resistencia era mayor para G que para P.



CONCLUSIONES

Los datos de este estudio parecen confirmar la falta regulación transcripcional cruzada entre las rutas BAA y BAR por no haberse detectado efectos comunes y paralelos en la expresión de los genes de ambas rutas tras el mismo herbicida.

- El tratamiento de la aplicación conjunta de ambos herbicidas en las poblaciones de estudio muestra que, de manera mayoritaria, provocó el mismo efecto que el mayor de los dos tratamientos individuales o la suma de ambos. Así, en todos los casos se detectó un efecto antagonista o como mucho aditivo para los parámetros fisiológicos evaluados. Este comportamiento es un aspecto a tener en cuenta a la hora de aplicar mezclas de estos herbicidas, ya que sugiere que al aplicar la mezcla en campo las dosis recomendadas no podrían ser disminuidas. Por ello, habría que poner atención en su uso ya que el riesgo de selección de poblaciones resistentes y con RM podrían aumentar considerablemente.
- Ambos herbicidas provocaron una importante inducción de las actividades proteolíticas VPEs y PLCPs (pero no en SHs) en las plantas sensibles. La activación de las actividades proteolíticas se correlacionó con mayores contenidos de aminoácidos libres (totales e individuales), coherente con una mayor degradación de las proteínas y, aumento del contenido de aminoácidos libres detectado. La resistencia simple a G (población RG) y la resistencia múltiple (población RM) alivió este efecto de inducción de actividad proteolítica.
- En el metabolismo del glutation los herbicidas G y P provocaron efectos diferentes en la población S. El G provocó un incremento de todas las formas de glutation y no alteró la actividad GST, sugiriendo una respuesta antioxidante frente al estrés oxidativo provocado por el G. El P no afectó a los contenidos de glutation, pero provocó una mayor actividad GST, sugiriendo una posible metabolización del P.

Se detectó una mayor actividad enzimática GST potencial en las plantas sin tratar de las poblaciones RG y RM, que podría complementar su fisiología resistente como mecanismo *NTSR*. Sin embargo, en las poblaciones RG y RM tratadas no se observaron aumentos consistentes de la actividad enzimática GST frente a los herbicidas cuestionando así la relevancia fisiológica de la actividad GST en los mecanismos de resistencia. Este trabajo aporta nuevos conocimientos a nivel del metabolismo del glutation dentro del modo de



acción de los herbicidas G e inhibidores de ALS y profundiza en la fisiología resistente de una población con resistencia múltiple a ambos.

CONCLUSIONS

• The RM (multiple resistant) population was resistant to glyphosate (G) and pyrithiobac (P; ALS inhibitor) due to target site resistance mechanisms (TSR).

All individuals analyzed showed glyphosate resistance. The TSR mechanism detected was *EPSPS* gene amplification with a relative gene copy number of 58-fold.

Resistance to ALS inhibitors was more variable among individuals (69% of individuals were resistant) and it was related to point mutations at five positions in the *ALS* gene sequence: A122, A205, W574, S653, and G654, which appeared as single or double mutations. W574L was the most common mutation in cases with a single mutation, and it was present in all double mutation cases. This mutation was heterozygous in all cases detected and it conferred the highest resistance level to pyrithiobac.

 In the RM population, the only additional effects detected and that were indirectly related to the molecular changes of resistance were gene expression of BAA (aromatic amino acid biosynthesis) and BAR (aromatic amino acid biosynthesis) pathways and AAR (branched-chain amino acid) content. These effects were clearly localized in the target pathways of the herbicides to which the population is resistant.

The phytotoxicity provoked by herbicide G was alleviated in the RM population because the TSR mechanism of *EPSPS* gene amplification detected. The phytotoxic effects observed in the treated sensitive (S) population were attenuated in the case of most parameters studied: AAT, AAA, AAR, amino acids, amides, acids, and others amino acids and carbohydrate content).

• The physiological effects of P herbicide were not as evident in the RM population as in the S population due to the resistance mechanism to ALS inhibitors. However, the RM population showed a higher physiological response to P than to G response, indicating a higher resistance level to G than to P.



The results of this study seem to confirm the lack of transcriptional crossregulation between the BAA and BAR pathways, since the application of the same herbicide did no induced common and parallel effects in gene expression of both pathways.

- The application of the combination of both herbicides provoked mostly the same effect as the most toxic of the two individual treatments or the sum of the two treatments. Antagonism or addition were the general behavior detected in all parameters. This behavior is an aspect to be considered when both herbicides are applied together as the recommended field rates of both herbicides have to be fully applied. For this reason, mixtures have to be used carefully as they will increase the risk of selecting multiple resistant populations to both types of herbicides.
- Both herbicides caused a relevant induction of VPEs and PLCPs (but not in SHs) proteolytic activities in the S plants. The activation of proteolytic activities was related with higher free amino acid pools (total and individual amino acids), consistent with higher protein turnover rates and the free amino acid accumulation detected. The evaluation of a glyphosate-resistant population (RG) and RM population showed an alleviation of the proteolysis induction after the herbicides to which the population was resistant.
- G and P herbicides provoked different effects on glutathione metabolism in the S population. After G, all glutathione forms were accumulated while GSTs were not affected, suggesting an antioxidant response to the oxidative stress induced by G. P did not affect the glutathione contents but provoked a higher GST activity suggesting a possible metabolization of P.

A higher potential GST enzyme activity was detected in untreated plants in RG and RM populations, which could be involved in their resistant physiology as an NTSR mechanism. However, no consistent GST activity induction was detected in treated plants in the RG and RM populations, questioning the physiological relevance of GST activity as an additional resistance mechanism. This work provides new insights about the role of glutathione metabolism in the mode of action of G and ALS inhibitors, and fulfills the resistant physiology of a population with multiple resistant populations to both herbicides.





BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- ABELL LM (1996). Biochemical approaches to herbicide discovery: advances in enzyme target identification and inhibitor design. Weed Science **44**, 734–742.
- ADU-YEBOAH P, MALONE JM, FLEET B, GILL G & PRESTON C (2020). *EPSPS* gene amplification confers resistance to glyphosate resistant populations of *Hordeum glaucum* Stued (northern barley grass) in South Australia. Pest Management Science **76**, 1214–1221.
- AHSAN N, LEE D-G, LEE K-W *et al.* (2008). Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. Plant Physiology and Biochemistry **46**, 1062–1070.
- ALCÁNTARA-DE LA CRUZ R, ROJANO-DELGADO AM, GIMÉNEZ MJ *et al.* (2016). First resistance mechanisms characterization in glyphosate-resistant *Leptochloa virgata*. Frontiers in Plant Science **7**, 1742.
- ALEXANDRATOS N & BRUINSMA J (2012). World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper No^o 12-03. Rome, FAO.
- ALLEGRINI M, ZABALOY MC & GÓMEZ E del V. (2015). Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. Science of the Total Environment **533**, 60–68.
- AMRHEIN N, DEUS B, GEHRKE P & STEINRUCKEN HC (1980). The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. Plant Physiology **66**, 830–834.
- AMRI E & MAMBOYA F (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. American Journal of Biochemistry and Biotechnology **8**, 99–104.
- ANDERSON J V. & DAVIS DG (2004). Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. Physiologia Plantarum **120**, 421–433.
- ANDERSON MP & GRONWALD JW (1991). Atrazine resistance in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. Plant Physiology **96**, 104–109.



- ANDERSON PC & HIBBERD KA (1985). Evidence for the interaction of an imidazolinone herbicide with leucine, valine, and isoleucine metabolism. Weed Science **33**, 479–483.
- ANGELOVICI R, FAIT A, ZHU X *et al.* (2009). Deciphering transcriptional and metabolic networks associated with lysine metabolism during *Arabidopsis* seed development. Plant Physiology **151**, 2058–2072.
- ANNETT R, HABIBI HR & HONTELA A (2014). Impact of glyphosate and glyphosatebased herbicides on the freshwater environment. Journal of Applied Toxicology **34**, 458–479.
- ARAÚJO WL, ТОНGE T, ISHIZAKI K, LEAVER CJ & FERNIE AR (2011). Protein degradation an alternative respiratory substrate for stressed plants. Trends in Plant Science **16**, 489–498.
- ARLT K, BRANDT S & KEHR J (2001). Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. Journal of Chromatography **926**, 319–325.
- ARMENDÁRIZ O, GIL-MONREAL M, ZULET A, ZABALZA A & ROYUELA M (2016). Both foliar and residual applications of herbicides that inhibit amino acid biosynthesis induce alternative respiration and aerobic fermentation in pea roots. Plant Biology **18**, 382–390.
- BAERSON SR, RODRIGUEZ DJ, TRAN M, FENG Y, BIEST N a & DILL GM (2002). Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Plant Physiology 129, 1265–1275.
- BAI S, ZHANG F, LI Z et al. (2019). Target-site and non-target-site-based resistance to tribenuron-methyl in multiply-resistant *Myosoton aquaticum* L. Pesticide Biochemistry and Physiology **155**, 8–14.
- BAKER HG (1974). The Evolution of Weeds. Annual Review of Ecology and Systematics **5**, 1–24.
- BARFOOT GB and P (2008). Global impact of biotech crops: socio-economic and environmental effects, 1996-2006. AgBioforum **11**, 21-38.
- BARRETT KA & MCBRIDE MB (2005). Oxidative degradation of glyphosate and aminomethylphosphonate by manganese oxide. Environmental Science and Technology **39**, 9223–9228.



- BARRETT M (1993). Interactions of herbicides and other agrochemicals in plants: interactions in mixtures with other herbicides and with safeners, fungicides, insecticides and nematicides. In: Pesticide Interactions in Crop Production: Beneficial and Deleterious Effects (ed J. Altman), 113–132. Boca Raton, Florida (EE.UU.).
- BARRY GF, LOUIS S, KISHORE GM *et al.* (1997). US5627061A Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases, US5627061A.
- BARUCH A, JEFFERY DA & BOGYO M (2004). Enzyme activity it's all about image. Trends in Cell Biology **14**, 29–35.
- BECERRIL JM, DUKE SO & LYDON J (1989). Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. Phytochemistry **28**, 695–699.
- BECKIE HJ (2006). Herbicide-resistant weeds: management tactics and practices. Weed Technology **20**, 793–814.
- BEKKAOUI F, SCHORR P & CROSBY WL (1993). Acetolactate synthase from *Brassica napus*: immunological characterization and quaternary structure of the native enzyme. Physiologia Plantarum **88**, 475–484.
- BENBROOK CM (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. Environmental Sciences Europe **28**, 1–15.
- BENDER J & FINK GR (1998). A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences **95**, 5655–5660.
- BENESOVA M & BODE R (1992). Chorismate mutase isoforms from seeds and seedlings of *Papaver somniferum*. Phytochemistry **31**, 2983–2987.
- BENSCH CN, HORAK MJ & PETERSON D (2003). Interference of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*), Palmer amaranth (*A. palmeri*), and common waterhemp (*A. rudis*) in soybean. Weed Science **51**, 37–43.
- BERGER S, MADEIRA PT, FERRELL J *et al.* (2016). Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) identification and documentation of ALS-resistance in Argentina. Weed Science **64**, 312–320.
- BERNARD SM & HABASH DZ (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. New Phytologist **182**, 608–620.



- BERNASCONI P, WOODWORTH AR, ROSEN BA, SUBRAMANIAN M V. & SIEHL DL (1995). A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. Journal of Biological Chemistry **270**, 17381–17385.
- BESTMAN HD, DEVINE MD & VANDENBORN WH (1990). Herbicide chlorsulfuron decreases assimilate transport out of treated leaves of field pennycress (*Thlaspi Arvense* L) seedlings. Plant Physiology **93**, 1441–1448.
- BINDER S (2010). Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. The Arabidopsis Book **8**, e0137.
- BINDER S, KNILL T & SCHUSTER J (2007). Branched-chain amino acid metabolism in higher plants. Physiologia Plantarum **129**, 68–78.
- BOHLMANN J, LINS T, MARTIN W & EILERT U (1996). Anthranilate synthase from *Ruta graveolens*. Duplicated AS alpha genes encode tryptophan-sensitive and tryptophan-insensitive isoenzymes specific to amino acid and alkaloid biosynthesis. Plant Physiology **111**, 507–14.
- BOOTH BD, MURPHY SD & SWANTON CJ (2003). Weed ecology in natural and agricultural systems. Experimental Agriculture, **40**, 272-273.
- BOSE B & HEMANTARANJAN A (2005). Developments in physical, biological and molecular biology of plants. New India Publishing agency, 105.
- BOSTAMAM Y, MALONE JM, DOLMAN FC, BOUTSALIS P & PRESTON C (2012). Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations containing a target site mutation in *EPSPS* and reduced glyphosate translocation are more resistant to glyphosate. Weed Science **60**, 474–479.
- BRADFORD M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72**, 248–254.
- BRAVO W, LEON RG, FERRELL JA, MULVANEY MJ & WESLEY WOOD C (2017). Differentiation of life-history traits among Palmer amaranth populations (*Amaranthus palmeri*) and its relation to cropping systems and glyphosate sensitivity. Weed Science **65**, 339–349.
- BROOKES G & BARFOOT P (2018). Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2016: impacts on pesticide use and carbon emissions. GM Crops & Food **9**, 109–139.



- BROSNAN JT & BROSNAN ME (2006). Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. The Journal of Nutrition **136**, 207-211.
- BROSNAN JT, VARGAS JJ, BREEDEN GK *et al.* (2016). A new amino acid substitution (Ala-205-Phe) in acetolactate synthase (*ALS*) confers broad spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides. Planta **243**, 149–159.
- BROSTER JC & PRATLEY JE (2006). A decade of monitoring herbicide resistance in *Lolium rigidum* in Australia. Australian Journal of Experimental Agriculture **46**, 1151–1160.
- BRUNK DG & RHODES D (1988). Amino acid metabolism of *Lemna minor* L.: III. Responses to aminooxyacetate. Plant Physiology **87**, 447–453.
- BUCHANAN BB, GRUISSEM W & JONES R (2015). Biochemistry and molecular biology of plants (ed John Wiley & Sons). American Society of Plant Physiologists. 1158-1203. Rockville, Maryland (EE.UU.).
- BUFFAGNI V, VURRO F, JANNI M, GULLÌ M, KELLER AA & MARMIROLI N (2020). Shaping durum wheat for the future: gene expression analyses and metabolites profiling support the contribution of BCAT genes to drought stress response. Frontiers in Plant Science **11**, 1–16.
- BURKE IC, SCHROEDER M, THOMAS WE & WILCUT JW (2007). Palmer amaranth interference and seed production in peanut. Weed Technology **21**, 367–371.
- CAMPE R, HOLLENBACH E, KÄMMERER L *et al.* (2018). A new herbicidal site of action: cinmethylin binds to acyl-ACP thioesterase and inhibits plant fatty acid biosynthesis. Pesticide Biochemistry and Physiology **148**, 116–125.
- CARPENTER JE & GIANNESSI LP (2010). Economic Impact of Glyphosate-Resistant Weeds. In: Glyphosate Resistance in Crops and Weeds. History, Development and Management (ed V.K. Nandula). 297-312. Hoboken, New Jersey (EE.UU.).
- CARRETERO J. (1990). Amaranthus. In: Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol II: [*Platanaceae-Plumbaginaceae (patim)*] (ed Castroviejo S. *et al.*) 559–569. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid.
- CAVERZAN A, PIASECKI C, CHAVARRIA G, STEWART C & VARGAS L (2019). Defenses against ROS in crops and weeds: the effects of interference and herbicides. International Journal of Molecular Sciences **20**, 1086.



- CHAHAL PS, VARANASI VK, JUGULAM M & JHALA AJ (2017). Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in Nebraska: confirmation, *EPSPS* gene amplification, and response to POST corn and soybean herbicides. Weed Technology **31**, 80–93.
- CHANDI A, MILLA-LEWIS SR, GIACOMINI D *et al.* (2012). Inheritance of evolved glyphosate resistance in a North Carolina Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) biotype. International Journal of Agronomy **2012**, 1–7.
- CHANDI A, JORDAN DL, MILLA-LEWIS SR, *et al.* (2013). Interference and control of glyphosate-resistant and susceptible Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) populations under greenhouse conditions. Weed Science **61**, 259–266.
- CHATHAM LA, WU C, RIGGINS CW *et al.* (2015). *EPSPS* gene amplification is present in the majority of glyphosate-resistant Illinois waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. Weed Technology **29**, 48–55.
- CHEN H, SAKSA K, ZHAO F, QIU J & XIONG L (2010). Genetic analysis of pathway regulation for enhancing branched-chain amino acid biosynthesis in plants. Plant Journal **63**, 573–583.
- CHEN J, CHU Z, HAN H *et al.* (2020). A Val-202-Phe α-tubulin mutation and enhanced metabolism confer dinitroaniline resistance in a single *Lolium rigidum* population. Pest Management Science **76**, 645–652.
- CHEN J, HUANG H, ZHANG C *et al.* (2015). Mutations and amplification of *EPSPS* gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). Planta **242**, 859–868.
- CHEN J, JIANG C, HUANG H *et al.* (2017). Characterization of *Eleusine indica* with gene mutation or amplification in *EPSPS* to glyphosate. Pesticide Biochemistry and Physiology **143**, 201–206.
- CHIPMAN DM, DUGGLEBY RG & TITTMANN K (2005). Mechanisms of acetohydroxyacid synthases. Current Opinion in Chemical Biology **9**, 475–481.
- CHRISTOFF AP & MARGIS R (2014). The diversity of rice phytocystatins. Molecular Genetics and Genomics **3**, 1321–1330.
- CILLIERS M, WYK SG VAN, HEERDEN PDR VAN, KUNERT KJ & VORSTER BJ (2018). Identification and changes of the drought-induced cysteine protease transcriptome in soybean (*Glycine max*) root nodules. Environmental and



Experimental Botany 148, 59–69.

- COLLAVO A, STREK H, BEFFA R & SATTIN M (2013). Management of an ACCaseinhibitor-resistant *Lolium rigidum* population based on the use of ALS inhibitors: Weed population evolution observed over a 7 year field-scale investigation. Pest Management Science **69**, 200-208.
- COOLEY WE & FOY CL (1992). Effects of Sc-0224 and glyphosate on free aminoacids, soluble-protein, and protein-synthesis in inflated duckweed (*Lemna gibba*). Weed Science **40**, 345–350.
- CORUZZI G & LAST R (2000). Amino Acids. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants (eds B. Buchanan, W. Gruissem & R. Jones). American Society of Plant Biologists, 358-410. Rockville, Maryland (EE.UU.).
- COUSENS & MORTIMER (1995). Dynamics of weed populations. Experimental Agriculture **33**, 113-119.
- CRAVATT BF, WRIGHT AT & KOZARICH JW (2008). Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. Annual Review of Biochemistry **77**, 383-414.
- CRESPO RJ, WINGEYER AB, KRUGER GR, RIGGINS CW, TRANEL PJ & BERNARDS ML (2017). Multiple-herbicide resistance in a 2,4-D-resistant waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population from Nebraska. Weed Science **65**, 743–754.
- CROMARTIE TH & POLGE ND (2000). An improved assay for shikimic acid and its use as monitor for the activity of sulfosate. Weed Science Society of America Proceedings **40**, 291.
- CULPEPPER AS, GREY TL, VENCILL WK *et al.* (2006). Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. Weed Science **54**, 620–626.
- CUMMINS I, WORTLEY DJ, SABBADIN F *et al.* (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**, 5812–5817.
- CURIEN G, BIOU V, MAS-DROUX C, ROBERT-GENTHON M, FERRER J-L & DUMAS R (2008). Amino acid biosynthesis: new architectures in allosteric enzymes. Plant Physiology and Biochemistry **46**, 325–339.



- DAVIS AS, SCHUTTE BJ, HAGER AG & YOUNG BG (2015). Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) damage niche in Illinois soybean is seed limited. Weed Science **63**, 658–668.
- DAYAN FE (2019). Current status and future prospects in herbicide discovery. Plants **8**, 341.
- DAYAN FE & DUKE SO (2020). Discovery for new herbicide sites of action by quantification of plant primary metabolite and enzyme pools. Engineering **6**, 509–514.
- DAYAN FE, DUKE SO & GROSSMANN K (2010). Herbicides as probes in plant biology. Weed Science **58**, 340–350.
- DÉLYE C & BOUCANSAUD K (2008). A molecular assay for the proactive detection of target site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. Weed Research **48**, 97–101.
- DÉLYE C, PERNIN F & SCARABEL L (2011). Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). Plant Science **180**, 333–342.
- DÉLYE C (2012). Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. Pest Management Science **69**, 176–187.
- DÉLYE C, JASIENIUK M & CORRE V LE (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. Trends in Genetics **29**, 649–658.
- DÉLYE C, DUHOUX A, PERNIN F, RIGGINS CW & TRANEL PJ (2015). Molecular mechanisms of herbicide resistance. Weed Science **63**, 91–115.
- DEVINE M (1989). Phloem translocation of herbicides. Reviews of Weed Science **4**, 191–213.
- DEVINE M, DUKE S & FEDTKE C (1993). Inhibition of amino acid biosynthesis. In: Physiology of Herbicide Action (eds Prentice Hall, Inc.). 252–263. Englewood Cliffs, New Jersey (EE.UU.).
- DIEBOLD R, SCHUSTER J, DASCHNER K & BINDER S (2002). The branched-chain amino acid transaminase gene family in arabidopsis encodes plastid and mitochondrial proteins. Plant Physiology **129**, 540–550.
- DILL GM (2005). Glyphosate-resistant crops: History, status and future. Pest Management Science **61**, 219–224.



- DILLON A, VARANASI VK, DANILOVA T V *et al.* (2017). Physical mapping of amplified copies of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene in glyphosate-resistant *Amaranthus tuberculatus*. Plant Physiology **173**, 1226–1234.
- DINAKAR C, RAGHAVENDRA AS & PADMASREE K (2010). Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: role of pyruvate and malate in activating AOX. Physiologia Plantarum **139**, 13–26.
- DIXON DP, LAPTHORN A & EDWARDS R (2002). Plant glutathione transferases. Genome Biology **3**.
- DIXON DP, SKIPSEY M & EDWARDS R (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. Phytochemistry **71**, 338-350.
- DOLUI AK, VIJAYAKUMAR AK, RAJASEKHARAN R & VIJAYARAJ P (2020). Activity-based protein profiling of rice (*Oryza sativa* L.) bran serine hydrolases. Scientific Reports **10**, 15191.
- DOMINGUEZ-VALENZUELA JA, GHEREKHLOO J, FERNÁNDEZ-MORENO PT *et al.* (2017). First confirmation and characterization of target and non-target site resistance to glyphosate in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) from Mexico. Plant Physiology and Biochemistry **115**, 212-218.
- DUGGLEBY RG, MCCOURT JA & GUDDAT LW (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. Plant Physiology and Biochemistry **46**, 309-324.
- DUGGLEBY RG & PANG SS (2000). Acetohydroxyacid synthase. Journal of Biochemistry and Molecular Biology **33**, 1–36.
- DUHOUX A, CARRÈRE S, GOUZY J, BONIN L & DÉLYE C (2015). RNA-Seq analysis of rye-grass transcriptomic response to an herbicide inhibiting acetolactatesynthase identifies transcripts linked to non-target-site-based resistance. Plant Molecular Biology **87**, 473–487.
- DUKE SO (2011). Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and susceptible crops and weeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**, 5835–41.
- DUKE SO (2018). The history and current status of glyphosate. Pest Management Science **74**, 1027–1034.



- DUKE SO (2019). Enhanced metabolic degradation: the last evolved glyphosate resistance mechanism of weeds? Plant Physiology **181**, 1401–1403.
- DUKE SO & DAYAN FE (2011). Modes of action of microbially-produced phytotoxins. Toxins **3**, 1038–1064.
- DUKE SO & POWLES SB (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science **64**, 319–325.
- DUMAS R, CORNILLONBERTRAND C, GUIGUETALET P, GENIX P, DOUCE R & JOB D (1994). Interactions of plant acetohydroxy acid isomeroreductase with reaction intermediate analogs correlation of the slow, competitive, inhibition kinetics of enzyme activity and herbicidal effects. Biochemical Journal **301**, 813–820.
- DUNN B (2001). Determination of protease mechanism. In: Proteolytic Enzymes: A Practical Approach. (ed RJ. Beynon & JS. Bond). 77–104. Oxford (U.K.).
- DURNER J & BÖGER P (1988). Acetolactate synthase from barley (*Hordeum vulgare* L) purification and partial characterization. Zeitschrift Fur Naturforschung **43**, 850–856.
- DURNER J, KNORZER OC & BOGER P (1993). Ketol-acid reductoisomerase from barley (*Hordeum Vulgare*). Purification, properties, and specific inhibition. Plant Physiology **103**, 903–910.
- DYER WE (2018). Stress-induced evolution of herbicide resistance and related pleiotropic effects. Pest Management Science **74**, 1759–1768.
- EBERHARD J, EHRLER TT, EPPLE P, FELIX G & RAESECKE HR (1996). Cytosolic and plastidic chorismate mutase isoenzymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties. Plant Journal **10**, 815–821.
- EBERLEIN C V, GUTTIERI MJ, MALLORY-SMITH CA, THILL DC & BAERG RJ (1997). Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). Weed Science **45**, 212–217.
- EDWARDS R & HANNAH M (2014). Focus on weed control. Plant Physiology **166**, 1087–1089.
- ENDO M, SHIMIZU T, FUJIMORI T, YANAGISAWA S & TOKI S (2013). Herbicide resistant mutations in acetolactate synthase can reduce feedback inhibition and lead to accumulation of branched-chain amino acids. Food and Nutrition



Sciences **04**, 522–528.

- EVANS MJ & CRAVATT BF (2006). Mechanism-based profiling of enzyme families. Chemical Reviews **106**, 3279-3301.
- FAIT A, FROMM H, WALTER D, GALILI G & FERNIE AR (2008). Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. Trends in Plant Science **13**, 14–19.
- FANOURAKIS D, NIKOLOUDAKIS N, PAPPI P *et al.* (2020). The role of proteases in determining stomatal development and tuning pore aperture: a Review Plants **9**, 340.
- FENG PCC, RUFF TG & KOSINSKI WG (1995). Metabolic deactivation of the herbicide thiazopyr by animal liver esterases. Xenobiotica **25**, 27–35.
- FERGUSON GM, HAMILL AS & TARDIF FJ (2001). ALS inhibitor resistance in populations of Powell amaranth and redroot pigweed. Weed Science **49**, 448–453.
- FERNÁNDEZ-ESCALADA M, GIL-MONREAL M, ZABALZA A & ROYUELA M (2016). Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological response to glyphosate in susceptible and resistant populations. Journal of Agricultural and Food Chemistry **64**, 95–106.
- FERNÁNDEZ-ESCALADA M, ZULET-GONZÁLEZ A, GIL-MONREAL M *et al.* (2017). Effects of *EPSPS* copy number variation (CNV) and glyphosate application on the aromatic and branched chain amino acid synthesis pathways in *Amaranthus palmeri*. Frontiers in Plant Science **8**, 1970.
- FERNÁNDEZ-ESCALADA M, ZULET-GONZÁLEZ A, GIL-MONREAL M, ROYUELA M & ZABALZA A (2019). Physiological performance of glyphosate and imazamox mixtures on *Amaranthus palmeri* sensitive and resistant to glyphosate. Scientific Reports **9**, 18225.
- FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C, QUADRANTI M, KUDSK P & BÀRBERI P (2008). Which future for weed science? Weed Research **48**, 297–301.
- FISCHER AJ, ATEH CM, BAYER DE & HILL JE (2000). Herbicide-resistant *Echinochloa* oryzoides and *E. phyllopogon* in California Oryza sativa fields. Weed Science **48**, 225–230.
- FITZPATRICK PF (2003). Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. Biochemistry **42**, 14083–14091.



- FOES MJ, LIU L, TRANEL PJ, WAX LM & STOLLER EW (1998). A biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistant to triazine and ALS herbicides. Weed Science **46**, 514–520.
- FOYER CH, LOPEZ-DELGADO H, DAT JF & SCOTT IM (1997). Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. Physiologia Plantarum **100**, 241–254.
- FOYER CH, PARRY M & NOCTOR G (2003). Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. Journal of Experimental Botany **54**, 585–593.
- FRANK RAW, TITMAN CM, PRATAP JV, LUISI BF & PERHAM RN (2004). A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. Science **306**, 872–876.
- FRANZ J, MAO M & SIRKORSKI J (1997). Glyphosate: a unique global herbicide. American Chemical Society Monograph **189**.
- FREITAS-SILVA L DE, RODRÍGUEZ-RUIZ M, HOUMANI H, SILVA LC DA, PALMA JM & CORPAS FJ (2017). Glyphosate-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* affecting peroxisomal metabolism and triggers activity in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (OxPPP) involved in NADPH generation. Journal of Plant Physiology **218**, 196–205.
- FROVA C (2006). Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. Biomolecular Engineering **23**, 149-169.
- FUNKE T, HAN H, HEALY-FRIED ML, FISCHER M & SCHONBRUNN E (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. Proceedings of the National Academy of Sciences **103**, 13010–13015.
- GAINES TA, ZHANG W, WANG D *et al.* (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. Proceedings of the National Academy of Sciences **107**, 1029–1034.
- GAINES TA, SHANER DL, WARD SM, LEACH JE, PRESTON C & WESTRA P (2011). Mechanism of resistance of evolved glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**, 5886–9.
- GAINES TA, WRIGHT AA, MOLIN WT *et al.* (2013). Identification of genetic elements associated with *EPSPs* gene amplification. PLoS One **8**, e65819.



- GAINES TA, PATTERSON EL & NEVE P (2019). Molecular mechanisms of adaptive evolution revealed by global selection for glyphosate resistance. New Phytologist **223**, 1770–1775.
- GAINES TA, DUKE SO, MORRAN S *et al.* (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. Journal of Biological Chemistry **295**, 10307–10330.
- GALILI G, AMIR R & FERNIE AR (2016). The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. Annual Review of Plant Biology **67**, 153–178.
- GARCIA EL & MOURAD GS (2004). A site-directed mutagenesis interrogation of the carboxy-terminal end of *Arabidopsis thaliana* threonine dehydratase/deaminase reveals a synergistic interaction between two effector-binding sites and contributes to the development of a novel selectable marker. Plant Molecular Biology **55**, 121–134.
- GARCIA MD, NOUWENS A, LONHIENNE TG & GUDDAT LW (2017). Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **114**, E1091–E1100.
- GARCÍA MJ, PALMA-BAUTISTA C, ROJANO-DELGADO AM *et al.* (2019). The triple amino acid substitution TAP-IVS in the *EPSPS* gene confers high glyphosate resistance to the superweed *Amaranthus hybridus*. International Journal of Molecular Sciences **20**, 2396.
- GARCÍA MJ, PALMA-BAUTISTA C, VAZQUEZ-GARCIA JG *et al.* (2020). Multiple mutations in the *EPSPS* and *ALS* genes of *Amaranthus hybridus* underlie resistance to glyphosate and ALS inhibitors. Scientific Reports **10**, 17681.
- GARDIN JAC, GOUZY J, CARRÈRE S & DÉLYE C (2015). ALOMYbase, a resource to investigate non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in the major grass weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). BMC Genomics **16**, 590.
- GARG B, VAID N & TUTEJA N (2014). In-silico analysis and expression profiling implicate diverse role of *EPSPS* family genes in regulating developmental and metabolic processes. BMC Research Notes **7**, 58.
- GASTON S, RIBAS-CARBO M, BUSQUETS S, BERRY JA, ZABALZA A & ROYUELA M (2003). Changes in mitochondrial electron partitioning in response to herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis in soybean. Plant Physiology **133**, 1351–1359.



- GASTON S, ZABALZA A, GONZALEZ EM, ARRESE-IGOR C, APARICIO-TEJO PM & ROYUELA M (2002). Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. Physiologia Plantarum **114**, 524–532.
- GE X, ANDRE'D'AVIGNON D, ACKERMAN JJH, OSTRANDER E & SAMMONS RD (2013). Application of ³¹P-NMR spectroscopy to glyphosate studies in plants: insights into cellular uptake and vacuole sequestration correlated to herbicide resistance. In: Handbook on Herbicides: Biological Activity, Classification and Health and Environmental Implications (eds Nova Science Publishers, Inc.). 55-83.
- GE X, ANDRÉ D'AVIGNON D, ACKERMAN JJH & DOUGLAS SAMMONS R (2010). Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. Pest Management Science **66**, 345–348.
- GE X, D'AVIGNON DA, ACKERMAN JJH *et al.* (2012). Vacuolar glyphosatesequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: A 31P NMR Investigation. Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**, 1243–1250.
- GERSHATER MC, CUMMINS I & EDWARDS R (2007). Role of a carboxylesterase in herbicide bioactivation in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry **282**, 21460–21466.
- GERWICK BC (2010). Thirty years of herbicide discovery surveying the past and contemplating the future. Agrow (ed Silver Jubilee): VII–IX.
- GERWICK BC, SUBRAMANIAN M V, LONEYGALLANT VI & CHANDLER DP (1990). Mechanism of action of the 1,2,4-triazolo[1,5-a] pyrimidines. Pesticide Science **29**, 357–364.
- GHERSA CM & HOLT JS (1995). Using phenology prediction in weed management: a review. Weed Research **35**, 461–470.
- GIACOMINI D, WESTRA P & WARD SM (2014). Impact of genetic background in fitness cost studies: an example from glyphosate-resistant Palmer Amaranth. Weed Science **62**, 29–37.
- GIANESSI LP (2008). Economic impacts of glyphosate-resistant crops. Pest Management Science **64**, 346–352.
- GIESY JP, DOBSON S & SOLOMON KR (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. Reviews of Environmental Contamination and



Toxicology **167**, 35–120.

- GIGOLASHVILI T, BERGER B, MOCK HP, MÜLLER C, WEISSHAAR B & FLÜGGE UI (2007). The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal **50**, 886–901.
- GIMSING AL, BORGGAARD OK, JACOBSEN OS, AAMAND J & SØRENSEN J (2004). Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils. Applied Soil Ecology **27**, 233–242.
- GOMES MP, BICALHO EM, SMEDBOL É, CRUZ FV da S, LUCOTTE M & GARCIA QS (2017). Glyphosate can decrease germination of glyphosate-resistant soybeans. Journal of Agricultural and Food Chemistry **65**, 2279–2286.
- GOMES MP & JUNEAU P (2016). Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? Environmental Pollution **218**, 402–409.
- GOMES MP, SMEDBOL E, CHALIFOUR A *et al.* (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by product aminomethylphosphonic acid: an overview. Journal of Experimental Botany **65**, 4691–4703.
- GRAZIANA A & BOUDET AM (1980). 3-Deoxy-D-arabino heptulosonate 7phosphate synthase from *Zea mays*: general properties and regulation by tryptophan. Plant and Cell Physiology **21**, 793–802.
- GREEN JM (2018). The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. Pest Management Science **74**, 1035–1039.
- GRUDKOWSKA M & ZAGDAŃSKA B (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. Acta Biochimica Polonica **51**, 609–624.
- GRUIS D, SCHULZE J & JUNG R (2004). Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. Plant Cell **16**, 270–290.
- GRUIS D, SELINGER DA, CURRAN JM & JUNG R (2002). Redundant proteolytic mechanisms process seed storage proteins in the absence of seed-type members of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. Plant Cell **14**, 2863–2882.
- GRUYS K & SIKORSKI J (1999). Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology (ed BK. Singh). 357–384. Boca Raton, Florida (EE.UU.).



- GU C, KOLODZIEJEK I, MISAS-VILLAMIL J *et al.* (2010). Proteasome activity profiling: a simple, robust and versatile method revealing subunit-selective inhibitors and cytoplasmic, defense-induced proteasome activities. The Plant Journal **62**, 160–70.
- GUERRA N, OLIVEIRA RS, CONSTANTIN J, OLIVEIRA NETO AM, SANTOS G & JUMES TMC (2011). Persistência de trifloxysulfuron-sodium e pyrithiobac-sodium em diferentes tipos de solo. Planta Daninha **29**, 673–681.
- GUO P & AL-KHATIB K (2003). Temperature effects on germination and growth of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*), Palmer amaranth (*A. palmeri*), and common waterhemp (*A. rudis*). Weed Science **51**, 869–875.
- GUTTIERI MJ, EBERLEIN C V, MALLORYSMITH CA, THILL DC & HOFFMAN DL (1992). Dna sequence variation in domain a of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and herbicide-susceptible weed biotypes. Weed Science **40**, 670–676.
- GUYER D, PATTON D & WARD E (1995). Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences **92**, 4997–5000.
- HADERLIE LC, WIDHOLM JM & SLIFE FW (1977). Effect of glyphosate on carrot and tobacco cells. Plant Physiology **60**, 40–43.
- HALGAND F, WESSEL PM, LAPRÉVOTE O & DUMAS R (2002). Biochemical and mass spectrometric evidence for quaternary structure modifications of plant threonine deaminase induced by isoleucine. Biochemistry **41**, 13767–13773.
- HARA-NISHIMURA I & HATSUGAI N (2011). The role of vacuole in plant cell death. Cell Death & Differentiation **18**, 1298–1304.
- HARA-NISHIMURA I, KINOSHITA T, HIRAIWA N & NISHIMURA M (1998). Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. Journal of Plant Physiology **152**, 668–674.
- HARKER KN & O'DONOVAN JT (2013). Recent weed control, weed management, and integrated weed management. Weed Technology **27**, 1–11.
- HARRIS RA, JOSHI M, JEOUNG NH & OBAYASHI M (2005). Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. The Journal of Nutrition **135**, 1527S-1530S.



- HATSUGAI N, KUROYANAGI M, NISHIMURA M & HARA-NISHIMURA I (2006). A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. Apoptosis **11**, 905–911.
- HATSUGAI N, YAMADA K, GOTO-YAMADA S & HARA-NISHIMURA I (2015). Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. Frontiers in Plant Science **6**, 234.
- HATTON P., DIXON D, COLE DJ & EDWARDS R (1996). Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species. Pesticide Science **46**, 267-275.
- HAWKINS CF, BORGES A & PERHAM RN (1989). A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. FEBS Letters **255**, 77–82.
- HEALY-FRIED ML, FUNKE T, PRIESTMAN MA, HAN H & SCHÖNBRUNN E (2007). Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Journal of Biological Chemistry **282**, 32949–32955.
- HEAP I & DUKE SO (2018). Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. Pest Management Science **74**, 1040–1049.
- HEAP I & KNIGHT R (1986). The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofop-methyl. Australian Journal of Agricultural Research **37**, 149–156.
- HEDSTROM L (2002). Serine protease mechanism and specificity. Chemical Reviews **102**, 4501–4523.
- HERNANDEZ A, GARCIA-PLAZAOLA JI & BECERRIL JM (1999). Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**, 2920–2925.
- HERRMANN KM (1995). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. The Plant Cell **7**, 907–919.
- HERRMANN KM & WEAVER LM (1999). The shikimate pathway. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**, 473–503.
- HEY SJ, BYRNE E & HALFORD NG (2010). The interface between metabolic and stress signalling. Annals of Botany **105**, 197–203.
- HILDEBRANDT TM, NUNES NESI A, ARAÚJO WL & BRAUN H-P (2015). Amino acid catabolism in plants. Molecular Plant **8**, 1563–1579.



- HIRASE K & HOAGLAND RE (2006). Characterization of aryl acylamidase activity from propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* [L.] Beauv.). Weed Biology and Management **6**, 197–203.
- HOAGLAND DR & ARNON DI (1950). The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular **347**, 1–32.
- HORAK MJ & PETERSON DE (1995). Biotypes of Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) and Common Waterhemp (*Amaranthus rudis*) are resistant to imazethapyr and thifensulfuron. Weed Technology **9**, 192–195.
- HORN CR VAN, MORETTI ML, ROBERTSON RR *et al.* (2018). Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 1. Novel rapid cell death response to glyphosate. Pest Management Science **74**, 1071–1078.
- HUANG Z, CHEN J, ZHANG C *et al.* (2016). Target-site basis for resistance to imazethapyr in redroot amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology **128**, 10–15.
- HUISMAN OC & KOSUGE T (1974). Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in higher plants. II. 3 Deoxy arabino heptulosonic acid 7 phosphate synthetase from cauliflower. Journal of Biological Chemistry **249**, 6842– 6848.
- HUNGRIA M, MENDES IC, NAKATANI AS *et al.* (2014). Effects of the glyphosateresistance gene and herbicides on soybean: field trials monitoring biological nitrogen fixation and yield. Field Crops Research **158**, 43–54.
- HYDRICK D & SHAW D (1994). Effects of tank-mix combinations of non-selective foliar and selective soil applied herbicides on three weed species. Weed Technology **8**, 129–133.
- IWAKAMI S, ENDO M, SAIKA H *et al.* (2014). Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. Plant Physiology **165**, 618–629.
- IWAKAMI S, KAMIDATE Y, YAMAGUCHI T *et al.* (2019). CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. New Phytologist **221**, 2112–2122.


- IWAKAMI S, SHIMONO Y, MANABE Y et al. (2017). Copy number variation in acetolactate synthase genes of thifensulfuron-methyl resistant *Alopecurus* aequalis (shortawn foxtail) accessions in Japan. Frontiers in Plant Science 8, 254.
- JAIN M & BHALLA-SARIN N (2001). Glyphosate-induced increase in glutathione Stransferase activity and glutathione content in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology **69**, 143–152.
- JASIENIUK M, AHMAD R, SHERWOOD AM *et al.* (2008). Glyphosate-resistant italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. Weed Science **56**, 496–502.
- JENSEN RA (1986). The shikimate arogenate pathway. Link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. Physiologia Plantarum **66**, 164–168.
- JOHNSON DS, WEERAPANA E & CRAVATT BF (2010). Strategies for discovering and derisking covalent, irreversible enzyme inhibitors. Future Medicinal Chemistry **2**, 949–964.
- JOSEPH DD, MARSHALL MW & SANDERS CH (2018). Efficacy of 2,4-D, dicamba, glufosinate and glyphosate combinations on selected broadleaf weed heights. American Journal of Plant Sciences **09**, 1321–1333.
- JUGULAM M & GILL BS (2018). Molecular cytogenetics to characterize mechanisms of gene duplication in pesticide resistance. Pest Management Science **74**, 22–29.
- JUGULAM M & SHYAM C (2019). Non-Target-Site Resistance to herbicides: recent developments. Plants **8**, 417.
- KANISSERY R, GAIRHE B, KADYAMPAKENI D, BATUMAN O & ALFEREZ F (2019). Glyphosate: its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. Plants **8**, 499.
- KASCHANI F, GU C, NIESSEN S, HOOVER H, CRAVATT BF & VAN DER HOORN, RAL (2009). Diversity of serine hydrolase activities of unchallenged and Botrytisinfected *Arabidopsis thaliana*. Molecular and Cellular Proteomics **8**, 1082– 1093.
- KASCHANI F, NICKEL S, PANDEY B, CRAVATT BF, KAISER M & VAN DER HOORN, RAL (2012). Selective inhibition of plant serine hydrolases by agrochemicals



revealed by competitive ABPP. Bioorganic and Medicinal Chemistry **20**, 597–600.

- KATEROVA ZI & MITEVA LPE (2010). Glutathione and herbicide resistance in plants. In: Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants (ed Springer). 191–207. Amsterdam.
- KAWAHIGASHI H (2009). Transgenic plants for phytoremediation of herbicides. Current Opinion in Biotechnology **20**, 225-230.
- KEELER SJ, SANDERS P, SMITH JK & MAZUR BJ (1993). Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression. Plant Physiology **102**, 1009–1018.
- KEELEY PE, CARTER CH & THULLEN RJ (1987). Influence of planting date on growth of Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). Weed Science **35**, 199–204.
- KHANNA-CHOPRA R, SRIVALLI B & AHLAWAT YS (1999). Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence. Biochemical and Biophysical Research Communications **255**, 324–327.
- KIDD D, LIU Y & CRAVATT BF (2001). Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes. Biochemistry **40**, 4005–4015.
- KINOSHITA T, NISHIMURA M & HARA-NISHIMURA I (1995). Homologues of a vacuolar processing enzyme that are expressed in different organs in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology **29**, 81–89.
- KINOSHITA T, YAMADA K, HIRAIWA N, KONDO M, NISHIMURA M & HARA-NISHIMURA I (1999). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. The Plant Journal **19**, 43–53.
- KISHORE GM & JACOB GS (1987). Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. Journal of Biological Chemistry **262**, 12164–12168.
- KISTNER EJ & HATFIELD JL (2018). Potential geographic distribution of palmer amaranth under current and future climates. Agricultural & Environmental Letters **3**, 170044.
- KJÆR J, ULLUM M, OLSEN P *et al.* (2003). The Danish pesticide leaching assessment programme: monitoring results May 1999–June 2002. Third report. Geological Survey of Denmark and Greenland.



- KLINGAMAN TE & OLIVER LR (2018). Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) interference in soybeans (*Glycine max*). Weed Science **42**, 523–527.
- KOCHEVENKO A, ARAÚJO WL, MALONEY GS *et al.* (2012). Catabolism of branched chain amino acids supports respiration but not volatile synthesis in tomato fruits. Molecular Plant **5**, 366–75.
- KOGER CH, SHANER DL, HENRY WB, NADLER-HASSAR T, THOMAS WE & WILCUT JW (2005). Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). Weed Science **53**, 559–566.
- KOHRT JR, SPRAGUE CL, SWATHI NADAKUDUTI S & DOUCHES D (2017). Confirmation of a three-way (glyphosate, ALS, and atrazine) herbicide-resistant population of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in Michigan. Weed Science **65**, 327–338.
- KOŁODZIEJEK I & VAN DER HOORN, RAL (2010). Mining the active proteome in plant science and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology **21**, 225–33.
- KOO D-H, MOLIN WT, SASKI CA et al. (2018). Extrachromosomal circular DNAbased amplification and transmission of herbicide resistance in crop weed Amaranthus palmeri. Proceedings of the National Academy of Sciences 115, 3332–3337.
- KRAKER JW DE & GERSHENZON J (2011). From amino acid to glucosinolate biosynthesis: protein sequence changes in the evolution of methylthioalkylmalate synthase in *Arabidopsis*. Plant Cell **23**, 38–53.
- KRAKER JW DE, LUCK K, TEXTOR S, TOKUHISA JG & GERSHENZON J (2007). Two arabidopsis genes (IPMS1 and IPMS2) encode isopropylmalate synthase, the branchpoint step in the biosynthesis of leucine. Plant Physiology **143**, 970–986.
- KRÜBEL L, JUNEMANN J, WIRTZ M *et al.* (2014). The mitochondrial sulfur dioxygenase ETHYLMALONIC ENCEPHALOPATHY PROTEIN1 is required for amino acid catabolism during carbohydrate starvation and embryo development in *Arabidopsis*. Plant Physiology **165**, 92–104.
- KUKLINSKY-SOBRAL J, ARAÚJO WL, MENDES R, PIZZIRANI-KLEINER AA & AZEVEDO JL (2005). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. Plant and Soil **273**, 91–99.



- KÜPPER A, BORGATO EA, PATTERSON EL *et al.* (2017). Multiple resistance to glyphosate and acetolactate synthase inhibitors in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) identified in Brazil. Weed Science **65**, 317–326.
- KUROKI G & CONN EE (1988). Increased chorismate mutase levels as a response to wounding in *Solanum tuberosum* L. tubers. Plant Physiology **86**, 895– 898.
- LABHILILI M, JOUDRIER P & GAUTIER MF (1995). Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. Plant Science **112**, 219–230.
- LALLEMAND J, BOUCHÉ F, DESIRON C *et al.* (2015). Extracellular peptidase hunting for improvement of protein production in plant cells and roots. Frontiers in Plant Science **6**, 37.
- LANZINGER A, FRANK T, REICHENBERGER G, HERZ M & ENGEL KH (2015). Metabolite profiling of barley grain subjected to induced drought stress: responses of free amino acids in differently adapted cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**, 4252–4261.
- LAPLANTE J, RAJCAN I & TARDIF FJ (2009). Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in *Setaria viridis*. Theoretical and Applied Genetics **119**, 577–585.
- LARRAN AS (2018). "Resistencia a herbicidas en poblaciones del género Amaranthus: mecanismos moleculares y expresión de alelos *ALS* resistentes en plantas de *A. thaliana* y trigo". Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Rosario.
- LARRAN AS, PALMIERI VE, PEROTTI VE, LIEBER L, TUESCA D & PERMINGEAT HR (2017). Target-site resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina. Pest Management Science **73**, 2578–2584.
- LEE LJ & NGIM J (2000). A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. Pest Management Science **56**, 336–339.
- LEE YT & DUGGLEBY RG (2001). Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. Biochemistry **40**, 6836–6844.



- LESS H & GALILI G (2008). Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. Plant Physiology **147**, 316–330.
- LEVITT G (1983). Sulfonylureas: new high potenty herbicides. In: Pesticide Chemistry: Human Welfare and Environment (eds J. Miyamoto & PC. Kearney) 243–250. Oxford, New York (EE.UU.).
- LI J, PENG Q, HAN H *et al.* (2018). Glyphosate resistance in *Tridax procumbens* via a novel *EPSPS* Thr-102-Ser substitution. Journal of Agricultural and Food Chemistry **66**, 7880–7888.
- LI JM, JOHNSON WG & SMEDA RJ (2002). Interactions between glyphosate and imazethapyr on four annual weeds. Crop Protection **21**, 1087–1092.
- LI M, YU Q, HAN H, VILA-AIUB M & POWLES SB (2012). ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. Pest Management Science **69**, 689-695
- LI W, BLANKMAN JL & CRAVATT BF (2007). A functional proteomic strategy to discover inhibitors for uncharacterized hydrolases. Journal of the American Chemical Society **129**, 9594–9595.
- LICH JM, RENNER AK & PENNER D (1997). Interaction of glyphosate with postemergence soybean (*Glycine max*) herbicides. Weed Science **45**, 12–21.
- LIU H, HU M, WANG Q, CHENG L & ZHANG Z (2018a). Role of Papain-Like Cysteine Proteases in plant development. Frontiers in Plant Science **72**, 3441–3454.
- LIU S, LIANG QM, ZHOU WW *et al.* (2015a). RNA interference of NADPHcytochrome P450 reductase of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, increases susceptibility to insecticides. Pest Management Science **71**, 32–39.
- LIU W, BAI S, ZHAO N *et al.* (2018b). Non-target site-based resistance to tribenuron-methyl and essential involved genes in *Myosoton aquaticum* (L.). BMC Plant Biology **18**, 1–14.
- LIU W, YUAN G, DU L *et al.* (2015b). A novel Pro197Glu substitution in acetolactate synthase (ALS) confers broad-spectrum resistance across ALS inhibitors. Pesticide Biochemistry and Physiology **117**, 31–38.



- LIU Y, PATRICELLI MP & CRAVATT BF (1999). Activity-based protein profiling: the serine hydrolases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**, 14694–14699.
- LIVAK KJ & SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of relative gene expression. Data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta$ CT method. Methods **25**, 402–408.
- LONHIENNE T, GARCIA MD, NOBLE C *et al.* (2017). High resolution crystal structures of the acetohydroxyacid synthase-pyruvate complex provide new insights into its catalytic mechanism. Chemistry Select **2**, 11981–11988.
- LOPEZ-NIEVES S, YANG Y, TIMONEDA A *et al.* (2017). Relaxation of tyrosine pathway regulation underlies the evolution of betalain pigmentation in *Caryophyllales*. New Phytologist **217**, 896–908.
- LORENTZ L, GAINES TA, NISSEN SJ *et al.* (2014). Characterization of glyphosate resistance in *Amaranthus tuberculatus* populations. Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**, 8134–8142.
- LORRAINE-COLWILL DF, POWLES SB, HAWKES TR, HOLLINSHEAD PH, WARNER SAJ & PRESTON C (2002). Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pesticide Biochemistry and Physiology **74**, 62–72.
- LU H, CHANDRASEKAR B, OELJEKLAUS J *et al.* (2015). Subfamily-specific fluorescent probes for cysteine proteases display dynamic protease activities during seed germination. Plant Physiology **168**, 1462–1475.
- LYDON J & DUKE SO (1988). Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher-plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry **36**, 813–818.
- MA R, KAUNDUN SS, TRANEL PJ *et al.* (2013). Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. Plant Physiology **163**, 363–377.
- MACRAE JC (1971). Quantitative measurement of starch in very small amounts of leaf tissue. Planta **96**, 101–108.
- MAEDA H & DUDAREVA N (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Biology **63**, 73–105.



- MAEDA H, SHASANY AK, SCHNEPP J *et al.* (2010). RNAi suppression of arogenate dehydratase1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate pathway in petunia petals. The Plant Cell **22**, 832–849.
- MALKANTHI SHP, SANDAREKA UG, WIJERATHNE AW & SIVASHANKAR P (2019). Banning of glyphosate and its impact on paddy cultivation: a study in Ratnapura district in Sri Lanka. Journal of Agricultural Sciences–Sri Lanka **14**, 129.
- MALLORY-SMITH CA, THILL DC & DIAL MJ (1990). Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). Weed Technology **4**, 163–168.
- MALONE JM, MORRAN S, SHIRLEY N, BOUTSALIS P & PRESTON C (2016). *EPSPS* gene amplification in glyphosate-resistant *Bromus diandrus*. Pest Management Science **72**, 81–88.
- MALONEY GS, KOCHEVENKO A, TIEMAN DM *et al.* (2010). Characterization of the branched-chain amino acid aminotransferase enzyme family in tomato. Plant Physiology **153**, 925–936.
- MANABE Y, TINKER N, COLVILLE A & MIKI B (2007). CSR1, the sole target of imidazolinone herbicide in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology **48**, 1340–1358.
- DE MARÍA N, BECERRIL JM, GARCÍA-PLAZAOLA JI *et al.* (2006). New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: role of shikimate accumulation. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**, 2621–2628.
- MAROLI A (2017). Elucidating the cellular physiology associated with the herbicide (glyphosate) resistance and tolerance in agricultural weeds using metabolomics approach. All Dissertations.
- MAROLI AS, NANDULA VK, DAYAN FE, DUKE SO, GERARD P & THARAYIL N (2015). Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**, 9199–9209.
- MAROLI AS, NANDULA VK, DUKE SO & THARAYIL N (2016). Stable isotope resolved metabolomics reveals the role of anabolic and catabolic processes in glyphosate-induced amino acid accumulation in *Amaranthus palmeri* biotypes. Journal of Agricultural and Food Chemistry **64**, 7040–7048.



- MARTÍNEZ M, CAMBRA I, GONZÁLEZ-MELENDI P, SANTAMARÍA ME & DÍAZ I (2012). C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. Physiologia Plantarum **145**, 85–94.
- MARTINEZ M & DIAZ I (2008). The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. BMC Evolutionary Biology **8**, 198.
- MASSINGA RA, CURRY RS, HORAK MJ & JR., BOYER J (2001). Interference of Palmer amaranth in corn. Weed Science **49**, 202–208.
- MATZRAFI M (2019). Climate change exacerbates pest damage through reduced pesticide efficacy. Pest Management Science **75**, 9–13.
- MAZUR BJ, CHUI CF & SMITH JK (1987). Isolation and characterization of plant genes-coding for acetolactate synthase, the target enzyme for 2 classes of herbicides. Plant Physiology **85**, 1110–1117.
- MAZUR BJ & FALCO SC (1989). The development of herbicide resistant crops. Annual review of plant physiology and plant molecular biology **40**, 441–470.
- MCCOURT JA & DUGGLEBY RG (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. Amino Acids **31**, 173–210.
- McDonald A, RIHA S, DITOMMASO A & DEGAETANO A (2009). Climate change and the geography of weed damage: analysis of U.S. maize systems suggests the potential for significant range transformations. Agriculture, Ecosystems and Environment **130**, 131–140.
- MCGRATH JW, HAMMERSCHMIDT F & QUINN JP (1998). Biodegradation of phosphonomycin by *Rhizobium huakuii* PMY1. Applied and Environmental Microbiology **64**, 356–358.
- MCLELLAN H, GILROY EM, YUN BW, BIRCH PRJ & LOAKE GJ (2009). Functional redundancy in the *Arabidopsis Cathepsin B* gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence. New Phytologist **183**, 408–418.
- MCNAUGHTON KE, LETARTE J, LEE E a. & TARDIF FJ (2005). Mutations in *ALS* confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). Weed Science **53**, 17–22.

- MEAGHER TR, BELANGER FC & DAY PR (2003). Using empirical data to model transgene dispersal. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **358**, 1157–1162.
- MEYER AJ & HELL R (2005). Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. Photosynthesis Research **86**, 435–457.
- MILANI A, PANOZZO S, FARINATI S *et al.* (2021). Recent Discovery of *Amaranthus palmeri* S. Watson in Italy: Characterization of ALS-Resistant Populations and Sensitivity to Alternative Herbicides. Sustainability **13**, 7003.
- MILLAR AH, WISKISH JT, WHELAN J & DAY DA (1993). Organic-acid activation of the alternative oxidase of plant-mitochondria. FEBS Letters **329**, 259–262.
- MISAS-VILLAMIL JC, TOENGES G, KOLODZIEJEK I *et al.* (2013). Activity profiling of vacuolar processing enzymes reveals a role for VPE during oomycete infection. Plant Journal **73**, 689–700.
- MITEVA L, TSONEVA J, IVANOV S & ALEXIEVA V (2005). Alterations of the content of hydrogen peroxide and malondialdehyde and the activity of some antioxidant enzymes in the roots and leaves of pea and wheat plants exposed to glyphosate. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences **58**, 733–738.
- MITEVA LP-E, IVANOV S V & ALEXIEVA VS (2010). Alterations in glutathione pool and some related enzymes in leaves and roots of pea plants treated with the herbicide glyphosate. Russian Journal of Plant Physiology **57**, 131–136.
- MOHAPATRA S, MINOCHA R, LONG S & MINOCHA SC (2010). Transgenic manipulation of a single polyamine in poplar cells affects the accumulation of all amino acids. Amino Acids **38**, 1117–29.
- MOHLER C (2001). Weed life history: identifying vulnerabilities. In: Ecological Management of Agricultural Weeds (eds M. Liebman, C. Mohler & C. Staver). 40–98. Cambridge (U.K.).
- MOHSENI-MOGHADAM M, SCHROEDER J & ASHIGH J (2013). Mechanism of resistance and inheritance in glyphosate resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) populations from New Mexico, USA. Weed Science **61**, 517–525.
- MOLDES CA, CAMIÑA JM, MEDICI LO, TSAI SM & AZEVEDO RA (2012). Physiological effects of glyphosate over amino acid profile in conventional and transgenic soybean (*Glycine max*). Pesticide Biochemistry and Physiology **102**, 134–141.



- MOLDES CA, MEDICI LO, ABRAHÃO OS, TSAI SM & AZEVEDO RA (2008). Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. Acta Physiologiae Plantarum **30**, 469–479.
- MOLIN WT, NANDULA VK, WRIGHT AA & BOND JA (2016). Transfer and expression of ALS inhibitor resistance from Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to an *A. spinosus* × *A. palmeri* hybrid. Weed Science **64**, 240–247.
- MOLIN WT, WRIGHT AA, LAWTON-RAUH A & SASKI CA (2017). The unique genomic landscape surrounding the *EPSPS* gene in glyphosate resistant *Amaranthus palmeri*: a repetitive path to resistance. BMC Genomics **18**, 91.
- MOLIN WT, PATTERSON EL, & SASKI CA (2020). Homogeneity among glyphosateresistant *Amaranthus palmeri* in geographically distant locations. PLoS ONE **15**.
- MOONEN AC & BÀRBERI P (2008). Functional biodiversity: an agroecosystem approach. Agriculture, Ecosystems and Environment **127**, 7–21.
- MORIMOTO K & VAN DER HOORN, RAL (2016). The increasing impact of Activity-Based Protein Profiling in plant science. Plant and Cell Physiology **57**, 446– 461.
- MORRAN S, MORETTI ML, BRUNHARO CA, FISCHER AJ & HANSON BD (2018). Multiple target site resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) lines from California orchards. Pest Management Science **74**, 2747–2753.
- MORTENSEN DA, FRANKLIN EGAN J, MAXWELL BD, RYAN MR & SMITH RG (2012). Navigating a critical juncture for sustainable weed management. BioScience **62**, 75-84.
- Moss S (2017). Herbicide Resistance in Weeds. In: Weed Research: Expanding Horizons, 181–214.
- Moss S, Ulber L & Hoed I den (2019). A herbicide resistance risk matrix. Crop Protection **115**, 13–19.
- MOTHARASAN M, SHUKOR MY, YASID NA, WAN JOHARI WL & AHMAD SA (2018). Environmental fate and degradation of glyphosate in soil. The Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews **4**, 102–116.
- MURPHY B & TRANEL P (2019). Target-site mutations conferring herbicide resistance. Plants **8**, 382.



- NAKKA S, GODAR AS, THOMPSON CR, PETERSON DE & JUGULAM M (2017a). Rapid detoxification via glutathione S-transferase (GST) conjugation confers a high level of atrazine resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). Pest Management Science **73**, 2236–2243.
- NAKKA S, THOMPSON CR, PETERSON DE & JUGULAM M (2017b). Target Site–Based and Non–Target Site Based Resistance to ALS Inhibitors in Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). Weed Science **65**, 681–689.
- NANDULA VK (2010). Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management (ed John Wiley & Sons). 321. New Jersey (EE.UU.).
- NANDULA VK, RAY JD, RIBEIRO DN, PAN Z & REDDY KN (2013). Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered Target-Site and Non target-Site mechanisms. Weed Science **61**, 374–383.
- NANDULA VK, REDDY KN, KOGER CH *et al.* (2012). Multiple resistance to glyphosate and pyrithiobac in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) from Mississippi and response to flumiclorac. Weed Science **60**, 179–188.
- NANDULA VK, REDDY KN, POSTON DH, RIMANDO AM & DUKE SO (2008). Glyphosate tolerance mechanism in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. Weed Science **56**, 344–349.
- NANDULA VK, RIECHERS DE, FERHATOGLU Y *et al.* (2019). Herbicide metabolism: crop selectivity, bioactivation, weed resistance, and regulation. Weed Science **67**, 149–175.
- NANDULA VK, WRIGHT A a., BOND J a., RAY JD, EUBANK TW & MOLIN WT (2014). *EPSPS* amplification in glyphosate-resistant spiny amaranth (*Amaranthus spinosus*): a case of gene transfer via interspecific hybridization from glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus* palmeri). Pest Management Science **70**, 1902–1909.
- NAVAS ML (2012). Trait-based approaches to unravelling the assembly of weed communities and their impact on agro-ecosystem functioning. Weed Research **52**, 479–488.
- NELSON GC & BULLOCK DS (2003). Simulating a relative environmental effect of glyphosate-resistant soybeans. Ecological Economics **45**, 189–202.



- NELSON KA & RENNER KA (2002). Yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) control and tuber production with glyphosate and ALS-inhibiting herbicides. Weed Technology **16**, 512–519.
- NEMATALLA M, BADAWI A, HASSAN N, ELBASTAWISY Z & BADRAN E (2008). Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings. Pesticide Biochemistry and Physiology **90**, 8–18.
- NENTWIG W, FRANK T & LETHMAYER C (1998). Sown weed strips: artificial ecological compensation areas as an important tool in conservation biological control. In: Conservation Biological Control (ed P. Barbosa). 133–153. San Diego, California (EE.UU.).
- NEVE P (2008). Simulation modelling to understand the evolution and management of glyphosate resistance in weeds. Pest Management Science **64**, 392–401.
- NGO TD, KRISHNAN M, BOUTSALIS P & GILL G (2018a). Target-site mutations conferring resistance to glyphosate in feathertop rhodes grass (*Chloris virgata*) populations in Australia. Pest Management Science **74**, 1094–1100.
- NGO TD, MALONE JM, BOUTSALIS P, GILL G & PRESTON C (2018b). *EPSPS* gene amplification conferring resistance to glyphosate in windmill grass (*Chloris truncata*) in Australia. Pest Management Science **74**, 1101–1108.
- NIPHAKIS MJ & CRAVATT BF (2014). Enzyme inhibitor discovery by Activity-Based Protein Profiling. Annual Review of Biochemistry **83**, 341–377.
- NOCTOR G, NOVITSKAYA L, LEA PJ & FOYER CH (2002). Coordination of leaf minor amino acid contents in crop species: Significance and interpretation. Journal of Experimental Botany **53**, 939–945.
- NOCTOR G, QUEVAL G, MHAMDI A, CHAOUCH S & FOYER CH (2011). Glutathione. The Arabidopsis Book **9**, 1–32.
- NOMURA DK & CASIDA JE (2011). Activity-Based Protein Profiling of organophosphorus and thiocarbamate pesticides reveals multiple serine hydrolase targets in mouse brain. Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**, 2808–2815.
- O'DONOVAN JT, BLACKSHAW RE, HARKER KN *et al.* (2007). Integrated approaches to managing weeds in spring-sown crops in western Canada. Crop



Protection 26, 390-398.

- ODELL JT, CAIMI PG, YADAV NS & MAUVAIS CJ (1990). Comparison of increased expression of wild-type and herbicide-resistant acetolactate synthase genes in transgenic plants, and indication of post-transcriptional limitation on enzyme-activity. Plant Physiology **94**, 1647–1654.
- OLIVER SN, LUNN JE, URBANCZYK-WOCHNIAK E *et al.* (2008). Decreased expression of cytosolic pyruvate kinase in potato tubers leads to a decline in pyruvate resulting in an *in vivo* repression of the alternative oxidase. Plant Physiology **148**, 1640–1654.
- ORCARAY L, IGAL M, MARINO D, ZABALZA A & ROYUELA M (2010). The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. Pest Management Science **66**, 262–269.
- ORCARAY L, IGAL M, ZABALZA A & ROYUELA M (2011). Role of exogenously supplied ferulic and p-coumaric acids in mimicking the mode of action of acetolactate synthase inhibiting herbicides. Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**, 10162–10168.
- ORCARAY L, ZULET A, ZABALZA A & ROYUELA M (2012). Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. Journal of Plant Physiology **169**, 27–33.
- OU J, STAHLMAN PW & JUGULAM M (2018). Reduced absorption of glyphosate and decreased translocation of dicamba contribute to poor control of kochia *(Kochia scoparia)* at high temperature. Pest Management Science **74**, 1134–1142.
- PADGETTE SR, KOLACZ KH, DELANNAY X *et al.* (1995). Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Science **35**, 1451–1461.
- ZITA PADILLA, GLORIA DE LOS ÁNGELES (2013). "Resistencia de malas hierbas a herbicidas inhibidores de la enzima ACCasa". Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- PALMA-BAUTISTA C, TORRA J, GARCIA MJ *et al.* (2019). Reduced absorption and impaired translocation endows glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri* harvested in glyphosate-resistant soybean from Argentina. Journal of Agricultural and Food Chemistry **67**, 1052–1060.



- PALMIERI V (2019). "Caracterización del mecanismo de resistencia a inhibidores ALS y glifosato en una subpoblación de *Amaranthus palmeri* identificada a campo". Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Rosario.
- PAN D, LI QX, LIN Z *et al.* (2017). Interactions between salicylic acid and antioxidant enzymes tilting the balance of H₂O₂ from photorespiration in non-target crops under halosulfuron methyl stress. Pesticide Biochemistry and Physiology **143**, 214–223.
- PAN L, YU Q, HAN H et al. (2019). Aldo-keto reductase metabolizes glyphosate and confers glyphosate resistance in *Echinochloa colona*. Plant Physiology 181, 1519–1534.
- PATTERSON EL, PETTINGA DJ, RAVET K, NEVE P & GAINES TA (2018). Glyphosate resistance and *EPSPS* gene duplication: convergent evolution in multiple plant species. Journal of Heredity **109**, 117–125.
- PATZOLDT WL & TRANEL PJ (2007). Multiple *ALS* mutations confer herbicide resistance in Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). Weed Science **55**, 421–428.
- PATZOLDT WL, TRANEL PJ, ALEXANDER AL & SCHMITZER PR (2001). A common ragweed population resistant to cloransulam-methyl. Weed Science **49**, 485–490.
- PENG Y, ABERCROMBIE LL, YUAN JS *et al.* (2010). Characterization of the horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expression analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. Pest Management Science **66**, 1053–1062.
- PERAGÓN J & AMORES-ESCOBAR MT (2018). Olive tree glutathione S-transferase and its response against the herbicides oxyfluorfen and glyphosate. Scientia Horticulturae **231**, 194–200.
- PEROTTI VE, LARRAN AS, PALMIERI VE *et al.* (2019). A novel triple amino acid substitution in the *EPSPS* found in a high-level glyphosate-resistant *Amaranthus hybridus* population from Argentina. Pest Management Science **75**, 1242–1251.
- PERPEROPOULOU F, POULIOU F & LABROU NE (2018). Recent advances in protein engineering and biotechnological applications of glutathione transferases. Critical Reviews in Biotechnology **38**, 511–528.



- PETERSEN IL, HANSEN HCB, RAVN HW, SØRENSEN JC & SØRENSEN H (2007). Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. Pesticide Biochemistry and Physiology **89**, 220–229.
- PHILLIPS RL, MORRIS PR, WOLD F & GENGENBACH BG (1981). Seedling screening for Lysine-Plus-Threonine resistant maize 1. Crop Science **21**, 601–607.
- PIASECKI C, YANG Y, BENEMANN DP *et al.* (2019). Transcriptomic analysis identifies new non-target site glyphosate-resistance genes in *Conyza bonariensis*. Plants **8**, 157.
- PINTO JEBP, DYER WE, WELLER SC & HERRMANN KM (1988). Glyphosate induces 3deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in potato (*Solanum tuberosum* L.) cells grown in suspension-culture. Plant Physiology **87**, 891–893.
- PINTO JEBP, SUZICH JAA & HERRMANN KM (1986). 3-Deoxy-D-Arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase from potato-tuber (*Solanum-tuberosum* L). Plant Physiology **82**, 1040–1044.
- PIZZUL L, CASTILLO M del P & STENSTRÖM J (2009). Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. Biodegradation **20**, 751–759.
- POWLES SB (2008). Review evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. Pest Management Science **64**, 360–365.
- POWLES SB (2010). Gene amplification delivers glyphosate-resistant weed evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences **107**, 955–956.
- POWLES SB, LORRAINE-COLWILL DF, DELLOW JJ & PRESTON C (1998). Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. Weed Science **46**, 604–607.
- POWLES SB & PRESTON C (1995). Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants. HRAC **1982**, 1–13.
- POWLES SB & YU Q (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. Annual Review of Plant Biology **61**, 317–347.
- PRABUCKA B & BIELAWSKI W (2004). Purification and partial characteristic of a major gliadin-degrading cysteine endopeptidase from germinating triticale seeds. Acta Physiologiae Plantarum **26**, 383–392.

- PRADO R DE, LOPEZ-MARTINEZ N & GONZALEZ-GUTIERREZ J (2000). Identification of two mechanisms of atrazine resistance in *Setaria faberi* and *Setaria viridis* biotypes. Pesticide Biochemistry and Physiology **67**, 114–124.
- PRATELLI R & PILOT G (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. Journal of Experimental Botany **65**, 5535–5556.
- PRATLEY J, URWIN N, STANTON R *et al.* (1999). Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum* L. Bioevaluation. Weed Science **47**, 405–411.
- PRESTON C, STONE LM, RIEGER MA & BAKER J (2006). Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. Pesticide Biochemistry and Physiology **84**, 227–235.
- PUJADAS SALVÀ & BERMEJO H (1988). Concepto de mala hierba. Itea 75, 47–56.
- QUINN JP, PEDEN JMM & DICK RE (1988). Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. Applied Microbiology and Biotechnology **29**, 511–516.
- RAMESH K, MATLOOB A, ASLAM F, FLORENTINE SK & CHAUHAN BS (2017). Weeds in a changing climate: Vulnerabilities, consequences, and implications for future weed management. Frontiers in Plant Science **8**.
- RAMIL-REGO R & VALES P (2019). Especies Exóticas Invasoras: situación e propostas de mitigación. Monografías do Ibader, Serie Biodiversidade.
- RAO MB, TANKSALE AM, GHATGE MS & DESHPANDE V V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, 597–635.
- RAWLINGS ND (2010). Peptidase inhibitors in the MEROPS database. Biochimie **92**, 1463–1483.
- RAWLINGS ND, BARRETT AJ, THOMAS PD, HUANG X, BATEMAN A & FINN RD (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. Nucleic Acids Research **46**, D624–D632.
- RAY TB (1982). The mode of action of chlorsulfuron: a new herbicide for cereals. Pesticide Biochemistry and Physiology **17**, 10–17.
- RAY TB (1984). Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. Plant Physiology **75**, 827–831.



- RAY TB (1989). Herbicides as inhibitors of amino acid biosynthesis. In: target sites of Herbicide Action (eds P. Boger & G. Sandyman).
- RECASENS J (2020). *Amaranthus palmeri*. Una seria amenaza de nuestros campos de maíz. Phytoma **321**, 45–50.
- RECASENS J, CONESA JA, ROYO-ESNAL A & TORRA J (2011). *Amaranthus palmeri* en España. ¿Una amenaza inminente? XIII Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, 63-66. La Laguna, Tenerife, España.
- REDDY KN, RIMANDO AM, DUKE SO & NANDULA VK (2008). Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**, 2125–2130.
- REININK M & BORSTLAP AC (1982). 3-Deoxy-d-arabino-heptulosonate 7phosphate synthase from pea leaves: Inhibition by L-tyrosine. Plant Science Letters **26**, 167–171.
- RIAR DS, NORSWORTHY JK, BOND JA, BARARPOUR MT, WILSON MJ & SCOTT RC (2012). Resistance of *Echinochloa crus-galli* populations to acetolactate synthaseinhibiting herbicides. International Journal of Agronomy **2012**, 1–8.
- RIAR DS, NORSWORTHY JK, SRIVASTAVA V, NANDULA V, BOND JA & SCOTT RC (2013). Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**, 278–289.
- RIBEIRO DN, PAN Z, DUKE SO *et al.* (2014). Involvement of facultative apomixis in inheritance of *EPSPS* gene amplification in glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri*. Planta **239**, 199–212.
- RIEBESEEL E, HÄUSLER RE, RADCHUK R *et al.* (2010). The 2-oxoglutarate/malate translocator mediates amino acid and storage protein biosynthesis in pea embryos. Plant Journal **61**, 350–363.
- RIGON CAG, GAINES TA, KÜPPER A & DAYAN FE (2020). Metabolism-based herbicide resistance, the major threat among the non-target site resistance mechanisms. Outlooks on Pest Management **31**, 162–168.
- RODRIGUES BN & ALMEIDA F. (2005). Guide of Herbicides. 5th (ed IAPAR). Londrina, Brazil.
- RODRIGUEZ-GIL JL, PROSSER R, POIRIER D *et al.* (2017). Aquatic hazard assessment of MON 0818, a commercial mixture of alkylamine ethoxylates commonly



used in glyphosate-containing herbicide formulations. Part 1: Species sensitivity distribution from laboratory acute exposures. Environmental Toxicology and Chemistry **36**, 501–511.

- ROMA-BURGOS N, HEAP I, ROUSE C & LAWTON-RAUH A (2019). Evolution of Herbicide-Resistant Weeds. In: Weed Control. Sustainability, hazards and risks in cropping system worldwide (eds N. Korres, NR. Burgos & SO. Duke). 92–132. Boca Raton, Florida (EE.UU.).
- ROMERO RM, ROBERTS MF & PHILLIPSON JD (1995). Chorismate mutase in microorganisms and plants. Phytochemistry **40**, 1015–1025.
- ROSALES-ROBLES E (2006). Clasificación y Uso de los Herbicidas por su Modo de Acción. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental Río Bravo.
- RUSTOM SY, WEBSTER EP, BLOUIN DC & MCKNIGHT BM (2019). Interactions of quizalofop-p-ethyl mixed with contact herbicides in ACCase-resistant rice production. Weed Technology **33**, 233–238.
- RYAN GF (1970). Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. Weed Science **18**, 614–616.
- SAARI LL, COTTERMAN JC & THILL DC (1994). Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry, (eds SB. Powles & JAM. Holtum). 83–139. Boca Raton, Florida (EE.UU.).
- SABBADIN F, GLOVER R, STAFFORD R *et al.* (2017). Transcriptome sequencing identifies novel persistent viruses in herbicide resistant wild-grasses. Scientific Reports **7**, 1–8.
- SADAKANE Y & HATANAKA Y (2006). Photochemical fishing approaches for identifying target proteins and elucidating the structure of a ligand-binding region using carbene-generating photoreactive probes. Analytical Sciences **22**, 209–218.
- SALAS-PEREZ RA (2018). "Non-Target-Site based tolerance to herbicides in *Amaranthus palmeri*". Tesis Doctoral. University of Arkansas.
- SALAS RA, DAYAN FE, PAN Z et al. (2012). EPSPS gene amplification in glyphosateresistant Italian ryegrass (Lolium perenne ssp. multiflorum) from Arkansas. Pest Management Science 68, 1223–1230.



- SALAS RA, SCOTT RC, DAYAN FE & BURGOS NR (2015). *EPSPS* gene amplification in glyphosate-resistant italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. multiflorum) populations from Arkansas (United States). Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**, 5885–5893.
- SAMMONS RD & GAINES TA (2014). Glyphosate resistance: state of knowledge. Pest Management Science **70**, 1367–1377.
- SANS FX & FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C (1997). Biología de las malas hierbas de España. Phytoma-SEMh. Valencia.
- SATO K, MASE K, NAKANO Y *et al.* (2006). 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7phosphate synthase is regulated for the accumulation of polysaccharidelinked hydroxycinnamoyl esters in rice (*Oryza sativa* L.) internode cell walls. Plant Cell Reports **25**, 676–688.
- SAUER J (1957). Recent migration and evolution of the dioecious Amaranths. Evolution **11**, 11.
- SAWADA Y, NAGAI Y, UEYAMA M & YAMAMOTO I (1988). Probable toxicity of surfaceactive agent in commercial herbicide containing glyphosate. The Lancet **331**, 299.
- SCARPONI L, ALLA MMN & MARTINETTI L (1995). Consequences on nitrogenmetabolism in soybean (*Glycine-Max* L.) as a result of imazethapyr action on acetohydroxy acid synthase. Journal of Agricultural and Food Chemistry **43**, 809–814.
- SCHALLER A, STINTZI A, RIVAS S *et al.* (2018). From structure to function a family portrait of plant subtilases. *New Phytologist.*
- SCHÖNBRUNN E, ESCHENBURG S, SHUTTLEWORTH WA *et al.* (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proceedings of the National Academy of Sciences **98**, 1376–80.
- SERGIEV IG, ALEXIEVA VS, IVANOV S V, MOSKOVA II & KARANOV EN (2006). The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. Pesticide Biochemistry and Physiology **85**, 139–146.
- SHAHID M, POURRUT B, DUMAT C, NADEEM M, ASLAM M & PINELLI E (2014). Heavymetal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 1–44.



- SHANER DL (1999). Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors in the United States: history, occurrence, detection, and management. Journal of Weed Science and Technology 44, 405–411.
- SHANER DL (2009). Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. Weed Science **57**, 118–123.
- SHANER DL, ANDERSON PC & STIDHAM MA (1984). Imidazolinones. Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. Plant Physiology **76**, 545–546.
- SHANER DL, LINDENMEYER RB & OSTLIE MH (2012). What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? Pest Management Science **68**, 3–9.
- SHANER DL & REIDER ML (1986). Physiological responses of corn (*Zea mays*) to AC 243,997 in combination with valine, leucine, and isoleucine. Pesticide Biochemistry and Physiology **25**, 248–257.
- SHAW DR & ARNOLD JC (2002). Weed control from herbicide combinations with glyphosate. Weed Technology **16**, 1–6.
- SHERGILL LS, BISH MD, JUGULAM M & BRADLEY KW (2018). Molecular and physiological characterization of six-way resistance in an *Amaranthus tuberculatus* var. rudis biotype from Missouri. Pest Management Science 74, 2688–2698.
- SHI C & XU LL (2009). Characters of cysteine endopeptidases in wheat endosperm during seed germination and subsequent seedling growth. Journal of Integrative Plant Biology 51, 52–57.
- SHIMABUKURO RH, FREAR DS, SWANSON HR & WALSH WC (1971). Glutathione Conjugation. An enzymatic basis for atrazine resistance in corn. Plant Physiology **47**, 10-40.
- SHIMIZU T, NAKAYAMA I, NAKAO T, NEZU Y & ABE H (1994). Inhibition of plant acetolactate synthase by herbicides, pyrimidinylsalicylic acids. Journal of Pesticide Science **19**, 59–67.
- SHUMILIN IA, BAUERLE R & KRETSINGER RH (2003). The high-resolution structure of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase reveals a twist in the plane of bound phosphoenolpyruvate. Biochemistry **42**, 3766–3776.
- SIBONY M & RUBIN B (2003). Molecular basis for multiple resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides and atrazine in *Amaranthus blitoides* (prostrate pigweed). Planta **216**, 1022–1027.



- SIEHL DL (1997). Inhibitors of EPSP sinthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. In: Hebicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology (eds RM. Roe, JD. Burton & RJ. Kuhr). 37–67. Amsterdam.
- SIHTMÄE M, BLINOVA I, KÜNNIS-BERES K, KANARBIK L, HEINLAAN M & KAHRU A (2013). Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. Applied Soil Ecology **72**, 215–224.
- SINGH BK (1999). Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine. In: Plant amino acids: Biochemistry and Biotechnology (ed BK. Singh), 227–247. New York (EE.UU.).
- SINGH BK & SHANER DL (1995a). Biosynthesis of branched-chain amino acids from test-tube to field. Plant Cell **7**, 935–944.
- SINGH BK & SHANER DL (1995b). Changes in free amino acid pools can predict the mode of action of herbicides. Pesticide Science **43**, 221–225.
- SINGH BK, STIDHAM MA & SHANER DL (1988). Assay of acetohydroxyacid synthase. Analytical Biochemistry **171**, 173–179.
- SINGH BK & WALKER A (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS Microbiology Reviews **30**, 428–471.
- SINGH S, SINGH V, SALAS-PEREZ RA, BAGAVATHIANNAN M V., LAWTON-RAUH A & ROMA-BURGOS N (2018). Target-site mutation accumulation among ALS inhibitor-resistant Palmer amaranth. Pest Management Science **75**, 1131–1139.
- SMITH IK, KENDALL AC, KEYS AJ, TURNER JC & LEA PJ (1985). The regulation of the biosynthesis of glutathione in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science **41**, 11–17.
- SOLOMON K & THOMPSON D (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B **6**, 289–324.
- SOSNOSKIE LM, KICHLER JM, WALLACE RD & CULPEPPER AS (2011). Multiple resistance in palmer amaranth to glyphosate and pyrithiobac confirmed in Georgia. Weed Science **59**, 321–325.
- SOSNOSKIE LM, WEBSTER TM & CULPEPPER AS (2013). Glyphosate resistance does not affect Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) seedbank longevity. Weed Science **61**, 283–288.



- SPAUNHORST DJ, NIE H, TODD JR, YOUNG JM, YOUNG BG & JOHNSON WG (2019). Confirmation of herbicide resistance mutations Trp574Leu, ΔG210, and *EPSPS* gene amplification and control of multiple herbicide-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) with chlorimuron-ethyl, fomesafen, and glyphosate. PLoS ONE **14**.
- SPENCER M, MUMM R & GWYN J (2000). Glyphosate Resistant Maize Lines. Dekalb Genetics Corporation. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- SPITZER-RIMON B, MARHEVKA E, BARKAI O *et al.* (2010). EOBII, a gene encoding a flower specific regulator of phenylpropanoid volatiles biosynthesis in petunia. The Plant Cell **22**, 1961–1976.
- SPRANKLE P, MEGGITT WF & PENNER D (1975). Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. Weed Science **23**, 229–234.
- STARKE RJ & OLIVER LR (1998). Interaction of glyphosate with chlorimuron, fomesafen, imazethapyr and sulfentrazone. Weed Science **46**, 652–660.
- STERLING TM (1997). Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. Reviews in toxicology **1**, 111–141.
- STODDARD EG, KILLINGER BJ, NAIR RN *et al.* (2017). Activity-Based Probes for isoenzyme and site specific functional characterization of glutathione S-transferases. Journal of the American Chemical Society **139**, 16032–16035.
- STORMER F & UMBARGER H (1964). Requirement for flavine adenine dinucleotide in formation of acetolactate by *Salmonella Typhimurium* extracts. Biochemical and Biophysical Research Communications **17**, 587-592.
- STORRIE A (2006). Herbicide Resistance mechanisms and common HR misconceptions. 2006 Grains Research Update for Irrigation Croppers. Brochure. Switzerland.
- SUELDO DJ & VAN DER HOORN, RAL (2017). Plant life needs cell death, but does plant cell death need Cys proteases? The FEBS Journal **284**, 1577–1585.
- SUZICH JA, DEAN JFD & HERRMANN KM (1985). 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from carrot root (*Daucus carota*) is a hysteretic enzyme. Plant Physiology **79**, 765–770.
- SZALAI G, KELLOS T, GALIBA G & KOCSY G (2009). Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. Journal of



Plant Growth Regulation 28, 66-80.

- SZEWIŃSKA J, SIMIŃSKA J & BIELAWSKI W (2016). The roles of cysteine proteases and phytocystatins in development and germination of cereal seeds. Journal of Plant Physiology **207**, 10–21.
- TAKANO HK, BEFFA R, PRESTON C, WESTRA P & DAYAN FE (2019). Reactive oxygen species trigger the fast action of glufosinate. Planta **249**, 1837–1849.
- TAKANO HK, BEFFA R, PRESTON C, WESTRA P & DAYAN FE (2020). A novel insight into the mode of action of glufosinate: how reactive oxygen species are formed. Photosynthesis Research **144**, 361–372.
- TAKATSUJI H, MORI M, BENFEY PN, REN L & CHUA NH (1992). Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in Petunia petals and seedlings. The EMBO Journal **11**, 241–249.
- TAN-WILSON AL & WILSON KA (2012). Mobilization of seed protein reserves. Physiologia Plantarum **145**, 140–153.
- TAN S, EVANS R & SINGH B (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. Amino Acids **30**, 195–204.
- TANAKA Y, SASAKI N & OHMIYA A (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal **54**, 733–749.
- TANI E, PERRAKI A, GERAKARI M *et al.* (2020). How is glyphosate resistance modified by exogenous salicylic acid application on *Conyza bonariensis* biotypes. Phytoparasitica **48**, 305–315.
- TARDIF FJ, RAJCAN I & COSTEA M (2006). A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. New Phytologist **169**, 251–264.
- TEASTER ND & HOAGLAND RE (2014). Characterization of glyphosate resistance in cloned *Amaranthus palmeri* plants. Weed Biology and Management **14**, 1–10.
- TÉTARD-JONES C, SABBADIN F, MOSS S, HULL R, NEVE P & EDWARDS R (2018). Changes in the proteome of the problem weed blackgrass correlating with multiple-herbicide resistance. The Plant Journal **94**, 709–720.
- TOHGE T, WATANABE M, HOEFGEN R & FERNIE AR (2013). The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. Critical Reviews in



Biochemistry and Molecular Biology 48, 123–52.

- TORNKVIST A, LIU C & MOSCHOU PN (2019). Proteolysis and nitrogen: emerging insights. Journal of Experimental Botany **70**, 2009–2019.
- TORRA J, ROJANO-DELGADO AM, MENÉNDEZ J, SALAS M & PRADO R DE (2021). Cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance to imazamox and 2,4-D in *Papaver rhoeas*. Plant Physiology and Biochemistry **160**, 51– 61.
- TORRA J, ROYO-ESNAL A, ROMANO Y, OSUNA MD, LEÓN RG & RECASENS J (2020). *Amaranthus palmeri* a new invasive weed in Spain with herbicide resistant biotypes. Agronomy **10**, 1–13.
- TRANEL, PATRIK J. AND WRIGHT TR (2002). Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? Weed Science **50**, 700–712.
- TRENKAMP S, ECKES P, BUSCH M & FERNIE AR (2009). Temporally resolved GC-MSbased metabolic profiling of herbicide treated plants treated reveals that changes in polar primary metabolites alone can distinguish herbicides of differing mode of action. Metabolomics **5**, 277–291.
- TSUI MTK & CHU LM (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere **52**, 1189–1197.
- TUESCA D, PAPA JC & MORICHETTI S (2016). Manejo de malezas problema. *Amaranthus palmeri* (S.) Watson. Bases para su manejo y control en sistemas de producción. En: Red de conocimiento en malezas resistentes. 2250-5350.
- TZIN V & GALILI G (2010a). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. Molecular Plant **3**, 956–972.
- TZIN V & GALILI G (2010b). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. The Arabidopsis Book **8**, 132.
- UMBARGER HE & BROWN B (1958). Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VIII. The formation of acetolactate. The Journal of Biological Chemistry **233**, 1156–1160.
- UOTILA M, GULLNER G & KOMIVES T (1995). Induction of glutathione S-transferase activity and glutathione level in plants exposed to glyphosate. Physiologia Plantarum **93**, 689–694.



- VAN DER HOORN, RAL (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. Annual Review of Plant Biology **59**, 191–223.
- VAN DER HOORN, RAL, LEEUWENBURGH MA, BOGYO M, JOOSTEN MHAJ & PECK SC (2004). Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. Plant Physiology **135**, 1170–1178.
- VAN MOERKERCKE A, HARING MA & SCHUURINK RC (2011). The transcription factor EMISSION of BENZENOIDS II activates the MYB ODORANT1 promoter at a MYB binding site specific for fragrant petunias. Plant Journal **67**, 917– 928.
- VANLERBERGHE GC, DAY DA, WISKISH JT, VANLERBERGHE AE & MCINTOSH L (1995). Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria dependence on tricarboxylic-acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. Plant Physiology **109**, 353–361.
- VELDHUIS LJ, HALL LM, O'DONOVAN JT, DYER W & HALL JC (2000). Metabolismbased resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**, 2986–2990.
- VENCILL W, NICHOLS R, WEBSTER T & MOSS S (2014). 26th German Conference on Weed Biology and Weed Control, Braunschweig, Germany. Julius-Kühn-Archiv **443**, 45-51.
- VENCILL WK, NICHOLS RL, WEBSTER TM *et al.* (2012). Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. Weed Science **60**, 2–30.
- VENNAPUSA AR, FALECO F, VIEIRA B *et al.* (2018). Prevalence and mechanism of atrazine resistance in Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Nebraska. Weed Science **66**, 595–602.
- VERDONK JC (2005). ODORANT1 Regulates Fragrance biosynthesis in petunia flowers. the Plant Cell **17**, 1612–1624.
- VERLOOVE F & SÁNCHEZ GULLÓN E (2008). New records of interesting xenophytes in the Iberian Peninsula. Nuevas citas de xenófitos interesantes en la Península Ibérica. Acta Botanica Malacitana **33**, 147–167.



- VILA-AIUB MM, NEVE P & POWLES SB (2005). Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. New Phytologist **167**, 787–796.
- VILA-AIUB MM, NEVE P & POWLES SB (2009). Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. New Phytologist **184**, 751-767.
- VILA-AIUB MM, BALBI MC, DISTÉFANO AJ *et al.* (2012). Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. Pest Management Science **68**, 430–436.
- VILA-AIUB MM, GOH SS, GAINES T a *et al.* (2014). No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive *EPSPS* gene amplification in *Amaranthus palmeri*. Planta **239**, 793–801.
- VILA-AIUB MM, YU Q & POWLES SB (2019). Do plants pay a fitness cost to be resistant to glyphosate? New Phytologist **223**, 532-547.
- VITAL CE, GIORDANO A, ALMEIDA SOARES E DE *et al.* (2017). An integrative overview of the molecular and physiological responses of sugarcane under drought conditions. Plant Molecular Biology **94**, 577–594.
- VIVANCOS PD, DRISCOLL SP, BULMAN CA *et al.* (2011). Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. Plant Physiology **157**, 256–268.
- VOGT T (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. Molecular Plant 3, 2–20.
- VORSTER BJ, CULLIS CA & KUNERT KJ (2019). Plant vacuolar processing enzymes. Frontiers in Plant Science **10**, 479.
- VRBNIČANIN S, PAVLOVIĆ D & BOŽIĆ D (2017). Weed resistance to herbicides. In: Herbicide Resistance in Weeds and Crops.
- WAKELIN AM, LORRAINE-COLWILL DF & PRESTON C (2004). Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. Weed Research **44**, 453–459.

WAKELIN AM & PRESTON C (2006). A target-site mutation is present in a



glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. Weed Research **46**, 432–440.

- WARD SM, WEBSTER TM & STECKEL LE (2013). Palmer Amaranth (Amaranthus *palmeri*): a review. Weed Technology **27**, 12–27.
- WARWICK SI, XU R, SAUDER C & BECKIE HJ (2008). Acetolactate synthase target-site mutations and single nucleotide olymorphism genotyping in ALSresistant Kochia (*Kochia scoparia*). Weed Science **56**, 797–806.
- WEBSTER TM & COBLE HD (1997). Changes in the weed species composition of the southern United States: 1974 to 1995. Weed Technology **11**, 308–317.
- WEIL R (1982). Maize-weed competition and soil erosion in unweeded maize. Tropical Agriculture **59**, 207-213.
- WEINSTOCK O, SELLA C, CHIPMAN D & BARAK Z (1992). Properties of subcloned subunits of bacterial acetohydroxy acid synthases. Journal of Bacteriology 174, 5560–5566.
- WESTWOOD JH, CHARUDATTAN R, DUKE SO *et al.* (2018). Weed management in 2050: perspectives on the future of weed science. Weed Science **66**, 275–285.
- WHALEY CM, WILSON HP & WESTWOOD JH (2007). A new mutation in plant *ALS* confers resistance to five classes of herbicides. Weed Science **55**, 83–90.
- WHITAKER JR, BURTON JD, YORK AC, JORDAN DL & CHANDI A (2013). Physiology of glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) biotypes collected from North Carolina. International Journal of Agronomy **2013**, 1–6.
- WHITCOMB CE (1999). An introduction to ALS-inhibiting herbicides. Toxicology and Industrial Health **15**, 231–239.
- WHITE AD, OWEN MDK & CARDINA J (2002). Common sunflower resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. Weed Science **50**, 432–437.
- WIERSMA AT, GAINES TA, PRESTON C *et al.* (2015). Gene amplification of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. Planta **241**, 463–474.
- WINDELS P, TAVERNIERS I, DEPICKER A, BOCKSTAELE E VAN & LOOSE M DE (2001). Characterisation of the Roundup Ready soybean insert. European Food Research and Technology **213**, 107–112.



- WISE AM, GREY TL, PROSTKO EP, VENCILL WK & WEBSTER TM (2009). Establishing the geographical distribution and level of acetolactate synthase resistance of Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) accessions in Georgia. Weed Technology **23**, 214–220.
- WITTENBACH V & ABELL LM (1999). Inhibition of valine, leucine and isoleucine biosynthesis. In: Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology (ed BK. Singh), 385–416. New York (EE.UU.).
- WOLMARANS K & SWART WJ (2014). Influence of glyphosate, other herbicides and genetically modified herbicide-resistant crops on soil microbiota: a review. South African Journal of Plant and Soil **31**, 177–186.
- WOLSWINKEL P, AMMERLAAN A & PETERS HFC (1984). Phloem unloading of amino ccids at the site of attachment of *Cuscuta europaea*. Plant Physiology **75**, 13–20.
- WOODWORTH AR, BERNASCONI P, SUBRAMANIAN M V. & ROSEN BA (1996). A second naturally occurring point mutation confers broad-based tolerance to acetolactate synthase inhibitors. Plant Physiol. **111S**, 105.
- XING A & LAST RL (2017). A regulatory hierarchy of the arabidopsis branchedchain amino acid metabolic network. Plant Cell **29**, 1480–1499.
- YAMADA K, BASAK AK, GOTO-YAMADA S, TARNAWSKA-GLATT K & HARA-NISHIMURA I (2020). Vacuolar processing enzymes in the plant life cycle. New Phytologist **226**, 21–31.
- YANG Q, DENG W, LI X, YU Q, BAI L & ZHENG M (2016). Target-site and non-targetsite based resistance to the herbicide tribenuron-methyl in flixweed (*Descurainia sophia* L.). BMC Genomics **17**, 1–13.
- YANG X, BERES ZT, JIN L *et al.* (2017). Effects of over-expressing a native gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (*EPSPS*) on glyphosate resistance in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One **12**, e0175820.
- YU Q, ABDALLAH I, HAN H, OWEN M & POWLES S (2009). Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. Planta **230**, 713– 723.
- YU Q, CAIRNS A & POWLES S (2007). Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. Planta **225**, 499– 513.



- YU Q, HAN H, LI M, PURBA E, WALSH MJ & POWLES SB (2012). Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific *ALS* mutations. Weed Research **52**, 178–186.
- YU Q, HAN H & POWLES SB (2008). Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. Pest Management Science 64, 1229–1236.
- YU Q, HAN H, VILA-AIUB MM & POWLES SB (2010). AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. Journal of Experimental Botany **61**, 3925–3934.
- YU Q, JALALUDIN A, HAN H, CHEN M, DOUGLAS SAMMONS R & POWLES SB (2015). Evolution of a double amino acid substitution in the 5enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high level glyphosate resistance. Plant Physiology **167**, 1440–1447.
- YU Q & POWLES SB (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. Pest Management Science **70**, 1340–1350.
- YUAN JS, ABERCROMBIE LLG, CAO Y *et al.* (2010). Functional genomics analysis of Horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. Weed Science **58**, 109–117.
- YUAN JS, TRANEL PJ & STEWART CN (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. Trends in Plant Science **12**, 6–13.
- YUN M-S, YOGO Y, MIURA R, YAMASUE Y, FISCHER AJ & YUN M-S (2005). Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). Pesticide Biochemistry and Physiology 83, 107–114.
- ZABALZA A, ORCARAY L, GASTON S & ROYUELA M (2004). Carbohydrate accumulation in leaves of plants treated with the herbicide chlorsulfuron or imazethapyr is due to a decrease in sink strength. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**, 7601–7606.
- ZABALZA A, GONZÁLEZ EM, ARRESE-IGOR C & ROYUELA M (2005). Fermentative metabolism is induced by inhibiting different enzymes of the branchedchain amino acid biosynthesis pathway in pea plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**, 7486–7493.

ZABALZA A, GASTON S, RIBAS-CARBO M, ORCARAY L, IGAL M & ROYUELA M (2006).



Nitrogen assimilation studies using 15N in soybean plants treated with imazethapyr, an inhibitor of branched-chain amino acid biosynthesis. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**, 8818–8823.

- ZABALZA A, GASTON S, SANDALIO LM, RÍO LA DEL & ROYUELA M (2007). Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. Environmental and Experimental Botany **59**, 150–159.
- ZABALZA A, GÁLVEZ L, MARINO D, ROYUELA M, ARRESE-IGOR C & GONZÁLEZ EM (2008). The application of ascorbate or its immediate precursor, galactono-1,4lactone, does not affect the response of nitrogen-fixing pea nodules to water stress. Journal of Plant Physiology **165**, 805–12.
- ZABALZA A, ORCARAY L, IGAL M *et al.* (2011). Unraveling the role of fermentation in the mode of action of acetolactate synthase inhibitors by metabolic profiling. Journal of Plant Physiology **168**, 1568–1575.
- ZABALZA A, ZULET A, GIL-MONREAL M, IGAL M & ROYUELA M (2013). Branched-chain amino acid biosynthesis inhibitors: herbicide efficacy is associated with an induced carbon-nitrogen imbalance. Journal of Plant Physiology **170**, 814–21.
- ZABALZA A, ORCARAY L, FERNÁNDEZ-ESCALADA M, ZULET-GONZÁLEZ A & ROYUELA M (2017). The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. Pesticide Biochemistry and Physiology **141**, 96–102.
- ZAGORCHEV L, SEAL CE, KRANNER I & ODJAKOVA M (2013). A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. International Journal of Molecular Sciences **14**, 7405–7432.
- ZAMYATNIN AA (2015). Plant proteases involved in regulated cell death. Biochemistry **80**, 1701–1715.
- ZHANG C, PANG Q, JIANG L *et al.* (2015). Dihydroxyacid dehydratase is important for gametophyte development and disruption causes increased susceptibility to salinity stress in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **66**, 879–888.
- ZHANG Q, LI W, YANG J, XU J, MENG Y & SHAN W (2020). Two *Phytophthora parasitica* cysteine protease genes, PpCys44 and PpCys45, trigger cell death in various *Nicotiana* spp. and act as virulence factors. Molecular Plant Pathology **21**, 541–554.



- ZHAO J & LAST RL (1996). Physiologists coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in Arabidopsis. Plant Cell **8**, 2235–2244.
- ZHAO J, LAST RL & WILLIAMS CC (1998). Induction of Arabidopsis tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. Plant Cell **10**, 359–370.
- ZHAO N, LI W, BAI S *et al.* (2017). Transcriptome profiling to identify genes involved in mesosulfuron-methyl resistance in *Alopecurus aequalis*. Frontiers in Plant Science **8**, 1–16.
- ZHAO N, YAN Y, LUO Y, ZOU N, LIU W & WANG J (2019). Unravelling mesosulfuronmethyl phytotoxicity and metabolism-based herbicide resistance in *Alopecurus aequalis*: insight into regulatory mechanisms using proteomics. Science of the Total Environment **670**, 486–497.
- ZHOU Q, LIU W, ZHANG Y & LIU KK (2007). Action mechanisms of acetolactate synthase inhibiting herbicides. Pesticide Biochemistry and Physiology **89**, 89–96.
- ZHU J, PATZOLDT WL, SHEALY RT, VODKIN LO, CLOUGH SJ & TRANEL PJ (2008). Transcriptome response to glyphosate in sensitive and resistant soybean. Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**, 6355–6363.
- ZHU X & GALILI G (2003). Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in Arabidopsis seeds. The Plant Cell 15, 845–853.
- ZINELLU A, SOTGIA S, POSADINO AM *et al.* (2005). Highly sensitive simultaneous detection of cultured cellular thiols by laser induced fluorescence capillary electrophoresis. Electrophoresis **26**, 1063–1070.
- ZISKA LH, BLUMENTHAL DM, RUNION GB, HUNT ER & DIAZ-SOLTERO H (2011). Invasive species and climate change: an agronomic perspective. Climatic Change **105**, 13–42.
- ZOBIOLE LHS, KREMER RJ, OLIVEIRA RS & CONSTANTIN J (2011). Glyphosate affects microorganisms in rhizospheres of glyphosate resistant soybeans. Journal of Applied Microbiology **110**, 118–127.
- ZULET-GONZÁLEZ A, BARCO-ANTOÑANZAS M, GIL-MONREAL M, ROYUELA M & ZABALZA A (2020). Increased glyphosate-induced gene expression in the shikimate



pathway is abolished in the presence of aromatic amino acids and mimicked by shikimate. Frontiers in Plant Science **11**, 459.

- ZULET A, GIL-MONREAL M, VILLAMOR JG, ZABALZA A, VAN DER HOORN, RAL & ROYUELA M (2013). Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. PLoS ONE **8**, e73847.
- ZULET A, GIL-MONREAL M, ZABALZA A, DONGEN JT VAN & ROYUELA M (2015). Fermentation and alternative oxidase contribute to the action of amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. Journal of Plant Physiology **175**, 102–112.

OTRAS FUENTES CONSULTADAS:

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) https://gd.eppo.int/

International Survey of Herbicide Resistant Weeds

http://www.weedscience.org/Home.aspx

Herbicide Resistance Action Committee (HRAC)

https://www.hracglobal.com/

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA)

https://www.mapa.gob.es/es/

Weed Science Society of America (WSSA)

https://wssa.net





Anexos

ANEXOS







Figura 1. Suplementaria. Clasificación del modo de acción HRAC 2021.



Anexos

Tabla 1. Suplementaria. Caracterización de la resistencia a P en los individuos de la población RM. Los datos sobre las mutaciones se obtuvieron a partir de la secuenciación de los individuos, los datos sobre los genotipos, se obtuvieron a partir del ensayo dCAPS desarrollado para las sustituciones A122T, S653N/T y W574L en el gen *ALS* y los datos de los FR, I₅₀, R², se obtuvieron a partir las curvas de actividad enzimática. Los resultados se presentan en función del tipo de mutación. Las líneas – en la columna genotipo indican los individuos en los que no se realizó el ensayo dCAPS.

Individuo RM	Tipo de mutación	Mutación	Genotipo	FR	R ²	I50
85	SIMPLE	W574L	RS	2,2	0,642	0,08
72		W574L	RS	28,4	0,758	1,1
87		W574L	RS	40,4	0,83	1,8
66		W574L	RS	61,7	0,910	2,35
107		W574L	RS	144,3	0,770	5,49
44		W574L	-	363,5	0,873	13,82
25		W574L	RS	521,8	0,814	19,85
28		W574L	RS	573,7	0,856	21,82
61		W574L	RS	591,2	0,942	22,49
89	SIMPLE	S653N	RR	3,23	0,850	0,12
88		S653N	RR	3,41	0,678	0,13
1		S653N/T	-	5,2	0,924	0,48
45		S653N	-	7,87	-	-
101		S653N	RR	7,87	0,934	0,30
51		S653N	RR	8,29	0,951	0,32
86		S653N	RR	11,33	0,848	0,4
6		S653N/T	-	11,6	0,96	1,1
73		S653N	RR	36,84	0,862	1,4
77		S653N	RR	195,67	0,763	7,44
27	SIMPLE	A122T	RS	4,98	0,915	0,19
80		A122T	RS	9,44	0,719	0,36
76		A122T	RS	250,91	0,651	9,54


Anexos

29		W574L+S653N	RS+RS	97,31	0,940	3,70
19	DOBLE	W574L+S653N	RS+RS	109,40	0,964	4,16
18		W574L+S653N	RS+RS	119,19	0,956	4,53
56		W574L+S653N	-	380,75	0,976	14,48
46		W574L+S653N	-	426,20	0,875	16,21
60		W574L+S653N	RS+RS	476,30	0,960	18,12
63		W574L+A122T	RS+RS	>500	0,845	48,29
112		W574L+A205D	RS+ -	>500	0,790	147,86





