



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Análisis del surgimiento de la resistencia a glifosato en *Sorghum halepense* en Argentina

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. María Noelia Ulrich

Directora de tesis: Dra. Daniela Tosto

Consejera de Estudios: Dra. Viviana Confalonieri

Instituto de Biotecnología CICVyA, CNIA, INTA
Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo, UEDD - INTA-CONICET)
Buenos Aires 2022

Resumen

Análisis del surgimiento de la resistencia a glifosato en *Sorghum halepense* en Argentina

La adopción de cultivos genéticamente modificados se ha desarrollado de forma creciente y continua desde 1996, en el año 2019 la superficie sembrada fue de 190 millones de hectáreas en 29 países, de los cuales Argentina ocupa actualmente el tercer lugar con 24 millones de hectáreas; siendo la característica predominante la tolerancia a herbicidas.

Los herbicidas constituyen una manera efectiva, eficiente y económica de controlar las malezas. El glifosato elimina de manera eficiente y no selectiva a todas las plantas herbáceas, su mecanismo de acción es competir con el fosfoenolpiruvato, que es el sustrato de la enzima 5-enolpiruvato shikimato-3-fosfosintasa (EPSPS) por el sitio activo de la enzima, resultando en la inhibición de la vía del shikimato; los productos de esta vía incluyen aminoácidos aromáticos esenciales como el triptófano, tirosina y fenilalanina y otros productos metabólicos importantes.

Una de las principales malezas, registrada en 53 países es el sorgo de Alepo (*Sorghum halepense* L. Persoon); es una especie gramínea perenne, alotetraploide de la familia Poaceae; la misma fue introducida en Argentina a principios del siglo pasado con el objetivo de ser utilizada como forrajera. Dado su carácter de planta invasora fue declarada plaga de la agricultura en 1930. La utilización del glifosato como herbicida no selectivo post-emergente en conjunto con la siembra directa y los cultivos transgénicos resistentes a glifosato disminuyó la aparición de *S. halepense* en los sistemas de cultivo argentinos desde 1996. Sin embargo, en Salta se reportó la aparición de sorgo de Alepo resistente a glifosato en 2002, y fue confirmado en el año 2005. La aparición de estos eventos de resistencia dificulta el manejo de los cultivos y su rendimiento generando pérdidas de productividad, aumentando el volumen de herbicida utilizado para poder controlar las malezas.

El objetivo del presente trabajo es el análisis de la variabilidad genética para establecer el origen de la resistencia y el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a glifosato en *S. halepense*.

Cuando comenzaron los primeros reportes de resistencia y se esparcieron a lo largo del país, surgió la necesidad de establecer el origen único o múltiple de la resistencia a glifosato. Con este fin se transfirieron y sistematizaron marcadores moleculares del tipo microsatélite para poder establecer la similitud genómica de los ejemplares resistentes, el presente análisis corroboró el origen múltiple de la resistencia a glifosato. Se realizaron ensayos de ddRADseq que permitieron identificar marcadores del tipo SSR y SNP especie específicos.

Las malezas pueden sobrevivir a las aplicaciones de herbicidas debido a una variedad de mecanismos que pueden ser divididos en dos amplias categorías: asociados al sitio blanco y no asociados al sitio blanco. Los mecanismos asociados al sitio blanco frecuentemente involucran mutaciones en los genes que codifican las enzimas blanco del herbicida o el incremento de la enzima ya sea por duplicación génica o aumento de la expresión, mientras que los mecanismos no asociados al sitio blanco incluyen absorción o traslocación reducida, transporte vacuolar o degradación metabólica del herbicida.

Se realizaron estudios para analizar los diferentes mecanismos moleculares reportados como responsables de otorgar resistencia, mediante secuenciación, PCR cuantitativa y secuenciación de ARN. En cuanto al estudio de los mecanismos asociados al sitio blanco, no se observaron sustituciones en el sitio P106 ó T102 en los biotipos analizados, pero si se observó diferencias en el número de copias genómicas y en los niveles de expresión cuantificados por PCR cuantitativa en algunos de los biotipos. Se realizó la validación de genes de referencia de manera de contar con genes de referencia estables para el sorgo de Alepo bajo tratamiento de glifosato. En cuanto a los mecanismos no asociados al sitio blanco se analizaron por PCR cuantitativa los niveles de expresión de genes transportadores del tipo ABC y de genes de detoxificación como el Citocromo P-450 y Glutathion S Transferasa, se observó variabilidad en los niveles de expresión entre los diferentes biotipos en los genes evaluados. Dado que los mecanismos NTSR son complejos y pueden involucrar varias familias de genes, la identificación de las causas moleculares de la resistencia se vuelve compleja, por lo que la técnica de RNAseq provee la comparación del transcriptoma completo de los biotipos resistentes versus los susceptibles y así poder identificar diferencias en la expresión génica que sea indicadora de los genes involucrados en la resistencia, para ello se analizó un biotipo susceptible y uno resistente, entre los genes diferencialmente expresados se encontraron Citocromos P450 y transportadores del tipo ABC. A partir de los resultados obtenidos se observó que habría distintos mecanismos involucrados en la resistencia tanto asociados al sitio blanco como no asociados al sitio blanco dependiendo del biotipo en estudio.

Estos resultados servirán de aporte para la comprensión de los mecanismos relacionados con la resistencia y así poder establecer prácticas agronómicas capaces de retrasar la aparición de la misma. Lo cual permitirá ampliar la durabilidad en el tiempo de las plataformas tecnológicas organismo genéticamente modificado- herbicida y evitar el aumento de uso del herbicida. Este trabajo a la vez provee de herramientas para los organismos de control y regulación para establecer Políticas Públicas.

Palabras Clave: Malezas – Resistencia a herbicidas – Glifosato – Sorgo de Alepo

Abstract

Analysis of the emergence of glyphosate resistance in *Sorghum halepense* in Argentina

The adoption of genetically modified crops has developed increasingly and continuously since 1996, in 2019 the area planted was 190 million hectares in 29 countries, of which Argentina is currently in third place with 24 million hectares.

Herbicides are the most effective, efficient and economical way to control weeds. glyphosate efficiently and non-selectively kills all herbaceous plants, its mechanism of action is to compete with phosphoenolpyruvate, which is the substrate of the enzyme 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) for the active site of the enzyme, resulting in inhibition of the shikimate pathway; the products of this pathway include essential aromatic amino acids such as tryptophan, tyrosine and phenylalanine and other important metabolic products.

One of the main weeds registered in 53 countries is Johnsongrass (*Sorghum halepense* L. Persoon); it is a perennial, allotetraploid grass species of the Poaceae family; it was introduced in Argentina at the beginning of the last century with the aim of being used as a fodder crop. Due to its invasive nature, it was declared an agricultural pest in 1930. The use of glyphosate as a non-selective post-emergent herbicide together with no-tillage and glyphosate-resistant transgenic crops has reduced the occurrence of *S. halepense* in Argentinean cropping systems since 1996. However, in Salta, the occurrence of glyphosate resistant Johnsongrass was reported in 2002 and confirmed in 2005. The emergence of these resistance events hinders crop management and yields, leading to productivity losses.

The aim of the present work is the analysis of genetic variability to establish the origin of resistance and the study of the molecular mechanisms involved in glyphosate resistance in *Sorghum halepense*.

When the first reports of resistance started and spread throughout the country, the need arose to establish the single or multiple origin of glyphosate resistance. To this end, microsatellite-type molecular markers were transferred and systematised to establish the genomic similarity of the resistant specimens, and this analysis revealed the multiple origin of glyphosate resistance.

Weeds can survive herbicide applications through a variety of mechanisms that can be divided into two broad categories: target site-associated and non-target site-associated. Target site-associated mechanisms often involve mutations in genes encoding herbicide target enzymes or enzyme upregulation either by gene duplication or increased expression, while non-target site-

associated mechanisms include reduced uptake or translocation, vacuolar transport or metabolic degradation of the herbicide.

Studies were carried out to test the different molecular mechanisms reported to be responsible for conferring resistance, using sequencing, quantitative PCR and RNA sequencing. Regarding the study of the mechanisms associated with the target site, no substitutions were observed in the P106 or T102 site in the biotypes analysed, but differences were observed in the number of genomic copies and in the levels of expression quantified by quantitative PCR in some of the biotypes; the validation of reference genes was carried out in order to have stable reference genes for sorghum Aleppo under glyphosate treatment. Regarding the mechanisms not associated with the target site, the expression levels of ABC type transporter genes and detoxification genes such as Cytochrome P-450 and Glutathione S Transferase were analysed by quantitative PCR; variability was observed in the expression levels between the different biotypes in the genes evaluated. Since NTSR mechanisms are complex and can involve several gene families, the identification of the molecular causes of resistance becomes complex, so the RNAseq technique can provide the comparison of the complete transcriptome of resistant versus susceptible biotypes and thus potentially identify differences in gene expression that is indicative of the genes involved in resistance, for this a susceptible and a resistant biotype were analysed, among the differentially expressed genes were found Cytochromes P450 and ABC transporters. From the results obtained, it was observed that there were different mechanisms involved in resistance, both associated with the target site and not associated with the target site, depending on the biotype under study.

These results will help to understand the mechanisms related to resistance and thus be able to establish agronomic practices capable of delaying the appearance of resistance. This will make it possible to extend the durability over time of the genetically modified organism-herbicide technology platforms and avoid an increase in the use of the herbicide. This work also provides tools for control and regulatory bodies to establish public policies.

Key Words: Weeds – Herbicide Resistance– Glyphosate - Johnsongrass

Agradecimientos

Esta pequeña colección de hojas es fruto mucho trabajo que no fue únicamente mío, la colaboración y el apoyo en una amplia variedad de aspectos algunos de los cuales tuvieron inicio mucho antes de comenzar con esta tesis.

Agradecer a INTA por la beca de formación para poder desarrollar este trabajo y al Instituto de Biotecnología ahora IABIMO y sus directivos por permitirme desarrollar esta Tesis y por poner a disposición los materiales e instalaciones de los laboratorios.

A mi directora Daniela por seleccionarme y aceptarme en su grupo de trabajo, por abrirme las puertas y dejarme ser en el laboratorio, por el apoyo incondicional tanto profesional como humano que me ayudaron a desarrollar los desafíos científicos y sobrellevar los de la vida misma día a día y ante todo siempre priorizar el bienestar con comprensión y cariño, eso realmente fue importante.

A Susana y Marisa que fueron de gran apoyo, ya sea para la discusión de resultados, el acompañamiento día a día y al compartir oficina con Daniela, escuchar las infinitas charlas de trabajo que teníamos, gracias por la paciencia.

A la Unidad de Genómica del IB y todos sus miembros, Andrea, Veronica, Marianne y Pablo, porque sin ellos gran parte de los ensayos presentados no habrían sido posibles, por la paciencia y el asesoramiento científico, MUCHÍSIMAS gracias.

A Agustín, Matías y Nacho por la ayuda en el invernáculo para el mantenimiento de las plantas y los ensayos.

A mis compañeros de laboratorio, Pame, Cintia, Nati, Gabi, Martin, Flavia, Laura, Ale, Gabi C y Flor por compartir el día a día.

A todos los chicos del locutorio, los actuales y los que han evolucionado, por los mates compartidos y los desayunos.

A Ale por ser mi compañera de grupo de plagas y malezas, soportar todas las descongeladas de freezer, las charlas circulares de resultados y viajes diarios al ACRI.

Al gran grupo de apoyo, Lau, Fla, Moni, Nati, Pame y Carli; por dejarme compartir con ustedes tantos momentos valiosos de amistad que fueron más allá de lo laboral, ser terapistas y brindar aliento continuo en cada uno de los altibajos y compartir las alegrías de logros, creo que no hubiera llegado hasta acá sin su ayuda, MILLÓN DE GRACIAS.

A Carla por la ayuda y paciencia con el análisis de GBS.

A Gabriel por la ayuda y paciencia con el análisis de datos poblacionales con R.

A Diego Lijavetzky por la ayuda en el análisis bioinformático de los datos del RNAseq.

A Esteban Muñiz por las muestras de Alepo y el asesoramiento en las técnicas de aplicación.

A los que son y han sido mi línea de base desde un principio...

A mis viejos y mi hermano que bancaron la loca idea de que estudiara ciencia, a mamá que no está para verla terminada pero seguro en algún lugar del universo está disfrutándolo, por las tantas horas de escucharme hablar de biología molecular con total interés, cual niña diciendo la lección, esto es en gran parte tuyo por enseñarme a leer, estudiar y que el esfuerzo y la práctica continua te llevan al éxito, muchas gracias se te extraña un montón.

A Diego mi amor, esposo y compañero, por elegirme y bancarme día a día desde hace 19 años, por suerte compartimos este gusto loco por la ciencia, lo que lleva a discutir en casa como analizar experimentos, como escribir, corregir manuscritos y presentaciones.

A Basti mi vida, alma y corazón por soportar con la entereza de sus pocos años el tener que compartir la atención de su mamá con una tesis doctoral.

A mis suegros Vivi y Miguel por quererme como una hija, por ser la red de contención y estar siempre con una mano extendida y a veces también en esa mano un vaso de cerveza fría para compartir.

A mis cuñados por interesarse, por qué crecimos juntos y me convirtieron en una tía feliz de Mile, Biancu, Lucho, Ame y Lauti, a Pau por prestar las orejas infinitas veces.

A Ricardo por ser el ejemplo de voluntad y disciplina y por qué, junto con Carina, Nano y Celes son esa familia que se elige tener.

Una mención especial para mi Celes, la hermanita menor que me regalo el destino, se coló en mi vida desde pijoito y se instaló para siempre, gracias por ser de fierro como pocas e incondicional y a Luciano ... bendita sea tu paciencia.

A Mony mi mejor amiga de toda la vida, crecimos juntas, lejos o cerca estamos siempre ahí compartiendo y ahora también vemos crecer a nuestros retoños juntos como alguna vez imaginamos y hacerme madrina de Pauli un hermoso regalo de la vida juntas que tenemos.

"Ningún humano es una isla" es por eso que les agradezco a todos los mencionados y a los que quizás he olvidado también porque por ayuda de ustedes he llegado a la finalización de este trabajo.

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en:

Ulrich, M.N.; Muñiz-Padilla, E.; Corach, A.; Hopp, E.; Tosto, D. Validation of Reference Genes for Quantitative PCR in Johnsongrass (*Sorghum halepense* L.) under Glyphosate Stress. *Plants* **2021**, *10*, 1555. <https://doi.org/10.3390/plants10081555>

Ulrich M.N., E. Muñiz Padilla, A. Corach, H.E. Hopp, D. Tosto. Análisis de la expresión diferencial de transportadores del tipo ABC en sorgo de alepo (*Sorghum halepense* L.) resistente a glifosato L Congreso Argentino de Genética y II Jornadas Regionales SAG-NEA. Modalidad híbrida. 2 al 5 de octubre 2022. Modalidad de presentación: póster. Publicado en la revista: BAG I Journal of Basic and Applied Genetics.

Ulrich M.N., E. Muñiz Padilla, A. Corach, H.E. Hopp, D. Tosto. Validación de genes de referencia para qPCR en sorgo de Alepo resistente a glifosato. XLVIII Congreso Argentino de genética. Modalidad virtual. 24 al 26 de septiembre 2020. Modalidad de presentación: póster. Publicado en la revista: BAG I Journal of Basic and Applied Genetics I Vol XXXI Suppl. (1); pag 118

Ulrich, N.; Gutiérrez, A.; Filippi, C.; Aguirre, N.; Muñiz, E.; Hopp, E. y Tosto, D. Análisis molecular de resistencia a glifosato en el sorgo de Alepo. II Congreso de Malezas- ASACIM. 5 y 6 de junio 2018. Rosario, Sante Fe. Argentina. Expositor de póster. Publicado en <http://www.malezas2018.com.ar/actas-malezas2018.pdf>. Sección Malezas problemáticas: 227

Ulrich, N.; Gutiérrez, A.; Filippi, C.; Aguirre, N.; Hopp, E. y Tosto, D. Desarrollo de marcadores moleculares mediante GBS ddRAD en sorgo de alepo. XLVI Congreso Argentino de Genética IV Jornada Regional NOA. Catamarca. Sociedad Argentina de Genética. 1 al 4 de octubre 2017. San Fernando del Valle de Catamarca, Catamarca. Argentina. Expositor de poster. Publicado en http://www.sag.org.ar/sitio/wp-content/uploads/2015/10/V.XXIX_2017_Suppl1.pdf. Sección genómica y genética molecular: 142. ISSN: 1852-6233

Ulrich, N.; Peluffo, L.; Fernández, L.; De Haro, L.; Papa, JC; Olea, I.; Hopp, E. y Tosto, D. Análisis molecular de la resistencia a glifosato en *Sorghum halepense* (L.) Pers. XXII Congreso de la ALAM I Congreso de la ASACIM. 9 y 10 de septiembre 2015. Palais Rouge – CABA, Buenos Aires. Expositor de póster. Publicado en: <http://www.asacim.com.ar/congreso/pdf/RH.EP.21Ulrichb.pdf>

Noelia Ulrich, L Fernández, L de Haro L, JC Papa, I Olea, HE Hopp, D Tosto. Estudios moleculares en Sorgo de Alepo resistente a glifosato. 5° Congreso Nacional e Internacional de Agrobiotecnología, Propiedad Intelectual y Políticas Públicas. Paraná, Entre ríos Argentina, 28-29 de agosto 2014.

Ulrich, N.; Fernández, L.; De Haro, L.; Papa, JC.; Olea, I.; Hopp, E. y Tosto, D. Análisis de la mutación del sitio 106 de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) en *Sorghum halepense* resistente a glifosato. VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de biotecnología. 18 al 22 de noviembre de 2013. NH Gran Hotel Mar del Plata. Mar del Plata; Argentina. Expositor de póster. Publicado en: <http://redbioargentina2013.com.ar/website/menu-principal/acceso-a-los-resumenes/>

Ulrich, N.; Fernández, L.; De Haro, L.; Papa, JC.; Olea, I.; Hopp, E. y Tosto, D. Monitoreo del surgimiento de la resistencia a glifosato en la maleza *Sorghum halepense*. XLII Congreso Argentino de Genética. III Reunión Regional SAG-NOA. 20 al 23 de octubre. Centro de Convenciones Salta S.E. 2013. Expositor de póster. Publicado en: Journal of Applied Genetics. Suppl. Vol XXIV (1) 2013. Sección genética de poblaciones y evolución: 197. ISSN: 1852-6233

Índice

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS	6
ÍNDICE.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ÍNDICE DE TABLAS.....	18
ABREVIATURAS	20
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	22
SITUACIÓN GLOBAL DE LOS ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN EL MUNDO.....	22
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN ARGENTINA	26
MALEZAS Y HERBICIDAS	27
GLIFOSATO	29
RESISTENCIA A HERBICIDAS	31
MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS HERBICIDAS.	36
<i>Mecanismos TSR</i>	38
Mutaciones sitio blanco	38
Mecanismos de duplicación génica.....	38
<i>Mecanismos NTSR</i>	40
Absorción reducida	40
Translocación reducida y resistencia metabólica.....	40
El fenómeno “fénix”.	42
Otros mecanismos metabólicos	42
Influencia de los factores ambientales en los mecanismos NTSR	43
RESISTENCIA A GLIFOSATO.....	43
<i>SORGHUM HALEPENSE</i>	47
HIPÓTESIS	53
OBJETIVO	54
OBJETIVOS PARTICULARES	54
CAPÍTULO 1:.....	55
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE SORGO DE ALEPO RESISTENTE A GLIFOSATO.	55
INTRODUCCIÓN	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59

<i>Análisis genético mediante marcadores moleculares microsatélites</i>	59
Material vegetal	59
PCR de los marcadores microsatélites	61
Análisis genético con los marcadores microsatélites	62
<i>Análisis genético por genotipificación por secuenciación (GBS)</i>	64
<i>Protocolo de ddRADseq</i>	64
<i>Análisis de los datos de ddRADseq</i>	66
RESULTADOS	68
<i>Análisis de los marcadores microsatélites</i>	68
<i>Análisis de GBS</i>	71
DISCUSIÓN	79
CAPÍTULO 2:	83
VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA PARA SU USO EN PCR CUANTITATIVA.	83
INTRODUCCIÓN	83
MATERIALES Y MÉTODOS	84
<i>Material vegetal</i>	84
<i>Ensayo de aplicación del herbicida</i>	85
<i>Extracción de ARN y síntesis del ADNc</i>	87
<i>Selección de genes de referencia y diseño de oligonucleótidos</i>	88
<i>Ensayo de qPCR</i>	90
<i>Análisis de datos para la estabilidad de la expresión de los genes de referencia</i>	90
RESULTADOS	91
<i>Verificación del fenotipo de los biotipos</i>	91
<i>Especificidad de los oligonucleótidos</i>	92
<i>Análisis de la estabilidad de los genes mediante diferentes métodos</i>	95
Análisis mediante geNorm	95
Análisis mediante NormFinder	96
Análisis mediante BestKeeper	96
Análisis mediante el método del ΔC_t	97
Comparación de datos mediante la plataforma web RefFinder	97
DISCUSIÓN	98
CAPÍTULO 3:	100
MECANISMOS ASOCIADOS AL SITIO BLANCO. SECUENCIACIÓN EPSPS. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS GENÓMICAS Y DE LA EXPRESIÓN DE ARNM DEL GEN EPSPS POR QPCR.	100
INTRODUCCIÓN	100
MATERIALES Y MÉTODOS	102
<i>Material vegetal</i>	102

Análisis de las mutaciones en la EPSPS.....	103
Muestras analizadas a partir de ADN genómico:	103
Muestras analizadas a partir de ADNc	104
Análisis de amplificación génica y sobreexpresión de la EPSPS.....	105
Material vegetal.....	105
Obtención de ARN/ADNc	105
Selección de genes y diseño de oligonucleótidos	105
Ensayo de PCR cuantitativa (qPCR).....	106
Análisis de datos de la expresión diferencial del gen de la EPSPS.....	107
RESULTADOS.....	107
Análisis de las secuencias.....	107
Especificidad y calibración de los iniciadores.....	111
Cuantificación del número de copias genómicas por qPCR.....	112
Análisis de la expresión de la EPSPS.....	113
DISCUSIÓN	114
CAPÍTULO 4:.....	117
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES	117
INTRODUCCIÓN	117
MATERIALES Y MÉTODOS	119
Material vegetal	119
Ensayo de aplicación del herbicida	119
Extracción de ARN:.....	119
Selección de genes y diseño de oligonucleótidos	120
Calibración de oligonucleótidos y evaluación de la expresión diferencial	121
Análisis de datos de la expresión diferencial de los genes transportadores.....	122
RESULTADOS.....	123
Respuesta a la Aplicación del herbicida	123
Diseño de oligonucleótidos y calibración	123
Análisis de expresión diferencial.....	126
DISCUSIÓN	131
CAPÍTULO 5:.....	136
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE SORGO DE ALEPO RESISTENTE A GLIFOSATO	136
INTRODUCCIÓN	136
MATERIALES Y MÉTODOS	138
Material vegetal y preparación de muestras.....	138
Construcción de las genotecas y secuenciación del ARN	138

<i>Ensamblado de transcritos e identificación</i>	<i>139</i>
<i>Análisis de expresión diferencial</i>	<i>139</i>
RESULTADOS.....	140
<i>Análisis de la expresión diferencial</i>	<i>140</i>
DISCUSIÓN	151
CONCLUSIONES.....	157
REFERENCIAS	160
ANEXOS	178

Índice de figuras

FIGURA I. 1. AUMENTO DEL ÁREA SEMBRADA CON OGM ALREDEDOR DEL MUNDO 1996 A 2017.	23
FIGURA I. 2. PAÍSES QUE CULTIVARON OGM EN 2019.	23
FIGURA I. 3. ÁREA GLOBAL DE OGM POR CULTIVO.	25
FIGURA I. 4. ÁREA GLOBAL DE CULTIVOS OGM POR CARACTERÍSTICA.	25
FIGURA I. 5. PRINCIPALES PAÍSES QUE SIEMBRAN OGM Y SU TASA DE ADOPCIÓN.	25
FIGURA I. 6. CULTIVOS OGM EN ARGENTINA CAMPAÑA 2020/2021.	26
FIGURA I. 7. CLASIFICACIÓN DE LOS HERBICIDAS EN FUNCIÓN DE SU MECANISMO DE ACCIÓN.	28
FIGURA I. 8. VÍA DEL SHIKIMATO, SITIO DE ACCIÓN DEL GLIFOSATO.	31
FIGURA I. 9. PASO DE SÍNTESIS INHIBIDO POR EL GLIFOSATO.	31
FIGURA I. 10. SELECCIÓN DE INDIVIDUOS RESISTENTES AL HERBICIDA TRAS SUCESIVAS APLICACIONES DEL MISMO MODO DE ACCIÓN.	32
FIGURA I. 11. MAPA MUNDIAL DE CASOS DE RESISTENCIA REPORTADOS.	33
FIGURA I. 12. CRECIMIENTO DE LOS CASOS DE MALEZAS RESISTENTES.	33
FIGURA I. 13. AUMENTO DE NÚMERO DE CASOS DE RESISTENCIA POR MODO DE ACCIÓN.	34
FIGURA I. 14. GRÁFICO DE RESISTENCIAS ACUMULADAS EN ARGENTINA POR ESPECIES DE MALEZAS Y MODOS DE ACCIÓN.	35
FIGURA I. 15. GRÁFICO DE RESISTENCIAS ACUMULADAS EN ARGENTINA.	35
FIGURA I. 16. MALEZAS CON MAYOR AVANCE GEOGRÁFICO.	36
FIGURA I. 17. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS HERBICIDAS.	37
FIGURA I. 18. MECANISMOS NTSR.	37
FIGURA I. 19. ESQUEMA DEL PROCESO DE DETOXIFICACIÓN EN 4 PASOS.	41
FIGURA I. 20. ESQUEMA DEL METABOLISMO DEL HERBICIDA EN UNA CÉLULA VEGETAL.	41
FIGURA I. 21. MAPA DE MALEZAS DE RESISTENCIA A GLIFOSATO.	44
FIGURA I. 22. NÚMERO DE ESPECIES RESISTENTES POR MODO DE ACCIÓN.	45
FIGURA I. 23. AUMENTO DEL NÚMERO DE ESPECIES DE MALEZAS RESISTENTES A GLIFOSATO.	46
FIGURA I. 24. EVOLUCIÓN INTERANUAL DE LAS 10 MALEZAS CON MAYOR PRESENCIA GEOGRÁFICA EN EL TERRITORIO ARGENTINO.	46

FIGURA I. 25. MUTACIONES EN LA ESTRUCTURA DE LA EPSPS DE <i>C. SUMATRENSIS</i> (A) Y <i>E. INDICA</i> (B).	48
FIGURA I. 26. IMAGEN DE SORGO DE ALEPO.	48
FIGURA I. 27. IMAGEN TAXONÓMICA (JOHNSONGRASS - <i>SORGHUM HALEPENSE</i>)	49
FIGURA I. 28. ÁREAS DEL NORTE Y CENTRO DE ARGENTINA CONFIRMADAS CON SORGO DE ALEPO EN 2008.	50
FIGURA I. 29. EVOLUCIÓN DEL ÁREA AFECTADA POR LOS BIOTIPOS RESISTENTES DE LAS 10 PEORES MALEZAS EN ARGENTINA.	51
FIGURA I. 30. EVOLUCIÓN DE LOS DEPARTAMENTOS AFECTADOS POR <i>S. HALEPENSE</i> DE 2013 A 2021.	52
FIGURA 1. 1 ESQUEMA DEL ANÁLISIS CON MARCADORES MICROSATÉLITES	58
FIGURA 1. 2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 0,8% DE LAS EXTRACCIONES DE ADN DE 8 BIOTIPOS DE SORGO DE ALEPO.	61
FIGURA 1. 3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2% DE LAS AMPLIFICACIONES DEL <i>LOCUS</i> XTXP123 DE 14 INDIVIDUOS ANALIZADOS <i>DE NOVO</i> .	62
FIGURA 1. 4. ESQUEMA GENERAL DE LA GENERACIÓN DE LA GENOTECA OBTENIDA CON PROTOCOLO OPTIMIZADO DE DDRADSEQ.	65
FIGURA 1. 5 . RESUMEN DEL PROTOCOLO DDRADSEQ APLICADO	68
FIGURA 1. 6. DENDROGRAMA DE BIOTIPOS DE <i>SORGHUM HALEPENSE</i> .	69
FIGURA 1. 7. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES DE LOS INDIVIDUOS ANALIZADOS CON 12 MARCADORES MICROSATÉLITES.	70
FIGURA 1. 8 . DISTRIBUCIÓN DE LOS MARCADORES SNP EN LOS DIFERENTES CROMOSOMAS DEL GENOMA <i>SORGHUM BICOLOR</i> UTILIZADO COMO REFERENCIA.	72
FIGURA 1. 9. CLASES DE SUSTITUCIONES OBSERVADAS EN LOS SNP DE LOS BIOTIPOS DE SORGO DE ALEPO	72
FIGURA 1. 10. FRECUENCIA DE LOS MOTIVOS SSR MAPEADOS	72
FIGURA 1. 11. FRECUENCIA DE LOS MOTIVOS DINUCLEÓTIDOS	73
FIGURA 1. 12. GEL DE AGAROSA 2 % DE 8 MARCADORES SSR OBTENIDOS A PARTIR DE GBS ANALIZADOS SOBRE EL BIOTIPO ERR05	74
FIGURA 1. 13. IMAGEN DEL GEL GENERADO A PARTIR DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR EN EL FRAGMENT ANALYZER DE 7 MARCADORES ANALIZADOS SOBRE EL BIOTIPO ERR05.	74

FIGURA 1. 14. ELECTROFORESIS CAPILAR DE LOS MARCADORES SSR OBTENIDOS A PARTIR DE GBS....	75
FIGURA 1. 15. DISTRIBUCIÓN DE LOS MARCADORES SNP EN LOS DIFERENTES CROMOSOMAS	76
DEL GENOMA <i>SORGHUM BICOLOR</i> UTILIZADO COMO REFERENCIA.....	76
FIGURA 1. 16. CLASES DE SUSTITUCIONES OBSERVADAS EN LOS SNP DE LOS BIOTIPOS DE SORGO DE ALEPO	76
FIGURA 1. 17. DISTRIBUCIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES EN LOS DIFERENTES CROMOSOMAS	76
DEL GENOMA <i>SORGHUM BICOLOR</i> UTILIZADO COMO REFERENCIA.....	76
FIGURA 1. 18. FRECUENCIA DE LOS MOTIVOS SSR POLIMÓRFICOS MAPEADOS	77
FIGURA 1. 19. FRECUENCIA DE LOS MOTIVOS DINUCLEÓTIDOS	77
FIGURA 2. 1. BIOTIPOS DE <i>SORGHUM HALEPENSE</i> MANTENIDOS EN INVERNACULO DEL IABIMO	84
FIGURA 2. 2. CLONES VEGETATIVOS DE <i>SORGHUM HALEPENSE</i> EN EL ESTADIO DE 3 – 4 HOJAS IABIMO-CNIA-INTA	86
FIGURA 2. 3. CLONES DE <i>SORGHUM HALEPENSE</i> PREVIO A LA APLICACIÓN.	86
FIGURA 2. 4. MANTENIMIENTO DE LOS CLONES DE <i>SORGHUM HALEPENSE</i> POST APLICACIÓN PARA MUESTREO Y CONTROL EN INVERNACULO.	87
FIGURA 2. 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1% DE LAS EXTRACCIONES DE ARN DE LAS RÉPLICAS BIOLÓGICAS DE LOS BIOTIPOS PARA EVALUAR INTEGRIDAD.....	88
FIGURA 2. 6. DETALLE DE LA HOJA DE UN BIOTIPO SUSCEPTIBLE PREVIO A LA APLICACIÓN Y 72 HPA DE GLIFOSATO.	92
FIGURA 2. 7. BIOTIPOS SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES PREVIO A LA APLICACIÓN (0 HPA) Y 3, 12 Y 17 DÍAS POSTAPLICACIÓN.	92
FIGURA 2. 8. GEL DE AGAROSA AL 2% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO DE GENES DE REFERENCIA CANDIDATOS.	93
FIGURA 2. 9. CURVAS DE DISOCIACIÓN PARA 10 DE LOS 17 GENES DE REFERENCIA EVALUADOS.	93
FIGURA 2. 10. CURVAS ESTÁNDAR PARA 10 GENES DE LOS 16GENES DE REFERENCIA EVALUADOS.	94
FIGURA 2. 11. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS.	95
FIGURA 2. 12. VALORES DE ESTABILIDAD CALCULADOS CON GENORM PARA 9 GENES DE REFERENCIA CANDIDATOS	96
FIGURA 2. 13. VALORES DE ESTABILIDAD CALCULADOS CON NORMFINDER DE 9 GENES DE REFERENCIA CANDIDATOS	96

FIGURA 2. 14. ESTABILIDAD CALCULADA POR EL MÉTODO DEL Δ CT PARA LOS 9 GENES CANDIDATO ANALIZADOS.....	97
FIGURA 3. 1. ESTRUCTURA DEL VECTOR PGEM-T EASY	104
FIGURA 3. 2. ELECTROFEROGRAMAS RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN EN ABI PRISM 3100.	108
FIGURA 3. 3. SECUENCIAS DEL BIOTIPO SFRA.....	108
FIGURA 3. 4. SECUENCIAS DEL BIOTIPO SFSB	109
FIGURA 3. 5. SECUENCIAS DE LOS BIOTIPOS COR03 Y COR05	109
FIGURA 3. 6. SECUENCIAS DEL BIOTIPO COR04.	109
FIGURA 3. 7. SECUENCIAS DEL BIOTIPO COS06.	110
FIGURA 3. 8. SECUENCIAS DE LOS BIOTIPOS COR07 Y COR08.	110
FIGURA 3. 9. SECUENCIAS DE LOS BIOTIPOS ANALIZADOS A PARTIR DE ADNC.....	110
FIGURA 3. 10. SECUENCIAS DE TODOS LOS BIOTIPOS ANALIZADOS Y SECUENCIA DE LA EPSPS DEL <i>S. BICOLOR</i> Y <i>S. HALEPENSE</i>	111
FIGURA 3. 11. GEL AGAROSA 2% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO GENES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS	111
FIGURA 3. 12. PUESTA A PUNTO DE LA REACCIÓN DE PCR PARA EL GEN DE LA EPSPS.	112
FIGURA 3. 13. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS GENÓMICAS DE LA EPSPS	112
FIGURA 3. 14. CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LA EPSPS.	113
FIGURA 3. 15. CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE COPIAS GENÓMICA Y EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LA EPSPS A 24 HPA RELATIVO A PP2A.	113
FIGURA 4. 1. IMÁGENES DE UNA HOJA DE UN BIOTIPO SUSCEPTIBLE Y UNO RESISTENTE A 6 DÍAS POST APLICACIÓN	123
FIGURA 4. 2. PLANTAS DE LOS BIOTIPOS SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES 10 DÍAS POST APLICACIÓN. .	124
FIGURA 4. 3. GEL AGAROSA 2% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO DE LOS 14 GENES CANDIDATOS ANALIZAR	124
FIGURA 4. 4. CURVAS DE DISOCIACIÓN DE LOS GENES DE TRANSPORTADORES A EVALUAR.....	125
FIGURA 4. 5. CURVAS ESTÁNDAR DE LOS GENES TRANSPORTADORES A EVALUAR.....	126
FIGURA 4. 6. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES CAT, C-P450 Y GST.	127
FIGURA 4. 7. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES P6, P3 Y P2.	128
FIGURA 4. 8. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES M11, M10, M9 Y M8.	129

FIGURA 4. 9. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES M6, M4, M2 Y M1.	130
FIGURA 5. 1. PASOS DE LA SECUENCIACIÓN PLATAFORMA ILLUMINA.	137
FIGURA 5. 2. GRÁFICO DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS POR RNASEQ PARA LOS DOS BIOTIPOS (HASI Y OV) Y LOS DOS TRATAMIENTOS (0 Y 72 HPA)	140
FIGURA 5. 3. DIAGRAMA DE VENN DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN SORGO DE ALEPO PARA LOS BIOTIPOS OV Y HASI Y LOS DOS TRATAMIENTOS (0 Y 72 HPA).....	141
FIGURA 5. 4. RESUMEN DE LOS 10 PRIMEROS TÉRMINOS GO CORRESPONDIENTES A GENES SOBREEXPRESADOS EN LOS BIOTIPOS (A) HASI Y (B) OV DE SORGO DE ALEPO.	142
FIGURA 5. 5. RESUMEN DE LOS 10 PRIMEROS TÉRMINOS GO CORRESPONDIENTES A GENES SOBREEXPRESADOS EN LOS BIOTIPOS (A) HASI Y (B) OV DE SORGO DE ALEPO.	142
FIGURA 5. 6. RESUMEN DE LOS 10 PRIMEROS TÉRMINOS GO CORRESPONDIENTES A GENES SOBREEXPRESADOS EN LOS BIOTIPOS (A) HASI Y (B) OV DE SORGO DE ALEPO.	143
FIGURA 5. 7. RESUMEN DE LOS 10 PRIMEROS TÉRMINOS GO CORRESPONDIENTES A GENES SUBEXPRESADOS EN LOS BIOTIPOS (A) HASI Y (B) OV DE SORGO DE ALEPO.	144
FIGURA 5. 8. RESUMEN DE LOS 10 PRIMEROS TÉRMINOS GO CORRESPONDIENTES A GENES SUBEXPRESADOS EN LOS BIOTIPOS (A) HASI Y (B) OV DE SORGO DE ALEPO.	144
FIGURA 5. 9. RESUMEN DE LOS 10 PRIMEROS TÉRMINOS GO CORRESPONDIENTES A GENES SUBEXPRESADOS EN LOS BIOTIPOS (A) HASI Y (B) OV DE SORGO DE ALEPO.	145
FIGURA 5. 10. VOLCANO PLOTS DE LAS DIFERENTES COMPARACIONES ANALIZADAS.....	148
FIGURA ANEXO 1. GRÁFICOS DE NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES TRANSPORTADORES EN FUNCIÓN DEL GEN DE REFERENCIA ARI8	197

Índice de tablas

TABLA I. 1. PANORAMA MUNDIAL DE PAÍSES QUE CULTIVAN TRANSGÉNICOS: SUPERFICIE Y CULTIVOS.	24
TABLA I. 2. CORRESPONDENCIA DE LA NUEVA CLASIFICACIÓN NUMÉRICA (HRAC/WSSA) CON LA ALFABÉTICA (ANTIGUA HRAC)	30
TABLA I. 3. MUTACIONES TSR A HERBICIDAS	38
TABLA I. 4. MUTACIONES EN MALEZAS RESISTENTES A GLIFOSATO VÍA INHIBICIÓN DE LA EPSPS.	47
TABLA 1. 1. COMPARACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES DE ADN MÁS UTILIZADOS EN PLANTAS	56
TABLA 1. 2 SITIOS DE MUESTREO DE LOS BIOTIPOS ANALIZADOS DE NOVO	59
TABLA 1. 3. SITIOS DE MUESTREO DE LOS BIOTIPOS ANALIZADOS PREVIAMENTE A ESTA TESIS.	60
TABLA 1. 4 . MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR) UTILIZADOS.....	61
TABLA 1. 5. INICIADORES MICROSATÉLITES OBTENIDOS A PARTIR DEL ENSAYO DE OPTIMIZACIÓN DE GBS.	74
TABLA 1. 6. DESCRIPCIÓN DE LOS MOTIVOS MICROSATÉLITES.....	78
TABLA 2. 1. NOMBRE DE LOS MATERIALES Y SITIOS DE MUESTREO	85
TABLA 2. 2. GENES DE REFERENCIA SELECCIONADOS, SECUENCIA DE LOS INICIADORES DISEÑADOS Y TAMAÑO DEL FRAGMENTO ESPERADO PARA LA VALIDACIÓN	89
TABLA 2. 3. INFORMACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR PARA CADA GEN CANDIDATO Y DETALLES DE LOS PARÁMETROS DE AMPLIFICACIÓN.	94
TABLA 2. 4. RANGOS DE ESTABILIDAD DE LA EXPRESIÓN PARA LOS 9 GENES CANDIDATOS CALCULADOS POR BESTKEEPER, GENORM, NORMFINDER, MÉTODO DEL Δ CT Y REFFINDER.	97
TABLA 2. 5. RANKING DE ESTABILIDAD DE LA EXPRESIÓN DE LOS 9 GENES CANDIDATOS CALCULADOS POR REFFINDER.	98
TABLA 3. 1. SITIOS DE MUESTREO	102
TABLA 3. 2. GENES Y LOS CORRESPONDIENTES INICIADORES UTILIZADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE L GEN DE LA EPSPS	107
TABLA 3. 3. INFORMACIÓN DE LOS INICIADORES Y DETALLES DE AMPLIFICACIÓN.	112
TABLA 4. 1. SITIOS DE MUESTREO Y BIOTIPOS ENSAYADOS	119
TABLA 4. 2. GENES DE 12 TRANSPORTADORES, CITOCROMO P450 Y GLUTATIÓN TRASNFERASA SELECCIONADOS PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN.	121

TABLA 4. 3. INFORMACIÓN DE LOS INICIADORES Y DETALLES DE CALIBRACIÓN.	122
TABLA 5. 1. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS A 72 HPA.....	141
TABLA 5. 2. LOS PRIMEROS 10 DEGS SOBREPRESADOS Y SUBEXPRESADOS DE CADA UNA DE LAS COMPARACIONES ANALIZADAS.....	146
TABLA 5. 3. (CONTINUACIÓN) LOS PRIMEROS 10 DEGS SOBREPRESADOS Y SUBEXPRESADOS DE CADA UNA DE LAS COMPARACIONES ANALIZADAS.	147
LA DESCRIPCIÓN DE LA FUNCIÓN FUE OBTENIDA A PARTIR DEL PHYTOZOME V.13. NA: FUNCIÓN NO ASIGNADA	147
TABLA 5. 4. FUNCIÓN DE LOS 20 DEGS DEL ANÁLISIS HASI 0 HPA VS HASI 72 HPA OBTENIDOS A PARTIR DEL VOLCANOSER.	149
TABLA 5. 5. FUNCIÓN DE LOS 20 DEGS DEL ANÁLISIS OV 0 HPA VS OV 72 HPA OBTENIDOS A PARTIR DEL VOLCANOSER.	149
TABLA 5. 6. FUNCIÓN DE LOS 20 DEGS DEL ANÁLISIS HASI 72 HPA VS OV 72 HPA OBTENIDOS A PARTIR DEL VOLCANOSER.	150
TABLA 5. 7. FUNCIÓN DE LOS 20 DEGS DEL ANÁLISIS HASI 0 HPA VS OV 0 HPA OBTENIDOS A PARTIR DEL VOLCANOSER.	150
TABLA 5. 8. CONSENSO DE LOS DEGS SOBREPRESADOS INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA NTSR EN OTRAS ESPECIES LUEGO DEL TRATAMIENTO A GLIFOSATO.	152
TABLA ANEXO 1. EVENTOS CON AUTORIZACIÓN COMERCIAL EN ARGENTINA (FUENTE: MINISTERIO DE ECONOMÍA, SUBSECRETARIA DE ALIMENTOS BIOECONOMÍA Y DESARROLLO REGIONAL)	178
TABLA ANEXO 2. TASA DE CAMBIO DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES TRANSPORTADORES EN FUNCIÓN DEL GEN DE REFERENCIA PP2A.....	183
TABLA ANEXO 3. TASA DE CAMBIO DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES TRANSPORTADORES EN FUNCIÓN DEL GEN DE REFERENCIA ARI8.	190
TABLA ANEXO 4. GENES INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA NTSR EN OTRAS ESPECIES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ANTE EL TRATAMIENTO A GLIFOSATO.	202
TABLA ANEXO 5. GENES INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA NTSR EN OTRAS ESPECIES, DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ANTE EL TRATAMIENTO A GLIFOSATO.	203

Abreviaturas

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ABC: transportadores dependientes de ATP
ACCasa: Acetil-CoA-Carboxilasa
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN copia
ae: equivalente ácido
AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorfism*, por sus siglas en inglés
AKR: aldo-ceto reductasa
Ala: alanina
ALS: aceto lactato sintasa
AMPA: ácido aminofosfónico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
AT: aminotransferasa
ATP: adenosina trifosfato
BP: procesos biológicos
CC: componentes celulares
CDS: secuencia codificante
CNV: *Copy Number Variation*, por sus siglas en inglés
c.s.p. cantidad suficiente para
CV: coeficiente de variación
ddRADseq: *double digest Restriction site-Associated DNA sequencing*, por sus siglas en inglés
DEGs: *Differentially expressed genes*, por sus siglas en inglés
DHODH: inhibidor de la dihidroorotato deshidrogenasa
DHS: dihidropteroato sintasa
En/Spm: *enhancer/suppressor mutator element*. por sus siglas en inglés
EPSPS: 5 enolpiruvilshikimato-3-fosfosintasa
ER: retículo endoplásmico
FDA: *Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés
FE: *Fold Enrichment*, por sus siglas en inglés
GBS: genotipificación por secuenciación
GO: *Gene onthology*, por sus siglas en inglés
GR: *glyphosate resistant*, por sus siglas en inglés
GS: glutamina sintasa
GST: glutatión S transferasa
GT: glicosil transferasa
ha: hectárea
HPA: horas post aplicación
HRAC: *Herbicide Resistance Action Committee*, por sus siglas en inglés
HST: homogentisato solanesil transferasa
ISAAA: *The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*, por sus siglas en inglés
ISSR: *Inter Simple Sequence Repeat*, por sus siglas en inglés
MAGyP: Ministerio de Agricultura ganadería y pesca
MBD: Matriz Básica de Datos
MF: función molecular
MT: malonil transferasa

NGS: *Next Generation Sequencing*, por sus siglas en inglés
NTSR: *Non Target Site Resistance*, por sus siglas en inglés
OGM: Organismo Genéticamente Modificado
OTUs: Unidades Taxonómicas Operativas
P-450: citocromo P450
PCA: análisis de componentes principales
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PE: paired end, por sus siglas en inglés. Ambos extremos de un fragmento de ADN que se secuencian
PEP: fosfoenolpiruvato
PP: proteínas fosfatasa
PPO: protoporfirinógeno oxidasa
Pro: prolina
qPCR: PCR cuantitativa
 R^2 : coeficientes de correlación
RAD-seq: *Restriction site-Associated DNA Sequencing*, por sus siglas en inglés
RAPD: *Random Amplified Polimorphic DNAs*, por sus siglas en inglés
REM: Red de Manejo de Plagas
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, por sus siglas en inglés
RH: tolerancia a herbicidas
RI: resistencia a insectos
RIN: *RNA Integrity Number*
ROS: especies reactivas del oxígeno
SD: desviación estándar
SNP: Single Nucleotide Polymorphism, por sus siglas en inglés
SSR: *Simple Sequence Repeat*, por sus siglas en inglés
Thr: treonina
TRS: *Target Site Resistance*, por sus siglas en inglés
UPGMA: *unweighted pair-group method using arithmetic averages*, por sus siglas en inglés
WSSA: *Weed Science Society of America*, por sus siglas en inglés

Introducción General

Situación global de los Organismos Genéticamente Modificados en el mundo

Se denomina OGM (Organismo Genéticamente Modificado) a cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna (Artículo 3, Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre Diversidad Biológica, 2003, <http://bch.cbd.int/protocol/text/>) (*Convention on Biological Diversity*, 1992). El objetivo de estas modificaciones genéticas es incorporar nuevas características o modificar algunas pre-existentes y así obtener beneficios. Por ejemplo: resistir a una plaga, producir más proteínas o vitaminas o tolerar condiciones climáticas adversas como la sequía (Cultivos Genéticamente Modificados, 2021). La transformación genética resolvió la principal limitación del mejoramiento clásico, la imposibilidad de incorporar genes de otras especies (Kumar *et al.*, 2020). En 1977 el descubrimiento de la habilidad natural de *Agrobacterium tumefaciens* para insertar establemente el plásmido Ti dentro del genoma vegetal condujo al gran avance hacia el desarrollo de las plantas transgénicas (Chilton *et al.*, 1977). Durante la infección la bacteria transfiere un fragmento de su plásmido (llamado plásmido Ti) a las células de la planta. Este fragmento se denomina ADN-T y termina integrándose en algún lugar del cromosoma. Por ingeniería genética se puede insertar un gen de interés en la región T del plásmido Ti. Así, luego de la infección, el nuevo gen será también transferido a la célula vegetal e insertado en el genoma de la planta (Argenbio); lo cual introduce el concepto de “evento” que es una inserción particular de ADN ocurrida en una célula vegetal a partir de la cual se originó la planta transgénica. Los eventos de transformación son únicos, y difieren en los elementos y genes insertados, los sitios de inserción en el genoma de la planta, el número de copias del inserto, los patrones y niveles de expresión de las proteínas de interés (Cultivos Genéticamente Modificados, 2021).

En 1994 fue aprobado el primer transgénico vegetal para comercialización por la FDA en EE. UU y fue un tomate con maduración retardada (Flavr-Savr™) (Kumar *et al.*, 2020), en 1996 el área global de cultivos biotecnológicos era de 1,7 millones de hectáreas, en 2006 10 años después, el área ascendía a 102 millones de hectáreas y en 2015, a casi 20 años, fueron 179,7 millones de hectáreas (James, 2015). El aumento del área global sembrada fue continuo año a año (Figura I. 1). Según los datos publicados por el Servicio Internacional de adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA: *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*) en 2019, 190 millones de hectáreas fueron sembradas con 14 cultivos OGM en 29 países (Figura I. 2) (Tabla I. 1), 24 países en vías de desarrollo, en los cuales se sembró el 56 % del área global

y 5 países industrializados. Otros 42 países importaron OGM para alimentación, forrajes y procesamiento; siendo EE. UU el país con mayor área sembrada con 71,5 millones de hectáreas (ISAAA, 2019). En la actualidad 439 eventos en 32 cultivos cuentan con aprobación, de los cuales los cultivos con mayor cantidad de eventos son maíz (152), algodón (66), papa (50), colza argentina (41), soja (40), clavel (19) y tomate (11) (ISAAA Database, 2022) (Figura I. 3).

Las principales características para las cuales se han desarrollado y aprobado eventos para comercialización incluyen, tolerancia a herbicidas (RH), resistencia a insectos (RI), resistencia a enfermedades, tolerancia a estrés abióticos y mejoramiento de la calidad nutricional (Figura I. 4) (Kumar *et al.*, 2020)

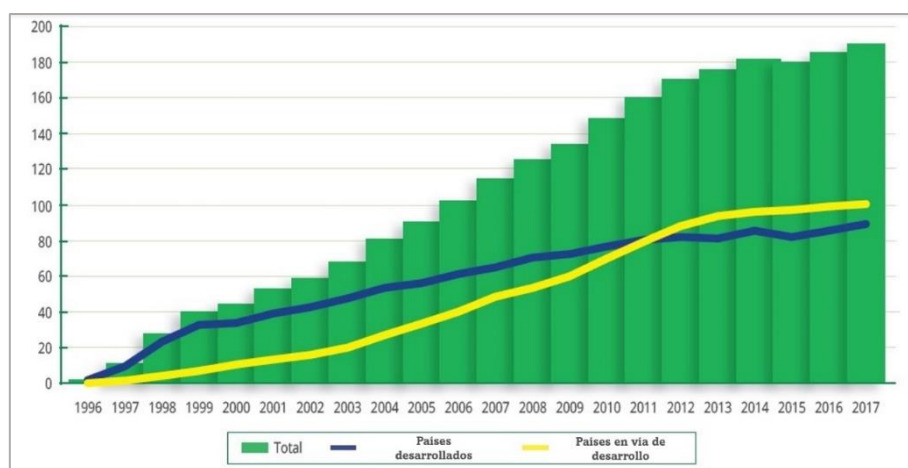


Figura I. 1. Aumento del área sembrada con OGM alrededor del mundo 1996 a 2017.
Fuente: ISAAA. 2017. ISAAA Brief No. 53

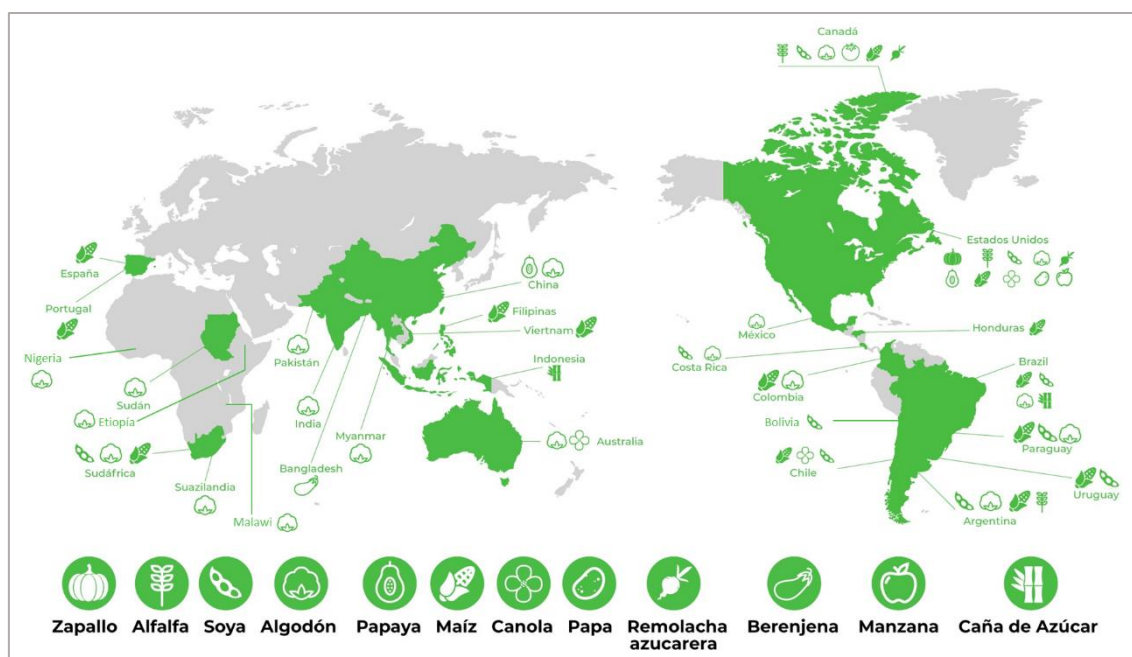


Figura I. 2. Países que cultivaron OGM en 2019.
Fuente: ISAAA, 2019. /Adaptación Chilebio.

Tabla I. 1. Panorama mundial de países que cultivan transgénicos: superficie y cultivos.
(ISAAA Database, 2022)

Posición	País	Área (millones/ha.)	Cultivo
1	EE. UU	71,5	Maíz, soja, algodón, alfalfa, canola, remolacha azucarera, papa, papaya, calabacín amarillo, manzana
2	Brasil	52,8	Soja, maíz, algodón y caña de azúcar
3	Argentina	24	Soja, maíz, algodón y alfalfa
4	Canadá	12,5	Canola, soja, maíz, remolacha azucarera, alfalfa, papa
5	India	11,9	Algodón
6	Paraguay	4,1	Soja, maíz, algodón
7	China	3,2	Algodón, papaya
8	Sudáfrica	2,7	Maíz, soja, algodón
9	Pakistán	2,5	Algodón
10	Bolivia	1,4	Soja
11	Uruguay	1,2	Soja y maíz
12	Filipinas	0,9	Maíz
13	Australia	0,6	Algodón, canola, cártamo
14	Myanmar	0,3	Algodón
15	Sudán	0,2	Algodón
16	México	0,2	Algodón
17	España	0,1	Maíz
18	Colombia	0,1	Maíz, algodón
19	Vietnam	0,1	Maíz
20	Honduras	<0,1	Maíz
21	Chile	<0,1	Maíz, canola
22	Malawi	<0,1	Algodón
23	Portugal	<0,1	Maíz
24	Indonesia	<0,1	Caña de azúcar
25	Bangladesh	<0,1	Berenjena
26	Nigeria	<0,1	Algodón
27	eSwatini	<0,1	Algodón
28	Etiopía	<0,1	Algodón
29	Costa Rica	<0,1	Algodón, ananá
Total		190,4	

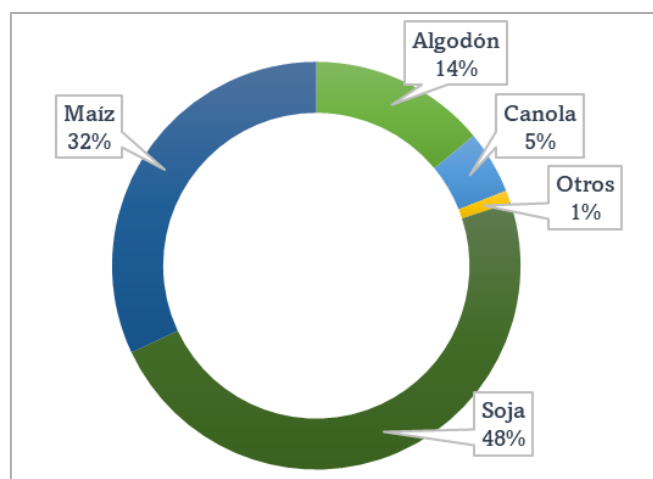


Figura I. 3. Área global de OGM por cultivo.
Adaptación ISAAA 2019.

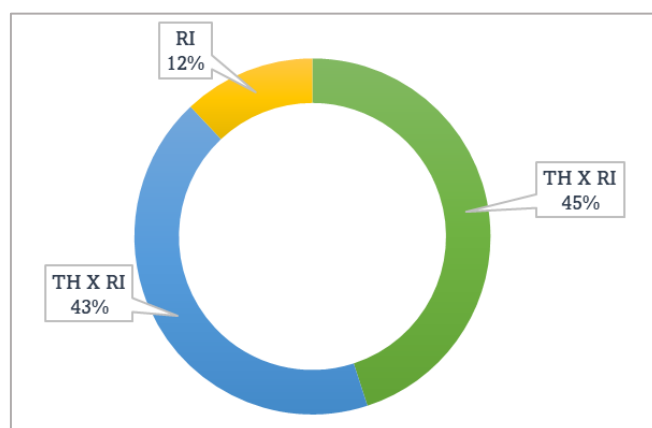


Figura I. 4. Área global de cultivos OGM por característica.
TH: tolerante a herbicida; RI: resistente a insectos. Adaptado ISAAA 2019

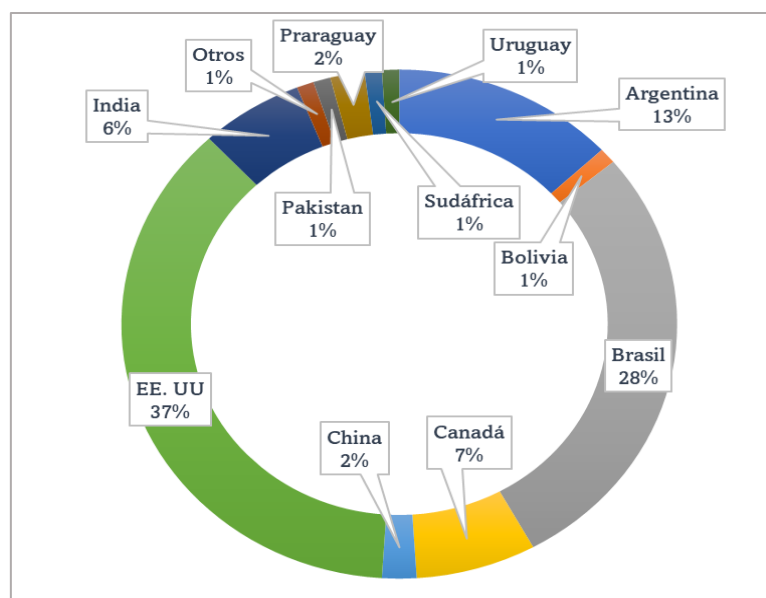


Figura I. 5. Principales países que siembran OGM y su tasa de adopción.
Otros: Filipinas, Australia, Myanmar, Sudán, México, España, Colombia, Vietnam, Honduras, Chile, Malawi, Portugal, Indonesia, Bangladesh, Nigeria, Esuatini, Etiopía y Costa Rica. (Adaptado ISAAA, 2019)

Organismos Genéticamente Modificados en Argentina

Argentina es uno de los países con mayor adopción de cultivos genéticamente modificados constituyéndose en el tercer país a nivel mundial con el 13% de la superficie global de OGM. Cuenta con una superficie sembrada 24 millones de hectáreas correspondientes a maíz, soja y algodón mayoritariamente (Ministerio de economía, Subsecretaria de Alimentos, Bioeconomía y Desarrollo regional).

El primer cultivo genéticamente modificado aprobado y sembrado en la Argentina fue la soja tolerante a glifosato en 1996 y el siguiente fue el maíz con resistencia a insectos en 1998. En la actualidad los eventos aprobados para su comercialización son 65 (Tabla Anexo 1), entre los cuales la mayoría se distribuyen entre maíz (36), soja (17) algodón (7) (Figura I. 6); otros eventos con autorización comercial son papa (1), trigo (1), cártamo (1) y alfalfa (2). Las características de estos eventos incluyen mayoritariamente la tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos apilados de ambos. En particular los eventos portadores de la resistencia a glifosato son 44 en los cultivos de soja (9), maíz (27), algodón (5) y alfalfa (2), de los cuales 6 poseen únicamente la resistencia a glifosato y los restantes 38 son apilados de este carácter con resistencia a insectos y otros herbicidas (Eventos con autorización comercial, <https://www.argentina.gob.ar/agricultura/alimentos-y-bioeconomia/ogm-vegetal-eventos-con-autorizacion-comercial>).



Figura I. 6. Cultivos OGM en Argentina campaña 2020/2021.
Fuente Argenbio y MAGyP

Malezas y Herbicidas

Las malezas son una de las principales causas de disminución de rendimiento para los cultivos, compitiendo con los mismos por la luz, los nutrientes y el agua, constituyendo un reservorio para insectos y enfermedades, contaminando los lotes de semillas (Paterson *et al.*, 1995). Todo esto puede causar una pérdida de hasta el 34% en todo el mundo al afectar la productividad de los cultivos (OERKE, 2006).

La pérdida de rendimiento en los cultivos debido a las malezas depende de varios factores, el tiempo de emergencia, la densidad, el tipo de maleza y de cultivo, etc. En Australia se estima que la pérdida ocasionada por las malezas asciende a 3.3 billones de dólares australianos anuales, en EE. UU. de 33 billones de dólares americanos anualmente y en India de 11 billones de dólares cada año (Chauhan, 2020). En Argentina se ha reportado que, en ausencia de control o manejo de las malezas, las pérdidas de rendimiento por competencia de las malezas alcanzarían valores entre el 30 y 60 %, según el cultivo y la maleza considerada (Satorre, 2017). Existen diferentes definiciones de malezas que fueron surgiendo a lo largo de la historia y de la evolución de la agricultura como actividad humana. La primera definición de maleza está registrada en el diccionario de Oxford, donde se define a una maleza como: “Una planta herbácea no valorada por su utilidad o belleza, que crece de forma salvaje, en el suelo o impide el crecimiento de plantas superiores” (Harlan & DeWet, 1965). Así mismo, un concepto más actual donde el punto de vista es puesto por el observador, define maleza como “una planta creciendo fuera de lugar” (Radosevich *et al.*, 2007).

Los herbicidas son productos fitosanitarios que pueden controlar las malezas de manera eficiente y económica, mejorando el rendimiento de los cultivos y disminuyendo la mano de obra (Heap, 2014). La historia del control de malezas se inicia con el comienzo de la agricultura. Antiguamente los agricultores llevaban a cabo esta actividad removiendo las malezas a mano. El uso de los herbicidas químicos como se conoce en la actualidad comenzó en 1945 con el desarrollo de los herbicidas orgánicos como el 2,4-D (Vats, 2015). Algunos herbicidas son no selectivos, es decir, que eliminan una amplia variedad de plantas, tanto deseables como indeseables. Otros son selectivos, matan a una clase de plantas permitiendo que otras sobrevivan. Esta selectividad permite que un cultivo de interés se desarrolle libre de la competencia con malezas (Au, 2003). También pueden ser clasificados de varias formas, por su familia química, método de aplicación, modo de acción o tiempo de aplicación (Vats, 2015). Los herbicidas de contacto afectan únicamente las partes que tocan. La absorción a través de las

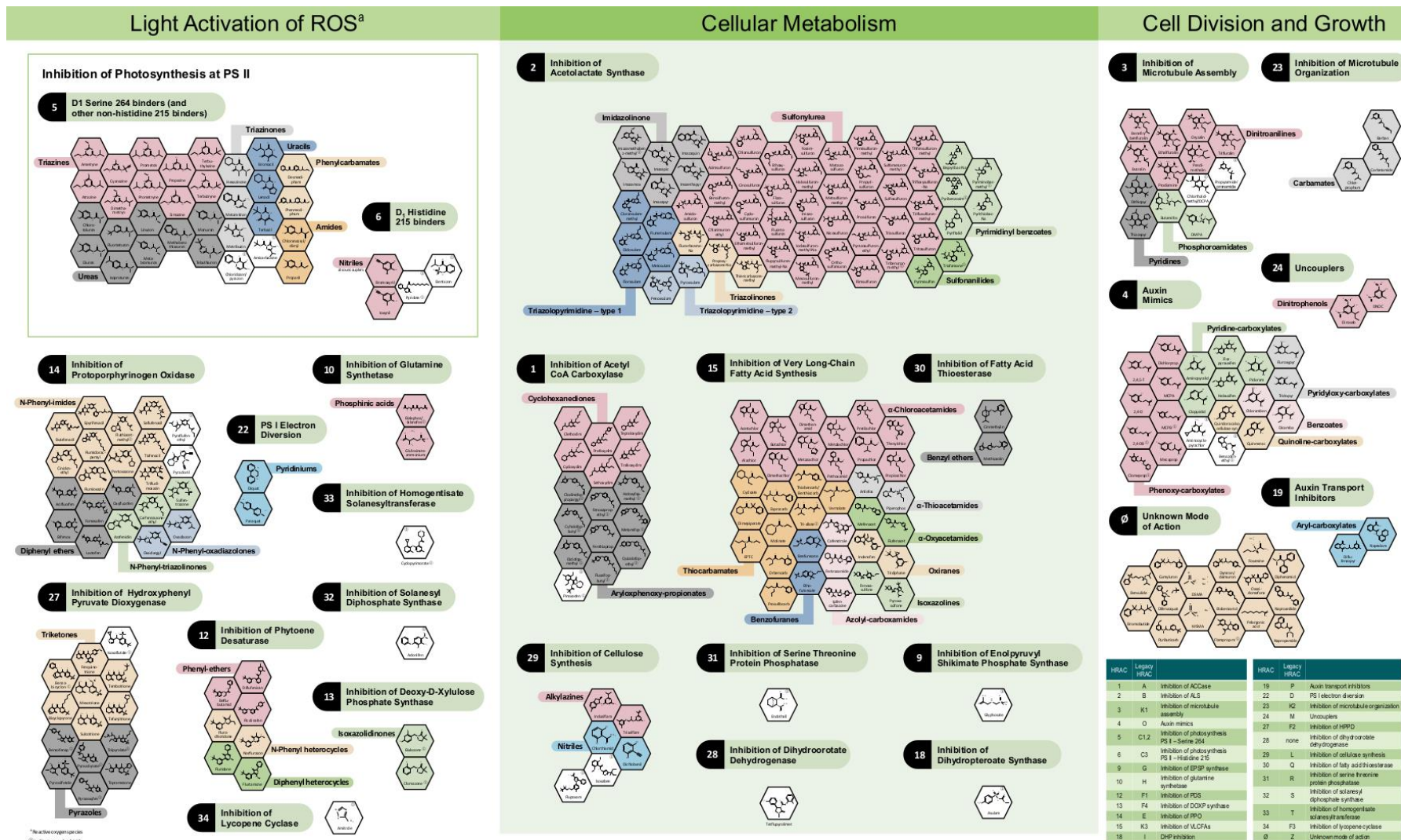


Figura I. 7. Clasificación de los herbicidas en función de su mecanismo de acción

hojas es mínima por lo que debe ser aplicado en suficiente cantidad para cubrir el follaje completo (por ejemplo, paraquat o diclofop).

Por el contrario los herbicidas sistémicos pueden ser translocados a otras partes de la planta, alteran las funciones biológicas interfiriendo con las reacciones bioquímicas (por ejemplo glifosato, atrazina o 2-4 D) (Au, 2003). Basados en su tiempo de aplicación, los herbicidas pueden ser preemergentes, los cuales son aplicados antes de que los brotes de las malezas emerjan de la superficie del suelo (por ejemplo, pendimetalina) o postemergentes, son aplicados una vez que la maleza emergió del suelo y generalmente requiere de múltiples aplicaciones para realizar un control adecuado (por ejemplo, 2-4 D). Los herbicidas frecuentemente también son clasificados por su modo de acción, ya que dentro de un mismo mecanismo de acción producen efectos similares en las plantas susceptibles. La Sociedad Americana de Ciencia de las Malezas (WSSA, por sus siglas en inglés, *Weed Science Society of America*,) propusieron una clasificación y posteriormente se alinearon con el Comité Internacional de Acción Herbicida (HRAC, por sus siglas en inglés, *Herbicide Resistance Action Committee*) (Figura I. 7). Para ayudar a los agricultores a identificar con facilidad y rapidez los modos de acción la HRAC desarrolló, en los años 80, un sistema de clasificación basado en letras. Por otro lado, la WSSA desarrolló un sistema de clasificación basado en números, a partir de un encuentro realizado en 2017, se decidió realizar una transición del sistema basado en letras a un nuevo sistema basado en números, armonizando la clasificación de la HRAC con la de la WSSA. De manera tradicional, los herbicidas se han clasificado en tres grandes grupos (Tabla I. 2): 1º) los que afectan a procesos relacionados con la fotosíntesis y/o producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que destruyen la integridad celular (color rojo); 2º) los que inhiben la síntesis de compuestos esenciales (color verde); y 3º) los que afectan a otros procesos metabólicos y de crecimiento en las plantas (color salmón) (Torra *et al.*, 2022).

Glifosato

El glifosato (nomenclatura IUPAC: N-fosfonometilglicina, Fórmula: $C_3H_8NO_5P$) es el compuesto activo en varios herbicidas comerciales. Es un herbicida de amplio espectro, desarrollado para eliminación de hierbas y de arbustos, en especial los perennes. La sal de isopropilamina del glifosato llegó al mercado por primera vez en 1974 como herbicida no selectivo post-emergente, y su popularidad creció constantemente (Duke & Powles, 2008), Roundup, fue la primer marca comercial conteniendo al glifosato como ingrediente activo y fue introducido por Monsanto (Baer & Marcel, 2014).

En las plantas es captado rápidamente a través de la superficie de la hoja, se mueve a través de la cutícula por difusión, las propiedades fisicoquímicas lo habilitan para ser translocado desde la hoja a través del floema a los mismos tejidos que son sumideros de sacarosa; así la fitotoxicidad actúa en meristemas, raíces y hojas jóvenes, órganos de almacenaje y cualquier otro tejido u órgano en crecimiento activo (Duke & Powles, 2008).

A nivel molecular actúa interfiriendo con la vía del shikimato, el cual es responsable de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, tirosina, fenilalanina y triptofano (Figura I. 8) y muchos productos secundarios como auxinas y lignina, actúa interfiriendo con la unión del fosfoenolpiruvato (PEP) a la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), mimetizando al intermediario de la reacción enzimática (Figura I. 9) esta enzima cataliza el penúltimo paso de la vía metabólica, llevando a la acumulación de shikimato (Figura I. 8) (Shaner *et al.*, 2012). El glifosato ha sido considerado inofensivo para los animales y los seres humanos, porque la vía del shikimato no existe en éstos. También debería tener riesgos limitados a largo plazo, porque se inactiva rápidamente en los suelos por su fuerte adsorción a las partículas y su rápida degradación microbiana (Helander *et al.*, 2012). Así mismo es no volátil, el mayor metabolito de degradación es el ácido aminofosfónico (AMPA), el cual es significativamente más móvil en los suelos que el glifosato (Duke & Powles, 2008). En la planta es absorbido rápidamente a través de la superficie, las tasas de penetración varían considerablemente entre especies, lo que explica parte de las diferencias en la susceptibilidad (Duke & Powles, 2008).

Tabla I. 2. Correspondencia de la nueva clasificación numérica (HRAC/WSSA) con la alfabética (antigua HRAC)
El 28 y 33 son los mecanismos nuevos reportados. PP: proteínas fosfatasa, GS: glutamina sintasa; EPSPS: 5 enolpiruvilshikimato-3-fosfosintasa; PPO: protoporfirinógeno oxidasa; DHS: dihidropteroato sintasa. Los colores indican la clasificación de los grupos herbicidas, verde: afectan procesos fotosintéticos, rojo: inhibidores de síntesis de compuestos esenciales y salmón: afectación de procesos metabólicos.

HRAC/ WSSA	Antigua HRAC	Enzima /proteína o proceso afectado
1	A	ACCasa
2	B	ALS
3	K1	Ensamblaje de microtúbulos
4	O	Auxinas
5	C1, C2	Fotosistema II
6	C3	Fotosistema II
9	G	EPSPS
10	H	GS
12	F1	PDS
13	F4	DOXSPS
14	E	PPO
15	K3	VLCFAS
18	I	DHPS
19	P	Transporte de auxinas
22	D	Fotosistema I
23	K2	Organización de microtúbulos
24	M	Desacopladores
27	F2	HPPD
28		DHODH
29	L	Síntesis de celulosa
30	Q	FAT
31	R	Serina/Treonina PP
32	S	SPS
33	T	HST
34	F3	Licopeno ciclasa
0	Z	Desconocido

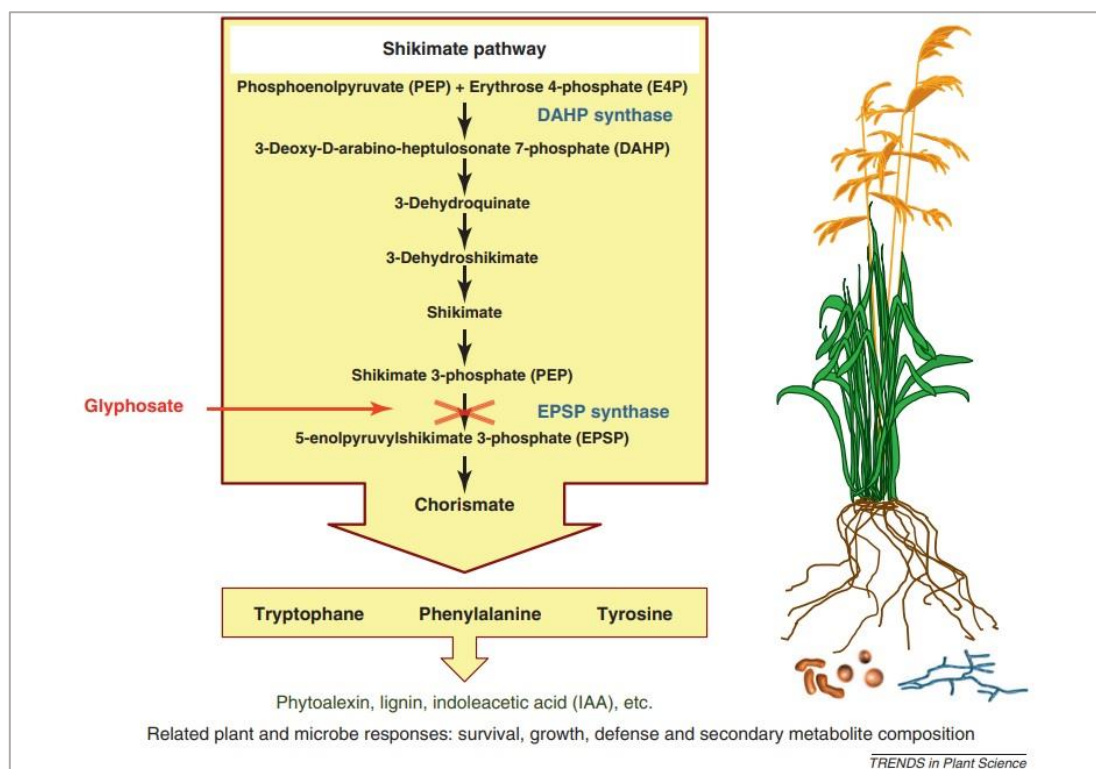


Figura I. 8. Vía del shikimato, sitio de acción del glifosato
Adaptado (Helander *et al.*, 2012)

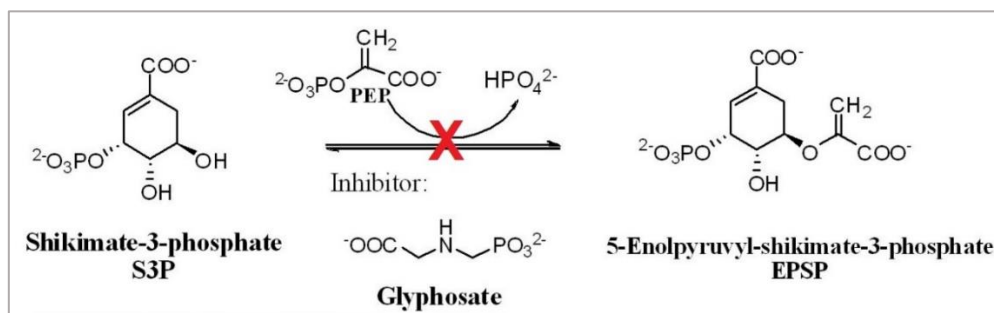


Figura I. 9. Paso de síntesis inhibido por el glifosato
Adaptado (Funke *et al.*, 2006)

Resistencia a herbicidas

La Sociedad Americana de Ciencia de Malezas definió que la resistencia a herbicida es “la habilidad inherente de una planta a sobrevivir y reproducirse posteriormente a la aplicación de una dosis de herbicida que normalmente sería letal para una planta silvestre. En una planta la resistencia puede ocurrir naturalmente o ser inducida por técnicas como la ingeniería genética o por la selección de variantes generadas por cultivo de tejidos o mutagénesis” (WSSA, 1998).

La selección de resistencia a herbicidas en malezas es un resultado predecible debido a la presión de selección que ejerce el uso constante de herbicidas. Variantes que confieren la resistencia existen dentro de

la población previamente al tratamiento; estas son enriquecidas mediante la aplicación repetida del herbicida hasta un punto en el cual la población de malezas no es controlada por el herbicida a las tasas de uso recomendadas (Figura I. 10) (Heap, 2014).

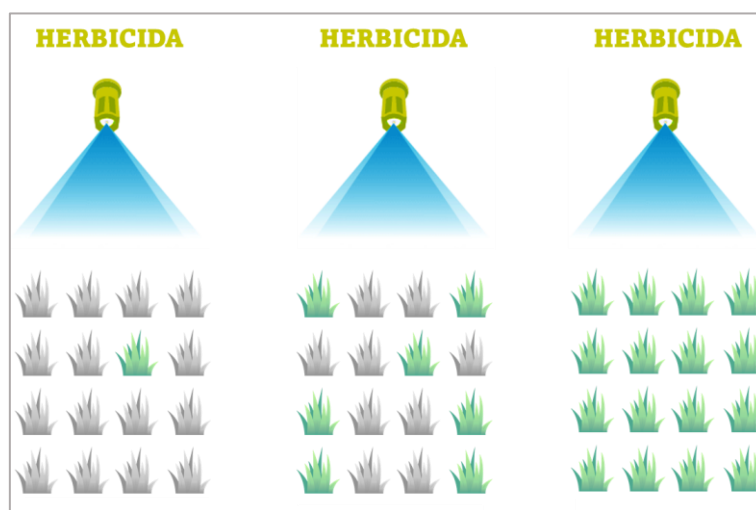


Figura I. 10. Selección de individuos resistentes al herbicida tras sucesivas aplicaciones del mismo modo de acción.
Adaptado de WSSA

La **resistencia cruzada** ocurre cuando un único mecanismo confiere resistencia a más de un herbicida; la **resistencia múltiple** ocurre cuando más de un mecanismo de resistencia ocurre dentro de una planta. Usualmente suele ser el resultado de la selección secuencial de mecanismos de resistencia por parte de herbicidas con diferentes sitios de acción o por la acumulación de genes de resistencia a través del flujo de polen (Heap, 2014).

Las malezas existen en grandes poblaciones, son prolíficas productoras de semillas y crecen rápidamente, lo que las vuelve ideales para estudios de adaptación, se encuentran a menudo marginadas, resistiendo frente a intensas perturbaciones y a menudo en condiciones abióticas muy variadas. Sin embargo, lo que realmente las distingue es que sobreviven, y en algunos casos prosperan, frente a los intentos de controlarlas (Sharma *et al.*, 2021). Las malezas han sido un problema desde siempre, las comunidades de las mismas han cambiado a lo largo del tiempo en respuesta a las prácticas de control que se implementaron (Johnson *et al.*, 2009).

Los herbicidas fueron la herramienta desarrollada más efectiva para el control de las malezas, eliminando entre el 90 al 99 % de las mismas, pero la edad dorada de los herbicidas duro poco ya que la detección de la primera maleza resistente fue en 1957 (Délye, 2013).

Hasta la fecha, hay reportados 513 casos de resistencia, en 267 especies de malezas de las cuales 154 son dicotiledóneas y 113 son monocotiledóneas las cuales han desarrollado resistencia a 21 de los 31 sitios de acción de herbicidas conocidos y a 165 herbicidas diferentes. Se ha informado de la existencia de malezas resistentes a los herbicidas en 96 cultivos de 72 países (Heap, 2022). En la Figura I. 11 se puede ver la

distribución y densidad mundial de los casos de resistencia reportados, EE. UU tiene el mayor número de malezas resistentes seguido por Australia y Canadá. Año tras año el número de casos reportados aumenta (Heap, 2014) (Figura I. 12)

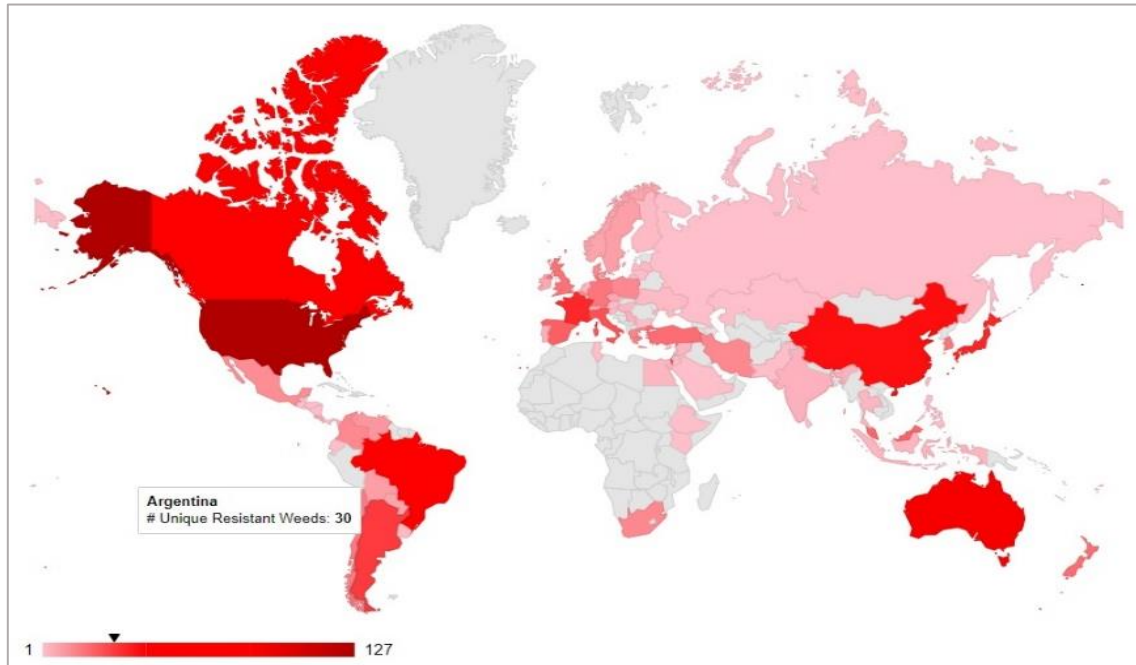


Figura I. 11. Mapa mundial de casos de resistencia reportados.
Fuente (Heap, 2022)

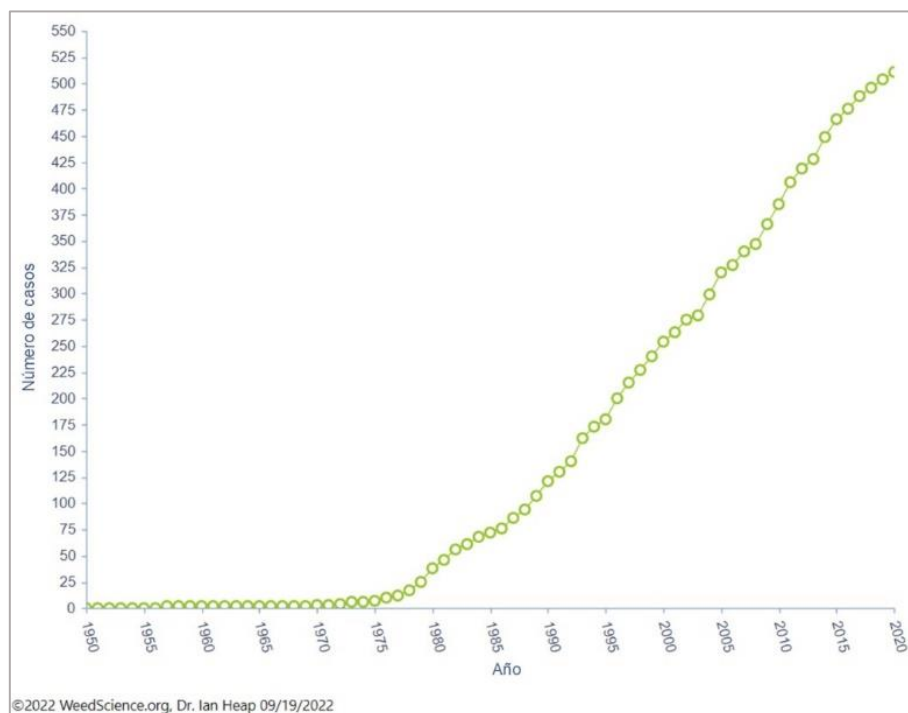


Figura I. 12. Crecimiento de los casos de malezas resistentes.
Fuente (Heap, 2022)

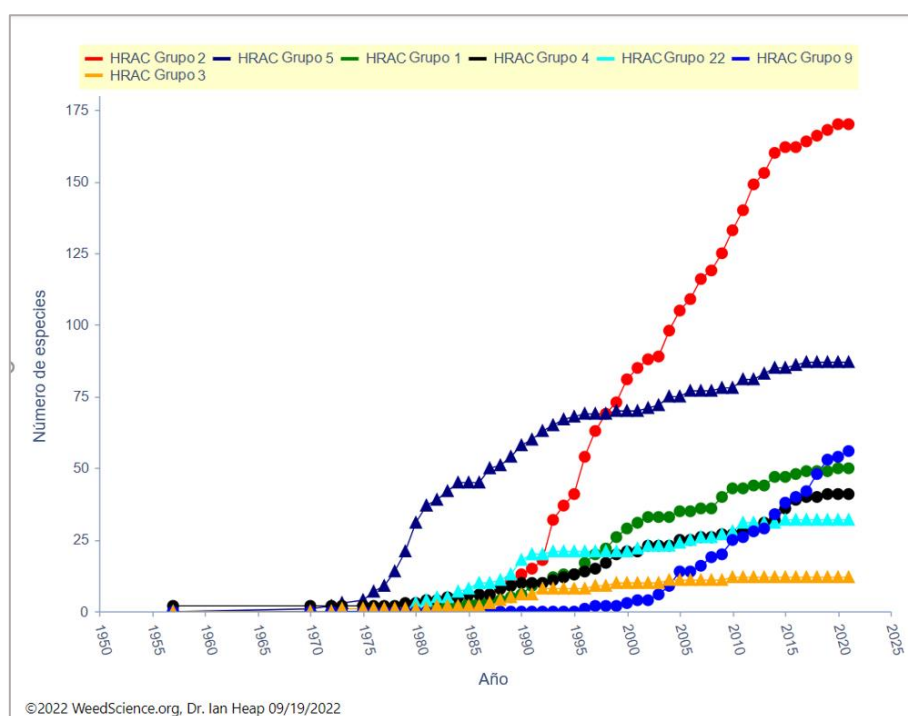


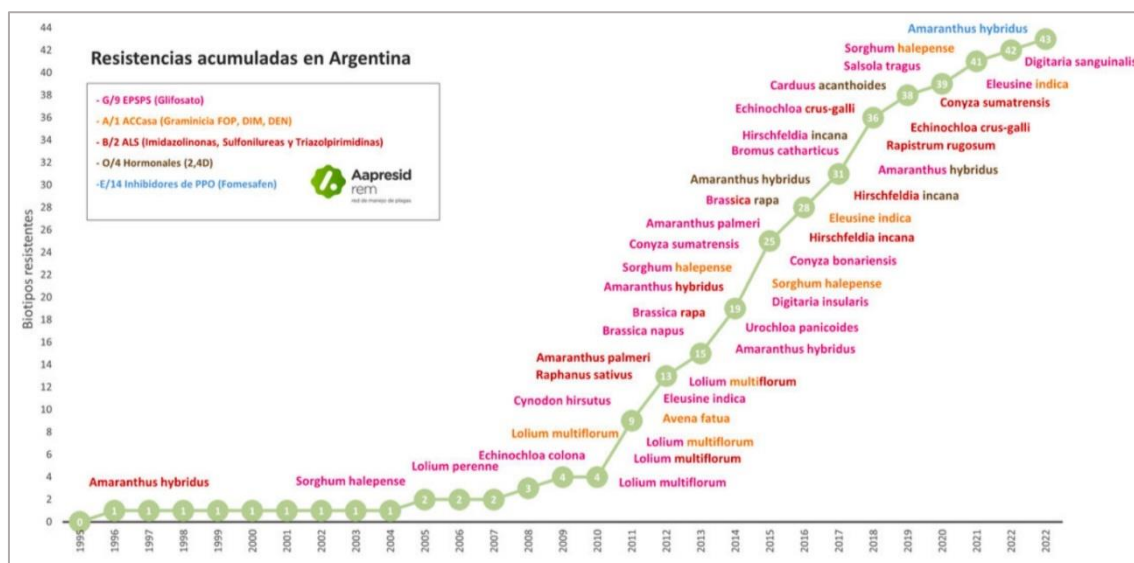
Figura I. 13. Aumento de número de casos de resistencia por modo de acción.

G2: Inhibidores ALS, G3: Inhibidores microtúbulos, G5: 3. Inhibidores de la fotosíntesis en el Fotosistema II, G1: Inhibidores ACCasa, G4: auxinas sintéticas, G22: Inhibidores fotosistema I, y G9: Inhibidores de la EPSPS: Fuente (Heap, 2022)

Se han reportado resistencias a todos los modos de acción conocidos (Figura I. 13) y no se han registrado modos de acción nuevos en el mercado desde 1991 (Délye, 2013); durante 30 años no se han lanzado al mercado nuevos modos de acción. Recientemente se anunció una nueva clasificación para dos nuevos modos de acción; grupo 28, inhibidor de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) por el tetflupirrolimet, esta enzima se encuentra en la ruta de síntesis de la uridina (nucleósido del ARN) y grupo 33, inhibidores de la homogentisato solanesil transferasa (HST), enzima en la ruta de síntesis de la plastoquinona (Torra *et al.*, 2022).

Algunos herbicidas tienen mayor probabilidad de desarrollar resistencias que otros, hay varias razones para que esto suceda, si un herbicida se utiliza con poca frecuencia en un área pequeña y sólo se dirige a unas pocas especies, es poco probable que seleccione malezas resistentes, incluso si la frecuencia de mutación inicial es alta (por ejemplo, difenzoquat). Por el contrario, si la frecuencia de mutación inicial es muy baja, pero se utiliza en un área masiva y está destinado a la mayoría de las especies, es probable que seleccione muchas malezas resistentes (por ejemplo, el glifosato). El peor de los casos ocurre cuando la frecuencia de mutación inicial es alta, el herbicida se utiliza en un área masiva, y el herbicida se dirige a muchas especies (inhibidores de acetolactato sintasa (ALS)) (Heap, 2014).

En Argentina están reportados 43 biotipos resistentes en 24 especies de malezas a 5 modos de acción de herbicidas (Figura I. 14 y Figura I. 15) (REM, 2022).



La Red de Manejo de Plagas (REM) de Aapresid cada dos años realiza un mapeo de malezas resistentes presentes en el territorio agrícola argentino, en 2021 se realizó el relevamiento de 29 millones de hectáreas. En sintonía con lo que sucede a nivel mundial se registró aumento en la cantidad de malezas mapeadas, alcanzando un total de 27 especies, si se distingue por modos de acción, 11 corresponden a resistencias a glifosato, 4 a graminicidas, 4 a ALS, 1 a hormonales y 2 a resistencias múltiples.

Se registró el avance de malezas en 449 partidos o departamentos nuevos, siendo la maleza mayor representada *Conyza* sp. resistente a ALS y en segundo lugar el complejo de nabos resistentes a 2,4D y a glifosato (*Raphanus sativus* (Nabón), *Brassica napus* (Colza o Canola), *Brassica rapa* (Nabo) e *Hirschfeldia incana*). La problemática a nivel nacional se complejiza ya que entre las 10 malezas de mayor crecimiento se encuentran otros herbicidas y no únicamente glifosato (Figura I. 16) (REM, 2021)

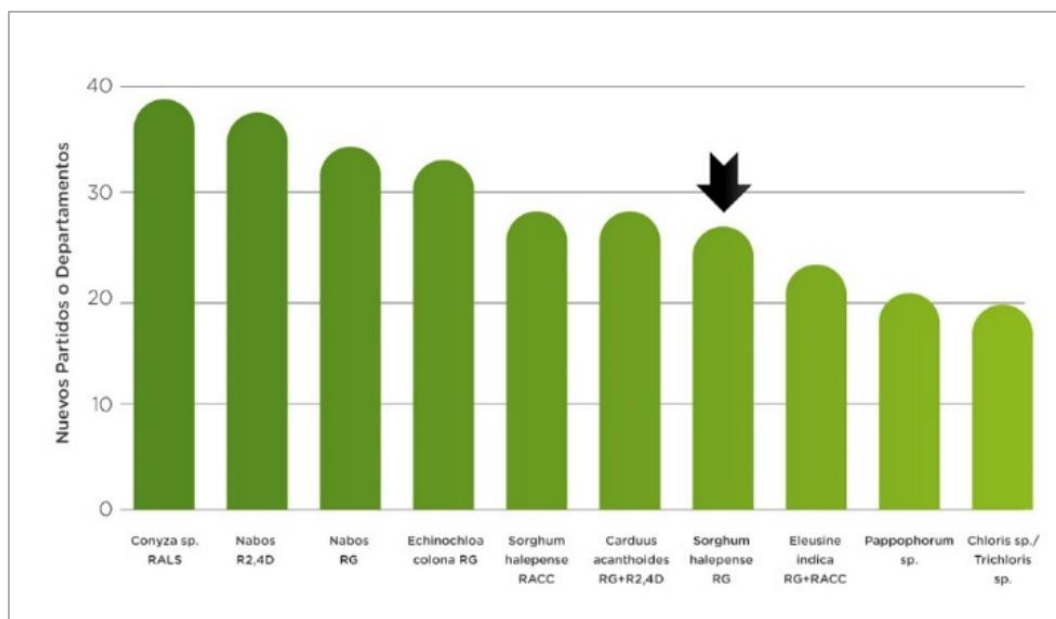


Figura I. 16. Malezas con mayor avance geográfico.
Fuente: REM 2021

Mecanismos de resistencia a los herbicidas.

El uso de herbicidas es ampliamente difundido en la agricultura moderna, ya que ofrece una herramienta excepcional para el manejo de malezas y también facilita la producción de cultivos sin labranza para conservar el suelo y la humedad. Sin embargo, la aplicación repetida de herbicidas con el mismo mecanismo de acción puede resultar en la selección de malezas resistentes a los herbicidas (Jugulam & Shyam, 2019).

Las malezas pueden sobrevivir a la aplicación de herbicidas mediante una variedad de mecanismos, que pueden ser divididos en dos amplias categorías: mecanismos asociados al sitio blanco (TRS, por sus siglas en inglés, *Target Site Resistance*,) y mecanismos no asociados al sitio blanco (NTSR, por sus siglas en inglés *Non Target Site Resistance*,) (Délye *et al.*, 2013) (Figura I. 17). Los mecanismos TSR involucran cambios en el blanco molecular del herbicida (usualmente una enzima) que resulta de una sustitución aminoacídica en la secuencia codificante y como consecuencia la eficacia del herbicida se ve disminuida, también puede estar asociado con la sobreexpresión (o amplificación génica) de la enzima (aumento de la expresión o del número de copias genómicas), frecuentemente es de carácter monogénico (Rigon *et al.*, 2020) . Los mecanismos

NTSR son mecanismos que reducen la cantidad del herbicida que llega al sitio de acción y/o modificando el herbicida; estos incluyen reducción de la absorción y/o translocación, incremento en el secuestro y aumento de la degradación metabólica; suelen ser caracteres poligénicos (Figura I. 18). Esta diversidad en los mecanismos representa una amenaza seria, dado que puede generar resistencia a herbicidas de diferentes modos de acción (Rigon *et al.*, 2020).

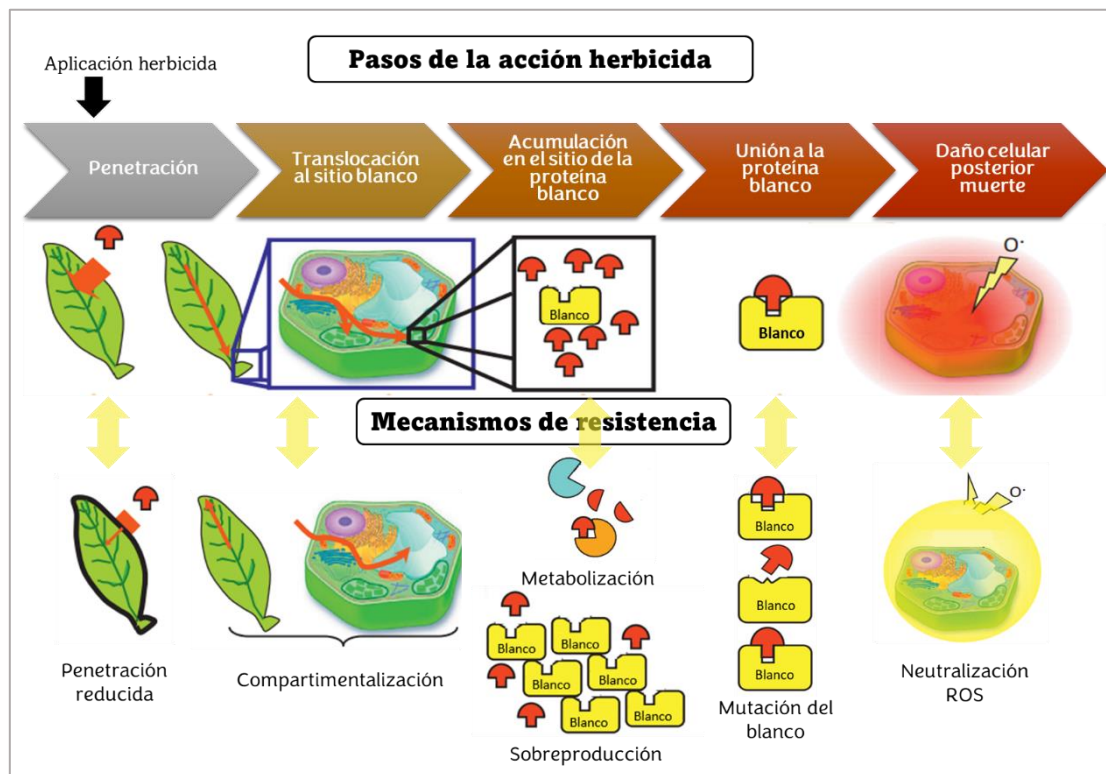


Figura I. 17. Mecanismos de resistencia a los herbicidas.
Adaptada (Délye *et al.*, 2013).

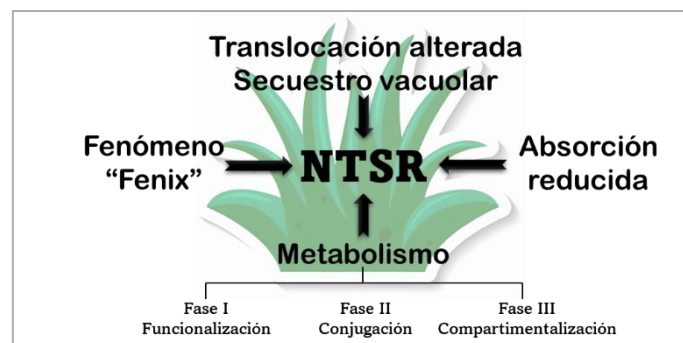


Figura I. 18. Mecanismos NTSR.
Adaptada (Rigon *et al.*, 2020). Imagen maleza: vectezy

Mecanismos TSR

Mutaciones sitio blanco

La resistencia TSR es conferida usualmente por alelos dominantes en un único *locus* en genes nucleares, se han identificado resistencias monogénicas nucleares para los herbicidas de los grupos A, B, K1,K2, E y G (Figura I. 7 y Tabla I. 3), mientras que el modo de herencia para el grupo C es citoplasmático (Délye *et al.*, 2013). Este mecanismo de resistencia se da generalmente por cambios en la estructura tridimensional de la proteína blanco del herbicida y en la distribución de los grupos polares en las posiciones cruciales para la estabilidad de la unión del herbicida a la proteína. Estos cambios son generalmente debido a sustituciones aminoacídicas en varias posiciones posibles; dependiendo del herbicida y del cambio estructural la disminución de la afinidad puede conferir resistencias moderadas o altas (Délye *et al.*, 2013). La primer mutación fue identificada hace más de 35 años y confería resistencia a triazina, desde entonces numerosas mutaciones fueron identificadas en docenas de especies de malezas y ahora abarcan nueve sitios blanco de herbicidas (Murphy & Tranel, 2019).

Numerosos factores influyen en la evolución de la resistencia asociada al sitio blanco, la tasa de mutación y la frecuencia inicial de los alelos resistentes en las poblaciones, su modo herencia y el efecto sobre la adaptabilidad ante la presencia y ausencia del herbicida, el patrón de cruzamientos entre los individuos de la población y el flujo de genes entre las poblaciones (Délye *et al.*, 2013).

Tabla I. 3. Mutaciones TSR a herbicidas

Sitio blanco	Herbicida	Grupo	Año
Proteína D1	atrazina	C	1983
Acetolactato sintasa	clorimuron	B	1992
Tubulina	trifluralina	K1, K2	1998
Acetil CoA carboxilasa	cletodim	A	2001
5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa	glifosato	G	2002
Fitoeno desaturasa	fluridona	F1	2004
protoporfirinogeno oxidasa	lactofen	E	2006
glutamina sintetasa	glufosinato	H	2012
receptor auxina	2,4-D	P	2018

Mecanismos de duplicación génica

La duplicación génica es la replicación heredable de un segmento de ADN codificante que resulta en una o más copias adicionales dentro del genoma de un organismo, este es un proceso común en la historia evolutiva de las plantas y es vital para la generación de la diversidad genómica, como consecuencia el aumento de la expresión a nivel de ARNm sería el resultado inmediato (Gaines *et al.*, 2020).

El primer caso de duplicación génica identificado en una población de malezas fue en *Amaranthus palmeri* resistente a glifosato donde la duplicación llevó de 4 a más 100 veces el número de copias relativo con el consecuente aumento en la expresión del ARNm (Gaines *et al.*, 2020). Estudios de citogenética mediante

FISH (por sus siglas en inglés, *Fluorescence in situ Hybridization*,) mostró que las copias de la EPSPS estaban dispersas en todo el genoma en todos los cromosomas. Las copias duplicadas mostraron contener intrones, indicando que la duplicación no ocurrió vía retrotransposones, y se hallaron múltiples tipos de elementos genéticos móviles asociados a los genes duplicados, mediante citometría de flujo pudieron analizar que los individuos de *A. palmeri* resistentes mostraban tener genomas significativamente más grandes que los susceptibles (Patterson *et al.*, 2018).

Un ejemplo fascinante de variabilidad genética que conduce a la adaptación es un gen duplicado para EPSPS contenido dentro de un replicón >300 kb conteniendo múltiples marcos de lectura abiertos adicionales, se descubrió que este replicón tenía estructura circular por fuera de los cromosomas, se lo denominó ADN circular extracromosómico (ADNecc), se puede adherir a los cromosomas y ser transmitido en meiosis y mitosis, explicando esto la variación en la herencia del número de copias de la EPSPS (Gaines *et al.*, 2020).

En *Kochia scoparia* también se demostró que la resistencia estaba dada por el incremento en el número de copias de la EPSPS que se correlacionó con el incremento en la expresión y la abundancia de la proteína, por FISH se reveló que todas las copias de la EPSPS se encuentran en un único *locus* sugiriendo que todas las copias están ubicadas en tándem, se propuso que esta duplicación en tándem estaba dada por un evento de *crossing-over* desigual produciendo las copias en tándem (Patterson *et al.*, 2018)

Se ha reportado casos de duplicación génica en *Lolium perenne ssp. multiflorum*, *Bromus diandrus*, *Eleusine indica* y *Cloris truncata*, de los cuales no hay estudios citogénicos o de secuenciación (Patterson *et al.*, 2019).

Una pregunta que ha surgido es, porqué la amplificación génica no se ha observado como mecanismo de resistencia para otros herbicidas, una explicación posible fue que hay “soluciones evolutivas” más fáciles para la mayoría de los otros herbicidas, por ejemplo, numerosas mutaciones puntuales para el gen de la acetato lactato sintasa (ALS) confiere una resistencia robusta que inhibe la enzima; en cambio para glifosato pocas mutaciones brindan la resistencia y con excepción de las mutaciones dobles el nivel de resistencia es moderado; por lo tanto, la amplificación génica puede ser un mecanismo de resistencia a los herbicidas extremadamente raro, que se selecciona en ausencia de los mecanismos tradicionales de mutación (Tranel, 2017). La variación en el número de copias (CNV, por sus siglas en inglés, *Copy Number Variation*,) es especialmente importante en plantas que tienen ciclos de vida cortos y viven constantemente en ambientes cambiantes con presión de selección continua como las malezas (Patterson *et al.*, 2018).

Se reportó la amplificación (entre 5 a 8 copias) de genes codificando la Acetil-CoA-Carboxilasa (ACCase) en *Digitaria sanguinalis*, aún no han sido elucidados los detalles de cómo se da la amplificación génica (Tranel, 2017). Recientemente se publicó un trabajo de amplificación génica en *A. palmeri* que brinda resistencia a glufosinato, la enzima blanco es la glutamina sintasa (GS) que cataliza la incorporación de amonio al glutamato produciendo glutamina en un proceso que es dependiente de ATP, siendo este el primer paso de la vía de asimilación de nitrógeno en plantas, la inhibición causa acumulación de amonio. En *A. palmeri* existen

para la GS dos isoformas citosólicas (GS1.1 y GS1.2) y dos isoformas cloroplásticas (GS2.1 y GS2), se observó un importante incremento en el número de copias de GS2 y también una significativa sobreexpresión en todas las muestras analizadas; mientras que GS1 es codificado por una familia nuclear multigénica compuesta por 3 a 5 isoformas, en cambio GS2 es codificada por un único gen nuclear (Noguera *et al.*, 2022).

Mecanismos NTSR

Los herbicidas son compuestos químicos que no constituyen sustratos naturales para las enzimas o los transportadores involucrados en la resistencia. Sin embargo, ante la constante presión de selección ejercida por su uso, se seleccionaron sofisticados sistemas de detoxificación para estos compuestos químicos (Yuan *et al.*, 2007). Uno de los aspectos más riesgosos de los mecanismos NTSR es que pueden estar asociados a resistencia cruzada, la cual es impredecible y no es específica para un modo de acción de terminado, así estos mecanismos seleccionados por un herbicida pueden conferir resistencia cruzada a otros modos de acción incluso a aquellos que aún no han sido comercializados (Délye *et al.*, 2013). Una hipótesis posible para la inducción de los NTSR es que la aplicación de los herbicidas es un estrés que dispara mecanismos de respuestas en todos los individuos de malezas independientemente de su sensibilidad al herbicida (Délye, 2013)

Absorción reducida

Los herbicidas para ser efectivos deben ser absorbidos en las plantas por raíces u hojas, los primeros trabajos sobre absorción foliar diferencial fueron atribuidos principalmente a diferencias en el grosor de las cutículas y su composición, también al número y la estructura de los tricomas. Otros tipos de hojas tienen glándulas lisígenas involucradas en la producción y almacenaje de metabolitos secundarios aceitosos que pueden compartimentalizar herbicidas lipofílicos, previniendo que los mismos alcancen el sitio de acción (Gaines *et al.*, 2020). La disminución de la absorción no es un mecanismo común, si bien ha sido reportado en *Helianthus annuus* resistente a imazetapir y clorimuron, en *Lactuca serriola* resistente a 2,4-D, *Poa annua* resistente a atrazina y *Lolium multiflorum* y *Sorghum halepense* resistentes a glifosato (Gaines *et al.*, 2020).

Translocación reducida y resistencia metabólica

Los herbicidas sistémicos dependen de la translocación por floema para una actividad óptima. Para ello deben atravesar la cutícula y entrar en las células de las hojas, lo que implica el transporte activo o procesos de difusión pasiva, una vez dentro del simplasto deben translocarse desde la hoja fuente a las hojas jóvenes vía floema; la resistencia debido a translocación reducida ocurre cuando el herbicida es retenido en las hojas fuente y se impide su translocación a las zonas de crecimiento. Los mecanismos que actúan son aquellos capaces de atrapar al herbicida en las hojas fuente (por ejemplo por el secuestro dentro de las vacuolas) o evitando el movimiento a través de las membranas (función alterada del transporte activo a través de la membrana) (Gaines *et al.*, 2020).

La resistencia puede estar causada por un proceso de detoxificación que sigue un esquema de 4 fases (Figura I. 19 y Figura I. 20) (Yuan *et al.*, 2007).

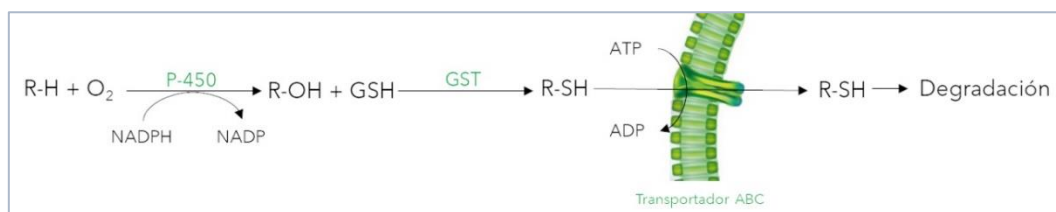


Figura I. 19. Esquema del proceso de detoxificación en 4 pasos. Citocromo P-450, glutatión S transferasa, transporte dependiente de ATP vía transportadores ABC, seguido por la posterior detoxificación en vacuola adaptado de Yuan *et al.*, 2007

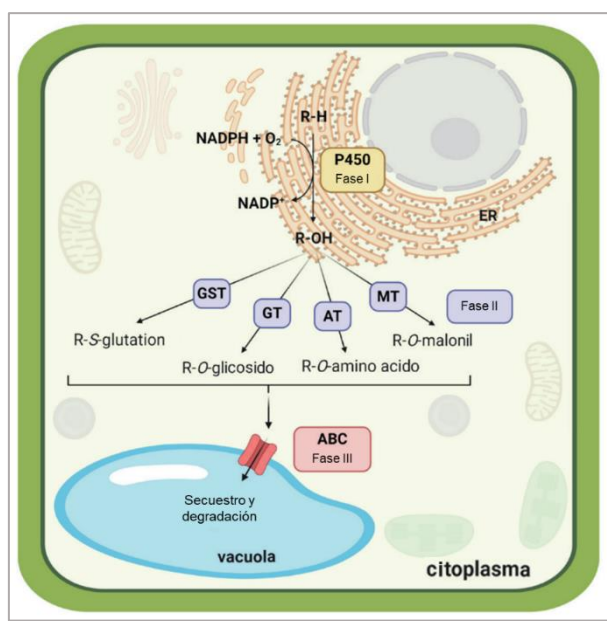


Figura I. 20. Esquema del metabolismo del herbicida en una célula vegetal.

Para ser detoxificados los herbicidas pueden pasar por tres fases, fase I agrega pequeños grupos funcionales en la estructura, fase II añade metabolitos hidrofílicos a través de diversas transferasas y fase III moviliza los conjugados a vacuola. P-450: citocromo P450, GST: glutatión S transferasa, GT: glicosil transferasa, AT: aminotransferasa; MT: malonil transferasa, ABC: transportadores dependientes de ATP, ER: retículo endoplásmico. Adaptado de Rigon *et al* 2020

Fase I:

Esta mediada frecuentemente por el citocromo P450; proteínas de membranas en el retículo endoplásmico están involucradas en muchos procesos biológicos en plantas, incluyendo la biosíntesis de macromoléculas y degradación de xenobióticos. La reacción principal es la inserción de un átomo de oxígeno al herbicida, convirtiéndolo en un compuesto relativamente hidrofílico con fitotoxicidad reducida. Los P450 de las malezas tienen la capacidad de metabolizar 11 de los 26 modos de acción reconocidos (Rigon *et al.*, 2020).

Recientemente se caracterizó a una aldo-ceto reductasa como gen de Fase I (Rigon *et al.*, 2020).

Fase II:

Involucra la conjugación del herbicida o su producto de degradación primaria. La glutatión S transferasa (GST) está involucrada en la respuesta a estrés y puede participar en la detoxificación, tiene una

especificidad de amplio espectro a diferentes sustratos. Aunque se trata de una superfamilia de enzimas se han reportado que media el metabolismo de 5 de los 26 modos de acción. Las aminotransferasas y malonil transferasas llevan a cabo reacciones similares conjugando una variedad de aminoácidos y malonato de los productos (Rigon *et al.*, 2020).

Las glicosiltransferasas es otra familia de proteínas involucradas en esta fase, conjugan una molécula de azúcar a un amplio rango de moléculas lipofílicas como hormonas vegetales, metabolitos secundarios y xenobióticos como los herbicidas, estas proteínas están presentes en todos los reinos y son clasificadas en 78 subfamilias (Yuan *et al.*, 2007).

Fase III:

Involucra la compartimentalización y la incorporación de los metabolitos dentro de la vacuola y/o como material de la pared celular. Los transportadores ABC dependientes de ATP están localizados en el tonoplasto y median la compartimentalización del herbicida dentro de la vacuola (Rigon *et al.*, 2020).

El fenómeno “fénix”.

Un mecanismo único para la resistencia a glifosato ha sido descrito como el “fenómeno fénix”, el cual es el resultado de una acción acelerada del herbicida, una de las ventajas del glifosato como herbicida es que actúa lentamente, lo que le permite translocarse y matar los tejidos meristemáticos. En el caso de *Ambrosia trifida* se observa una rápida respuesta a glifosato que evita la translocación a los meristemas, se produce un rápido marchitamiento y desecación de las hojas, seguido de un rebrote de la planta a partir de los meristemas que no tuvieron contacto con el herbicida, de ahí el nombre de fenómeno fénix. En este caso no se encontró que ningún otro mecanismo de resistencia este actuando. Especies reactivas del oxígeno (ROS) se acumulan dentro de los 30 minutos de aplicado el herbicida en las hojas viejas del biotipo resistente. Las causas de este tipo de respuesta rápida aún son desconocidas, pero guarda similitud con desencadenantes de la inmunidad (Gaines *et al.*, 2019). Una rápida necrosis seguida de rebrote fue un mecanismo de resistencia identificado en un biotipo de *Conyza sumatrensis* del sur de Brasil resistente a 2,4-D. Los síntomas posteriores a la aplicación son similares a los observados en *A. trifida*, probablemente la rápida muerte celular por ROS impide la translocación del herbicida (Gaines *et al.*, 2020).

Otros mecanismos metabólicos

Algunas especies especialmente las leguminosas metabolizan el glifosato a ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glioxilato, en plantas no se ha identificado ni gen ni enzima de la glifosato oxidorreductasa, el AMPA es poco tóxico por lo que una degradación lo suficientemente rápida brindaría resistencia (Gaines *et al.*, 2020). En *Echinochloa colona* se caracterizó un biotipo resistente a glifosato, mediante secuenciación de ARN encontraron la sobreexpresión de dos genes aldo-ceto reductasa (AKR) y analizando el metabolismo de las

plantas resistentes, éstas tenían mayor capacidad de transformar glifosato a AMPA y glioxilato (Pan *et al.*, 2019).

Influencia de los factores ambientales en los mecanismos NTSR

Se sospecha que los mecanismos NTSR se desarrollan gradualmente en respuesta a estrés del tipo biótico y abiótico, lo que les permite adaptarse a las condiciones de crecimiento. Las condiciones cambiantes del medioambiente pueden afectar la eficacia de los herbicidas y favorecer la selección de biotipos más resistentes, los efectos de condiciones ambientales como la temperatura, la concentración de CO₂ y la humedad relativa han sido estudiados en varias malezas resistentes. Por ejemplo, a altas temperaturas disminuye la eficacia de la mesotriona para controlar *A. palmeri* debido al rápido metabolismo (Jugulam & Shyam, 2019).

Resistencia a Glifosato

El creciente uso de herbicidas para controlar malezas es una característica dominante en la agricultura moderna, el glifosato es el herbicida más aplicado a nivel mundial y desde 1996 a 2014 su uso se incrementó en un factor de 15 veces (Clapp, 2021).

En 1996 se introdujo la primera soja resistente a glifosato (GR, *glyphosate resistant*, por sus siglas en inglés), (Heap & Duke, 2018). Los cultivos GR eran de fácil manejo, económicos, efectivos y compatibles con el ambiente ya que reducían el uso de combustible y trabajo, por la disminución de las horas y energía necesarias para la labranza (Johnson *et al.*, 2009). Los agricultores adoptaron estos cultivos cuando los tuvieron disponibles, volviendo esta tecnología en la adoptada con mayor rapidez en la historia de la agricultura. Al ser desde el inicio muy eficaz, muchos productores dependían totalmente del uso de glifosato, por lo cual una cuestión clave siempre fue si un sistema tan extenso que dependía sólo del glifosato sería sostenible a lo largo del tiempo (Green, 2018). Mientras que previamente eliminaba a todas las plantas, con el advenimiento de los cultivos resistentes, podía ser utilizado no solo previo a la siembra sino también a lo largo de toda la estación de crecimiento sin daño alguno al cultivo y ahorrando el laboreo de eliminar a las malezas (Clapp, 2021).

El uso sucesivo campaña tras campaña desplazó el uso de otros modos de acción selectivos en la medida que aumentaba su uso en los cultivos GR. Por ejemplo, el uso de componentes activos de herbicidas utilizados en al menos el 10 % del área sojera de EE. UU descendió de 11 en 1995 a solo 1 en 2002. En 2014 todavía dominaba el mercado global con el 65% del volumen, mientras que muy alejado el segundo era la atrazina con el 6% (Green, 2014).

Aunque es un herbicida que comparativamente tiene bajo riesgo para la evolución de resistencias, la presión de selección ha sido ejercida en superficies mucho más grandes durante largos períodos de tiempo, a

diferencia de cualquier otra clase de herbicida; con lo cual los mecanismos de resistencia desarrollados para el glifosato son más diversos que para cualquier otro modo de acción de herbicidas (Heap & Duke, 2018). Actualmente 56 especies de malezas han desarrollado resistencia al glifosato alrededor del mundo (Figura I. 21 y Figura I. 22), 27 dicotiledóneas y 29 monocotiledóneas (Figura I. 24) (Heap, 2022). Hay reportes de 19 malezas resistentes a glifosato para las cuales el mecanismo todavía no ha sido confirmado (Baek *et al.*, 2021). En la Figura I. 23 se pueden observar cuando y cuales malezas fueron reportadas como resistentes a glifosato (Heap, 2022).

Las malezas resistentes a glifosato se han registrado en 30 países, de los cuales la mayoría tienen reportes de menos de 5 especies, Australia, EE. UU y Argentina son excepcionalmente notables ya que registran 19, 17 y 15 especies resistentes respectivamente (Baek *et al.*, 2021).

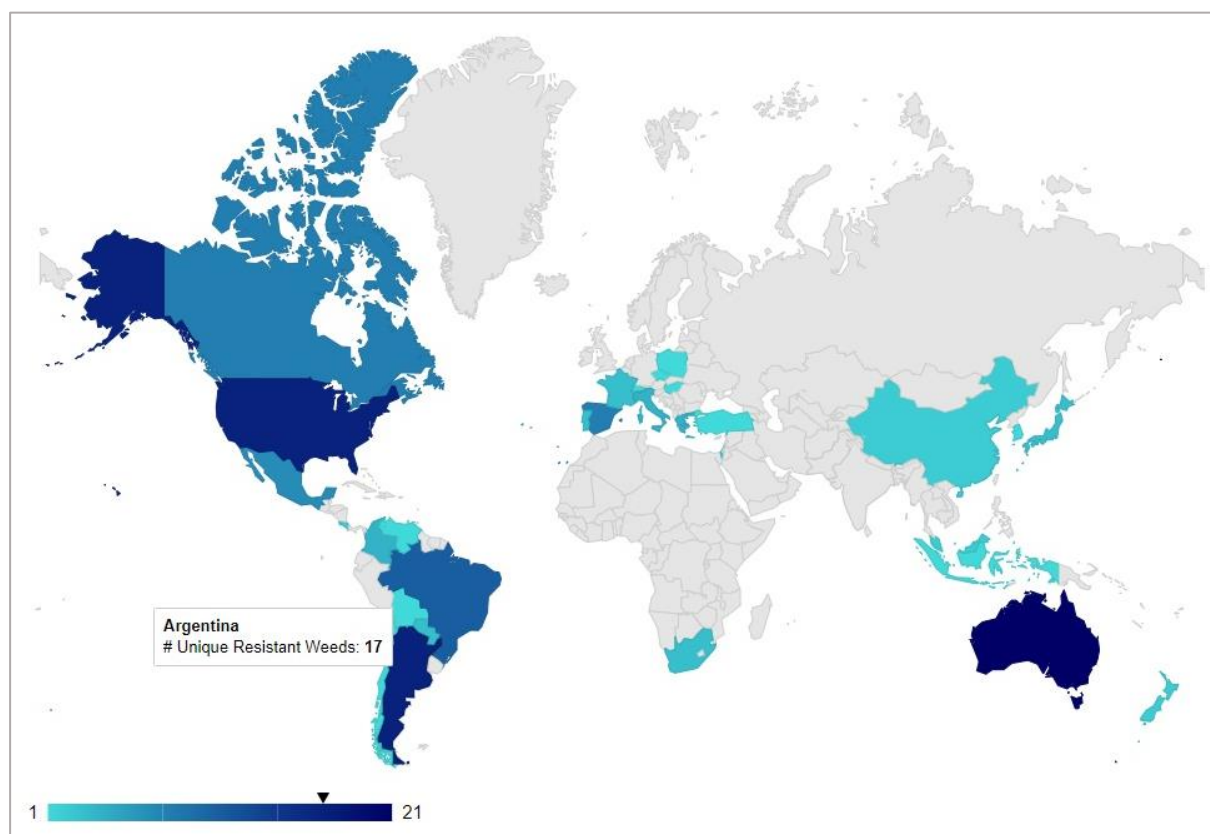


Figura I. 21. Mapa de malezas de resistencia a glifosato.

Fuente Heap, 2022. <https://weedscience.org>

En el relevamiento de la REM 2021 todas las especies del “top 10” son resistentes o tolerantes a glifosato, al concentrarnos en la presencia geográfica de las malezas; liderando este ranking, encontramos a *Conyza* sp. RG, seguida por *Amaranthus* sp. RG y luego las gramíneas *Sorghum halepense* RG, *Eleusine indica* RG y *Echinochloa colona* RG. Luego aparecen las tolerantes del complejo *Chloris/Trichloris* sp., *Commelina erecta* (mapeada nuevamente después de que en las campañas 2017 y 2019 no fuera relevada),

le sigue *Lolium* sp. RG y finalizan otras dos tolerantes, *Pappophorum* sp. y *Borreria* sp. (Figura I. 24) (REM, 2021).

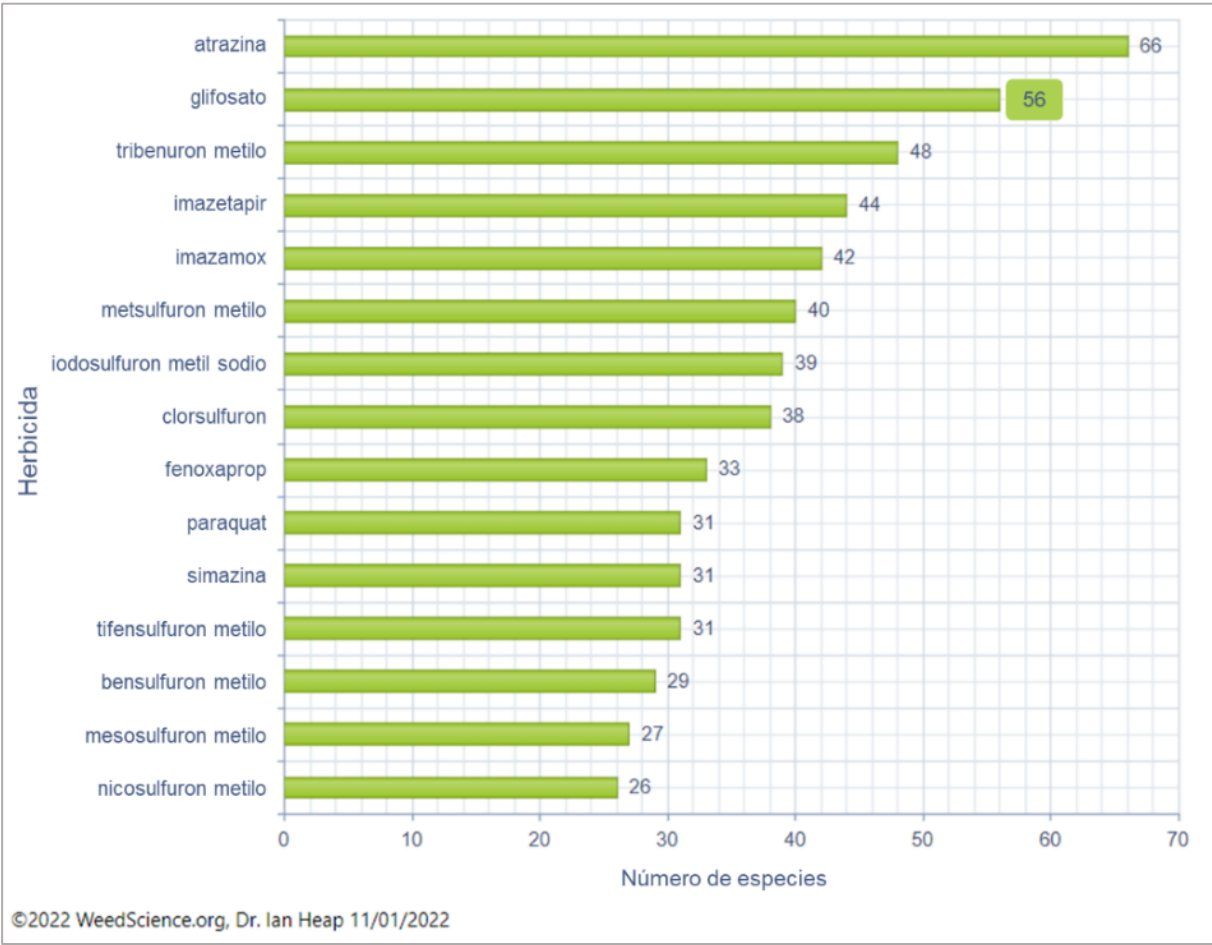


Figura I. 22. Número de especies resistentes por modo de acción.
Fuente Heap, 2022. <https://weedscience.org>

La EPSPS tiene una longitud total de 520 aminoácidos y solo 3 están asociados a la resistencia, Thr-102, Ala-103 y Pro-106 (Tabla I. 4 y Figura I. 25), la sustitución en la posición 106 es suficiente para brindar resistencia, las sustituciones 102 y 103 se han observado únicamente acompañadas de la 106. A diferencia de mutaciones en otros herbicidas en las cuales los cambios brindaron una resistencia robusta, en el caso de la mutación P106 es frecuentemente asociada a un nivel de resistencia débil (Baek *et al.*, 2021).

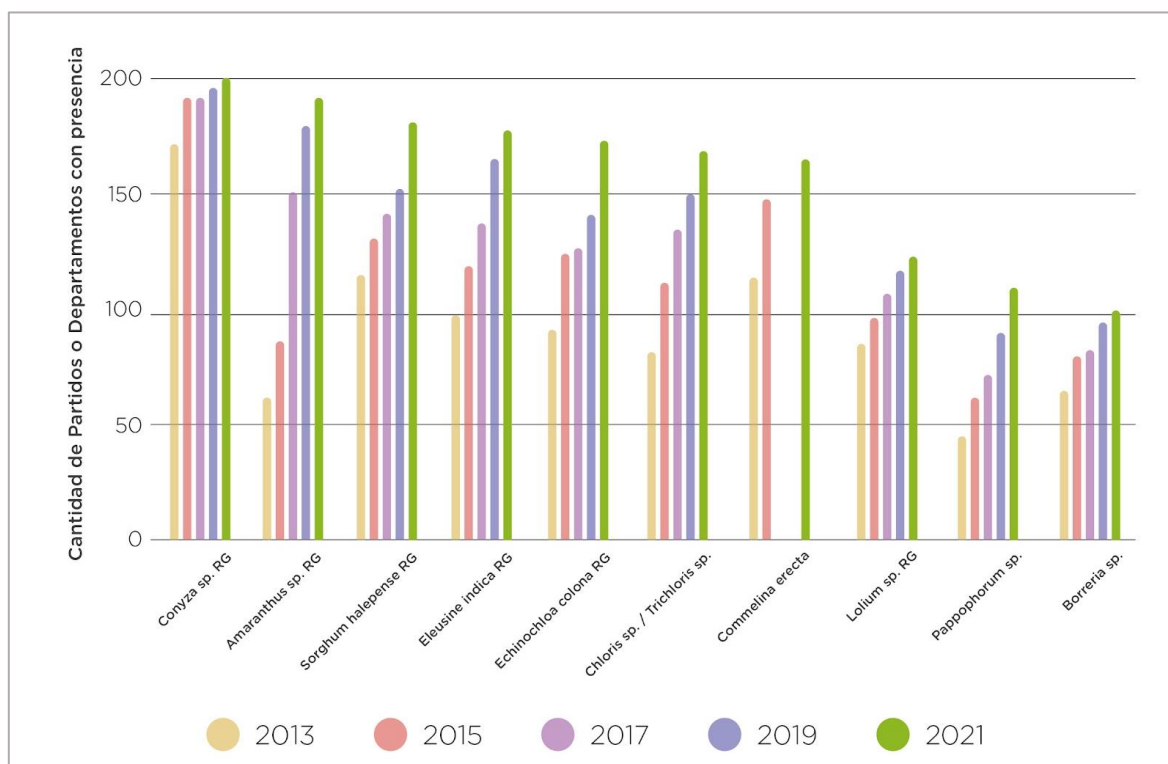
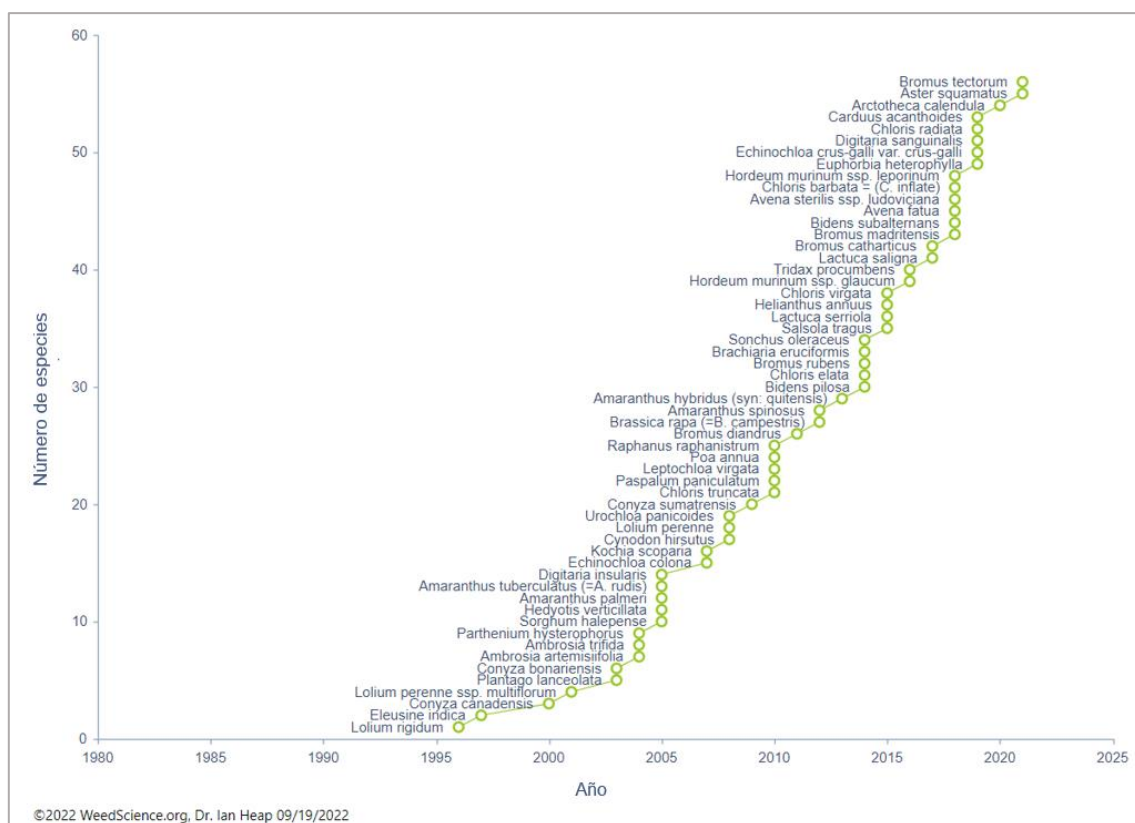


Tabla I. 4. Mutaciones en malezas resistentes a glifosato vía inhibición de la EPSPS.
Fuente: <https://weedscience.org>

Aminoácido	Sustitución	Maleza	Planta	Año
Thr 102	Ile	<i>Eleusine indica</i>	monocotiledónea	2015
	Ile	<i>Bidens pilosa</i>	dicotiledónea	2016
	Ser	<i>Tridax procumbens</i>	dicotiledónea	2018
	Ile	<i>Bidens subalternans</i>	dicotiledónea	2019
	Ile	<i>Amaranthus hybridus</i> (syn: <i>quitensis</i>)	dicotiledónea	2019
Ala 103	Val	<i>Amaranthus hybridus</i> (syn: <i>quitensis</i>)	dicotiledónea	2019
Pro 106	Ser	<i>Eleusine indica</i>	monocotiledónea	2002
	Thr	<i>Eleusine indica</i>	monocotiledónea	2003
	Thr	<i>Lolium rigidum</i>	monocotiledónea	2006
	Ser	<i>Lolium perenne</i> ssp. <i>multiflorum</i>	monocotiledónea	2007
	Ala	<i>Lolium rigidum</i>	monocotiledónea	2007
	Ala	<i>Lolium perenne</i> ssp. <i>multiflorum</i>	monocotiledónea	2008
	Ser	<i>Lolium rigidum</i>	monocotiledónea	2008
	Leu	<i>Lolium rigidum</i>	monocotiledónea	2011
	Thr	<i>Digitaria insularis</i>	monocotiledónea	2012
	Ser	<i>Amaranthus tuberculatus</i> (=A. <i>rudis</i>)	dicotiledónea	2013
	Ser	<i>Echinochloa colona</i>	monocotiledónea	2013
	Thr	<i>Echinochloa colona</i>	monocotiledónea	2014
	Leu	<i>Echinochloa colona</i>	monocotiledónea	2015
	Leu	<i>Eleusine indica</i>	monocotiledónea	2015
	Ser	<i>Lolium perenne</i>	monocotiledónea	2015
	Ser	<i>Parthenium hysterophorus</i>	dicotiledónea	2016
	Ser	<i>Bidens pilosa</i>	dicotiledónea	2016
	Ser	<i>Leptochloa virgata</i>	monocotiledónea	2016
	Ser	<i>Conyza canadensis</i>	dicotiledónea	2017
	Ser	<i>Amaranthus palmeri</i>	dicotiledónea	2017
	Thr	<i>Bidens subalternans</i>	dicotiledónea	2019
	Ser	<i>Amaranthus hybridus</i> (syn: <i>quitensis</i>)	dicotiledónea	2019

Sorghum halepense

El sorgo de Alepo, *Sorghum halepense* (L.) Pers, pertenece a la familia Poácea y es considerada una de las malezas más problemáticas del mundo (Holm *et al.*, 1977).

Sorghum halepense (L.) Persoon. Etimología: halepense (latín), de la ciudad de Haleb (Alepo) en Siria. Nombre vulgar: sorgo de Alepo, sorguillo, maicillo, canutillo, pasto ruso, pasto polaco, cañota, *Johnsongrass* (Leguizamón, 2012).

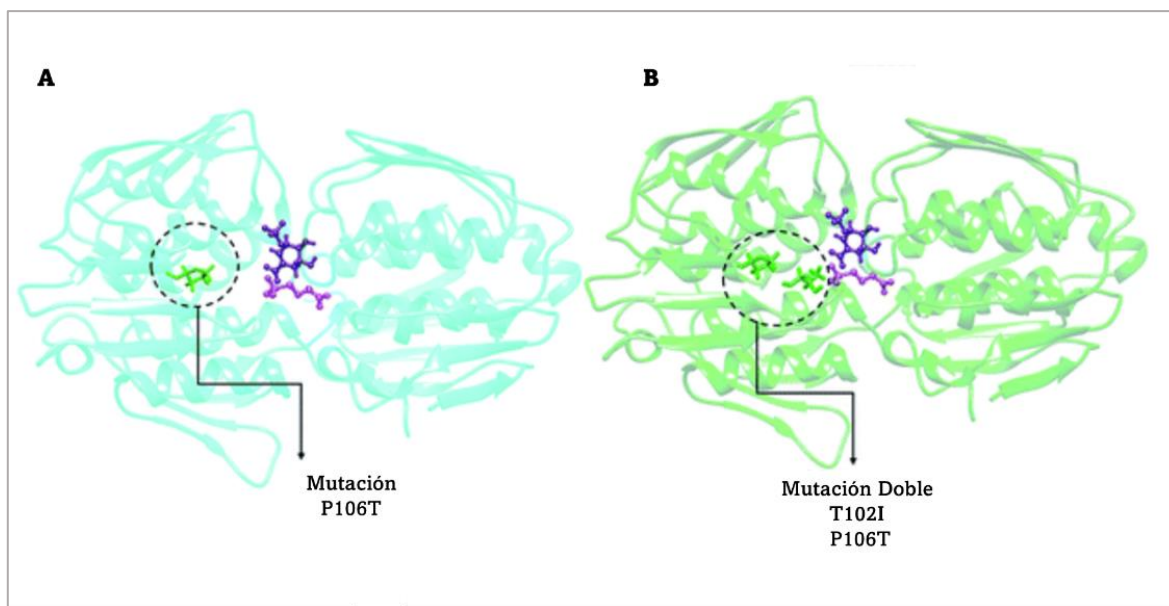


Figura I. 25. Mutaciones en la estructura de la EPSPS de *C. sumatrensis* (A) y *E. indica* (B).
Adaptado de Fonseca *et al.*, 2020.

Es una especie cosmopolita, originaria de la región mediterránea, está considerada una de las peores malezas en 53 países, ubicados en un rango de latitudes muy amplio (55° N hasta 45° S) (Holm *et al.*, 1977). En Argentina el rango de agroecosistemas invadidos es muy amplio, abarcando desde los campos bajo regadío del valle del Río Colorado y de la región cuyana, hasta los sistemas de cultivos intensivos y extensivos de secano en la pampa ondulada, el NOA y el NEA (Leguizamón, 2012).

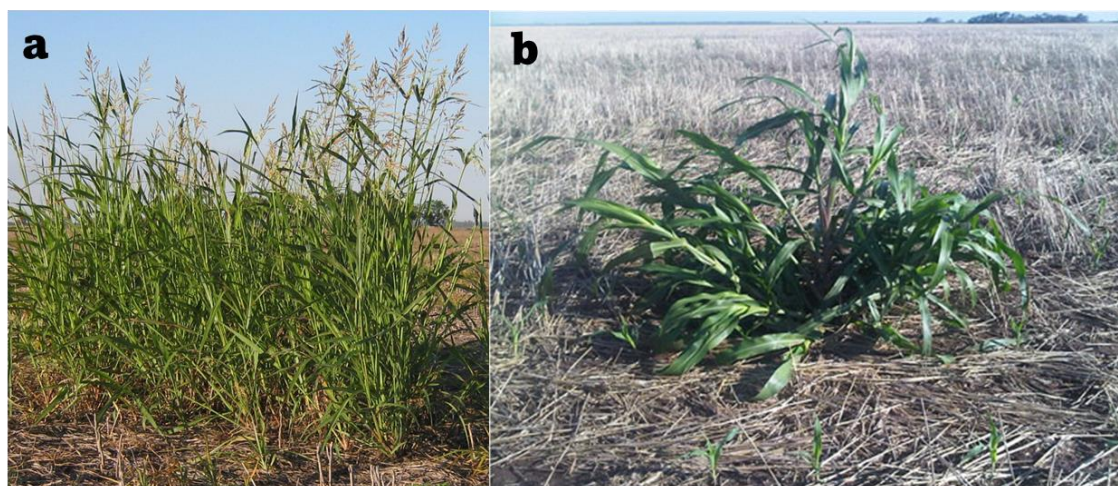


Figura I. 26. Imagen de Sorgo de Alepo.
Fuente: REM 2021

El sorgo de Alepo es una gramínea perenne de ciclo estival con un vigoroso sistema de rizomas de crecimiento horizontal o ligeramente oblicuo (Figura I. 26). Sus hojas son lineales y planas. Las cañas son erectas con médula seca; formando extensas matas. Su inflorescencia se presenta en panojas piramidales y el fruto es un cariopsis (Figura I. 27). Es una especie allotetraploide ($n=10$, $2n = 40$) (Celarier, 1958).

Información citológica, morfológica y molecular sugiere que *Sorghum halepense* surgió como un híbrido natural entre el *Sorghum bicolor* ($2n=20$) y *Sorghum propinquum* ($2n=20$). Se ha extendido en desde su hipotético centro de origen en Asia occidental por gran parte de Asia, África, Europa, América del Norte y del Sur y Australia (Paterson *et al.*, 2020).

Presenta un ciclo anual de desarrollo que se inicia para la parte aérea en primavera, fructificando en verano y multiplicándose a través de rizomas o semillas. Su principal estrategia de reproducción en los ecosistemas agrícolas es mediante la dispersión clonal del rizoma o la producción de semillas (Ghersa *et al.*, 1990).

La introducción en nuestro país a fines del siglo pasado fue con el propósito de utilizarla como forrajera; dado su carácter de planta invasora fue declarada plaga de la agricultura en 1930. Posteriormente, en 1951, se prohibió su siembra y multiplicación en todo el territorio nacional (Fernandez *et al.*, 2018).

Hacia mediados de los '70 constituía un problema ya que generaba pérdidas de rendimiento notables que llegaban hasta 14 toneladas de peso fresco de rizomas por hectárea (Fernandez *et al.*, 2018). Se desarrollaron diversas técnicas de control, entre las cuales el control mecánico inicialmente era el más frecuente, llegando a desarrollarse herramientas especiales para aumentar la exposición de los rizomas (Ghersa *et al.*, 1990); para esta misma época una serie de herbicidas se introdujeron en el mercado argentino y las técnicas de control comenzaron a combinar estrategias químicas y mecánicas, en la década de los '80 el uso y la variedad de herbicidas se incrementó, tanto los pre-siembra como los graminicidas selectivos (Binimelis *et al.*, 2009).



Figura I. 27. Imagen taxonómica (Johnsongrass - *Sorghum halepense*)
Sue Abonyi, professional botanical illustrator

La introducción de la soja RG en 1996 le posibilitó a los productores una nueva estrategia de manejo para controlar una amplia variedad de gramíneas y latifoliadas con un único ingrediente activo (Johnson *et al.*, 2009) y se logró controlar de forma eficiente al sorgo de Alepo durante décadas, sin embargo la utilización continua del mismo modo de acción del herbicida condujo a la selección de biotipos resistentes (Duke & Powles, 2008; Heap, 2014). El consumo de este herbicida aumento de 1 millón de litros en 1991 a 180 millones en 2007 (Binimelis *et al.*, 2009).

Se especulaba con que era improbable la aparición de malezas resistentes a glifosato debido al mecanismo de acción, otros sugirieron que la aplicación de la continua presión de selección provocaría inevitablemente cambios en las malezas (Johnson *et al.*, 2009).

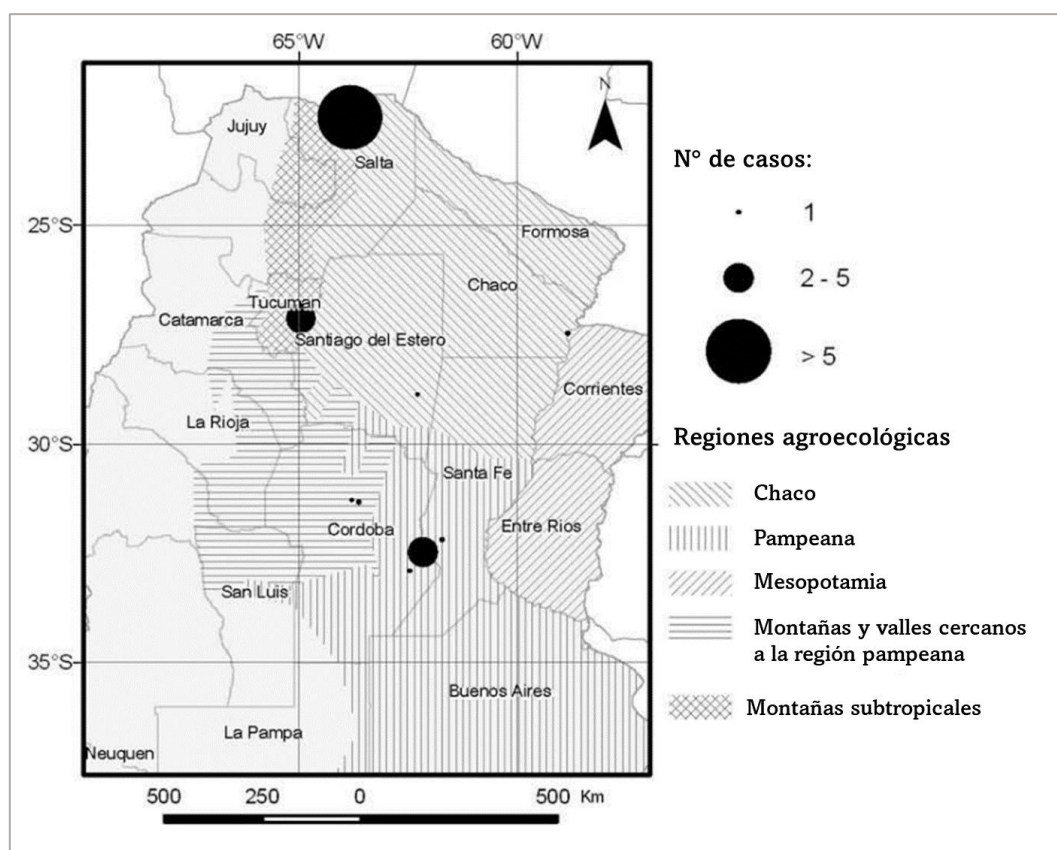


Figura I. 28. Áreas del norte y centro de Argentina confirmadas con sorgo de Alepo en 2008.
Adaptado de Binimelis *et al.* 2009

A partir del 2000 en Salta se comenzó a sembrar soja RG y se utilizó glifosato de forma intensiva y exclusiva como herbicida no selectivo y selectivo durante el barbecho y la siembra de soja respectivamente, en el año 2007 se reportó que durante los 3 años anteriores los productores de la región observaban fallas en el control con glifosato en numerosas poblaciones de sorgo de Alepo (Vila-Aiub *et al.*, 2007). En 2005 se reportó la resistencia a glifosato en sorgo de Alepo en Salta (Figura I. 28) (Binimelis *et al.*, 2009; Heap, 2022) y en 2015 se reportó la triple resistencia a glifosato, cletodim y haloxyfop en Córdoba (Ustarroz, 2015). En EE. UU en

2007 también se reportó la falta del control del glifosato en el sorgo de Alepo en Arkansas, en campos en los cuales se había sembrado continuamente soja RG por al menos seis años en los cuales el único herbicida utilizado fue el glifosato (Riar *et al.*, 2011). Recientemente en Europa se registró el primer caso de resistencia invadiendo las vías de trenes y autopistas del sur de España (Vazquez-Garcia *et al.*, 2020). El sorgo de Alepo en la actualidad en Argentina es una de las 10 peores malezas y la continua aparición de poblaciones resistentes a glifosato en las últimas décadas ha dificultado su control. La REM relevó por tercera vez (2017, 2019, 2021) la abundancia de algunas de las especies resistentes respecto al área afectada y el *S. halepense* RG con 8 millones de hectáreas de superficie afectada se encuentra en sexto lugar (Figura I. 29) (REM, 2021). En los mapas con la información recopilada sobre la presencia y abundancia, se puede observar que en 8 años (2013-2021) el sorgo de Alepo ha invadido la mayoría de la superficie de San Luis y Entre Ríos, la zona Noreste de La Pampa y se ha extendido hacia el sur de Buenos Aires (Figura I. 30).

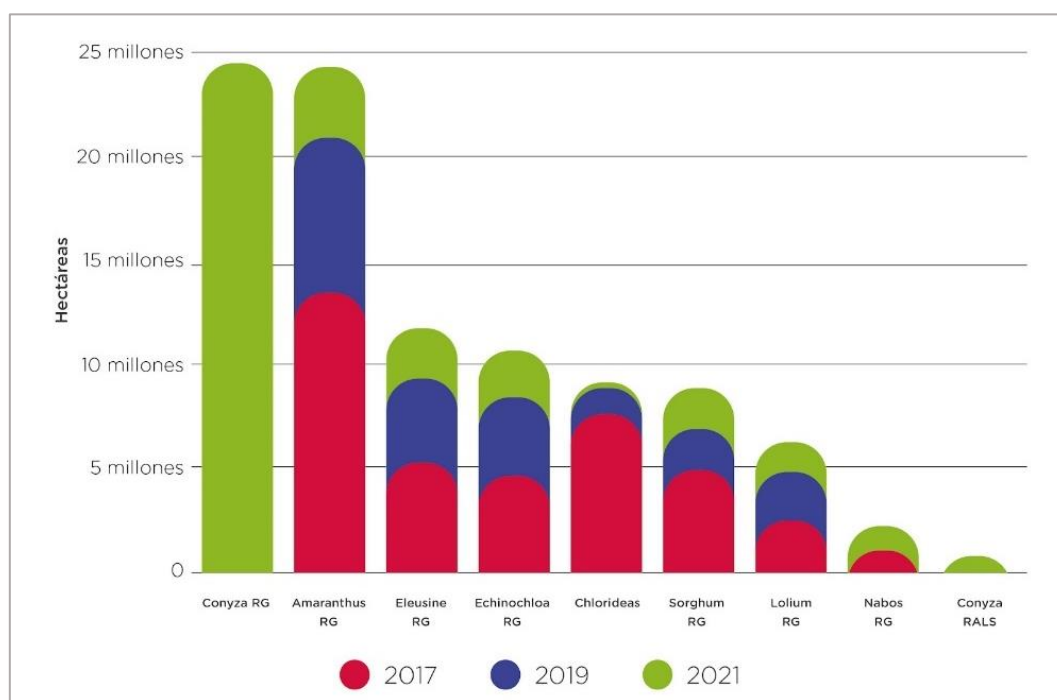


Figura I. 29. Evolución del área afectada por los biotipos resistentes de las 10 peores malezas en Argentina.
Fuente: REM 2021

El cultivo de malezas en diferentes entornos ha demostrado que pueden adaptarse, y de hecho lo hacen, lo que da lugar a poblaciones que varían en rasgos clave. Por ejemplo, se hicieron crecer poblaciones de *S. halepense* recogidas en hábitats agrícolas de EE. UU. y en hábitats sin manejo; en el experimento descubrieron que las plantas no agrícolas (de hábitats no gestionados) crecían más y mostraban una plasticidad fenotípica reducida en relación con las plantas de los hábitats agrícolas. Los mecanismos que impulsan la expansión del sorgo de Alepo siguen sin estar claros, pero es probable que la plasticidad

fenotípica desempeñe un papel importante. Las malezas tienden a mostrar una mayor plasticidad fenotípica que el resto de las plantas y parecen hacerlo sin las limitaciones adaptativas que se encuentran en las plantas que no son malezas, o, en otras palabras, no experimentan un coste adaptativo asociado a la plasticidad (Sharma *et al.*, 2021)

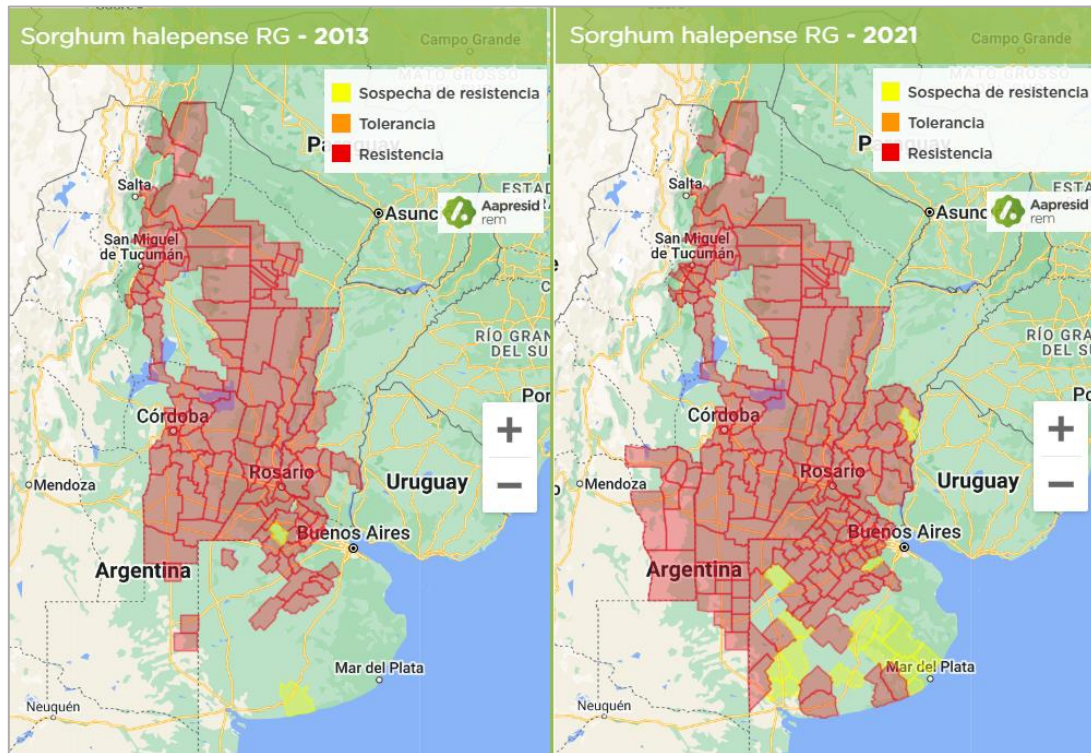


Figura I. 30. Evolución de los departamentos afectados por *S. halepense* de 2013 a 2021.
Fuente: REM 2021

En un estudio realizado para evaluar el potencial de la genómica en el manejo y la biología de malezas, se les consultó a los participantes que eligieran 3 especies prioritarias que consideren podrían ser objeto de secuenciación, el sorgo de Alepo quedó entre las primeras 5 especies de malezas sobre las que se quisiera tener información genómica, denotando el interés sobre esta especie (Ravet *et al.*, 2018).

La secuenciación de los genomas puede brindar información acerca de los orígenes evolutivos de las malezas, permitiendo la identificación de estrategias de manejo que puedan mitigar la evolución de la resistencia. Además, la genómica puede identificar las fortalezas y debilidades de las poblaciones de malezas y aportar datos de cómo las plantas responden a la selección de los herbicidas (Beckie, 2020).

Hipótesis

Respecto a la resistencia a glifosato en los biotipos analizados de sorgo de Alepo, se pondrán a prueba las siguientes hipótesis:

- 1- La hipótesis de origen único o múltiple del carácter resistencia. En el primer caso se espera que las plantas resistentes de distintas regiones presenten índices de similitud genética más elevados entre sí que con las poblaciones susceptibles vecinas. En la hipótesis de origen múltiple las plantas resistentes tendrían fondos genéticos similares a las de sus vecinas.
- 2- También se pondrá a prueba las hipótesis acerca de algunos de los distintos tipos de mecanismos de resistencia a glifosato en los biotipos analizados de sorgo de Alepo basados en:
 - a- la sustitución de uno o dos aminoácidos críticos (posición 102 y 106) en la región más conservada de la enzima EPSPS
 - b- Sobreexpresión y/o amplificación del gen codificante para la enzima EPSPS
 - c- Variación del nivel de expresión de genes involucrados en mecanismos no asociados al sitio blanco

Objetivo

Análisis de la variabilidad genética y estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a glifosato en *Sorghum halepense*

Objetivos particulares

- I. Analizar y establecer el origen único o múltiple de la resistencia a glifosato mediante marcadores microsatélites y poner a punto la técnica ddRADseq para el desarrollo de marcadores moleculares especie específicos.
- II. Evaluar diferentes genes de referencia con el fin de identificar los más estables para realizar qPCR.
- III. Analizar mecanismos TSR mediante la secuenciación del gen que codifica para la enzima EPSPS y el análisis mediante qPCR del número de copias genómicas y el nivel de expresión del gen de la EPSPS.
- IV. Analizar mecanismos NTSR mediante el análisis de los niveles de expresión de genes candidatos a estar involucrados en estos mecanismos.
- V. Analizar la expresión diferencial de genes frente al tratamiento a glifosato mediante RNAseq.

Capítulo 1:

Epidemiología molecular de sorgo de Alepo resistente a glifosato.

Introducción

La evolución y la distribución global de la resistencia a herbicidas en plantas brinda la oportunidad de explorar los interrogantes acerca de los procesos que le dieron origen. El hecho de que la resistencia a herbicidas (en particular las que involucran cambios en el sitio blanco sobre el que actúa el herbicida), sea conferida por las mismas mutaciones puntuales en el mismo *locus* en múltiples poblaciones a lo largo de diferentes especies, es en sí misma, la evidencia de patrones globales de evolución convergente (Gaines *et al.*, 2021)

Una de las principales preguntas acerca del surgimiento de la resistencia es si la misma surge con poca frecuencia (o incluso como un evento único) y posteriormente se propaga a través del flujo de genes dentro y entre las poblaciones, o existen múltiples eventos evolutivos locales (Fernández *et al.*, 2013; Gaines *et al.*, 2021; Kreiner *et al.*, 2018; Neve *et al.*, 2014). El caso de la resistencia a glifosato presenta una dinámica evolutiva potencialmente diferente. El glifosato ha sido usado como un herbicida no selectivo en la agricultura mundial desde mediados de los '70, pero a diferencia de los herbicidas ALS (basados en la inhibición de la acetolactato sintasa), donde la resistencia fue registrada 5-8 años después de su introducción, el primer caso de resistencia a glifosato fue reportado en EE.UU en 2001, después de 25 años de uso (Gaines *et al.*, 2021).

Las mutaciones establecen la frecuencia a la cual las variaciones surgen, la presión de selección determina la dinámica a la cual los genotipos/fenotipos portadores de esas mutaciones ventajosas sobreviven. De esta manera estos genotipos tendrán la posibilidad de dispersarse entre poblaciones y a través de los territorios. En especies que no se mueven, como las plantas, la distancia de dispersión se espera que sea más limitada, haciendo relativamente más probable que los eventos de amplia distribución de la resistencia surjan de múltiples orígenes evolutivamente independientes (Beckie *et al.*, 2019). Sin embargo, en los agroecosistemas las dispersión de semillas de malezas puede ser facilitada por las actividades humanas; dado que las semillas pueden ser transportadas en los territorios por la maquinaria agrícola y potencialmente puede cruzar continentes como contaminante en las semillas de los cultivos (Ravet *et al.*, 2018).

Los marcadores moleculares detectan polimorfismos heredables que pueden ser medidos en uno o más poblaciones de individuos y facilitan el estudio de la genética de poblaciones y la evolución (Davey *et al.*, 2011).

Existe una amplia variedad de marcadores moleculares y la elección de cuál utilizar es dependiente del objetivo del estudio y de las capacidades técnicas para poder ponerlos en práctica (Tabla 1. 1). Existen tres clases principales de marcadores: a) los marcadores morfológicos, los cuales son caracteres fenotípicos que pueden ser medidos por observación, b) los marcadores bioquímicos (proteínas, isoenzimas o aloenzimas) y

c) marcadores de ADN, los cuales son secuencias variables en el ADN; estos últimos son los más usados debido a su abundancia y a que no se encuentran influenciados por el ambiente (Kordrostami & Rahimi, 2015). Particularmente aquellos marcadores basados en la amplificación por PCR son los más implementados desde la invención de esta técnica. Estos marcadores así mismo pueden ser agrupados en: marcadores de amplificación arbitraria (no es necesario tener conocimiento sobre la secuencia a amplificar) y marcadores de amplificación sitio específico (es necesario tener conocimiento de la secuencia a analizar) (Weising *et al.*, 2005).

Tabla 1. 1. Comparación de los marcadores moleculares de ADN más utilizados en plantas
Adaptado de Kordrostami & Rahimi 2015

	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Cobertura genómica	Genoma completo	Genoma completo	Genoma completo	Genoma completo
Cantidad de ADN requerida	Baja	Media	Baja	Baja
Calidad de ADN requerida	Baja	Alta	Media	Alta
Nivel de polimorfismo	Alto	Alto	Alto	Alto
Herencia	Dominante	Dominante/Codominante	Codominante	Codominante
Demanda técnica	Baja	Media	Baja	Alta
Reproducibilidad	Baja/Media	Alta	Alta	Alta
Intensidad de trabajo	Baja	Media	Baja	Baja
Automatización	Media	Alta	Alta	Alta
Costo de desarrollo	Bajo	Medio	Alto	Alto

Dentro de los marcadores de amplificación arbitraria los más destacados son:

-RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNAs*, por sus siglas en inglés): se utilizan iniciadores de 10 nucleótidos de longitud de secuencia arbitraria, estos se unen a las secuencias complementarias en el genoma y ocurre amplificación cuando las regiones entre los iniciadores opuestos están a distancias amplificables (100-3000pb), luego los productos de PCR son separados por electroforesis (Idrees & Irshad, 2014).

-AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, por sus siglas en inglés), son fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción seguido por la ligación con adaptadores y amplificación selectiva por PCR, los fragmentos generados son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (Spooner *et al.*, 2005) o se resuelven mediante la utilización de secuenciadores.

-ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*, por sus siglas en inglés), involucra la amplificación de segmentos de ADN presentes a una distancia amplificable (100-3000 pb) entre dos regiones idénticas de microsatélites orientadas en sentido opuesto. Utiliza iniciadores de 15-25 bp de longitud en una PCR de iniciador único, que es diseñado a partir de las secuencias de los microsatélites, a la que puede agregársele, o no, una extensión de 1 a 4 nucleótidos en el extremo 3' ó 5' que se denomina ancla. Los fragmentos son separados por electroforesis en gel (Pradeep Reddy *et al.*, 2002).

Dentro de los marcadores de amplificación sitio específico se destacan:

-SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, por sus siglas en inglés), es una variación en la secuencia de ADN de un único nucleótido entre los individuos de una misma especie, es el tipo de marcador más abundante, son altamente automatizables a través de la generación de microarreglos. Una manera de detectarlos es por amplificación por PCR empleando iniciadores sobre las regiones flanqueantes al sitio de la variación y posteriormente se secuencia para detectar las sustituciones (Weising *et al.*, 2005).

-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*, por sus siglas en inglés) son fragmentos de 200-800 pb amplificados por PCR usando iniciadores específicos de 20-25 pb de longitud, las hebras simples de ADN de los productos generados son separados por electroforesis no desnaturalizante. Está basado en el hecho de que la movilidad electroforética de la cadena simple de ADN depende de la estructura secundaria, la cual cambia con la mutación (Spooner *et al.*, 2005).

-SSR (*Simple Sequence Repeat*, por sus siglas en inglés) o también llamados marcadores microsatélites o SSR (Figura 1. 1) consisten en un segmento corto de ADN, habitualmente con una longitud de uno a seis o más pares de bases, que se repite múltiples veces en *tandem* en una ubicación genómica particular. Estas secuencias de ADN repetidas habitualmente no son codificantes. La cantidad de segmentos repetidos en una secuencia microsatélite con frecuencia varía entre individuos, lo que los hace útiles como marcadores polimórficos para describir los patrones de diversidad intraespecíficos y evaluar la historia evolutiva de las poblaciones debido a que son altamente polimórficos, multialélicos, muestran herencia codominante y los resultados pueden ser analizados mediante estadísticas sencillas (Andreakis *et al.*, 2009). Una de las características más destacadas de estos marcadores es que pueden detectar múltiples alelos por *locus*. Esta hipervariabilidad los vuelve más informativos que los SNP los cuales en general son bialélicos (Zalapa *et al.*, 2012). Este tipo de marcadores SSR han sido utilizados en estudios para evaluar el origen y dispersión de las malezas resistentes, como por ejemplo en *Bassia scoparia* (Ravet *et al.*, 2018), *Asparagopsis taxiformis* (Andreakis *et al.*, 2009), *Amaranthus palmeri* (Shimono *et al.*, 2020), *Conyza canadensis* (Page *et al.*, 2018) y *Sorghum halepense* (Fernández *et al.*, 2013).

La aproximación molecular ideal para estudios de genética de poblaciones debería emplear cientos de marcadores polimórficos que tengan cobertura del genoma en un experimento único, sencillo y confiable. Décadas atrás esto no era posible pero en la actualidad esto comienza a ser factible con los experimentos de secuenciación de nueva generación (NGS: *Next Generation Sequencing*, por sus siglas en inglés) Técnicas como la Secuenciación de ADN Asociada a Sitios de Restricción (por sus siglas en inglés, *RAD-seq: Restriction site-Associated DNA Sequencing*) las cuales son capaces de descubrir, secuenciar y genotipificar miles de marcadores incluso en poblaciones donde la información genética sea escasa o nula. Al igual que otros marcadores moleculares, como RFLP (por sus siglas en inglés, *Restriction Fragment Length*

Polymorphism) o AFLP, muchos de estos métodos de NGS dependen del empleo de digestiones con enzimas de restricción para producir una reducción de la complejidad del genoma.

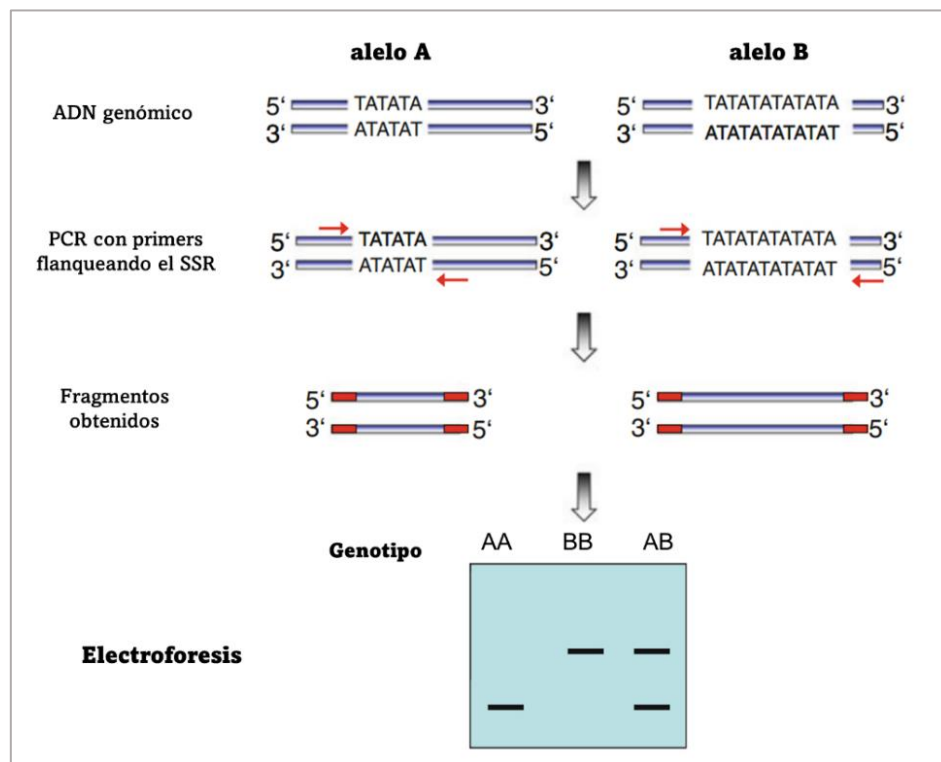


Figura 1. 1 Esquema del análisis con marcadores microsatélites (adaptado de Reineke & Devi, 2013). El ADN genómico es amplificado con oligonucleótidos flanqueando el SSR, los fragmentos son separados por electroforesis.

De esta manera el uso de las enzimas de restricción combinadas con NGS para el descubrimiento de marcadores de todo el genoma, constituyen nuevas tecnologías como la secuenciación de representación reducida (*reduced-representation sequencing*), la secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción mencionada anteriormente (RAD-seq) y la genotipificación múltiple por disparo (*multiplexed shotgun genotyping* MSG, Davey *et al.*, 2011).

Secuenciar el genoma completo de cada individuo en una población es costoso. Esto es frecuentemente innecesario, dado que muchos interrogantes biológicos pueden ser respondidos utilizando polimorfismos que son medidos en una submuestra de regiones genómicas como las que se obtienen con las tecnologías mencionadas (Davey *et al.*, 2011). Otra ventaja de NGS a diferencia del desarrollo convencional de marcadores, es el aislamiento simultáneo de microsatélites de múltiples especies, con la consecuente robustez de poder evaluar los polimorfismos en las regiones flanqueantes. Los métodos convencionales para desarrollar los marcadores microsatélites suelen generar las secuencias a partir de un único individuo y no tienen en cuenta la presencia de elementos repetitivos y mutaciones de inserción-delección que flanquean el *locus* candidato en otros individuos, lo que puede afectar al éxito y la precisión del genotipado dando lugar a

genotipos erróneos. Además, al diseñar iniciadores para múltiples especies, se podrían omitir las pruebas de transferencia cruzada, que son necesarias para muchos estudios (Bonatelli *et al.*, 2015).

En particular el protocolo original de *double digest Restriction site-Associated DNA sequencing* (ddRADseq por sus siglas en inglés) fue desarrollado sobre genomas animales. Debido a la diversidad y complejidad de los genomas vegetales, los diferentes pasos del protocolo requieren revisión para lograr mejores resultados en especies vegetales no modelo (Aguirre *et al.*, 2019). La técnica de ddRADseq utiliza dos enzimas de restricción diferentes, una de corte raro y una de corte frecuente. Únicamente son secuenciados los fragmentos que contienen los dos sitios de restricción en sus extremos y dentro de un rango específico de tamaño (Peterson *et al.*, 2012). Las aplicaciones de esta técnica incluyen el descubrimiento de SNP y SSR en las secuencias generadas (Aballay *et al.*, 2021; Aguirre *et al.*, 2019; Gutiérrez *et al.*, 2021).

Materiales y Métodos

Análisis genético mediante marcadores moleculares microsatélites

Material vegetal

Se recolectaron a campo 18 genotipos resistentes y susceptibles de sorgo de Alepo (Tabla 1. 2). Los rizomas fueron cultivados en un invernadero bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo 16hs/8hs, temperatura 24 °C $\pm$ 3 °C y 140 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ intensidad de luz. También se mantuvieron los ejemplares recolectados con anterioridad a este trabajo (

Tabla 1. 3).

Tabla 1. 2 Sitios de muestreo de los biotipos analizados de novo

ID	Sitio de recolección	Latitud	Longitud	Condición
ERs01	Oro Verde, Entre Ríos	31°49'58"S	60°31'27"O	susceptible
ERs02	Facultad; Entre Ríos	31°49'59"S	60°31' 28"O	susceptible
ERr03	Soresi; Entre Ríos	31°19'56"S	60°01'16"O	resistente
ERr04	Pavioti; Entre Ríos	31°18'48"S	59°46'30"O	resistente
ERr05	Hasenkamp; Entre Ríos	31°27'20"S	59°52'54"O	resistente
ERr06	Hasenkamp; Entre Ríos	31°26'15"S	59°53"O	resistente
ERr07	Hernandarias; Entre Ríos	31°17'11"S	59°46'42"O	resistente
ERr08	Hernandarias; Entre Ríos	31°16'21"S	59°26'13"O	resistente
ERr09	Hernandarias; Entre Ríos	31°15'91"S	59°25'93"O	resistente
ERr10	Ortovsky; Entre Ríos	31°30'34"S	59°41'56"O	resistente
COr03	San Justo; Córdoba	31°11'26,2"S	62°24'12,8"O	resistente
COr04	San Justo; Córdoba	31°11'26,6"S	62°24'11,1"O	resistente
COr05	San Justo; Córdoba	31°11'26,9"S	62°24'09,2"O	resistente
COr06	San Justo; Córdoba	31°11'27,7"S	62°24'07,6"O	susceptible
COr07	San Justo; Córdoba	31°12'38,4"S	62°22'51,5"O	resistente
COr08	San Justo; Córdoba	31°12'38,4"S	62°22'51,5"O	resistente
SFrA	Arteaga; Santa Fé	33°06'22.0"S	61°50'50.7"O	resistente
SFsB	Arteaga; Santa Fé	33°06'29.3"S	61°51'02.9"O	susceptible

Se realizó la extracción de ADN utilizando el kit Nucleo Spin Plant II (Macherey Nagel) de los individuos presentes en la tabla 1 siguiendo las instrucciones del proveedor. La integridad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Figura 1. 2). La calidad

(relación de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm) y cantidad (absorbancia a 260nm) fue verificada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Tabla 1. 3. Sitios de muestreo de los biotipos analizados previamente a esta tesis.

ID	Sitio de recolección	Latitud	Longitud	Condición
BAs01	Castelar, Buenos Aires	34°37'20.32"S	58°39'15.08"O	susceptible
BAs02	Pergamino, Buenos Aires	33°56'40.64"S	60°36'54.44"O	susceptible
COr01	Río Tercero, Córdoba	32°12'35.57"S	64°08'42.51"O	resistente
COs02	Río Tercero, Córdoba	32°13'5.91"S	64°08'52.01"O	susceptible
SAr01	Tartagal, Salta	22°41'4.11"S	64°02'58.73"O	resistente
SAr02	Tartagal, Salta	22°49'1.15"S	64°02'59.54"O	resistente
SAr03	Tartagal, Salta	22°41'36.80"S	63°37'43.23"O	resistente
SAr04	Tartagal, Salta	22°55'21.83"S	63°38'36.40"O	resistente
SAr06	Tartagal, Salta	22°40'06.10"S	63°47'14.80"O	resistente
SAs05	Tartagal, Salta	23°20'6.11"S	64°13'14.19"O	susceptible
SEr01	Taboada, Santiago del Estero	28° 3'53.33"S	63°46'31.48"O	resistente
SEr02	Taboada, Santiago del Estero	28° 3'36.41"S	63°47'40.89"O	resistente
SEr03	Taboada, Santiago del Estero	28° 5'11.02"S	63°46'42.42"O	resistente
SEr04	Taboada, Santiago del Estero	28° 5'3.50"S	63°48'11.80"O	resistente
SFr01	Las Rosas, Santa Fe	32°26'9.60"S	61°34'27.32"O	resistente
SFr02	Las Rosas, Santa Fe	32°25'33.24"S	61°35'3.93"O	resistente
SFr03	Las Rosas, Santa Fe	32°26'7.42"S	61°36'17.41"O	resistente
SFr09	Videla, Santa Fe	30°55'3.85"S	60°39'13.34"O	resistente
SFr10	Videla, Santa Fe	30°55'8.49"S	60°40'1.27"O	resistente
SFr11	Videla, Santa Fe	30°55'43.72"S	60°40'4.51"O	resistente
SFr12	Videla, Santa Fe	30°57'0.18"S	60°36'11.71"O	resistente
SFr13	El Trébol, Santa Fe	32°13'21.71"S	61°42'23.87"O	resistente
SFr14	El Trébol, Santa Fe	32°13'8.72"S	61°43'32.79"O	resistente
SFr15	El Trébol, Santa Fe	32°12'15.67"S	61°43'35.19"O	resistente
SFr16	El Trébol, Santa Fe	32°13'10.46"S	61°42'25.39"O	resistente
SFs04	Oliveros, Santa Fe	32°32'45.17"S	60°51'24.58"O	susceptible
SFs05	Oliveros, Santa Fe	32°32'30.85"S	60°50'49.83"O	susceptible
SFs06	Oliveros, Santa Fe	32°32'0.37"S	60°51'24.20"O	susceptible
SFs07	Oliveros, Santa Fe	32°31'58.25"S	60°52'1.19"O	susceptible
SFs08	Videla, Santa Fe	30°56'26.19"S	60°39'02.78"O	susceptible
TUr01	Aráoz, Tucumán	27°02'43.40"S	64°53'55.90"O	resistente
TUr02	Aráoz, Tucumán	27°02'41.00"S	64°53'55.80"O	resistente
TUr03	Aráoz, Tucumán	27°02'2.36"S	64°54'35.24"O	resistente
TUr06	Aráoz, Tucumán	27°02'41.24"S	64°53'55.17"O	resistente
TUr07	Aráoz, Tucumán	27°01'52.65"S	64°55'17.54"O	resistente
TUr08	Aráoz, Tucumán	27°04'52.75"S	64°54'30.20"O	resistente
TUr09	Burruyacu, Tucumán	26°40'45.62"S	64°37'50.59"O	resistente
TUr10	Burruyacu, Tucumán	26°23'32.89"S	64°35'32.82"O	resistente
TUr11	Burruyacu, Tucumán	26°32'44.19"S	64°41'01.17"O	resistente
TUr15	Burruyacu, Tucumán	26°40'45.62"S	64°37'50.59"O	resistente
TUr17	Burruyacu, Tucumán	26°47'34.70"S	64°40'16.00"O	resistente
TUs04	EEA Obispo Colombres, Tucumán	26°46'24.52"S	65°12'02.86"O	susceptible
TUs05	Las Talitas, Tucumán	26°47'18.20"S	65°12'21.00"O	susceptible
TUs12	Burruyacu, Tucumán	26°19'52.90"S	64°36'55.20"O	susceptible
TUs13	Las Talitas, Tucumán	26°47'18.20"S	65°12'21.00"O	susceptible
TUs16	El Manantial, Tucumán	26°51'0.11"S	65°18'23.37"O	susceptible
BIC01	<i>Sorghum bicolor</i>	34°37'20.32"S	58°39'15.08"O	NA
BIC02	<i>Sorghum bicolor</i>	34°37'20.32"S	58°39'15.08"O	NA

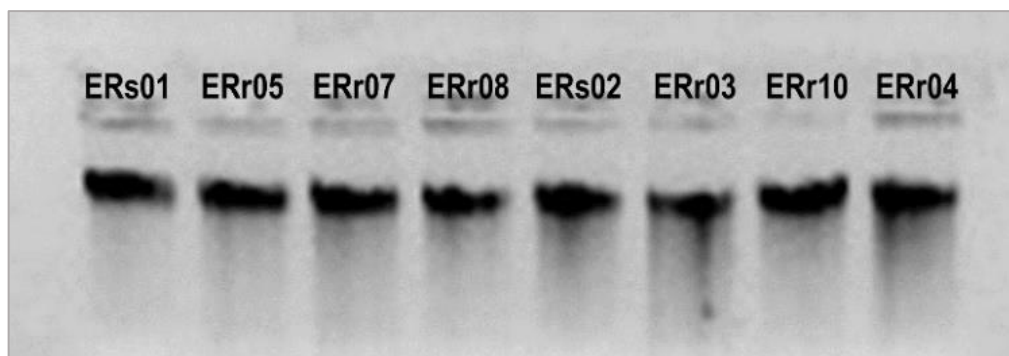


Figura 1. 2 Electroforesis en Gel de agarosa 0,8% de las extracciones de ADN de 8 biotipos de Sorgo de Alepo.

PCR de los marcadores microsatélites

Se realizó la amplificación de 12 *loci* SSR (

Tabla 1. 4) en las muestras presentadas en la Tabla 1. 2, mediante PCR (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

Las condiciones de la reacción de PCR fueron: H₂O c.s.p. 10 µl, 20 ng de ADN, 0,25 µmol/L de oligonucleótidos iniciadores, 2mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de cada dNTP, 1X buffer de reacción y 1U Taq polimerasa platinum (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU). Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 94° C, seguido de 40 ciclos de 45 seg a 94° C, 45 seg a 60° C, 2 min a 72° C y elongación final de 10 min a 72° C. Para verificar las amplificaciones se resolvieron las mismas mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio. A a modo de ejemplo se muestra uno de los geles con las amplificaciones del *locus* Xtxp123 (Figura 1. 3).

Tabla 1. 4 . Marcadores microsatélites (SSR) utilizados.

Nombre	Repetición	Iniciador (F) (5"–3")	Iniciador (R) (5"–3")	Cromosoma
Xtxp4	(GA)	AATACTAGGTGTCAGGGCTGTG	ATGTAACCGCAACAACCAAG	2
Xtxp16	(AG)	TAGGGAAGAGCAAGTGCAGAC	AAGAAAGGGCCCAGAGTTTC	3
Xtxp27	(AG)	AACCTTGCCCTATCCACCTC	TATGATGAATCAAGGGAGAGG	4
Xtxp47	(GT)	CAATGGCTTGCACATGTCCTA	GGTGCGAGCTAGTTAAGTGGG	8
Xtxp50	(CT)	TGATGTTGTTACCTTCTGG	AGCCTATGTATGTGTTTCGTCC	2
Xtxp63	(GA)	CCAACCGCGTCGCTGATG	GTGGACTCTGTGCGGGCACTG	2
Xtxp123	(AT)	TCGGCGAGCATCTTACA	TACGTAGGCGGTTGGATT	5
Xtxp295	(TC)	AAATCATGCATCCATGTTTCGTCTTC	CTCCCGCTACAAGAGTACATTCATAGCTTA	7
Xtxp298	(AGA)	GCATGTGTCAGATGATCTGGTGA	GCTGTTAGCTTCTTCTAATCGTCGGT	2
Xtxp303	(GT)	AATGAGGAAAATATGAAACAAGTACCAA	AATAACAAGCGCAACTATATGAACAATAAA	5
Xgap57	(AG)	ACAGGGCTTTAGGGAAATCG	CCATCACCGTCGGCATCT	1
Xtxp67	(GA)	CCTGACGCTCGTGGCTACC	TCCACACAAGATTCAGGCTCC	9

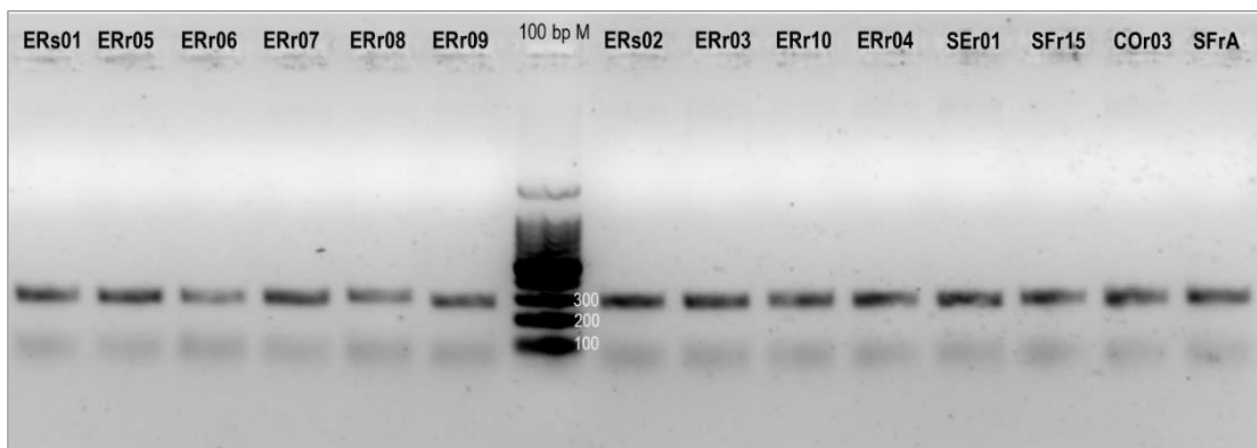


Figura 1. 3. Electroforesis en Gel de agarosa 2% de las amplificaciones del *locus* Xtxp123 de 14 individuos analizados *de novo*. 100 bpM: marcador de peso molecular

Los fragmentos amplificados y verificados se analizaron mediante electroforesis capilar en función de la marca fluorescente del iniciador sentido las cuales fueron 6-FAM, HEX o NED (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU y Alpha DNA) en un secuenciador GA3500xl (Applied Biosystems) en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología INTA. La asignación del tamaño de los fragmentos fue realizada utilizando el marcador de peso molecular GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems). Los alelos fueron identificados por comparación con el marcador de peso molecular utilizando el programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

Análisis genético con los marcadores microsatélites

El análisis de los marcadores microsatélites en especies poliploides se vuelve complejo en cuanto a la asignación de cuál alelo ocurre en más de una copia o la relación alélica verdadera (homóloga u homeóloga) en cada uno de los *loci*. En el presente análisis los marcadores microsatélites fueron tratados como marcadores dominantes como se había realizado en trabajos previos del grupo (Fernández *et al.*, 2013). Los datos genotípicos fueron convertidos en *loci* dominantes (Rodzen, 2004), cada genotipo individual es convertido en un vector $1 \times n$, donde n es el número de bandas del locus. Por cada banda en la matriz, al elemento i en el vector le es asignado el valor 1 si la banda está presente o 0 si la banda está ausente en el genotipo analizado. Para más de un *locus* microsatélite el proceso se repite para cada locus j . Al final este procedimiento forma una matriz $1 \times nj$ para cada locus, donde nj es el número de bandas en el locus j , estas matrices se concatenan horizontalmente en una matriz $k \times nT$, donde nT es el total del número de bandas de todos los *loci* para todos los k individuos.

A partir del conjunto de datos derivado del análisis se generó una MBD (Matriz Básica de Datos) en la cual la ausencia o presencia del alelo se indica como 0 ó 1 respectivamente. Se definieron las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) como los distintos individuos

Para comparar a los distintos biotipos estudiado a la matriz se le aplicó el coeficiente de asociación Jaccard $J = a/(a+b+c)$, el cual considera sólo las presencias de bandas compartidas como contribuciones a la similitud de los individuos (OTU) dividido el total de bandas.

Este coeficiente varía de 0 a 1 y toma este último valor en el caso de la identidad.

a: es el número de caracteres en los cuales el mismo estado es compartido por ambas OTUs (1,1).

b: es el número de caracteres en los cuales un estado es poseído por la primera OTU, pero no por la segunda (1,0).

c: es el número de caracteres en los cuales está ausente en la primer OTU, pero presente en la segunda (0,1).

A partir del cálculo del coeficiente se construyó la matriz de similitud sobre la que se aplicó el análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages), ligamiento promedio, que utiliza la media aritmética no ponderada, donde se considera que el valor de similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo (Sneath y Sokal, 1973).

La estructura obtenida a través del análisis de agrupamiento se representó gráficamente mediante un dendrograma que muestra la relación de similitud entre las OTUs.

Se aplicó el test de Mantel (1967) a fin de determinar el coeficiente de correlación cofenética (r) para verificar el grado de ajuste entre los datos obtenidos en la matriz de similitud y el dendrograma generado (Crisci & López Armengol, 1983).

Para el análisis de las distancias genéticas y sus representaciones gráficas se utilizó R versión 4.2.1 (R Core Team, 2022), para calcular la distancia de Jaccard se utilizó en paquete *vegan* mediante la función *vegdist* (R: *Dissimilarity Indices for Community Ecologists*) (Oksanen *et al.*, 2013). Posteriormente para el cálculo de la matriz de agrupamiento se utilizó el paquete *stats* (versión 3.6.2) mediante la función *hclust* (<https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2/topics/hclust>). Finalmente, para los gráficos se utilizaron los paquetes *ggplo2* (Wickham, 2016) y *factoextra* (Kassambara & Mundt, 2017) mediante la función *fviz_dend* (dendrograma) y *fviz_cluster* (Coordendas Principales) (R: Visualize Clustering Results).

Asimismo, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales que se utiliza cuando las variables estudiadas son cualitativas y permite analizar una matriz de asociación Q (matriz que describe las relaciones entre los objetos, OTU x OTU) dentro de un espacio euclidiano, situando a los objetos dentro de una dimensión reducida, preservando bien las relaciones de distancia entre ellos (Gower, 1971). Este análisis define un nuevo conjunto de ejes ortogonales (independientes entre sí) que son función de las variables originales. Las nuevas variables se denominan Coordenadas Principales y son combinaciones lineales de las variables originales que tienen independencia y no están correlacionadas, sintetizando la máxima variabilidad contenida

en los datos. El análisis de coordenadas principales preserva las distancias de origen ya que sitúa los objetos en un espacio factorial reducido, preservando entre ellos las relaciones de distancias descritas por la medida de similitud. Así, la representación de estos objetos dentro del espacio de las primeras coordenadas principales forma la mejor aproximación posible de estas distancias dentro del espacio reducido. El primer eje es el más importante. El agrupamiento de las OTU determinado por este eje es el que concentra la mayor variación.

Análisis genético por genotipificación por secuenciación (GBS)

Protocolo de ddRADseq

Se llevó a cabo la puesta a punto de esta metodología en sorgo de Alepo a partir de la aplicación del protocolo optimizado para *Eucalyptus dunni* (Aguirre *et al.*, 2019) (Figura 1. 5).

En el primer ensayo se seleccionaron un biotipo susceptible (COs02) y uno resistente (SFr15) (Tabla 1. 3). La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo del proveedor, utilizando el kit Nucleo Spin Plant II (Macherey Nagel). La integridad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio y se cuantificó utilizando el kit Broad Range, Qubit (HS dsDNA kit, Thermo Fisher Scientific).

Digestión: 150 ng de ADN genómico fueron digeridos utilizando una enzima de corte raro: SphI: 5' GCATG^C 3' y una de corte frecuente: MboI: 5' ^GATC 3' (2,4 U enzimáticas, New England Biolabs). La reacción consistió en una incubación a 37°C durante 90 minutos con ambas enzimas, seguido de un paso de inactivación por calor (65 °C por 20 minutos). Luego, las digestiones se purificaron utilizando 1,5 volúmenes de AmpureXP Beads (Agencourt). Se verificó la distribución de los fragmentos de digestión mediante electroforesis capilar en un equipo Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Inc).

Ligación: en esta etapa, se procedió a la ligación de adaptadores (i.e oligonucleótidos de doble cadena, complementarios a los sitios de corte dejados por ambas enzimas) (Figura 1. 4) (Aguirre *et al.*, 2019, Aguirre, 2020) a los fragmentos de digestión, utilizando T4 ADN Ligasa (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU). La reacción de ligación consistió en una incubación inicial a 23°C por 60 minutos, seguido por 20°C por 60 minutos, e inactivación a 65°C por 20 minutos. Las ligaciones se purificaron con 1,5 volúmenes de AmpureXP Beads (Agencourt), y se cuantificaron utilizando el kit Broad Range, Qubit (HS dsDNA kit, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del proveedor.

PCR: Para la amplificación de las genotecas generadas, se utilizaron los oligonucleótidos de doble índice diseñados por Lange (Lange *et al.*, 2014), y la enzima NEB Phusion High-Fidelity DNA polimerasa. Cabe destacar que la reacción de PCR para ddRADseq consta de un ciclado corto (3 min a 95 °C, 10 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 45 seg a 72°C y 2 min de extensión final a 72°C), a fin de evitar la

sobrerrepresentación de regiones repetitivas. La genoteca fue purificada utilizando 1,2 volúmenes de AmpureXP Beads (Agencourt)

Selección de tamaño: se realizó en forma manual, seleccionando aquellos fragmentos comprendidos en el rango entre 450 y 550 pb mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de baja fusión (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.). Los fragmentos se purificaron del gel utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Alemania).

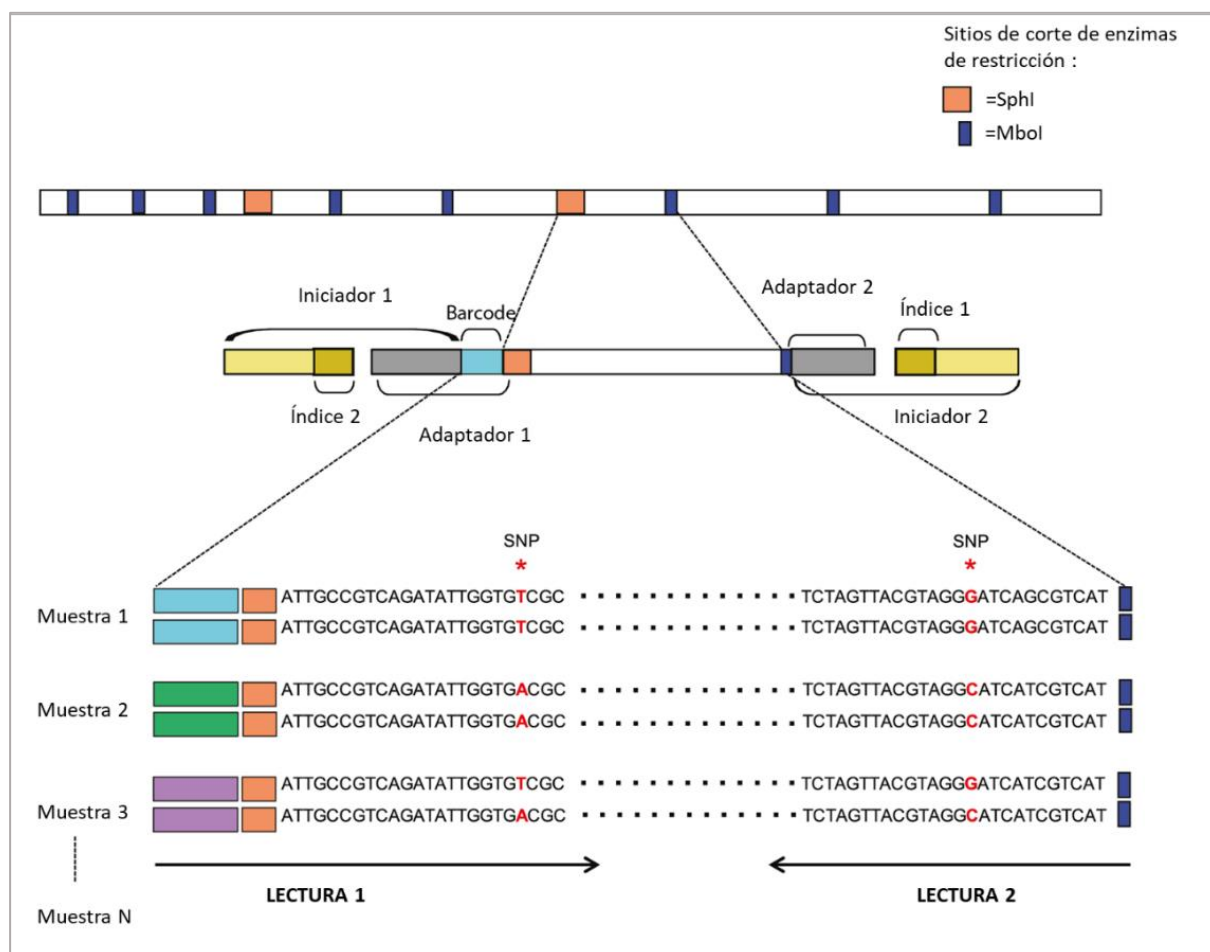


Figura 1. 4. Esquema general de la generación de la genoteca obtenida con protocolo optimizado de ddRADseq. ADN digerido con el par enzimático SphI-MboI, ligación de adaptadores con *barcodes*, amplificación por PCR con oligonucleótidos con índices. Se esquematizan fragmentos de tres muestras secuenciados por PE y se localizan SNPs en ambos loci. Adaptado de Aguirre 2020.

Secuenciación: las genotecas se cuantificaron utilizando el kit Broad Range, Qubit (HS dsDNA kit, Thermo Fisher Scientific) y su calidad se comprobó mediante una corrida electroforética en un equipo Fragment Analyzer. Las muestras se secuenciaron desde los dos extremos (PE, *pair end* por sus siglas en inglés) (2 × 250 pb) en equipo MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

Posteriormente se realizó un segundo ensayo con otros biotipos, un biotipo susceptible (FCA) y dos resistentes (Corti, OST). El protocolo aplicado a las muestras fue el detallado anteriormente.

La optimización y aplicación del protocolo de ddRADSeq fue realizado en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología INTA.

Análisis de los datos de ddRADseq

Se realizaron y analizaron dos ensayos diferentes. El ENSAYO 1 correspondió a la puesta a punto y optimización del método analizando 2 biotipos (1 susceptible y 1 resistente). En el ENSAYO 2 se analizaron 3 biotipos (1 Susceptible y 2 resistentes).

SNP (Single nucleotide polymorphism)

ENSAYO 1: La calidad de las secuencias fue verificada visualmente utilizando FastQC (Andrews *et al.*, 2019). Luego, el módulo process_radtags de Stacks v.1.43 (Catchen *et al* 2013) fue utilizado para demultiplexar el archivo de secuenciación (i.e. separar las secuencias por individuo), eliminar lecturas de baja calidad, lecturas con *barcodes* ambiguos y/o que no contenían el sitio de corte de la enzima. Las lecturas remanentes fueron mapeadas contra el genoma de referencia disponible de *Sorghum bicolor* (Sorghum_bicolor_NCBIv1.0), utilizando el software Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) y los parámetros utilizados fueron los establecidos por defecto.

Para la detección y llamado de SNPs se utilizó el software Stacks v1.43 (Catchen *et al.*, 2013) y el módulo “ref_map” para trabajar con genoma de referencia. Los SNPs generados fueron sometidos a un análisis posterior con el módulo rxstacks para eliminar posibles falsos SNPs.

ENSAYO 2: La calidad de las secuencias fue verificada visualmente utilizando FastQC (Andrews *et al.*, 2019). Luego, el módulo process_radtags de Stacks v.2.0 (Catchen *et al* 2013) fue utilizado para eliminar lecturas de baja calidad y/o que no contenían el sitio de corte de la enzima.

Las lecturas obtenidas fueron mapeadas contra la última versión del genoma de referencia disponible de *Sorghum bicolor* (GCF_000003195.3_Sorghum_bicolor_NCBIv3), utilizando el software Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) y los parámetros por defecto. El análisis se realizó considerando a las muestras como “diploides”, como la referencia con la que se cuenta.

Para la detección y llamado de SNPs se utilizó el software Stacks v2.0 (Catchen *et al.*, 2013) y el módulo para trabajar con genoma de referencia “ref_map”, considerando los parámetros por defecto. La matriz de SNPs fue extraída en formato VCF y filtrada utilizando VCFTOOLS (Danecek *et al.*, 2011), considerando la calidad de la posición variable, como mínimo 3 lecturas que den soporte a cada alelo, y 0,5 de máxima proporción de datos perdidos.

SSR (Simple Sequence Repeat)

Para la identificación de microsatélites (SSR) a partir de los datos de secuenciación de ddRAD-Seq, se utilizó el programa MISA (MicroSATellite, Institute of plant Genetics and Crop Plant Research, Germany). El insumo

para la búsqueda de SSR fue un archivo en formato FASTA, generado con Stacks v2.0, conteniendo las secuencias de cada muestra para cada loci secuenciado. El criterio para definir microsatélites en el primer ensayo fue: un mínimo de 9 repeticiones para dinucleótidos, siete repeticiones para trinucleótidos, cinco repeticiones para tetranucleótido, cuatro repeticiones para pentanucleótidos y tres repeticiones para hexanucleótidos. Mientras que en el segundo ensayo el criterio para definir microsatélites fue: un mínimo de 5 repeticiones para dinucleótidos, cuatro repeticiones para trinucleótidos y tres repeticiones para tetra, penta y hexanucleótidos. La tabla final de SSR reportada solo contiene aquellos loci polimórficos entre las muestras.

Se diseñaron iniciadores (Tabla 1. 5) para 8 *loci* microsatélites para aquellas lecturas en las cuales el motivo SSR se encontraba localizado en el medio de la lectura, permitiendo diseñar ambos iniciadores sobre la misma lectura.

Los iniciadores fueron diseñados con el software PRIMER3 v4.0.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>); con los siguientes parámetros: la región repetitiva fue seleccionada como blanco, 100 a 250 pb tamaño de fragmento, 18-25 pb de longitud del iniciador, 58-63 °C temperatura de hibridación, mientras que el resto de los parámetros fueron los determinados por defecto por el programa.

Se realizó la amplificación por PCR de estos *loci* microsatélites empleando los iniciadores diseñados para verificar los fragmentos. Las condiciones de PCR fueron: H₂O c.s.p. 10 µl, 20 ng de ADN, 0,25 µmol/L de oligonucleótido, 2mmol/L MgCl₂, 0,2 mmol/L de cada dNTP, 1X buffer de reacción y 1U Taq polimerasa platinum (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU).

Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 94° C, seguido de 40 ciclos de 45 seg a 94° C, 45 seg a 60° C, 2 min a 72° C y elongación final de 10 min a 72° C, Posteriormente los marcadores Sh2 a Sh8 fueron evaluados por electroforesis capilar en un equipo Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Inc). El análisis de los datos de GBS fue realizado en colaboración con la Dra. Carla Filippi (FAGRO Udelar, Universidad de la República, Uruguay)

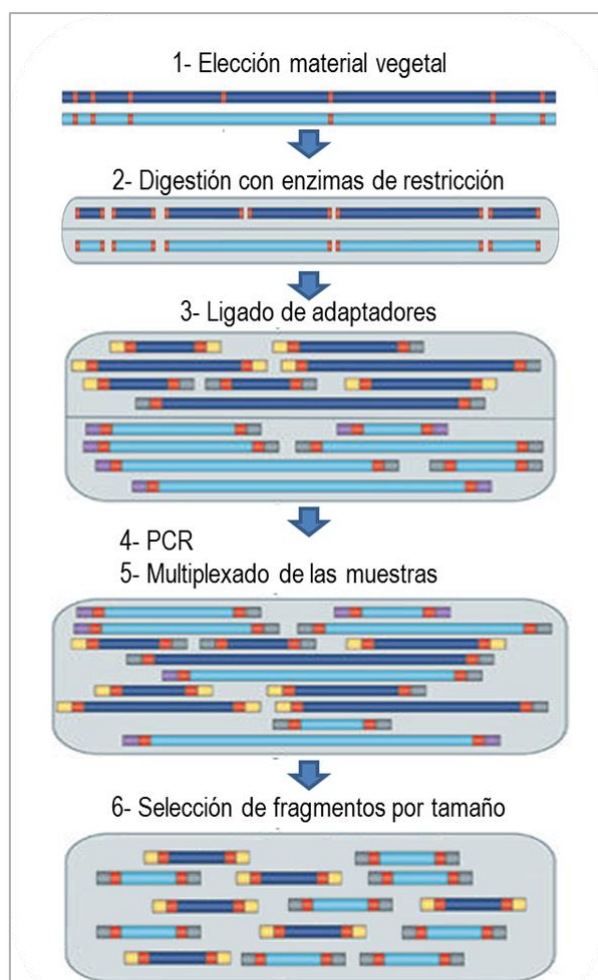


Figura 1. 5. Resumen del protocolo ddRADSeq aplicado
Adaptado Davey *et al* 2011

Resultados

Análisis de los marcadores microsatélites

Para el análisis se utilizaron 12 marcadores microsatélites obtenidos de *Sorghum bicolor*, los cuales amplificaron 164 alelos con un promedio de 13 alelos por *locus* y con un rango de cantidad de alelos que fue de un mínimo de 5 para el locus Xtxp123 a un máximo de 20 para Xtxp298.

A partir de la MBD utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA se realizó un dendrograma (Figura 1. 6). Se observan diferentes agrupaciones entre los biotipos, el agrupamiento más distante fue con BIC01 y BIC02 los cuales corresponden a los controles fuera de grupo (*out group*) de *Sorghum bicolor* y la mayor similitud se observó entre SFs07 y SFs04. Se observan cuatro agrupamientos (*cluster*) principales. En dos casos estos agrupamientos se corresponden con una cercanía geográfica (C y B), mientras que en el agrupamiento/nodo C se encuentran (principalmente) los biotipos de Santa Fé, en el cluster B los individuos pertenecen a Tucumán y SEr03.

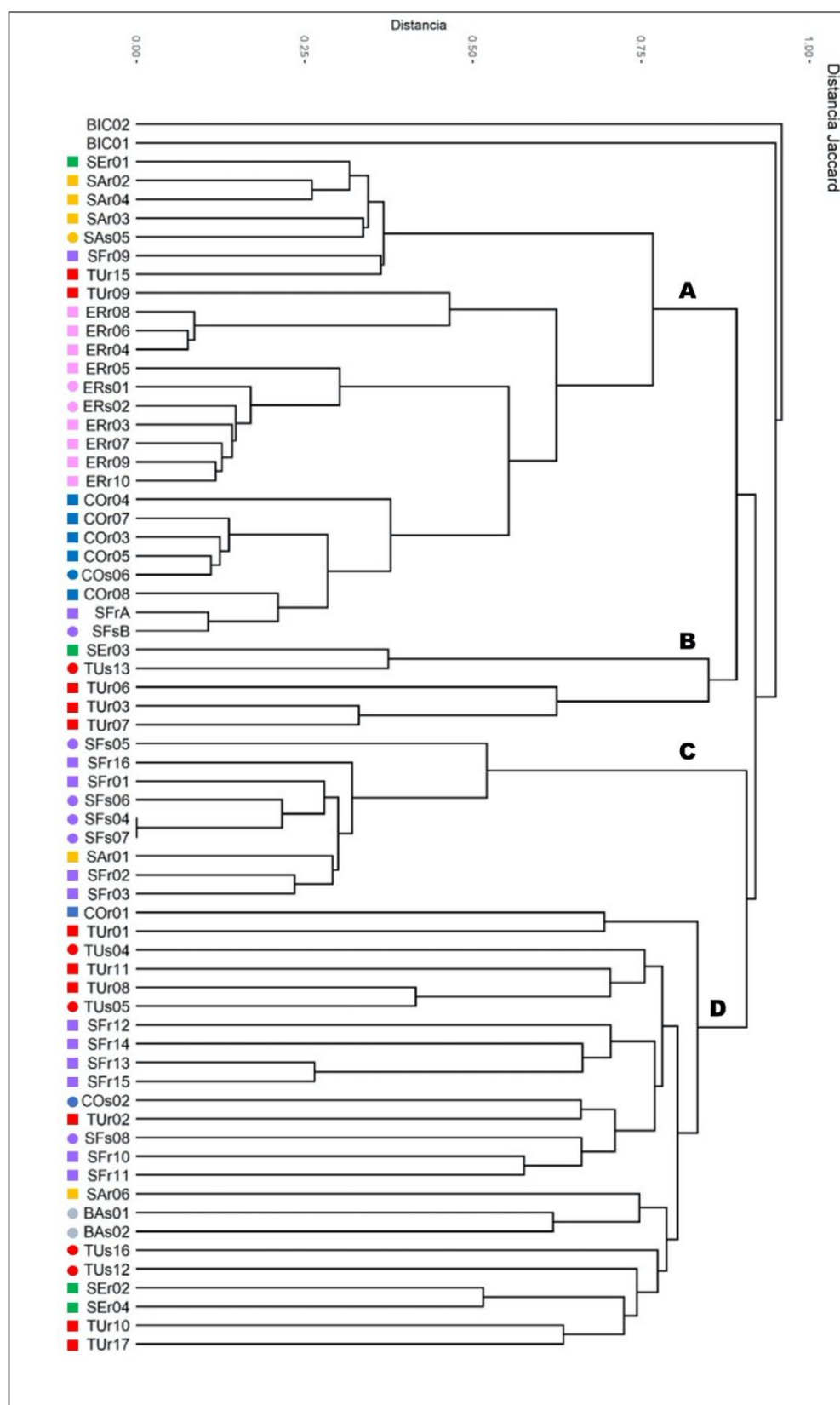


Figura 1. 6. Dendrograma de biotipos de *Sorghum halepense*.

Biotipos susceptibles y resistentes a glifosato reportados en diferentes localidades/departamentos de provincias argentinas analizados con 12 marcadores SSR. R: biotipos resistentes ■; s: biotipos susceptibles ●. Provincias: SA: Salta ●, TU: Tucumán ●, SE: Santiago del Estero ●, CO: Córdoba ●, SF: Santa Fé ●, ER: Entre Ríos ●, BA: Buenos Aires ● y BIC: controles fuera de grupo de *Sorghum bicolor*

También se observan dos grandes agrupamientos, A y D, en el primer caso hay subagrupamientos que también contienen individuos relacionados geográficamente. En el subgrupo superior del nodo A los valores del índice de similitud son de aproximadamente 0,4 e involucra individuos principalmente de Salta, incluyendo algunos Santiago del Estero, Tucumán y Santa Fe, en el otro subgrupo algunos de los biotipos muestran una mayor similitud con índices menores del 0,25 e incluyen biotipos de Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba respectivamente. Por último, en el nodo D se encuentran biotipos de Tucumán, Córdoba, Santa Fe, Salta, Santiago del Estero y Buenos Aires relacionados a distancias mayores. Es importante destacar que en cada uno de los nodos hay presencia de biotipos tanto resistentes como susceptibles.

La aplicación del coeficiente de correlación cofenética arrojó un $r=0,94$, lo que indica una alta correlación entre la matriz de distancia (índice de Jaccard) y la matriz cofenética (matriz derivada del dendrograma).

Utilizando técnicas de ordenación, se realizó el Análisis de Coordenadas Principales. Las 3 primeras coordenadas principales explican el 59,5 de la variación observada, contribuyendo con el 33 %, 16,6 % y 9,9 % cada una de ellas, respectivamente. La (Figura 1. 7) muestra la distribución de las OTUs en un espacio bidimensional definido por las coordenadas 1 (eje x) y 2 (eje y) y se observa un ordenamiento similar al del análisis de agrupamiento; la coordenada 1 explica el 33 % de la varianza y la coordenada 2 explica el 16,6 %. El grupo sombreado en verde está separado en ambas dimensiones del resto, el mismo incluye biotipos de Santa Fe, el grupo sombreado en gris es el más grande incluyendo 29 biotipos de 6 provincias siendo también el más disperso en ambas componentes, el grupo sombreado en violeta está formado principalmente por individuos de individuos de Córdoba y Entre Ríos. El eje 1 es el que más contribuye a la diferenciación de los individuos pertenecientes a la provincia de Entre Ríos del resto, mientras que el eje 2 contribuye a la separación de los individuos de la provincia de Santa Fe.

Análisis de GBS

El primer ensayo de GBS fue realizado con el fin de establecer las condiciones óptimas del protocolo ya que el sorgo de Alepo es una especie no modelo y poliploide. Se estableció la combinación de enzimas SphI y MboI como las adecuadas ya que mostraron un patrón homogéneo de digestión y cierto enriquecimiento en el tamaño del peso molecular requerido para la metodología.

Las lecturas obtenidas fueron mapeadas contra el genoma de referencia disponible de *Sorghum bicolor*, (sorghumbicolor_v1.0), el análisis se realizó considerando a las muestras como “diploides”, como la referencia disponible. El 69,53% de las lecturas del biotipo COs02 y el 70,36% de las del SFr15 mapearon al menos una vez contra el genoma de referencia.

En total, se generaron 26162 SNPs polimórficos en 11914 regiones polimórficas secuenciadas, al comparar contra el genoma de referencia (Figura 1. 8). Se analizaron el tipo de sustituciones halladas, se puede

observar que las sustituciones C/T y G/A fueron las más frecuentes y las menos frecuentes fueron las sustituciones A/C y T/C (Figura 1. 9).

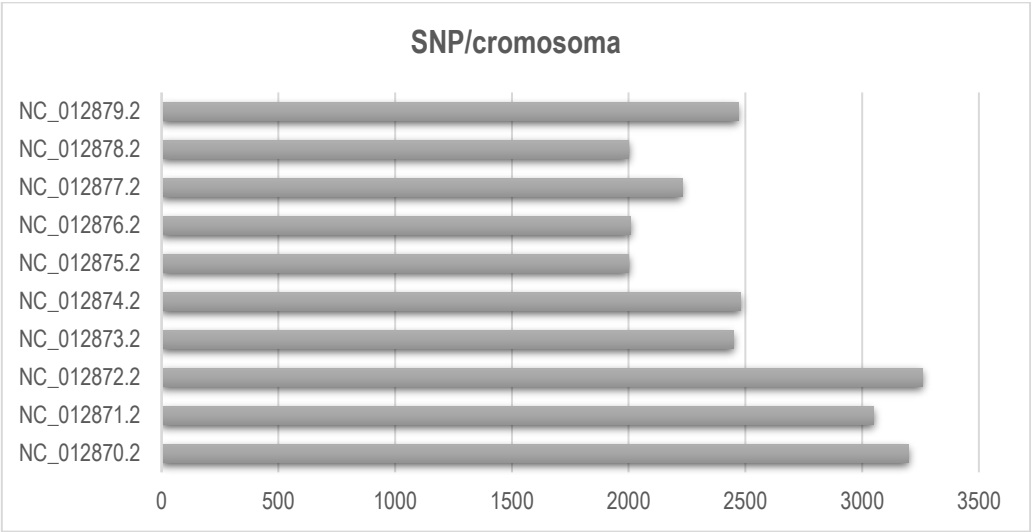


Figura 1. 8 . Distribución de los marcadores SNP en los diferentes cromosomas del genoma *Sorghum bicolor* utilizado como referencia

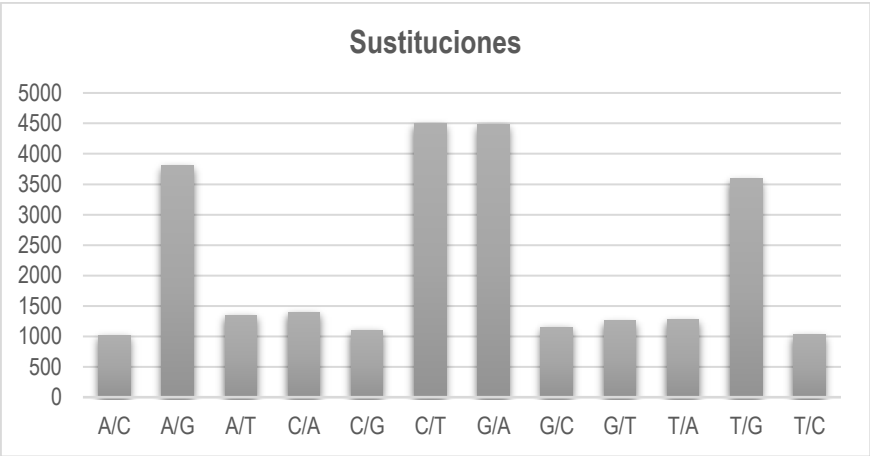


Figura 1. 9. Clases de sustituciones observadas en los SNP de los biotipos de sorgo de Alepo



Figura 1. 10. Frecuencia de los motivos SSR mapeados

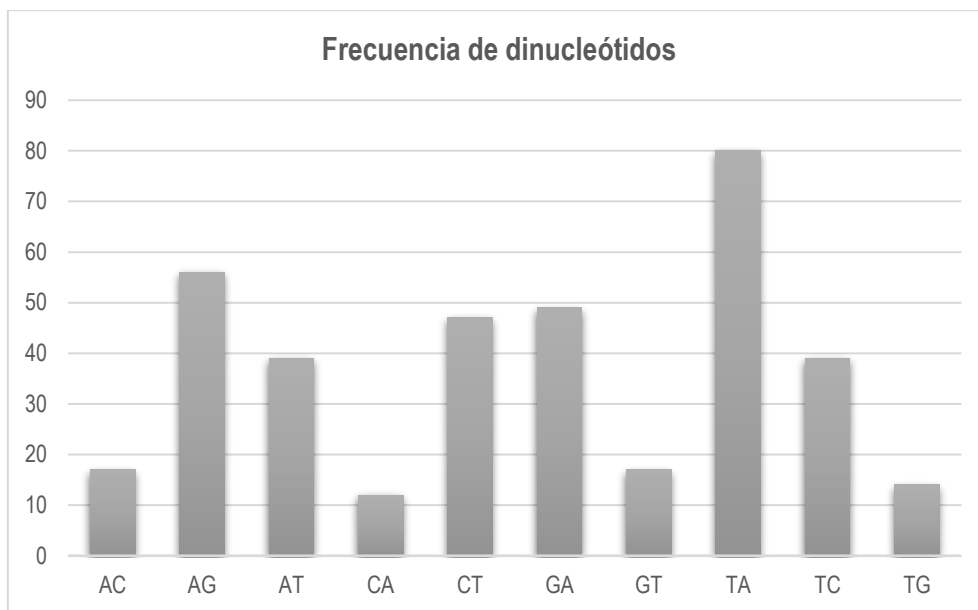


Figura 1. 11. Frecuencia de los motivos dinucleótidos

Se identificaron 1463 SSR, de los cuales el motivo hexanucleótido son la mayor proporción (41%), seguido por el motivo dinucleótido con 370 SSR (25%), los motivos tri, tetra y pentanucleótido están presentes en una proporción similar, cercana al 10% (Figura 1. 10). La frecuencia de los diferentes dinucleótidos fue variable siendo el de mayor presencia TA (21,62 %) y los menos representados CA y GT con el 3,78% y 4,59 % respectivamente (Figura 1. 11).

De la totalidad de microsatélites identificados 17 fueron polimórficos entre ambos biotipos analizados, los cuales se encuentran al menos uno en cada cromosoma (excepto para el cromosoma 2) (Tabla 1. 5). De estos el 70,6 % fueron dinucleótidos, 11,76 % fueron trinucleótidos y un porcentaje igual de hexanucleótidos y 5,9% de tetranucleótidos. En función de estos datos se diseñaron 8 iniciadores para la amplificación de estas regiones que se están poniendo a punto (Tabla 1. 5). En la Figura 1. 12 se puede ver el resultado de la PCR realizada con las mismas condiciones que los marcadores utilizados anteriormente, el marcador Sh1 mostro bandas de alto peso molecular, los marcadores Sh2 a Sh8 amplificaron una o dos bandas en el rango de 100 a 200 pb, posteriormente estos marcadores fueron corridos por electroforesis capilar, en la reconstrucción de gel que realiza el Fragment Analyzer (Figura 1. 13), se puede observar que los marcadores Sh2, Sh5 y Sh8 muestran una banda intensa, al observar las corridas individuales de estos marcadores se observa para Sh2 un pico a 104 pb y uno menor a 111 bp, para Sh5 se observa un pico único de 105 pb y para Sh8 un pico a 133pb (Figura 1. 14 a, b y c); en cambio los marcadores Sh3, Sh4 y Sh7 muestran varios picos con poca diferencia de pares de bases (Figura 1. 14 d, e y f).

Tabla 1. 5. Iniciadores microsatélites obtenidos a partir del ensayo de optimización de GBS.

Nombre	Secuencia	Longitud	Tm	Motivo	Tamaño	Cromosoma
Sh01_AG	F: AGTGCACAATACGCATCGAC	20	59,75	(AG)9	111	3
	R: GTCGAGTTCGTGGCCACC	18	62,76			
Sh02_GA	F: GAGAGGAGCACCCTCTTT	20	58,62	(GA)11	150	4
	R: CTCGGTCCCGTCGCTACT	19	62,66			
Sh03_GA	F: CATGCAGAGGAAAACCTCAAATC	23	62,16	(GA)22	150	3
	R: TCATCCTATTGACCTATTCCCCTTC	25	62,68			
Sh04_CCTGCC	F: AGACCGAGCTCACATTAC	20	59,42	(CCTGCC)3	150	9
	R: GAGCCGAATGCTCGAATTAC	20	59,81			
Sh05_GGCTGT	F: AGGGAAGTATGGGGGTGATG	20	60,96	(GGCTGT)3	150	3
	R: GAGGTCTCGTGCGGTCGT	18	62,51			
Sh06_TA	F: TCCAGTATGTCTTCTGCCTTCA	22	59,88	(TA)12	150	1
	R: TGTGTCAATTGATAATTCACAGAA	26	59,37			
Sh07_TG	F: CATCCAGCCGATGAATCAGT	20	61,04	(TG)9	150	3
	R: TTGTTGCGTGACATACGAGACCT	22	59,66			
Sh08_CT	F: TGCTGACATCTCCCTACTCC	20	57,81	(CT)9	150	7
	R: GCCTGTAGCTATGCGTCACA	20	60,04			

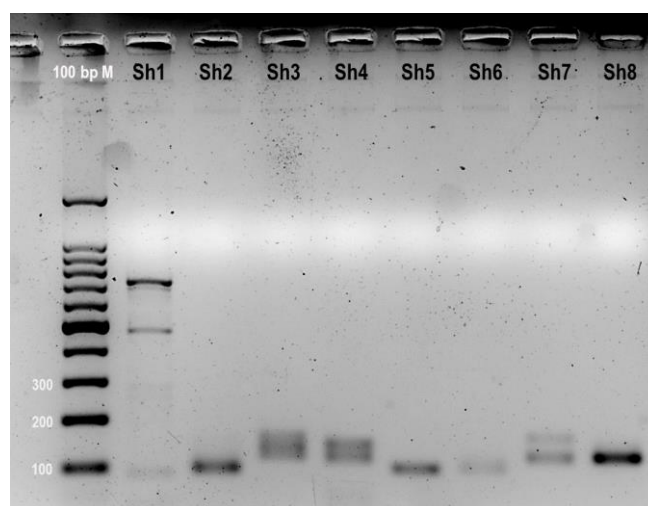


Figura 1. 12. Gel de agarosa 2 % de 8 marcadores SSR obtenidos a partir de GBS analizados sobre el biotipo ERr05

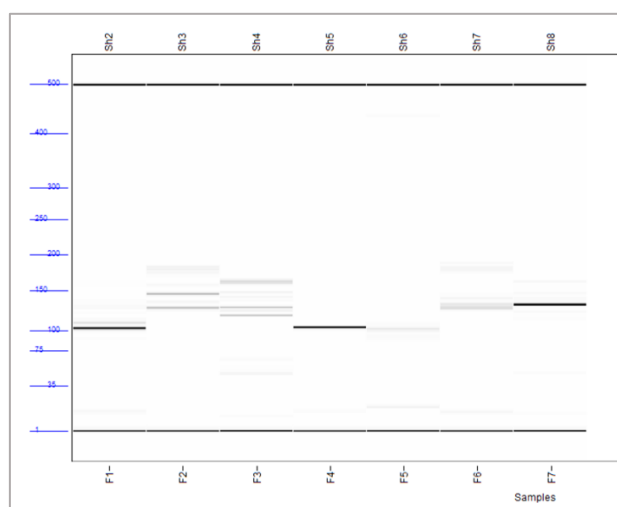


Figura 1. 13. Imagen del gel generado a partir de la electroforesis capilar en el Fragment Analyzer de 7 marcadores analizados sobre el biotipo ERr05.

Productos de amplificación por PCR de los marcadores SSR Sh2 a Sh8.

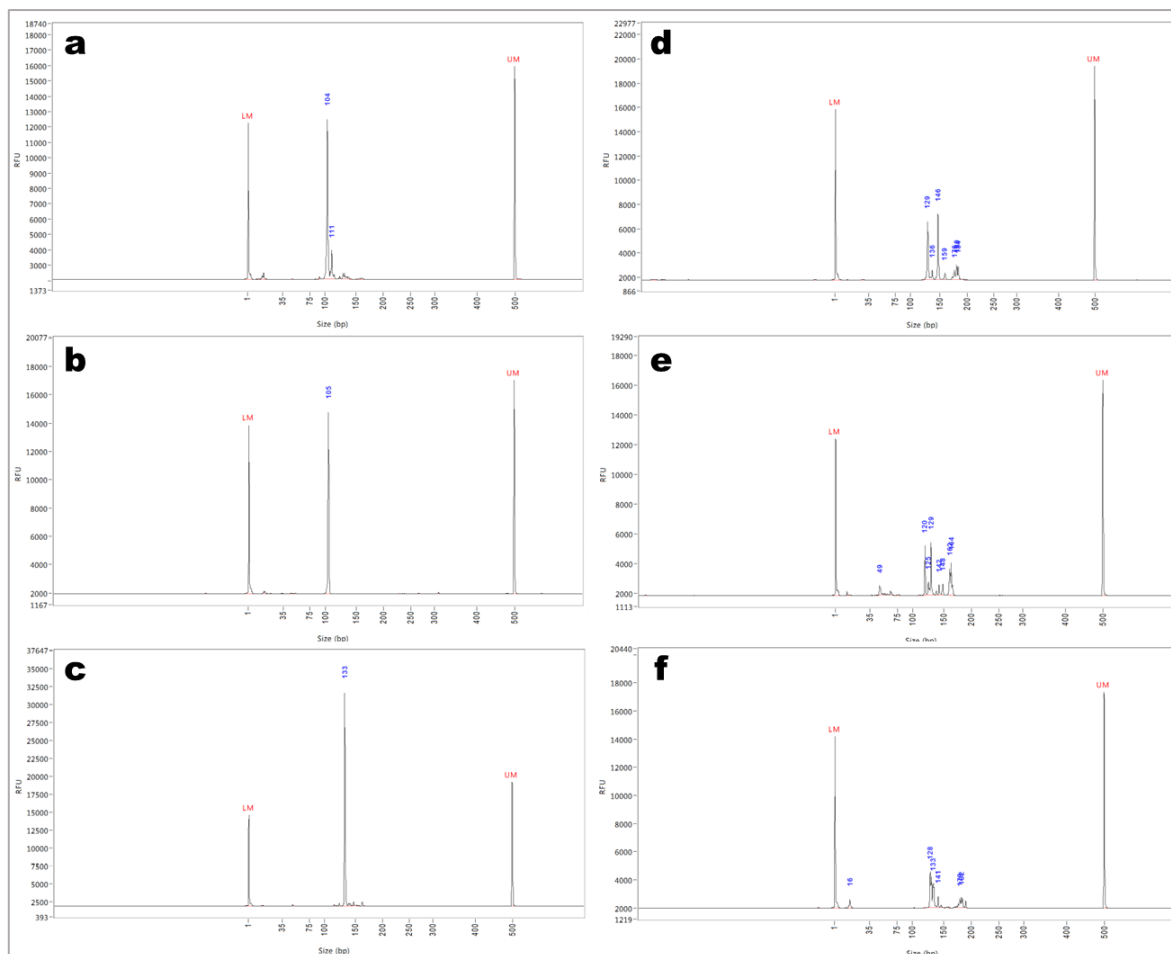


Figura 1. 14. Electroforesis capilar de los marcadores SSR obtenidos a partir de GBS.
a) Sh2, b) Sh5, c) Sh8, d) Sh3, e) Sh4 y f) Sh7

En el segundo ensayo las lecturas obtenidas fueron mapeadas contra el genoma de referencia disponible de *Sorghum bicolor*, (GCF_000003195.3_Sorghum_bicolor_NCBIv3), el análisis se realizó considerando a las muestras como “diploides”, como la referencia disponible. El 54.46% de las lecturas del biotipo FCA; el 60.41% de las lecturas de Corti y 63.41% de OST mapearon contra la referencia.

En total se obtuvieron 110254 SNPs sin filtrar, al utilizar la herramienta VCFTOOL para filtrar los datos tomando en consideración la calidad de la posición variable, un mínimo de 3 lecturas para darle soporte al alelo y una proporción máxima de 0,5 de datos perdidos, resultando en 11047 SNP polimórficos en 5325 regiones secuenciadas. Los mismos están distribuidos en los 10 cromosomas del genoma de referencia, siendo el máximo encontrado de 1700 en NC_012870.2 (cromosoma 1) y el mínimo de 683 en NC_012876.2 (cromosoma 7) (Figura 1. 15).

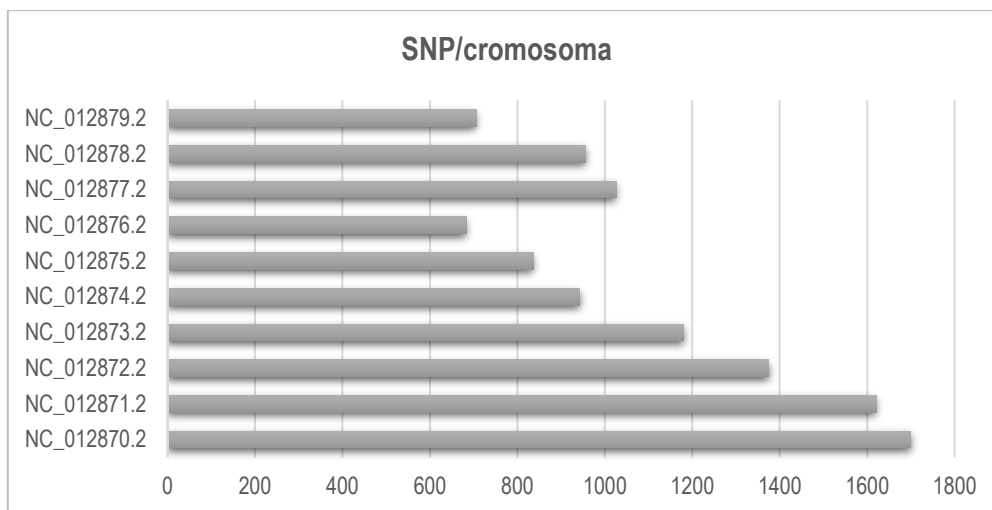


Figura 1. 15. Distribución de los marcadores SNP en los diferentes cromosomas del genoma *Sorghum bicolor* utilizado como referencia

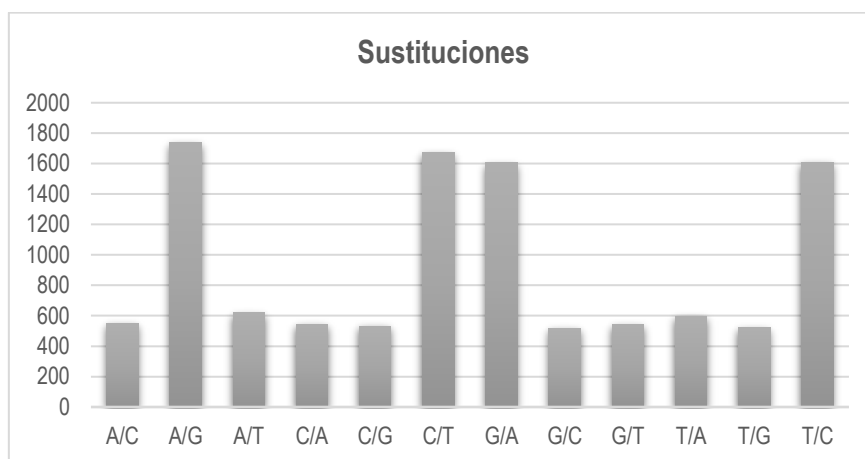


Figura 1. 16. Clases de sustituciones observadas en los SNP de los biotipos de sorgo de alepo

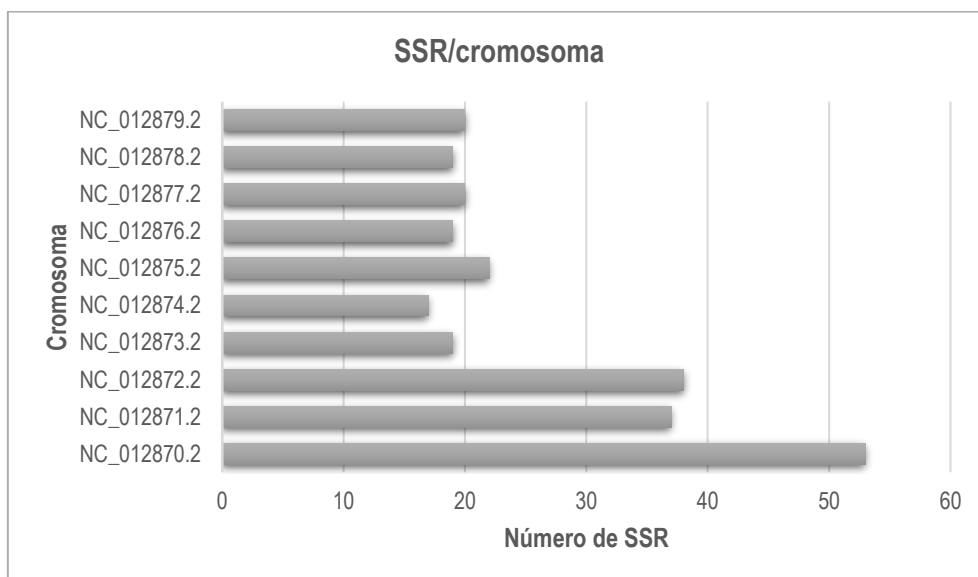


Figura 1. 17. Distribución de los marcadores microsatélites en los diferentes cromosomas del genoma *Sorghum bicolor* utilizado como referencia

Se analizaron el tipo de sustituciones halladas, se puede observar que las sustituciones A/G, C/T, G/A y T/C fueron las más frecuentes (Figura 1. 16).

En la búsqueda de microsatélites, se encontraron 264 SSR polimórficos, distribuidos en los 10 cromosomas, entre 19 y 53 en cada cromosoma (Figura 1. 17), en el cromosoma 1 es cual tiene mayor cantidad de microsatélites, le siguen el cromosoma 3 y 2 con 38 y 37 marcadores respectivamente. La mayoría de los marcadores fueron del tipo dinucleótido 41,67% (110 dinucleótidos), casi con la mitad 24,24% tenemos los trinucleótidos y tetranucleótidos con 19,70 % y por último a los penta y hexanucleótidos con 5,30 % y 4,55 % respectivamente (Figura 1. 18).

El motivo dinucleótido con mayor frecuencia fue TC (18 %) seguido por los motivos AT y CT con el 16 % ambos, los motivos CG y GC fueron los de menor aparición con 0,9 % cada uno (Figura 1. 19). Para el caso de los tri, tetra y pentanucleótidos los motivos con mayor frecuencia fueron GCT 9,7% (con una base de 31 variantes), CTAG 5,8%, ATGCC 20% (11 motivos de pentanucleótidos) y hexanucleótidos solo hubo dos motivos GACGAG y GTTGCA que fueron encontrados una vez cada uno (Tabla 1. 6).



Figura 1. 18. Frecuencia de los motivos SSR polimórficos mapeados

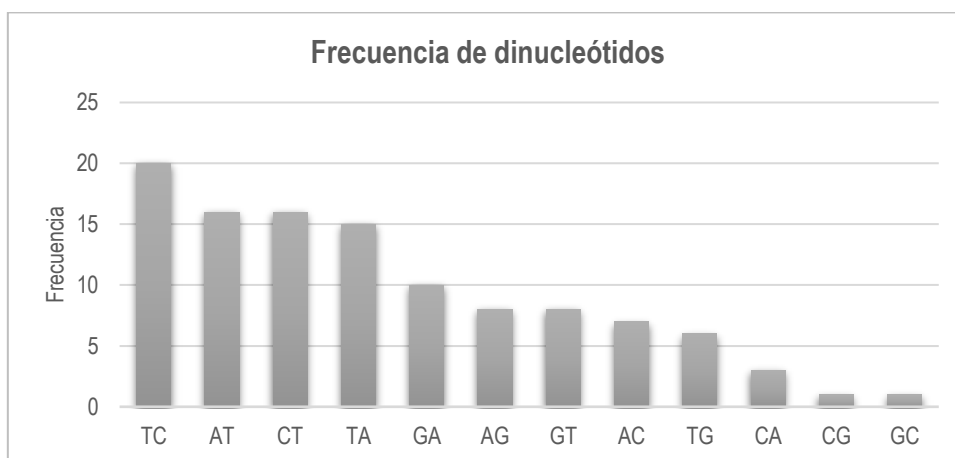


Figura 1. 19. Frecuencia de los motivos dinucleótidos

Tabla 1. 6. Descripción de los motivos microsatélites.

M: Motivo del microsatélite; N°: número de veces que se encontró repetido el motivo; F %: frecuencia a la cual se encuentra un determinado motivo en función del número de veces encontrado sobre el total de motivos.

M	N°	F (%)	M	N°	F (%)	M	N°	F (%)	M	N°	F (%)
TC	20	18,02	GCT	6	9,68	CTAG	3	5,88	ATGCC	3	20,00
AT	16	14,41	AAT	5	8,06	TGCA	3	5,88	AAGAG	2	13,33
CT	16	14,41	CTC	4	6,45	CATG	2	3,92	GAGAC	2	13,33
TA	15	13,51	GTC	4	6,45	GATA	2	3,92	ACAAA	1	6,67
GA	10	9,01	GAT	3	4,84	GCTT	2	3,92	AGAAG	1	6,67
AG	8	7,21	TTC	3	4,84	TAGT	2	3,92	AGGGG	1	6,67
GT	8	7,21	AAG	2	3,23	TCCT	2	3,92	ATTACT	1	6,67
AC	7	6,31	ACC	2	3,23	TTAA	2	3,92	GGGCA	1	6,67
TG	6	5,41	AGA	2	3,23	AAAG	1	1,96	GTCAG	1	6,67
CA	3	2,70	ATC	2	3,23	AAAT	1	1,96	TGTTTT	1	6,67
CG	1	0,90	ATG	2	3,23	AATC	1	1,96	TTGCA	1	6,67
GC	1	0,90	CAC	2	3,23	ACAG	1	1,96	Total	15	100,00
Total	111	100,00	CCT	2	3,23	ACTG	1	1,96	N° motivos		
N° motivos			CGT	2	3,23	AGCT	1	1,96	pentanucleótidos		11
dinucleótidos		12	GAG	2	3,23	AGGA	1	1,96			
			TAG	2	3,23	AGGG	1	1,96			
			TGG	2	3,23	ATAA	1	1,96			
			TGT	2	3,23	ATCT	1	1,96			
			AGT	1	1,61	ATGC	1	1,96			
			CCA	1	1,61	ATGT	1	1,96			
			CCG	1	1,61	ATTA	1	1,96			
			CGG	1	1,61	CACT	1	1,96			
			GAA	1	1,61	CCAG	1	1,96			
			GAC	1	1,61	CCGG	1	1,96			
			GTA	1	1,61	CCTC	1	1,96			
			GTG	1	1,61	CGCA	1	1,96			
			TCC	1	1,61	CGGC	1	1,96			
			TCT	1	1,61	CTGA	1	1,96			
			TGA	1	1,61	GAAA	1	1,96			
			TGC	1	1,61	GATG	1	1,96			
			TTG	1	1,61	GCAG	1	1,96			
			Total	62	100,0	GCAT	1	1,96			
			N° motivos			GCCG	1	1,96			
			trinucleótidos		31	GCGG	1	1,96			
						GGCG	1	1,96			
						TAGA	1	1,96			
						TATG	1	1,96			
						TGAT	1	1,96			
						TGCC	1	1,96			
						TGTT	1	1,96			
						TTCT	1	1,96			
						Total	51	100,0			
						N° motivos		41			
						tetranucleótidos					

Discusión

Los microsatélites han sido uno de los marcadores moleculares más utilizados en genética de poblaciones, dado que los mismos son codominantes, reproducibles, altamente polimórficos y abundantes en todos los eucariotas (Bonatelli *et al.*, 2015).

El uso de marcadores SSR muestra algunos problemas en especies poliploides, principalmente por su imposibilidad de identificar en forma precisa el número de alelos homólogos; por lo que se han propuesto varios métodos para poder adecuarlos a este tipo de especies. En todos estos métodos, los alelos individuales para cada *locus* se registran en una matriz binaria y se le aplican índices desarrollados para marcadores dominantes (Andreakis *et al.*, 2009).

El análisis de marcadores microsatélites ha sido utilizado en diversas especies para caracterizar la variabilidad genética así como también para evaluar el origen epidemiológico de la resistencia a los herbicidas como en los casos de *A. palmeri* resistente a glifosato en Japón (Shimono *et al.*, 2020), en *Bassia scoparia* resistente a glifosato en Norteamérica (Ravet *et al.*, 2021), *C. canadensis* en Ontario Canadá (Page *et al.*, 2018) y en *Ipomea purpurea* resistente a glifosato en el sureste y mediooeste de Estados Unidos (Kuester *et al.*, 2015). Para el caso de *A. palmeri* en Japón utilizaron 10 marcadores SSR (Shimono *et al.*, 2020), a la fecha del estudio no se habían reportado individuos resistentes en las zonas agrícolas, las malezas fueron reportadas y colectadas de las zonas aledañas a los puertos, en base a lo analizado se cree que estas poblaciones fueron introducidas como contaminación con las semillas de los cultivos porque guardan relación genética con las entradas de EE.UU. En *B. scoparia* se desarrollaron marcadores SSR específicos mediante secuenciación 454 – Roche y se generaron inicialmente 30 microsatélites de los cuales 11 fueron utilizados para el estudio, con ellos pudieron estudiar que al menos hubo dos eventos independientes de resistencia a glifosato y que fue seguido por un importante flujo genético regional dispersando así los alelos de resistencia a nuevos fondos genéticos (Ravet *et al.*, 2021). En el análisis de *Ipomea purpurea* los autores utilizaron 15 SSR (Kuester *et al.*, 2015), ellos encontraron pocos indicios de que sea un único evento de resistencia el que se dispersó por el territorio, lo que sugeriría que la resistencia en las poblaciones de esta especie fue el resultado de mutaciones nuevas dentro de cada población. Page y colaboradores en el estudio de poblaciones de *C. canadensis* resistentes de Ontario (Page *et al.*, 2018) utilizaron 8 microsatélites para el estudio de 98 muestras, reportaron que un grupo de individuos que se diferenciaban del resto en el análisis de diversidad y esto estaba correlacionado con la mutación Pro-106-Ser que habían hallado, otros individuos que eran resistentes por otro tipo de mecanismo estaban mezclados con los susceptibles.

En nuestro país los primeros reportes de sorgo de Alepo resistente a glifosato fueron en 2005 en Salta para 2007 ya estaba en todo el noroeste del país llegando hasta Sante Fe (Binimelis *et al.*, 2009). En la actualidad

el territorio afectado por el sorgo de Alepo resistente a glifosato incluye el noroeste y centro del país llegando hasta el sur de la provincia de Buenos Aires (<https://www.aapresid.org.ar/rem-malezas>).

En nuestro estudio se analizaron 64 biotipos con 12 marcadores microsatélites transferidos a partir de *Sorghum bicolor*. Se observó variabilidad genética entre todos los individuos analizados con un cierto grado de agrupamiento por regiones geográficas, así como también se observó que los biotipos resistentes no se encuentran aislados y que comparten un fondo genético con los susceptibles más cercanos geográficamente. Esto sugiere que el origen de la resistencia no fue único en el caso del sorgo de Alepo en nuestro país, dado que en ese escenario los biotipos resistentes mostrarían mayor cantidad de alelos compartidos entre sí que respecto a los susceptibles, esto puede observarse tanto en el dendrograma (Figura 1. 6) como en el análisis de coordenadas principales (Figura 1. 7). Por ejemplo, el grupo sombreado en verde coincide con el nodo C y se puede observar que está formado por 4 biotipos susceptibles y 5 biotipos resistentes pertenecientes a la provincia de Santa Fe a excepción de 1 biotipo resistente de Salta.

Tanto el presente estudio como estudios previos sobre el sorgo de Alepo resistente a glifosato fueron realizados mediante la utilización de marcadores SSR transferidos desde *Sorghum bicolor* (Fernández *et al.*, 2013). La aplicación de la técnica de ddRADseq permitirá el desarrollo de marcadores moleculares específicos para esta especie y con la posibilidad de seleccionar aquellos que sean más polimórficos y permitan el estudio de ambos complementos del genoma tetraploide.

La gran cantidad de información generada mediante NGS da la posibilidad de seleccionar marcadores microsatélites perfectos (es decir, series ininterrumpidas de una única unidad repetitiva), ya que muestran una mayor variabilidad alélica que los microsatélites compuestos (es decir, series ininterrumpidas o interrumpidas de dos o más unidades de repetición) y son más apropiados para los análisis que asumen modelos de mutación por pasos (Bonatelli *et al.*, 2015).

Los análisis por ddRADseq permiten el desarrollo de marcadores moleculares ya sean del tipo SSR o SNP especie específicos sin la necesidad del trabajo costoso, laborioso y que lleva mucho tiempo de desarrollo mediante técnicas tradicionales, sin mencionar que el rendimiento de marcadores útiles es bajo (Zalapa *et al.*, 2012). Siendo el sorgo de Alepo una maleza, la información genómica de la misma es escasa al no tratarse de una especie modelo ni de interés agronómico para cultivo. Al ser esta una técnica de secuenciación que involucra la reducción de la complejidad del genoma (Davey *et al.*, 2011) permite el desarrollo de herramientas especie específicas con un costo menor que los estudios con secuenciación completa del genoma y más rápido que el convencional, con la ventaja adicional que durante la búsqueda bioinformática de los marcadores pueden seleccionarse *in silico* aquellos marcadores que muestran polimorfismos.

La prueba y optimización del protocolo de ddRADseq para esta especie se basó en la experiencia realizada para *E. dunni*. Este protocolo al utilizar digestión con dos enzimas de restricción reduce la cantidad de fragmentos muestreados lo que permite mayor reproducibilidad y amplia cobertura de *loci*. El protocolo

aplicado para bajo número de muestras (P1, Aguirre *et al.*, 2019)) requiere solo un par de adaptadores por par de enzimas lo que evita una inversión inicial alta al inicio de la investigación y aun utilizando dos individuos es posible la obtención de marcadores moleculares que estén distribuidos a lo largo del genoma (Aguirre *et al.*, 2019).

Se han realizado estudios de genotipificación por secuenciación en otras malezas resistentes con la finalidad de la obtención de marcadores moleculares y estudios de diversidad. Por ejemplo, en *A. palmeri* se realizó un análisis de GBS para la búsqueda de marcadores y desarrollaron 1351 SNPs. Esta técnica les permitió hallar marcadores a pesar de no tener genoma de referencia y de ser una especie no modelo, dado que el consenso de las lecturas alrededor de los sitios secuenciados se convierte en la secuencia de referencia (Küpfer *et al.*, 2018)- En el caso de *Kochia scoparia* utilizaron ddRAD-seq en 26 poblaciones de Canadá, hallaron 3440 *loci* polimórficos en total realizando análisis contra un genoma de referencia y análisis *de novo*, encontraron evidencias de que las poblaciones de *K. scoparia* son genéticamente poco variables comparadas con otras malezas y que la diversidad genética de las poblaciones resistentes y susceptibles no difiere, el alto flujo de genes entre las poblaciones sugiere que quizás puedan considerarse como una gran única población (Martin *et al.*, 2020)

La obtención de marcadores moleculares especie específicos sobre la maleza en estudio brindará la posibilidad de mejorar la calidad del análisis epidemiológico mediante el análisis con marcadores SSR con representación en todo el genoma. El primer ensayo de ddRADseq en el presente estudio buscó establecer las condiciones óptimas de digestión, secuenciación y procesamiento de datos. Por ejemplo, en cuanto al diseño de oligonucleótidos para los microsatélites se observó que la corta longitud de las lecturas de esta primera instancia dificultaba el diseño de los microsatélites si los mismos no se hallaban en el medio de la lectura, razón por la cual se realizaron lecturas más largas para el segundo ensayo de manera de disponer de secuencias flanqueantes lo suficientemente largas para el diseño de oligonucleótidos para PCR. En el primer ensayo se identificaron únicamente 17 SSR polimórficos entre los genotipos secuenciados, los cuales no llegan a estar distribuidos en todos los cromosomas del genoma de referencia, en cambio en el segundo ensayo con lecturas más largas se pudieron mapear 264 SSR polimórficos en los tres individuos, los cuales están distribuidos entre los 10 cromosomas de la referencia utilizada. De los 17 SSR polimórficos se diseñaron 8 iniciadores Sh1 a Sh8 Tabla 1. 5 y se realizaron pruebas preliminares para su puesta a punto. Se realizó una PCR y por electroforesis en el gel de agarosa se pudo observar que algunos de ellos amplificaban un fragmento y otros 2. El marcador Sh1 no amplificó fragmentos del tamaño esperado. Al realizar la electroforesis capilar de estos marcadores se pudo observar que Sh2 mostraba en los electroferogramas un pico a 104 pb y uno con menor señal a 111pb, Sh5 y Sh8 tenían un único pico, y Sh3, Sh4 y Sh7 mostraban varios picos. Para Sh2, Sh5 y Sh8 se podría evaluar la variabilidad en diferentes individuos y para Sh3, Sh4 y Sh7 optimizar las condiciones de PCR para obtener mejores amplificaciones y de esta manera verificar si se

están amplificando los alelos correspondientes a los dos complementos que dieron origen al genoma tetraploide.

Para el caso de los SNP en el segundo ensayo el número de marcadores mapeados disminuyó, de 26162 SNPs polimórficos en el primer ensayo a 11047 en el segundo, esto se debería a un cambio en el tratamiento de los datos; ya que se modificó el genoma de referencia sobre los que fueron alineados, la herramienta para el análisis de los SNPs se actualizó (actualización del programa Stacks) y cambios en los algoritmos de filtrado.

Contar con información de los factores que influyen en el origen de la resistencia a herbicidas y la historia demográfica de las malezas es fundamental para la elaboración de estrategias exitosas para demorar y manejar la resistencia a los herbicidas (Küpper *et al.*, 2018)

Capítulo 2:

Validación de genes de referencia para su uso en PCR cuantitativa.

Introducción

Las malezas pueden sobrevivir a las aplicaciones de herbicidas gracias a una variedad de mecanismos que pueden ser divididos en dos amplias categorías: asociados al sitio blanco del herbicida y no asociados al sitio blanco. Los mecanismos asociados al sitio blanco frecuentemente involucran mutaciones en los genes que codifican las enzimas blanco del herbicida o el incremento de la enzima ya sea por duplicación génica o aumento de la expresión, mientras que los mecanismos no asociados al sitio blanco incluyen absorción o traslocación reducida, transporte vacuolar o degradación metabólica del herbicida (Délye *et al.*, 2013; Gaines *et al.*, 2020).

El análisis de la expresión génica se suele utilizar para explorar la amplificación del gen que codifica para la enzima blanco del herbicida y de los genes involucrados en detoxificación, que suelen estar implicados en la resistencia a los herbicidas (Chen *et al.*, 2017).

La PCR cuantitativa (qPCR) es el método más eficaz para la cuantificación de la expresión génica debido a su simplicidad, sensibilidad, exactitud y costo. Sin embargo la utilidad de este método suele ser limitada debido a la ausencia de genes de referencia confiables para la normalización de los datos (Sudhakar Reddy *et al.*, 2016).

Uno de los puntos más cruciales en el análisis de los datos obtenidos con la qPCR es la elección de un método de normalización adecuado, siendo la cuantificación paralela de los genes de referencia endógenos la que se acepta como el método más confiable de normalización de muestras (De Spiegelaere *et al.*, 2015).

La normalización durante la qPCR suele realizarse utilizando uno o varios genes de referencia que deben expresarse a niveles estables en todas las muestras y tratamientos, independientemente de las condiciones experimentales del análisis de la qPCR (Bustin *et al.*, 2009). Dado que no hay un gen universal que satisfaga estos requisitos, la elección del gen/genes depende de factores como el tipo de muestra y de tejido, las condiciones experimentales y la integridad de la muestra (Sundaram *et al.*, 2019). Se han publicado varios estudios con el fin de identificar genes de referencia adecuados para el análisis de la expresión génica en plantas en diferentes condiciones, algunos de ellos contemplan las malezas (Xu *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Sólo recientemente, se encuentran algunos estudios que se centran en el estrés que sufren las malezas bajo tratamiento con herbicidas.

A su vez, para facilitar el análisis de los múltiples genes de referencia estudiados, se han desarrollado una serie de algoritmos para permitir la comparación de la estabilidad de los distintos genes de referencia. Los tres algoritmos más utilizados para este fin son: BestKeeper, geNorm y NormFinder. Estos algoritmos se

combinaron en una herramienta web de libre uso: RefFinder (Xie *et al.*, 2012) que, acopladas con una cuarta comparación denominada método comparativo del ΔC_t (Silver *et al.*, 2006), permite evaluar el gen de referencia más estable. Numerosos estudios se han realizado sobre la validación de genes de referencia utilizando estas herramientas en diferentes plantas y en diferentes condiciones experimentales (Chen *et al.*, 2017; Moretti *et al.*, 2017; Petit *et al.*, 2012; Sudhakar Reddy *et al.*, 2016; Wrzesińska *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019).

En este capítulo se evaluará la estabilidad de genes de referencia usualmente reportados en la bibliografía mediante la utilización de diferentes algoritmos a fin de poder seleccionar los óptimos para el estudio del sorgo de Alepo ante el tratamiento a glifosato.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se recolectó a campo biotipos de sorgo de Alepo que presentaron resistencia a glifosato, también biotipos susceptibles de manera de contar con genotipos resistentes y susceptibles al herbicida, la localización de los rizomas fue registrada por georeferenciación (Tabla 2. 1). Los ejemplares fueron trasladados al invernáculo del Instituto de Biotecnología INTA (34°36'18.3" S; 58°40'24.0" O) y fueron cultivados bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo 16hs/8hs, temperatura 24 °C $\pm$ 3 °C y 140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ intensidad de luz (Figura 2. 1).



Figura 2. 1. Biotipos de *Sorghum halepense* mantenidos en invernáculo del Instituto de Biotecnología INTA

Ensayo de aplicación del herbicida

Previamente a la aplicación de glifosato (Round Up Activo) se realizó la calibración de la mochila a utilizar. Se utilizó una mochila de pulverización manual con una pastilla de abanico plano (8001 VS, naranja, **TEEJET TP**). Para la calibración de la mochila se siguieron los siguientes pasos:

- Se cargo el tanque con una cantidad precisa de agua (2 L en nuestro caso)
- Se midió el ancho de trabajo (0,8 m)
- Se recorrió en línea recta una distancia de 10 m a paso constante de avance para lograr la uniformidad de la aplicación en el área
- Se vació el líquido restante en la mochila para calcular la cantidad utilizada en la aplicación (100 mL)

En función de estas mediciones se realizó el cálculo para aplicar la dosis recomendada de marbete de glifosato.

Para cada uno de los biotipos a analizar (Tabla 2. 1) se realizaron tres clones por propagación vegetativa de los rizomas (replicas biológicas) que fueron mantenidas en macetas individuales en invernáculo. En el estadio de 3-4 hojas (Figura 2. 2) totalmente expandidas fueron tratadas con glifosato (Glifosato SL al 48% p/V) a una tasa de 360 g ae ha⁻¹ (Figura 2. 3).

Se tomaron muestras a tres tiempos: previo a la aplicación (Tiempo 0) y a las 24 y 72 horas post-aplicación (Figura 2. 4).

Se recolectaron muestras de hojas de 6 biotipos: 2 susceptibles y 4 resistentes. Las muestras fueron colectadas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta la extracción de ARN.

Los clones de los biotipos susceptibles fueron usados como control para evaluar la eficacia de la aplicación del herbicida. Todas las réplicas fueron crecidas, aplicadas y muestreadas al mismo tiempo bajo las mismas condiciones.

Tabla 2. 1. Nombre de los materiales y Sitios de muestreo

ID	Sitio de recolección	Latitud	Longitud	Fenotipo
OV	Oro Verde, Entre Ríos	31°49'58"S	60°31'27"O	Susceptible
FCA	Facultad; Entre Ríos	31°49'59"S	60°31' 28"O	Susceptible
SOR	Soresí; Entre Ríos	31°19'56"S	60°01'16"O	Resistente
PAV	Pavíoti; Entre Ríos	31°18'48"S	59°46'30"O	Resistente
HAS	Hasenkamp; Entre Ríos	31°27'20"S	59°52'54"O	Resistente
HER	Hernandarias; Entre Ríos	31°17'11"S	59°46'42"O	Resistente



Figura 2. 2. Clones vegetativos de *Sorghum halepense* en el estadio de 3 – 4 hojas Instituto de Biotecnología INTA.



Figura 2. 3. Clones de *Sorghum halepense* previo a la aplicación.



Figura 2. 4. Mantenimiento de los clones de *Sorghum halepense* post aplicación para muestreo y control en invernáculo.

Extracción de ARN y síntesis del ADNc

Se extrajo ARN total de las hojas utilizando el protocolo TRIzol (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La integridad del ARN fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % (Figura 2. 5). La calidad (relación de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm) y cantidad (absorbancia a 260nm) se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific). Para la síntesis de ADNc sólo se utilizaron las muestras de ARN con valores de A260/A280 que oscilaron entre 1,80 y 2 y A260/A230 superiores a 2. El ADN genómico se eliminó mediante un tratamiento con DNasa I durante 60 minutos a temperatura ambiente utilizando DNasa I (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU). Para cada muestra, se retrotranscribió 1 µg del ARN total utilizando un kit de transcripción SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific) y cebadores hexaméricos aleatorios según las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

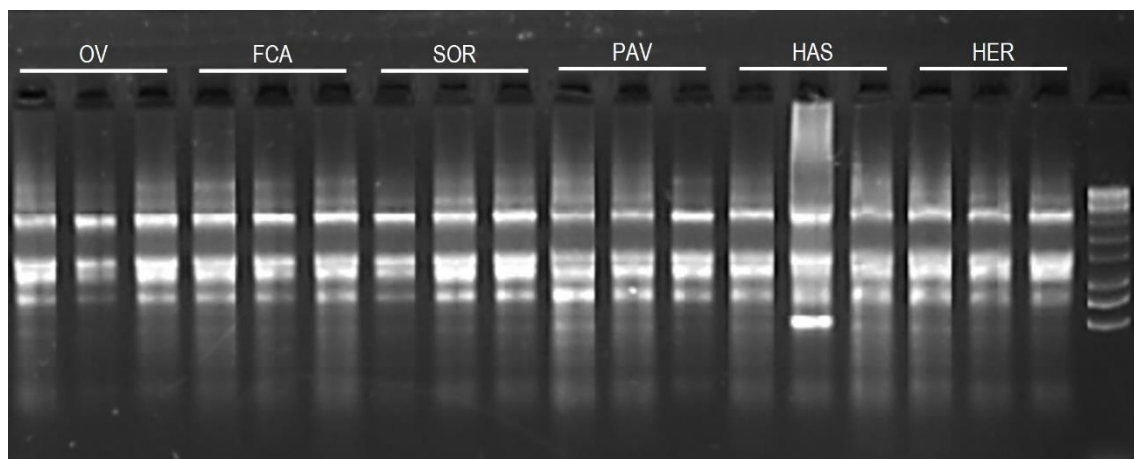


Figura 2. 5. Electroforesis en Gel de agarosa 1% de las extracciones de ARN de las réplicas biológicas de los biotipos para evaluar integridad.

Selección de genes de referencia y diseño de oligonucleótidos

Para este estudio se seleccionaron 16 genes de referencia reportados usualmente en la bibliografía (Tabla 2. 2). Los iniciadores para los genes GADPH, UBC1, α TUB, EF-P, SAMDC, MDH, ADP, β -TUB, PP2A, EIF4 α se obtuvieron del trabajo realizado en *Sorghum bicolor* para estreses abióticos por Sudhakar Reddy *et al.*, 2016. El resto de los iniciadores (ACT, ARI8, DnaJ, H2A, Hsp70, ALS1 y EPSPS) fueron diseñados a partir de las secuencias de genes de referencia reportados en otras especies por comparación con el genoma de *Sorghum bicolor* utilizando la plataforma Phytozome v 12.1 (<http://phytozome.jgi.doe.gov>). Los oligonucleótidos para la qPCR se diseñaron utilizando el programa informático Primer3 en línea (<http://primer3.ut.ee/>) con los siguientes parámetros: 55-65 °C de temperatura de hibridación de los iniciadores (*annealing*), 18-25 pb de longitud del cebador, 45-55% contenido de GC, 3 GC máx. en el extremo de 3', y 90-150 pb de longitud del producto de amplificación. El resto de los parámetros fueron los establecidos por defecto por el software.

Los iniciadores fueron diseñados en base a la secuencia CDS (secuencia codificante, *coding sequence*), y se verificó que el iniciador sentido (*forward*) y el antisentido (*reverse*) hibridaran dentro del mismo exón. Un análisis similar se realizó para los iniciadores tomados del trabajo de Sudhakar Reddy *et al.* MDH, ADP, PP2A y EIF4 α , mediante el alineamiento de la secuencia para la cual el oligonucleótido fue reportado (i.e., XM_002441244, XM_002453490, XM_021459375 y XM_002467034, Tabla 2. 2) con la secuencia obtenida por comparación con el genoma de *Sorghum bicolor* v3.1.1. En el caso de ADP, PP2A y EIF4 α los iniciadores hibridaron dentro del mismo exón mientras que para MDH lo hacían en exones diferentes. La especificidad fue chequeada *in silico* utilizando el software Primer BLAST; todos los oligonucleótidos hibridaron sobre la secuencia blanco. La especificidad del iniciador se evaluó mediante la realización de una PCR en tiempo final utilizando el ADNc de sorgo de Alepo como templado. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: H₂O c.s.p. 10 μ l, 20 ng de ADN, 0,25 μ mol/L de oligonucleótidos iniciadores, 2mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de

cada dNTP, 1X buffer de reacción y 1U Taq polimerasa platinum (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU). Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 94° C, seguido de 40 ciclos de 45 seg a 94° C, 45 seg a 60° C, 2 min a 72° C y elongación final de 10 min a 72° C. El producto amplificado se resolvió mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y posterior tinción con bromuro de etidio (Figura 2.8). Los fragmentos obtenidos se secuenciaron para confirmar la identidad en *S. halepense* mediante el servicio ofrecido por la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología INTA.

Tabla 2. 2. Genes de referencia seleccionados, secuencia de los iniciadores diseñados y tamaño del fragmento esperado para la validación

	Función celular	N° ID	Iniciadores (F/R) (5"-3")	Longitud del fragmento
GAPDH Sb	Glyceraldehyde 3-phosphate-Dehydrogenase	XM_021448008	AAGGCCGGCATTGCTTTGAAT	107
UBC1 Sb	Ubiquitin Protein 1 Isoform C	XM_002452660	ACATGTGGCAGATCAGGTCGA	120
α-TUB Sb	Alpha –Tubulin	XM_021465793	AGAGGCTCATCTTCGCTGGG	103
EF-P Sb	Elongation Factor P	XM_002463651	CTCAGTTAACACGGCCACCAC	114
SAMDC Sb	S-adenosylmethionine decarboxylase	XM_002446695	GAGGGTGAGTTCTCTGAGGCC	132
MDH Sb	Malate dehydrogenase	XM_002467034	CTCCCTCATCTCCATCCTCGC	103
ADP-RF Sb	ADP-Ribosylation Factor	XM_002441244	TGAAGCGGGTGAGAAGATTGT	136
β-TUB Sb	Beta Tubulin	XM_002451561	AGCCAAATCATACTCGCCCA	98
PP2A Sb	Serine/threonine-Protein Phosphatase	XM_002453490	GTGGCGGACTCCTCATCTACC	138
EIF4α Sb	Eukaryotic Initiation Factor 4A	XM_021459375	CCAGTTTGCGGTCTTCACAG	144
ACT Sb	Actin	Sobic.009G005900	TGCAGTGGTGGTGAATGGAA	100
ARI8 Sb	E3 ubiquitin-protein ligase ARI8	Sobic.006G131000	GCGTCTTCTCTCCGACAGC	121
DnaJ Sb	Chaperone protein DnaJ 49	Sobic.003G185200	GTCTGTGCGATGTGGGGATGT	103
H2A Sb	Histone H2A	Sobic.002G059200	CACAGCACACAGTCGGACATG	133
HSP70 Sb	Heat shock 70 kDa protein	Sobic.002G249800	GCGTGTGAGTCATCCGTTTAC	150
ALS1 Sb	Acetolactate Synthase	Sobic.004G155800	CCGCCTCAGTGAACCTCATCT	100
EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	Sobic.010G023800	AACCCGCAAAACCCAGACTA	113
			TACAGGTCGGGCTCATGGAAC	
			CAACTTTGTACCCGCGATGA	
			TCCAGAAACCTTAGCAGCCCA	
			TCGAGACACTTGTGGCAGATT	
			CGCACATGGAGCCACAACAT	
			CGGGCTCTGGAACTGGATT	
			TTGATGCCCTGTTCTTGCCA	
			TTTCAGGACTGGTGGGATGC	
			GAGCAACAGCAGCAGTAGGA	
			GGCCAGGGACAACAAGAAGA	
			ACTGTGGATGTTGGGGAGGA	
			ACCTGCTGAAGTCACCAAGG	
			CCACCACCTTGTTGCATGTG	
			TGGGCCTTGGCAATTTCC	
			AGATCCGCCTTATCCACTGCAT	
			CATGGACCGAGACTAGCGTAACT	
			AGTCATGGCAACATCAGGCATT	

Ensayo de qPCR

Para evaluar la eficiencia de la amplificación de cada gen candidato, a partir del ADNc se realizaron diluciones seriadas para generar curvas estándar de cuatro puntos (1; 1/10; 1/100 y 1/1000). Se incluyó un control negativo en cada amplificación para evaluar posibles contaminaciones.

Con el fin de confirmar la obtención de un único fragmento específico como producto de amplificación por PCR se observó la obtención de un único pico de amplificación analizando la curva de disociación dF vs Temperatura (Figura 2. 9).

Los coeficientes de correlación (R^2) y los valores de la pendiente se obtuvieron a partir de las curvas estándar dF vs Ciclo, y las eficiencias de amplificación de la PCR (E) se calcularon de acuerdo con $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ (Tabla 2. 3).

Las reacciones se realizaron en un volumen total de 20 μ l que contenía 10 ng de ADNc, ROX 1X (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU), SYBR Green 2X (Life Technologies), 0,2 μ M de cada iniciador, 2 mmol/L de $MgCl_2$, 0,2 mmol/L de cada dNTP, buffer de reacción 1X, Taq Platinum 1 U (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU.) y agua libre de nucleasas.

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, EE. UU.) con las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min, luego se verificó la especificidad del amplicón mediante el análisis de la curva de disociación (60 a 95°C). El ensayo de qPCR se llevó a cabo utilizando tres réplicas biológicas para cada biotipo y dos réplicas técnicas.

Análisis de datos para la estabilidad de la expresión de los genes de referencia

Para calcular la estabilidad de la expresión de los 9 genes de referencia candidatos se seleccionaron los programas informáticos geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) y Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) y el método de Δ Ct comparativo (Silver *et al.*, 2006) .

A continuación se utilizó la herramienta web RefFinder (Xie *et al.*, 2012) para realizar una clasificación integral de los genes de referencia candidatos mediante la comparación de los resultados calculados por estos tres programas informáticos y el método comparativo Δ Ct.

Los valores Cq (ciclo de cuantificación) de todos los genes de referencia utilizados en geNorm y NormFinder se convirtieron en cantidades relativas de acuerdo con la fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (ΔCt = el valor Cq correspondiente - Cq mínimo). Los valores medios de las réplicas biológicas se utilizaron como datos de entrada para el análisis de geNorm y Normfinder.

El programa informático GeNorm evalúa el nivel de estabilidad mediante el parámetro **M**. El valor **M** más bajo significa la expresión génica más estable, para cada combinación de dos genes de referencia **j** y **k** se calcula un arreglo de **A_{jk}** de *m* elementos el cual consiste en la transformación log2 de la relación **a_{ij}/a_{ik}**, se define la

variación por pares V_{jk} para los genes j y k como la desviación estándar de los elementos de A_{jk} . La medida de la estabilidad genética M para los genes de referencia j es la media aritmética para todos los pares de variaciones V_{jk} (Vandesompele *et al.*, 2002).

El valor de estabilidad es el parámetro utilizado por el programa NormFinder para realizar la evaluación, siendo el valor de estabilidad más bajo el que indica una mayor estabilidad de la expresión. Este programa permite la estimación de la variación intragrupo para estimar las varianzas intragrupo: El programa calcula los residuos habituales de un modelo aditivo, los eleva al cuadrado y toma la suma sobre las muestras que pertenecen al grupo. (Andersen *et al.*, 2004).

BestKeeper es otra herramienta de software para determinar la estabilidad de la expresión de los genes de referencia mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar (SD) de los valores de Cq. El SD y CV más bajos indican el gen de referencia más estable y sólo los genes con $SD < 1$ se deben considerar apropiados como genes de referencia (Pfaffl *et al.*, 2004).

El método comparativo ΔCt identifica potenciales genes de referencia comparando la expresión relativa entre los pares de genes dentro de cada muestra. Se realiza teniendo en cuenta todos los genes y comparando todas las combinaciones posibles de genes, con lo que se forma un patrón por el cual los genes tienden a estar asociados con niveles mayores o menores de desviación en ΔCt (Silver *et al.*, 2006).

Para proporcionar una evaluación integral de los genes de referencia candidatos, se llevó a cabo un análisis adicional utilizando la herramienta integral basada en la web RefFinder, que integra geNorm, Normfinder, BestKeeper y el método comparativo ΔCt (Xie *et al.*, 2012).

Resultados

Verificación del fenotipo de los biotipos

Se realizó la aplicación de glifosato para corroborar la resistencia/susceptibilidad al herbicida glifosato de los biotipos recolectados a campo. Se observó que a 72 HPA los biotipos susceptibles ya presentaban amarillamiento en sus hojas (Figura 2. 6) y que el efecto del herbicida se incrementaba a lo largo de los sucesivos días posteriores a la aplicación. Este efecto no se evidenció en los biotipos resistentes (Figura 2. 7)

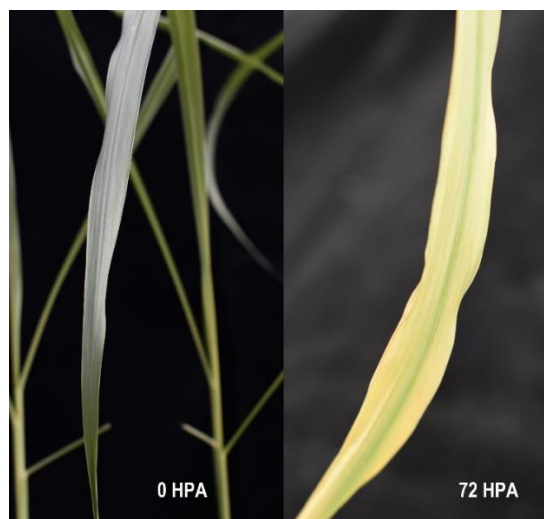


Figura 2. 6. Detalle de la hoja de un biotipo susceptible previo a la aplicación y 72 HPA de glifosato.

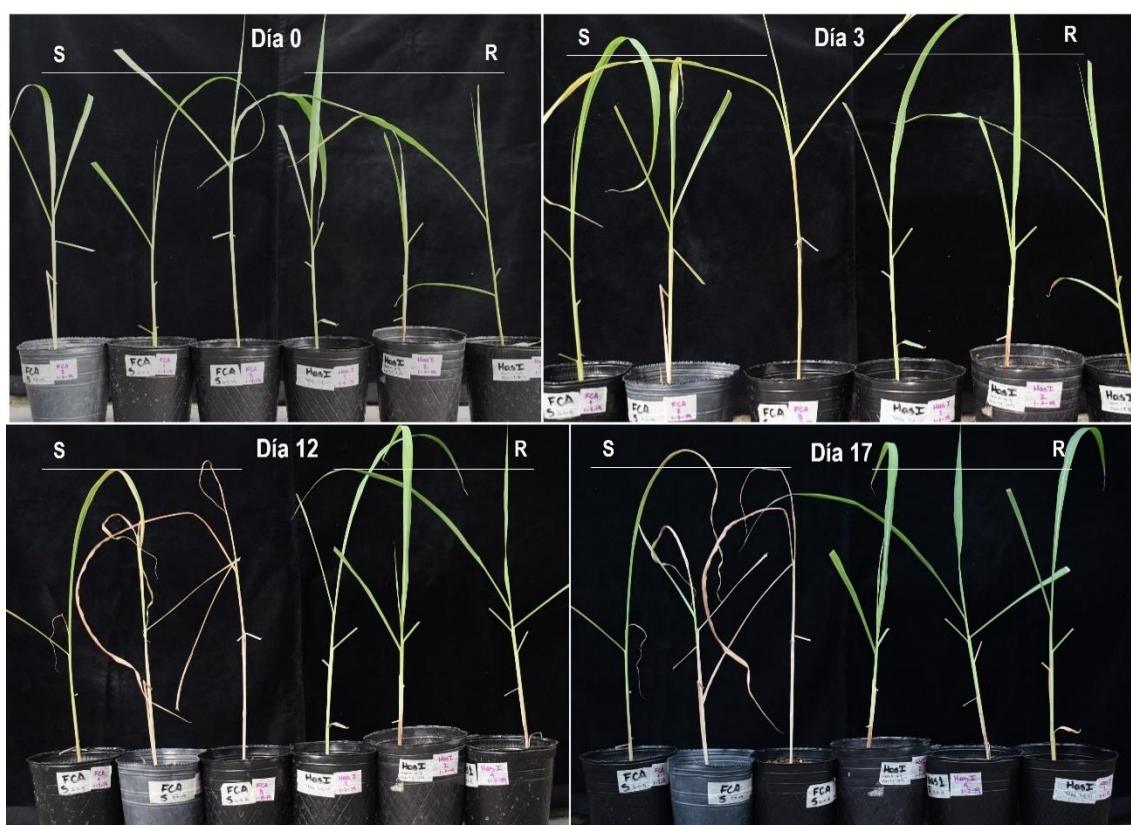


Figura 2. 7. Biotipos susceptibles y resistentes previo a la aplicación (0 HPA) y 3, 12 y 17 días postaplicación. Se muestran 3 replicas biológicas de FCA (susceptible) y 3 replicas biológicas de HASI (resistente).

Especificidad de los oligonucleótidos

La especificidad de los iniciadores fue confirmada mediante la amplificación por PCR en tiempo final y la visualización de un único producto de amplificación luego de realizar la electroforesis en gel de agarosa (Figura 2. 8). También se evaluó la presencia de un solo pico correspondiente a un único producto de amplificación en las curvas de disociación mediante la amplificación por qPCR (Figura 2. 9).

La eficiencia de la amplificación se evaluó mediante la realización de la curva estándar (Figura 2. 10).

De los 16 genes analizados, 7 genes candidatos evaluados fueron descartados debido a que presentaban dímeros entre los iniciadores, o que al calcular la eficiencia en la curva estándar no estaban en el valor adecuado para su utilización (datos no mostrados). Los genes descartados fueron: GADPH, UBC, EF-P, α TUB, SAMDC, β TUB y H2A

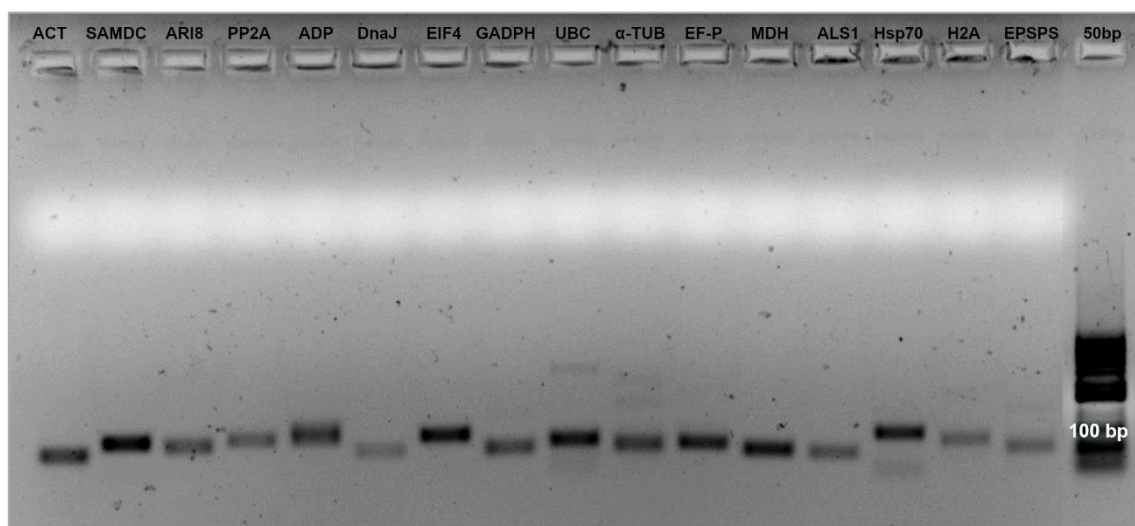


Figura 2. 8. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de genes de referencia candidatos.

Los genes amplificados son ACT: actina; SAMDC: S-adenosylmethionine decarboxylase; ARI8: E3 ubiquitin-protein ligase ARI8; PP2A: Serine/threonine-Protein Phosphatase; ADP: ADP-Ribosylation Factor; DnaJ: Chaperone protein DnaJ 49; EIF4: Eukaryotic Initiation Factor 4A; GADPH: Glyceraldehyde 3-phosphate-Dehydrogenase; UBC: Ubiquitin Protein 1 Isoform C; α -TUB: Alpha – Tubulin; EF-P: Elongation Factor P; MDH: Malate dehydrogenase; ALS1: Acetolactate Synthase; Hsp70: Heat shock 70 kDa protein; H2A: Histone H2A y EPSPS: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase.

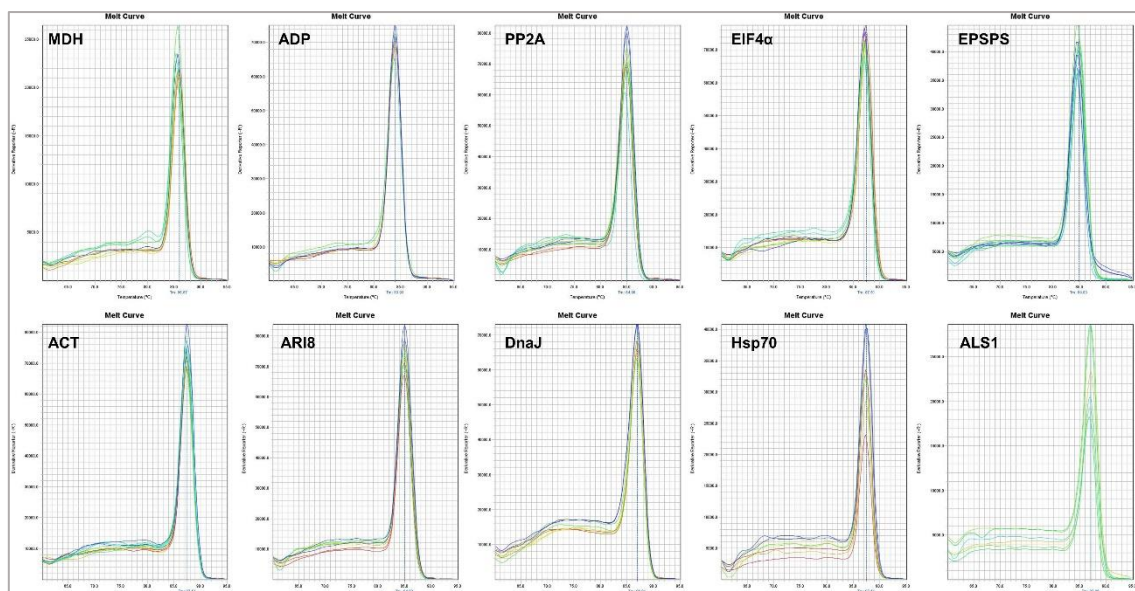


Figura 2. 9. Curvas de disociación para 10 de los 17 genes de referencia evaluados.

Eje X: Temperatura, Eje Y: dF

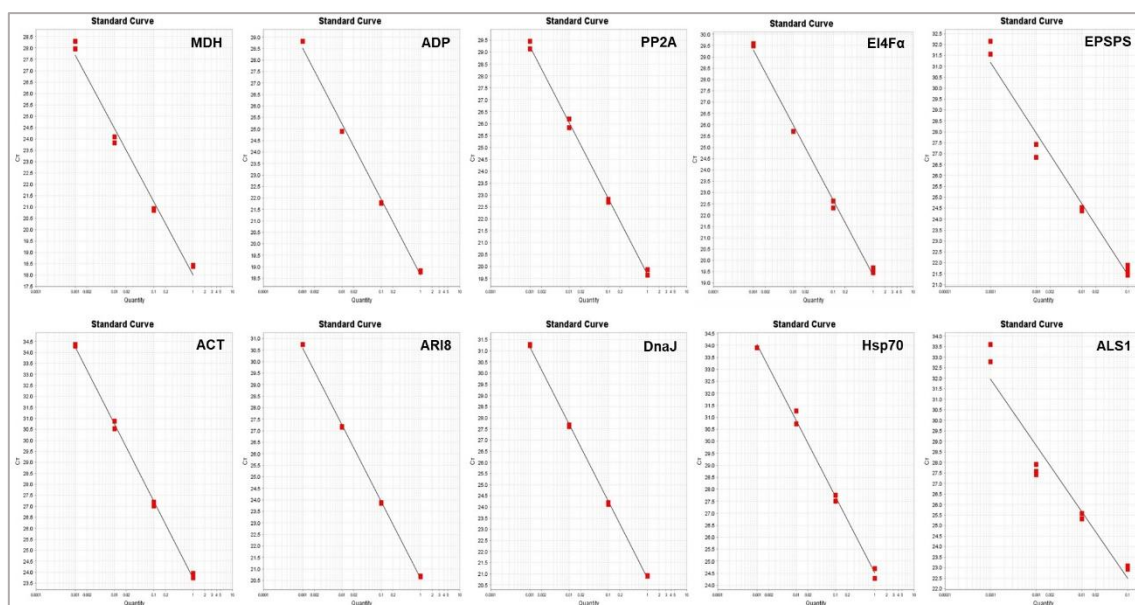


Figura 2. 10. Curvas estándar para 10 genes de los 16genes de referencia evaluados.

Eje X: cantidad (1; 0,1; 0,01 y 0,001), Eje Y: ciclos

De los 10 genes de referencia aceptados según los criterios anteriores, se secuenciaron los amplicones para confirmar la identidad de estos. El tamaño de los fragmentos osciló entre 103 y 150 pb, las secuencias obtenidas se compararon con la base BLASTN a partir de la cual se verificó la correspondencia con sorgo bicolor (genoma de referencia). La eficiencia de la amplificación varió entre el 97% (ACT) y el 106,8 (ALS1), con el coeficiente de regresión de la curva estándar que varía entre 0,934 (ALS1) y 1 (DnaJ) (Tabla 2. 3).

Los valores de los ciclos de cuantificación (Ct) de los diez genes candidatos en todas las muestras oscilaron entre 19,4 y 29,7. Los valores medios de Ct de los genes analizados oscilaron entre 20,90 (MDH) y 26,63 (Hsp70). Los valores bajos de Ct de la MDH se corresponden a un alto nivel de expresión, mientras que la expresión más baja, con altos valores de Ct, se observaba en la Hsp70. La mayor variación en los valores de Ct de un gen se detectó en la ALS1 (22,22-29,35) y en la ACT (22,08-28,57), mientras que DnaJ (20,07-22,41) y ARI8 (22,77-25,99) mostraron la menor variación (Figura 2. 11).

Tabla 2. 3. Información de los productos de PCR para cada gen candidato y detalles de los parámetros de amplificación.

EFF: Eficiencia porcentual; E (Eficiencia)= $10^{-1/\text{pendiente}}$

Gen	Longitud del fragmento	Parmetros de curva estándar			
		Pendiente	R ²	Eff%	E
MDH	103	-3,277	0,985	104,133	2,019
ADP	136	-3,287	0,996	101,179	2,015
PP2A	138	-3,188	0,998	105,919	2,059
EIF4α	144	-3,316	0,995	100,265	2,002
ACT	100	-3,396	0,997	97,003	1,970
ARI8	121	-3,327	0,999	99,772	1,998
DnaJ	103	-3,363	1	98,3	1,983
Hsp70	150	-3,178	0,996	106,392	2,064
ALS1	100	-3,168	0,934	106,827	2,089

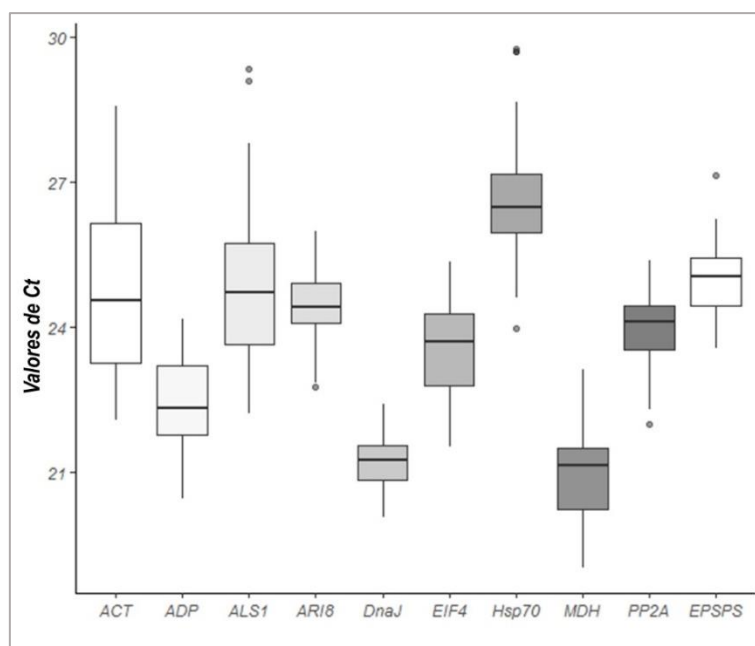


Figura 2. 11. Niveles de expresión de los genes candidatos.

Las líneas de las cajas indican los valores medios, los bordes superior e inferior de la caja los percentiles 25 a 75, mientras que los bigotes muestran el rango de Ct de todas las muestras

Análisis de la estabilidad de los genes mediante diferentes métodos

Se utilizaron diferentes algoritmos matemáticos con el fin de evaluar la estabilidad de los diferentes genes de referencia candidatos para este ensayo

Análisis mediante geNorm

El programa informático geNorm se utiliza para clasificar la estabilidad de la expresión de los genes analizados mediante el cálculo de sus valores de estabilidad de expresión (M) en función de la relación de expresión por pares promedio. Los genes de referencia candidatos con valores medios de estabilidad de expresión (M) más bajos se consideran los genes de referencia expresados de forma más estable (Vandesompele *et al.*, 2002). Los valores de estabilidad (M) de los genes probados evaluados por geNorm se muestran en la (Figura 2. 12). El gen de referencia es aceptado si los valores de M son inferiores a 1,5. En este ensayo, PP2A y MDH se clasificaron como el par de genes de referencia más estable con un M= 0,45; ACT fue el gen menos estable con un M=1,27 y DnaJ no es aceptable debido a que el valor M fue superior a 1,5 (Tabla 2. 4 y Figura 2. 12) bajo las condiciones de ensayo.



Figura 2. 12. Valores de estabilidad calculados con geNorm para 9 genes de referencia candidatos

Análisis mediante NormFinder

NormFinder clasifica la estabilidad de la expresión de los genes de referencia candidatos mediante el cálculo de la variación por pares promedio de un gen en relación con la de otros genes candidatos. Los genes con el valor de estabilidad de expresión más bajo se caracterizan como los genes de referencia más estables (Andersen *et al.*, 2004). Los resultados incluyen el gen más estable y la mejor combinación de dos genes de referencia. En este estudio, considerando 3 subconjuntos 0HPA (previo a la aplicación) 24 HPA y 72 HPA el gen más estable fue el PP2A (0,26) y la mejor combinación de dos genes para evaluar la expresión fue PP2A y ARI8 (Tabla 2. 4), mientras que los genes menos estables fueron el ALS1 y el ACT (Figura 2. 13).



Figura 2. 13. Valores de estabilidad calculados con NormFinder de 9 genes de referencia candidatos

Análisis mediante BestKeeper

El tipo de análisis realizado por el programa Bestkeeper difiere del realizado por otros algoritmos (o programas) como el geNorm y el NormFinder, ya que se basa en la SD (desviación estándar) y el CV (coeficiente de variación) de los valores de Cq. La SD y CV más bajas indican el gen de referencia más estable. Además, sólo los genes de referencia cuya SD < 1 son aceptables. En las condiciones de este

estudio, la ACT y la ALS1 mostraron valores de $SD > 1$ y, por lo tanto, no se consideran adecuados. Los genes con menor desviación fueron el DnaJ, el ARI8 y el PP2A (valores de SD de 0,43, 0,55 y 0,6 respectivamente) (Tabla 2. 4).

Tabla 2. 4. Rangos de estabilidad de la expresión para los 9 genes candidatos calculados por BestKeeper, geNorm, NormFinder, método del ΔCt y RefFinder.
SD: desviación estándar, CV: coeficiente de variación y VE: Valor de estabilidad.

Ranking	Gen	BestKeeper		geNorm		NormFinder		ΔCt method		RefFinder	
		SD ($\pm Ct$)	CV (% Ct)	Gen	VE	Gen	VE	Gen	VE	Gen	VE
1	DnaJ	0,43	2,04	PP2A	0,45	PP2A	0,26	DnaJ	0,55	PP2A	1,32
2	ARI8	0,55	2,26	MDH	0,45	ARI8	0,27	ARI8	0,70	ARI8	2,21
3	PP2A	0,60	2,53	ARI8	0,57	MDH	0,39	PP2A	0,74	DnaJ	2,63
4	MDH	0,69	3,28	ADP	0,74	ADP	0,50	MDH	0,83	MDH	2,63
5	ADP	0,75	3,34	EIF4	0,85	EIF4	0,61	ADP	0,91	ADP	5,00
6	EIF4	0,82	3,47	Hsp70	1,00	Hsp70	0,66	EIF4	0,95	EIF4	6,00
7	Hsp70	0,93	3,50	ALS1	1,15	DnaJ	0,83	Hsp70	1,25	Hsp70	7,00
8	ALS1	1,23	4,96	ACT	1,27	ALS1	0,84	ALS1	1,59	ALS1	8,00
9	ACT	1,36	5,49	DnaJ	1,55	ACT	0,93	ACT	1,59	ACT	9,00

Análisis mediante el método del ΔCt

El método de ΔCt comparativo identifica los posibles genes de referencia comparando la expresión relativa de los pares de genes dentro de cada muestra (Silver *et al.*, 2006). Siendo DnaJ, ARI 8 y PP2A los genes más estables en este estudio (Tabla 2. 4 y Figura 2. 14).

El método de Ct comparativo examinó la expresión relativa entre los pares de genes (Silver *et al.*, 2006).

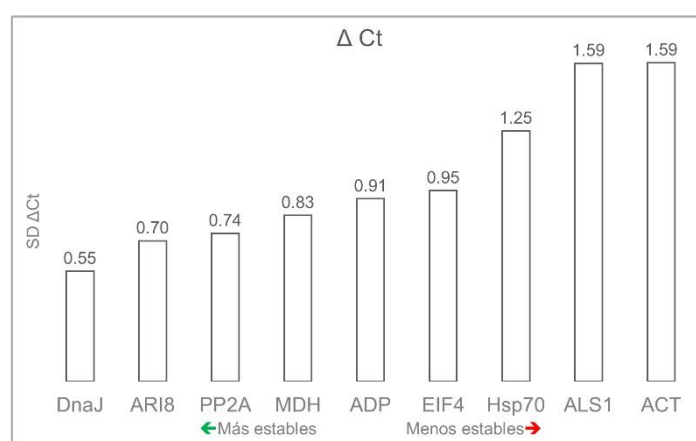


Figura 2. 14. Estabilidad calculada por el método del ΔCt para los 9 genes candidato analizados

Comparación de datos mediante la plataforma web RefFinder

El orden en función de la estabilidad de los genes generados por geNorm, NormFinder, BestKeeper y el método de ΔCt comparativo mostraron algunas diferencias. Para proporcionar una evaluación integral de los genes, se realizó un nuevo análisis utilizando una plataforma basada en la web RefFinder, que integra los

distintos algoritmos. Los órdenes de clasificación recomendados por RefFinder según lo calculado por la plataforma para cada algoritmo y para el ranking integrado se muestran en la Tabla 2. 5. PP2A y ARI8 se clasificaron como los genes más estables; el ACT y la ALS1 fueron los menos estables entre los 9 genes analizados.

Tabla 2. 5. Ranking de estabilidad de la expresión de los 9 genes candidatos calculados por RefFinder.
SD: desviación estándar y VE: Valor de estabilidad

Rank	BestKeeper		geNorm		NormFinder		ΔCt method		RefFinder	
	Gen	SD (±Cq)	Gen	VE	Gen	VE	Gen	VE	Gen	VE
1	DnaJ	0,36	PP2A	0,49	PP2A	0,22	PP2A	0,94	PP2A	1,32
2	ARI8	0,48	MDH	0,49	ARI8	0,35	ARI8	1,00	ARI8	2,21
3	PP2A	0,56	ARI8	0,59	MDH	0,50	DnaJ	1,01	DnaJ	2,63
4	MDH	0,64	DnaJ	0,64	DnaJ	0,51	MDH	1,04	MDH	2,63
5	ADP	0,66	ADP	0,73	ADP	0,82	ADP	1,17	ADP	5,00
6	EIF4	0,69	EIF4	0,80	EIF4	0,95	EIF4	1,23	EIF4	6,00
7	Hsp70	0,89	Hsp70	0,95	Hsp70	1,28	Hsp70	1,51	Hsp70	7,00
8	ALS1	1,16	ALS1	1,11	ALS1	1,31	ALS1	1,54	ALS1	8,00
9	ACT	1,35	ACT	1,2	ACT	1,46	ACT	1,64	ACT	9,00

Discusión

La qPCR es la forma más frecuente de evaluar los niveles de expresión de los genes relacionados con la resistencia a los herbicidas en las malezas (Chen *et al.*, 2017; Petit *et al.*, 2012; Wrzesińska *et al.*, 2016).

Para determinar las bases moleculares de la resistencia mediante el análisis de los niveles de expresión ya sea de los genes blanco o de los involucrados en los procesos de desintoxicación, se debieron identificar genes de referencia apropiados en las condiciones de estrés en estudio. En ese sentido, el presente trabajo es el primer y único estudio sobre la selección de genes de referencia estables y confiables para analizar mediante qPCR la expresión diferencial de genes bajo tratamiento con glifosato en sorgo de Alepo (Ulrich *et al.*, 2021).

Se probaron 16 genes candidatos de los cuales se evaluó la estabilidad de nueve genes de referencia regularmente usados MDH, ADP, PP2A, EIF4α, ACT, ARI8, DnaJ, HSP70 y ALS. El primer paso fue la búsqueda de genes candidatos a ser utilizados como referencia, el diseño de iniciadores, en los casos necesarios y la verificación de que todos ellos satisficieran los criterios de eficiencia requeridos para la qPCR siguiendo la guía de las reglas MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*, por sus siglas en inglés) (Bustin *et al.*, 2009). Estas reglas incluyen la utilización de herramientas *in silico* como el BLAST para verificar la posibilidad de identidad con pseudogenes, realizar validaciones empíricas específicas con evidencia experimental como geles de electroforesis, perfiles de curvas de disociación y secuenciación de los fragmentos amplificados, verificación la ausencia de dímeros de

oligonucleótidos (dado que la presencia de los mismos en ensayos basados en SYBR Green pueden generar falsos positivos), inclusión de controles negativos (permiten detectar contaminaciones y productos de amplificación no deseados como por ejemplo, dímeros de oligonucleótidos), establecer la eficiencia de la amplificación por PCR mediante curvas de calibración (esto es indicativo de la sensibilidad analítica y robustez del ensayo), por mencionar los requerimientos más destacados.

En este estudio el análisis de los datos se realizó con diferentes paquetes de programas informáticos y se utilizó una herramienta web para comprobar la fiabilidad de los genes de referencia candidatos.

De acuerdo con el análisis Bestkeeper, ACT y ALS1 deberían excluirse porque su SD > 1. Para el resto de los algoritmos, ambos genes también se encuentran en las peores posiciones en cuanto a los parámetros de estabilidad. Sin embargo, estos dos genes se utilizan frecuentemente como genes de referencia. En algunos ensayos de validación han demostrado ser los más estables como por ejemplo en *Eleusine indica* bajo estrés por herbicida (Chen *et al.*, 2017), en *Salix matsudana* bajo estrés abiótico (Zhao *et al.*, 2019), en *Conyza canadiensis* y *Conyza bonariensis* (Moretti *et al.*, 2017) bajo estrés por glifosato. Sin embargo, en otros trabajos se demostró que el gen de referencia ACT, que interviene en la estructura del citoesqueleto, no solía permanecer inalterado bajo el tratamiento experimental como por ejemplo en *Galium aparine* (Su *et al.*, 2020) y *Avena fatua* (Wrzesińska *et al.*, 2016).

En el conjunto de muestras de este estudio, la mayoría de los algoritmos identificaron a PP2A y ARI8 como los genes de referencia más estables. Se observaron resultados similares para *S. bicolor* bajo diferentes estreses abióticos donde también se encontró que el gen de referencia que respondía de manera más estable era el PP2A (Sudhakar Reddy *et al.*, 2016) y en *Brassica napus* donde PP2A se identificó entre los cuatro principales genes de referencia en seis de las ocho condiciones experimentales de estrés en estudio (Wang *et al.*, 2014).

Todos estos resultados sugieren que la evaluación de la estabilidad del gen de referencia es indispensable antes del análisis de la expresión del gen en estudio en condiciones experimentales específicas (Zhao *et al.*, 2019).

Es importante señalar que entre los diferentes algoritmos utilizados para la evaluación de la estabilidad se presentan algunas diferencias sobre cuáles son los mejores genes de referencia, esto se debe a las diferencias en sus fundamentos matemáticos (Xu *et al.*, 2017). La plataforma RefFinder es una herramienta ampliamente utilizada para la validación de genes de referencia, ya que es gratuita y realiza un análisis rápido utilizando los tres algoritmos más utilizados para la validación de genes de referencia a partir de una sola tabla entrada con los valores Cq únicamente (De Spiegelaere *et al.*, 2015). El ranking de estabilidad de esta plataforma establece como más adecuado al gen PP2A en 3 de los 4 algoritmos calculados. Por lo tanto, para los ensayos subsiguientes se decidió utilizar el gen PP2A como gen de referencia.

Capítulo 3:

Mecanismos asociados al sitio blanco. Secuenciación EPSPS.

Cuantificación del número de copias genómicas y de la expresión de ARNm del gen EPSPS por qPCR.

Introducción

En la actualidad se reconoce que la resistencia a los herbicidas es el resultado de la evolución adaptativa de las poblaciones de malezas a la intensa presión de selección ejercida por el uso constante y en grandes dosis de herbicidas, mediante la selección de aquellos individuos portadores de mutaciones ventajosas, estas malezas resistentes pueden sobrevivir a la aplicación del herbicida mediante diversos mecanismos (Délye, 2013). Dentro de la categoría de los mecanismos asociados al sitio blanco de acción del herbicida, existen modificaciones estructurales de la proteína blanco del herbicida, como por ejemplo la EPSPS para el glifosato, que consisten en la sustitución de aminoácidos afectando la interacción de ésta con el herbicida (Sammons & Gaines, 2014). Además, existen mecanismos relacionados con el aumento en el número de copias del gen y con la sobreexpresión del gen aumentando el ARNm de la proteína blanco. Ambos mecanismos conducen a la posibilidad de la posterior sobreproducción de la proteína EPSPS blanco del glifosato (Patterson *et al.*, 2018). El incremento de la enzima estaría relacionado con el aumento en los niveles de resistencia, siendo por lo tanto necesario elevar la cantidad del herbicida para inhibir el incremento de EPSPS y ocasionar la muerte de la planta (Heap & Duke, 2018).

El modo de acción del glifosato es la inhibición de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la enzima de la vía metabólica del shikimato, la cual es la responsable de la síntesis de aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano (Bo *et al.*, 2017) (Figura I. 8).

La primer mutación reportada que confiere resistencia a glifosato fue el cambio en la posición 106 de prolina a serina, alanina o treonina en especies de *Lolium* (Kaundun *et al.*, 2011). Solo tres posiciones aminoacídicas han sido asociadas con la resistencia a glifosato en malezas: Thr-102, Ala-103 y Pro-106 (Bo *et al.*, 2017) (Tabla I. 4). Las mutaciones reportadas que confieren resistencia a glifosato en malezas cambian la Pro106 por aminoácidos hidrofóbicos como Ala o Leu, o aminoácidos hidrofílicos como Ser o Thr (Bo *et al.*, 2017). La posición Pro-106 no está involucrada directamente en la interacción con el glifosato ni con el sustrato natural, fosfoenolpiruvato (PEP), no obstante el cambio en este aminoácido causa una modificación estructural en el sitio activo de la enzima y se reduce el espacio disponible para la interacción con el herbicida (Sammons &

Gaines, 2014). La sustitución en el sitio Pro-106 es suficiente para conferir la resistencia. Las mutaciones Thr-102 y Ala-103 solo han sido observadas coexistiendo con la primera (Baek *et al.*, 2021). La mutación doble Thr-102-Ile + Pro-106-Thr, denominada **TIPS**, fue observada por primera vez en *Bidens subalternans* y provee un nivel alto de resistencia. La sustitución triple, Thr-102-Ile + Ala-103-Val + Pro-106-Ser, denominada **TAP-IVS** da como resultado un rearrreglo en el dominio de unión a glifosato y una reducción del sitio de interacción (Murphy & Tranel, 2019). Las mutaciones dobles y triples confieren niveles de resistencia mayores que los mecanismos no asociados al sitio blanco, NTSR (Baek *et al.*, 2021).

Diversas malezas han sido reportadas por sus mutaciones en el sitio de la EPSPS, confiriéndoles resistencia a glifosato: *Echinochloa colona* (Alarcón-Reverte *et al.*, 2015); triple mutación en *Amaranthus hybridus* (Perotti *et al.*, 2019); *Digitaria insularis* (Galeano *et al.*, 2016), *Eleusine indica* (Chen *et al.*, 2015), *C. canadensis* (Beres *et al.*, 2020), entre otras.

Por otro lado, la resistencia a herbicida (involucrando al sitio blanco) puede estar dada por la “duplicación génica” la cual es definida como la duplicación heredable de un segmento de ADN, que da como resultado una o más copias de genes adicionales dentro del genoma del organismo.

A mayor número de copias de la EPSPS el nivel de resistencia se incrementa en varias especies (Sammons & Gaines, 2014), como es el caso de *Amaranthus palmeri*, donde el alto número de copias se correlaciona con un alto nivel de resistencia (Gaines *et al.*, 2010). En *Chloris truncata* (Ngo *et al.*, 2018) los individuos resistentes tenían entre 16 y 48 copias más que los susceptibles, y este número fue variable dentro y entre poblaciones. Los autores sugirieron que el efecto de las copias adicionales era aditivo, por lo cual explicaban que, a mayor cantidad de copias, más alta era la resistencia conferida. Desde el descubrimiento de este mecanismo en *A. palmeri* (Gaines *et al.*, 2010) se han reportado varios casos, ejemplo de ello es la amplificación génica en *Amaranthus tuberculatus*, *A. spinosus*, *Lolium multiflorum* (Patterson *et al.*, 2018), *Kochia scoparia* (Wiersma *et al.*, 2015), *E. indica* (Chen *et al.*, 2015) y *Bromus diandrus* (Malone *et al.*, 2016). En el caso de *A. spinosus* el elevado número de copias pudo deberse a la hibridación con *A. palmeri* resistente a glifosato (Patterson *et al.*, 2018).

En cuanto a los casos de sobreexpresión del ARNm de la EPSPS, en *Lolium rigidum* se reportó el aumento de la expresión de la EPSPS de 2,5 a 3 veces. Esta sobreexpresión de ARNm que era basal sería lo que les otorgaría la resistencia a los individuos resistentes, sin que hubiese evidencia de duplicación génica (Gaines *et al.*, 2019). En *E. indica* (Gherekhloo *et al.*, 2017) los biotipos resistentes requirieron grandes cantidades de glifosato para inhibir la actividad de la EPSPS en un 50 %, lo que fue asociado con la sobreexpresión del ARNm de la enzima. En este caso las diferencias a nivel de actividad basal sí se asocian a una mayor amplificación del gen EPSPS y a la sobreexpresión del ARNm de su enzima.

La correspondencia entre las copias de la EPSPS, la cantidad de enzima y la resistencia es generalmente positiva (Heap & Duke, 2018).

Cabe destacar que todos los mecanismos asociados al sitio blanco pueden coexistir en la misma especie. Por ejemplo, en *E. indica* se han reportado mutaciones simples y dobles en algunas poblaciones, así como en otras poblaciones de la misma especie la resistencia puede estar dada por amplificación génica y el aumento de la expresión (Chen *et al.*, 2015).

En este capítulo se analizará la secuencia de EPSPS alrededor de la posición 106 y se evaluará la amplificación del número de copias genómica de la EPSPS, así como también el nivel de expresión del ARNm de esta ante el tratamiento a glifosato en sorgo de Alepo.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Genotipos resistentes y susceptibles de sorgo de Alepo fueron recolectados a campo (Tabla 3. 1). Los rizomas fueron cultivados en un invernadero bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo 16hs/8hs, temperatura $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $140\text{ }\mu\text{mol/ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ intensidad de luz.

Tabla 3. 1. Sitios de muestreo

ID	Sitio de recolección	Latitud	Longitud	Condición
FCA	Facultad; Entre Ríos	31°49'59"S	60°31' 28"O	susceptible
SOR	Soresi; Entre Ríos	31°19'56"S	60°01'16"O	resistente
PAV	Pavoti; Entre Ríos	31°18'48"S	59°46'30"O	resistente
HASI	Hasenkamp; Entre Ríos	31°27'20"S	59°52'54"O	resistente
HASII	Hasenkamp; Entre Ríos	31°26'15"S	59°53'12"O	resistente
HER3	Hernandarias; Entre Ríos	31°16'21"S	59°26'13"O	resistente
HER5	Hernandarias; Entre Ríos	31°17'11"S	59°46'42"O	resistente
OST	Ortovsky; Entre Ríos	31°30'34"S	59°41'56"O	resistente
COOr03	San Justo; Córdoba	31°11'26,2"S	62°24'12,8"O	resistente
COOr04	San Justo; Córdoba	31°11'26,6"S	62°24'11,1"O	indeterminada
COOr05	San Justo; Córdoba	31°11'26,9"S	62°24'09,2"O	resistente
COs06	San Justo; Córdoba	31°11'27,7"S	62°24'07,6"O	susceptible
COOr07	San Justo; Córdoba	31°12'38,4"S	62°22'51,5"O	indeterminado
COOr08	San Justo; Córdoba	31°12'38,4"S	62°22'51,5"O	indeterminado
SFrA	Arteaga; Santa Fé	33°06'22.0"S	61°50'50.7"O	resistente
SFsB	Arteaga; Santa Fé	33°06'29.3"S	61°51'02.9"O	susceptible

Con el fin de analizar las secuencias correspondientes a los sitios candidatos a conferir resistencia a glifosato (Thr-102, Ala-103 y Pro-106) se utilizaron dos estrategias. La primera estrategia se basó en la secuenciación de dicha región a partir de ADN genómico mientras que la segunda consistió en la secuenciación de la región que contiene los sitios candidatos a partir de ADNc.

Análisis de las mutaciones en la EPSPS

Muestras analizadas a partir de ADN genómico:

Las muestras analizadas a partir de ADN genómico fueron: COr03, COr04, COr05, COs06, COr07, COr08, SFrA y SFsB

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Nucleo Spin Plant II (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN fue evaluada mediante un gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio; la calidad y cantidad fue verificada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Para llevar a cabo la reacción de amplificación se diseñaron iniciadores para amplificar un fragmento de aproximadamente 300 pb que contiene los sitios 102,103 y 106 de la EPSPS:

Sor106EPSPS Fw: TCTTCTTGGGGAATGCTGGA

Sor106EPSPS Rv: TAACCTTGCCGCCAGGTAGCCCTC

Las condiciones de reacción para PCR fueron: H₂O c.s.p. 25 µl, buffer de reacción 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP's 0,2 mM c/u, Iniciadores Fw y Rv 0,2 µM, Taq Platinum 1 U y ADN 20 ng.

Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 94° C, seguido de 40 ciclos de 45 seg a 94° C, 45 seg a 60° C, 2 min a 72° C y elongación final de 10 min a 72° C.

Debido a la naturaleza tetraploide del genoma de *S. halepense*, y con el fin de poder detectar posibles mutaciones en los distintos complementos que dan origen al poliploide, los productos obtenidos por PCR fueron clonados en el vector pGEM-T (Figura 3. 1) (Promega, Madison, USA) y se secuenciaron 10 clones por muestra COr03, COr04, COr05, COs06, COr07, COr08, SFrA y SFsB.

Ligación: 50 ng del vector se ligaron con T4 ligasa (EPICENTRE, Madison, USA) al fragmento de PCR en una relación 3:1 siguiendo las instrucciones del fabricante

Transformación:

50µl de *E. coli* DH5α competentes se incubaron con 4 µl de la ligación previamente obtenida durante 30 min en hielo. Posteriormente se incubaron 1h 30 min a 42° C y luego se incubó 2 min más en hielo. Se agregó 1000 µl de medio LB e incubó 40 min a 37° C en agitación para recuperar las bacterias. Se centrifugó 4 min a 4000 rpm, se retiró el sobrenadante y se plaqueo en placas con LB agar con ampicilina, suplementadas con XGAL sustrato de la β galactosidasa en flujo laminar. Las placas fueron incubadas a 37° C O.N. Se repicaron 10 colonias blancas (colonias positivas) y se incubaron a 37° C O.N. en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina. Se realizó la extracción de ADN plasmídico recombinante utilizando un kit comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se digirieron con la enzima EcoRI para determinar la presencia y el tamaño del inserto. La secuenciación se llevó a cabo utilizando un

secuenciador automático ABI prism 3100 (Applied Biosystems) en el Servicio de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología INTA.

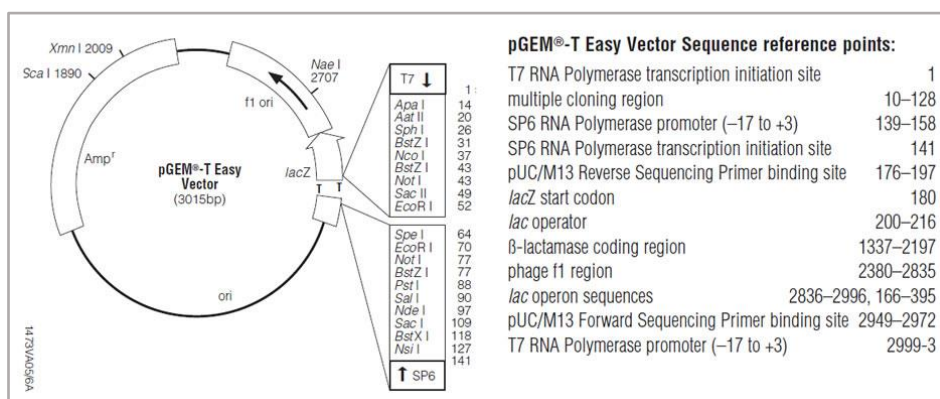


Figura 3. 1. Estructura del vector pGEM-T easy

Muestras analizadas a partir de ADNc

Las muestras analizadas a partir de ADNc fueron: Has I, Has II, Her5, Her3, FCA, SOR, OST y PAV.

Se extrajo ARN total de las hojas utilizando el protocolo TRIzol (Thermo Fisher Scientific). La integridad del ARN fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %. La calidad y la cantidad del ARN se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop[™] 1000 (Thermo Fisher Scientific). Para la síntesis de ADNc solo se utilizaron las muestras de ARN con valores de A260/A280 que oscilaban entre 1,80 y 2 y A260/A230 superiores a 2. El ADN genómico se eliminó después de un tratamiento con DNasa I (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para cada muestra, se retrotranscribió 1 µg del ARN total utilizando el kit de transcripción SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific) y cebadores hexaméricos aleatorios según las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Se realizó una PCR para amplificar un fragmento que contiene los sitios 102,103 y 106 de la EPSPS con los siguientes oligonucleótidos:

Sor106EPSPS Fw: TCTTCTTGGGGAATGCTGGA

Sor106EPSPS Rv: TAACCTTGCCGCCAGGTAGCCCTC

Las condiciones de reacción para PCR fueron: H₂O c.s.p. 25 µl, buffer de reacción 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP's 0,2 mM c/u, Iniciadores Fw y Rv 0,2 µM, Taq Platinum 1 U y ADN 20 ng.

Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 94° C, seguido de 40 ciclos de 45 seg a 94° C, 45 seg a 60° C, 2 min a 72° C y elongación final de 10 min a 72° C.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit QIAquick PCR purification (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las purificaciones fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop[™] 1000

(Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático capilar ABI prism 3100 (Applied Biosystems) en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología INTA.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas utilizando el programa Bioedit (Hall, 1999) con los parámetros predeterminados.

Análisis de amplificación génica y sobreexpresión de la EPSPS

Material vegetal

Las distintas plantas (y tres clones por planta) en igual estadio de crecimiento (3-4 hojas) se les aplicó glifosato (Glifosato SL at 48% p/V) a una tasa de 360 g ae ha⁻¹ (Round Up Activo). Se tomaron muestra a tres tiempos: previo a la aplicación (Tiempo 0) y a las 24 y 72 horas post-aplicación.

Se recolectaron muestras de hojas de 8 biotipos: 1 susceptibles (FCA) y 7 resistentes HASI, HASII, HER3, HER5, OST, PAV y SOR. Para cada uno de ellos se realizaron tres clones por propagación vegetativa de los rizomas (replicas biológicas). Las muestras fueron colectadas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta la extracción de RNA.

Los clones del biotipo susceptible (FCA) fueron usados como control para evaluar la eficacia de la aplicación del herbicida. Todas las replicadas fueron crecidas, aplicadas y muestreadas al mismo tiempo bajo las mismas condiciones.

Obtención de ARN/ADNc

La extracción de ARN se realizó mediante el Kit Purelink RNA mini kit (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La integridad del ARN fue confirmada como se describió anteriormente.

Selección de genes y diseño de oligonucleótidos

Los iniciadores para el gen de la EPSPS fueron diseñados en base a las secuencias obtenidas a partir del genoma de *Sorghum bicolor* utilizando la plataforma Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/>) (Goodstein *et al.*, 2012). Se diseñaron utilizando el programa informático Primer3 en línea (<http://primer3.ut.ee/>) con los siguientes parámetros: 55-65 °C de temperatura de *annealing*, 18-25 pb de longitud del cebador, 45-55 % contenido de GC, 3 GC máx. en el extremo de 3' y 90-150 pb de longitud del fragmento. El resto de los parámetros utilizados son los predeterminados por defecto por el software. Se verificó que el iniciador *forward* y el *reverse* hibridaran dentro del mismo exón. La especificidad de los *primers* o iniciadores fue evaluada en primera instancia *in silico* utilizando el software Primer BLAST. Luego la especificidad del iniciador se evaluó mediante la realización de una PCR en tiempo final utilizando el ADNc del sorgo de Alepo como templado y el

producto amplificado fue resuelto por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Se secuenciaron los fragmentos para confirmar la identidad de las secuencias en *S. halepense*.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit QIAquick PCR purification (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante, las purificaciones fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático capilar ABI prism 3100 (Applied Biosystems) del Servicio de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología INTA. Las secuencias fueron revisadas y analizadas con el software Bioedit (Hall, 1999) y posteriormente se realizó un análisis de similitud de estas mediante la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Ensayo de PCR cuantitativa (qPCR)

Para evaluar la eficiencia de la amplificación de la EPSPS, a partir del ADNc se realizaron diluciones seriadas para generar curvas estándar de cuatro puntos (1; 1/10; 1/100 y 1/1000). Se incluyó un control negativo en cada amplificación para verificar posibles contaminaciones.

Los coeficientes de correlación (R^2) y los valores de la pendiente se obtuvieron a partir de las curvas estándar, y las eficiencias de amplificación de la PCR (E) se calcularon de acuerdo con $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$.

Las reacciones se realizaron en un volumen total de 20 µl que contenía 10 ng de ADNc/ADNg, ROX 1X (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU), SYBR Green 2X (Life Technologies), 0,2 µM de cada iniciador, 2 mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de cada dNTP, buffer de reacción 1X, Taq Platinum 1 U (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU) y agua libre de nucleasas.

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, EE. UU.) con las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Luego se verificó la especificidad del amplicón mediante el análisis de la curva de disociación (60 a 95°C). El ensayo de qPCR se llevó a cabo utilizando tres réplicas biológicas para cada condición, y dos réplicas técnicas.

Se analizó la forma de la curva de disociación para confirmar que cada producto de amplificación correspondía a un único fragmento.

Tanto para la evaluación de la cantidad de copias genómicas como para el análisis del nivel de expresión del gen EPSPS, se utilizaron los mismos iniciadores, ya que en su diseño se contempló que los mismos hibriden dentro de un mismo exón, por lo que el tamaño de los fragmentos de amplificación a partir de ADN genómico es acorde a los tamaños requeridos para la utilización de qPCR (Tabla 3. 2).

Tabla 3. 2. Genes y los correspondientes iniciadores utilizados para la cuantificación de l gen de la EPSPS

	Función celular	N° ID	Primers (F/R) (5"-3")	Longitud del fragmento
PP2A	Serine/threonine-Protein Phosphatase	XM_002453490	AACCCGCAAAACCCCAGACTA TACAGGTCGGGCTCATGGAAC	138
EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	Sobic.010G023800	CATGGACCGAGACTAGCGTAACTG AGTCATGGCAACATCAGGCATT	113

Análisis de datos de la expresión diferencial del gen de la EPSPS

Se realizó utilizando los genes PP2A y ARI8 como genes de referencia. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa *LinRegPCR*, (Ruijter *et al.*, 2009). El análisis del número de copias y de la expresión de la EPSPS se realizó según Pfaffl 2001:

$$R = \text{Eff}_{\text{EPSPS}}^{(Cq\ S - Cq\ T)} / \text{Eff}_{\text{REF}}^{(Cq\ S - Cq\ T)}$$

Siendo, R: Ratio, Eff: la eficiencia de cada gen, REF: gen de referencia, Cq: se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo (*background*), S: susceptible y T: tratamiento.

El calculo para el número de copias del gen de la EPSPS se realizó relativizándolo usado el gen de referencia con respecto al biotipo susceptible.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa fgStatistics, este programa permite realizar un análisis de la varianza para cada una de las comparaciones y estimar los p-valores correspondientes (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Los datos presentados en este capítulo son en función del análisis realizado con el gen de referencia PP2A.

Resultados

Análisis de las secuencias

Las regiones de 300 pb conteniendo las mutaciones reportadas para el gen de la enzima EPSPS, que confieren resistencia a glifosato, fueron amplificadas por PCR y secuenciadas. Las secuencias obtenidas a partir de ADN genómico mostraban patrones de picos superpuestos en el electroferograma lo que correspondería a varias secuencias, lo cual es esperable teniendo en cuenta que *S. halepense* es un tetraploide (Figura 3. 2. a). Por lo tanto, los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T y se secuenciaron a partir del mismo con dos fines: mejorar la calidad de las secuencias e identificar posibles polimorfismos entre los genomas que dan origen al tetraploide (Figura 3. 2. b). Posteriormente los fragmentos fueron amplificados a partir de ADNc, en este caso no se observó superposición de picos en el electroferograma (Figura 3. 2. c)

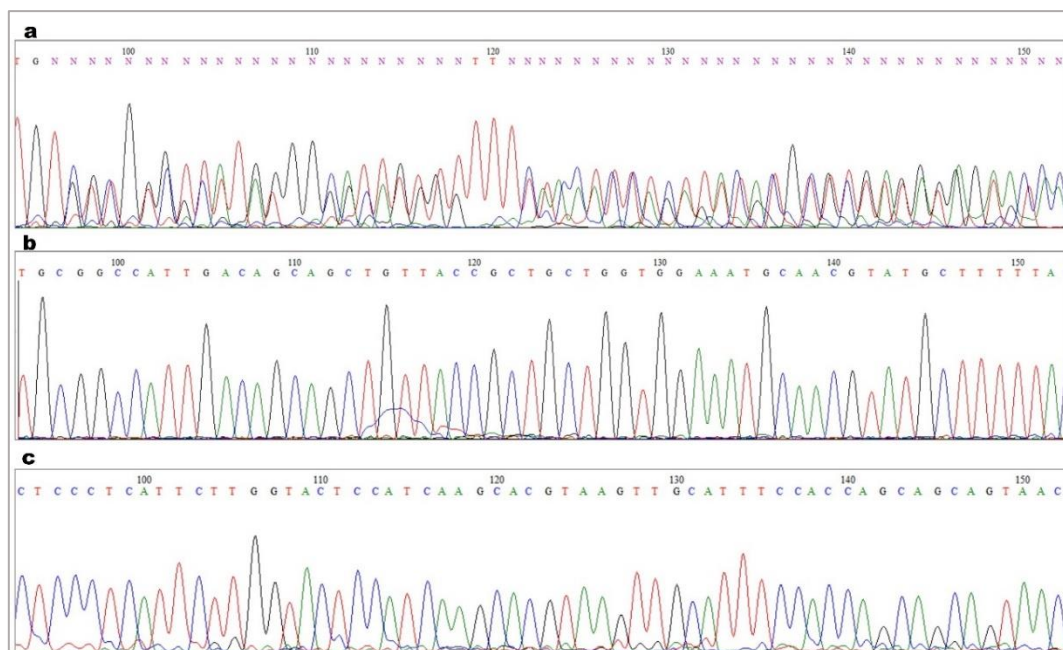


Figura 3. 2. Electroferogramas resultados de la secuenciación en ABI prism 3100.

(a) electroferograma del producto de PCR de la EPSPS biotipo CO03. (b) electroferograma de un único producto de PCR clonado en el vector pGEM-T biotipo CO03. (c) electroferograma del producto de PCR obtenido a partir de ADNc biotipo HASI

Los fragmentos amplificados y clonados conteniendo el sitio Pro-106 de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa de los diferentes biotipos susceptibles y resistentes no mostraron mutaciones en el sitio 106 así como tampoco en el sitio 102 ni en el sitio 103. Los biotipos analizados a partir de ADNc tampoco mostraron mutaciones en su secuencia (Figura 3. 3 a Figura 3. 10)

En la Figura 3. 10 se muestran los alineamientos de las secuencias de todos los biotipos analizados y la secuencia correspondiente de la EPSPS del *S. bicolor* (XM_002436379.2 PREDICTED: Sorghum bicolor 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase 2 (LOC8068394) mRNA) y *S. halepense* (MK492471.1 Sorghum halepense 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (epsps) mRNA, complete cds)

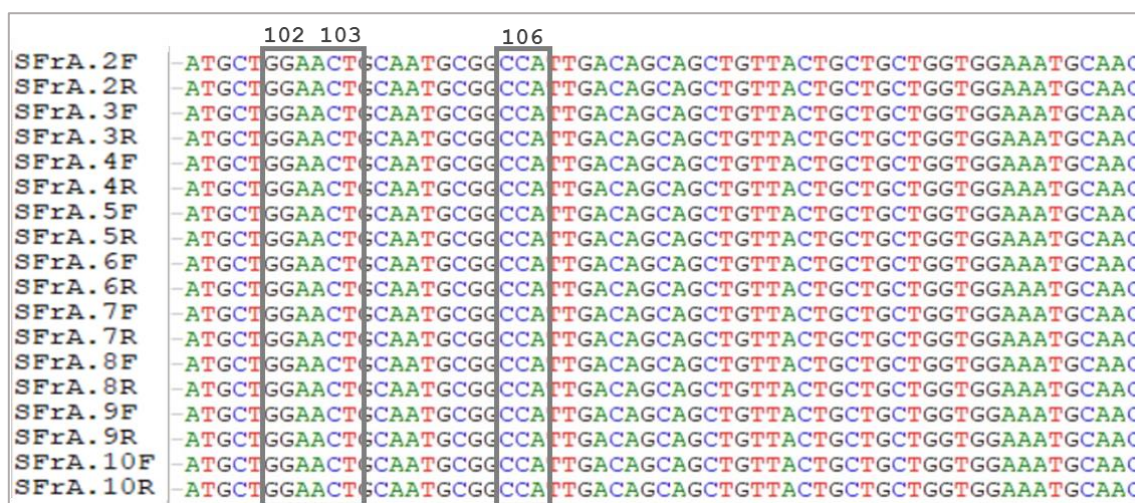


Figura 3. 3. Secuencias del biotipo SFrA.

Sequence	102	103	106
SFsB.1F	A	T	C
SFsB.1R	A	T	C
SFsB.2F	A	T	C
SFsB.2R	A	T	C
SFsB.3F	A	T	C
SFsB.3R	A	T	C
SFsB.5F	A	T	C
SFsB.5R	A	T	C
SFsB.7F	A	T	C
SFsB.7R	A	T	C
SFsB.8F	A	T	C
SFsB.8R	A	T	C
SFsB.9F	A	T	C
SFsB.10F	A	T	C
SFsB.10R	A	T	C

Sequence	102	103	106
CoR03.1	A	T	G
CoR03.3	A	T	G
CoR03.4	A	T	G
CoR03.5	A	T	G
CoR03.6	A	T	G
CoR03.7	A	T	G
CoR03.8	A	T	G
CoR03.9	A	T	G
CoR03.10	A	T	G
CoR05.1	A	T	G
CoR05.2	A	T	G
CoR05.3	A	T	G
CoR05.4	A	T	G
CoR05.6	A	T	G
CoR05.7	A	T	G
CoR05.8	A	T	G
CoR05.9	A	T	G
CoR05.10	A	T	G

	102	103	106	
COs06.2F	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACCGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.2R	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACCGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.3F	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.3R	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.4F	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.4R	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.5F	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.5R	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.6F	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.6R	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.7F	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.7R	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.9F	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COs06.9R	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC

Figura 3. 7. Secuencias del biotipo COs06.

	102	103	106	
COr07.1	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr07.2	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr07.3	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr07.4	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr07.5	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr07.6	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr07.7	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr07.8	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr07.9	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr07.10	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.1	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.2	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.3	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.4	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.5	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.6	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.7	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.8	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.9	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
COr08.10	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC

Figura 3. 8. Secuencias de los biotipos COr07 y COr08.

	102	103	106	
S. bicolor	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
FCA	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGGTGGTGGAAATGCAAC
HasI	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
HasII	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
Her5	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
Her3	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
Ost	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
Pav	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC
Sor	-ATGCTGGA	ACTGCA	ATGCGCC	ATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC

Figura 3. 9. Secuencias de los biotipos analizados a partir de ADNc.

		102	103		106	
SFrA	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
SFsB	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
COor03	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
COor04	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
COor05	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
COs06	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
COor07	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
COor08	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
<i>S. bicolor</i>	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
FCA	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
HasI	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
HasII	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
Her5	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
Her3	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
Pav	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
Ost	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
Sor	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	
<i>S. halepense</i>	-	ATGCTG	GAACTG	CAATGCGG	CCATTGACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAAC	

Figura 3. 10. Secuencias de todos los biotipos analizados y secuencia de la EPSPS del *S. bicolor* y *S. halepense*.

Especificidad y calibración de los iniciadores

La especificidad de los pares de iniciadores fue confirmada por PCR y por la electroforesis en gel de agarosa (Figura 3. 11). También se evaluó especificidad a través de PCR en tiempo real mediante la presencia de un solo pico en la curva de disociación (Figura 3. 12. a). La eficiencia de los iniciadores se evaluó mediante la realización de la curva estándar (Figura 3. 12. b) y mediante el análisis de las curvas de amplificación de las diluciones seriadas se observó una diferencia de aproximadamente 3 Cq entre cada punto de dilución (como es de esperar cuando se utiliza una dilución de factor 10) (Figura 3. 12. c).

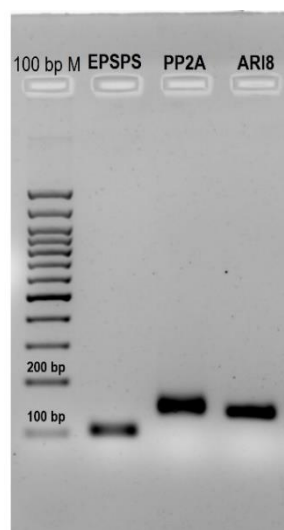


Figura 3. 11. Gel agarosa 2% teñido con bromuro de etidio genes utilizados para el análisis

Respecto a la eficiencia de la amplificación, la misma fue del 100 % para EPSPS, con un coeficiente de regresión para la curva estándar de 0,979 (Tabla 3. 3)

Tabla 3. 3. Información de los iniciadores y detalles de amplificación.

EFF: Eficiencia porcentual; E (Eficiencia)= $10^{-1/\text{pendiente}}$

Gen	Longitud del fragmento	Parámetros de curva estándar			
		Pendiente	R ²	Eff%	E
PP2A	138	-3,188	0,998	105,919	2,059
EPSPS	113	-3,309	0,979	100,538	2,005

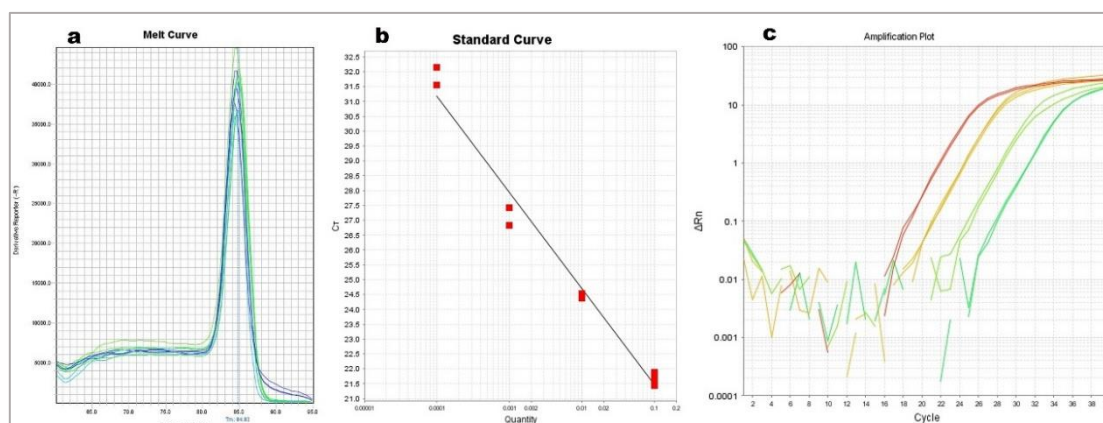


Figura 3. 12. Puesta a punto de la reacción de PCR para el gen de la EPSPS.

- (a) curva de disociación Eje X: Temperatura, Eje Y: dF. (b) curva de calibración Eje X: cantidad (1; 0,1; 0,01 y 0,001), Eje Y: ciclos. (c) curvas de amplificación de las diluciones seriadas para la calibración Eje X: Temperatura, Eje Y: dF.

Cuantificación del número de copias genómicas por qPCR

La tasa de cambio para el número de copias del gen de la EPSPS fue variable entre los distintos 8 biotipos analizados (Figura 3. 13). El rango de número de copias fue desde 12,84 (FCA) hasta 134 para SOR. El valor de la tasa de cambio de HASI fue similar que el susceptible FCA. Los biotipos de HASII, HER3 y HER5 tuvieron valores de 27,36; 32,88 y 29,06 respectivamente. Se observó un valor alto de tasa de cambio para los biotipos OST (134,98), PAV (74,69) y SOR (93,57) con respecto al susceptible FCA (12,84).

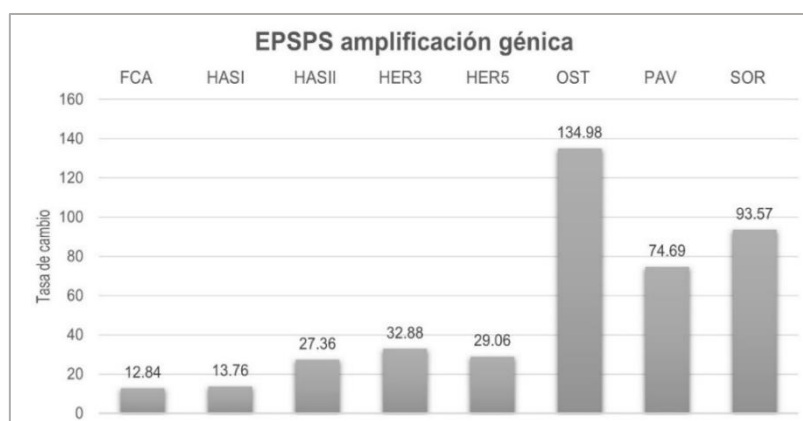


Figura 3. 13. Cuantificación del número de copias genómicas de la EPSPS

Expresada como la tasa de cambio. Susceptible: FCA, Reistentes: HASI, HASII, HER3, HER5, OST, PAV Y SOR.

$$\text{Tasa de cambio} = R = \frac{\text{Eff}_{\text{EPSPS}} (Cq_S - Cq_T)}{\text{Eff}_{\text{REF}} (Cq_S - Cq_T)}$$

Análisis de la expresión de la EPSPS

Se analizaron los niveles de expresión de la EPSPS de los diferentes 8 biotipos previo a la aplicación y a las 24 hs y 72 hs post aplicación. Los niveles de expresión en general se elevaron a las 24 hs respecto a t0 (excepto en el caso de HER5), también fueron levemente mayores al valor de FCA t24 y t72 (susceptible), en cambio a las 72hs los niveles de expresión fueron más bajos que a las 24 hs en los distintos biotipos resistentes.

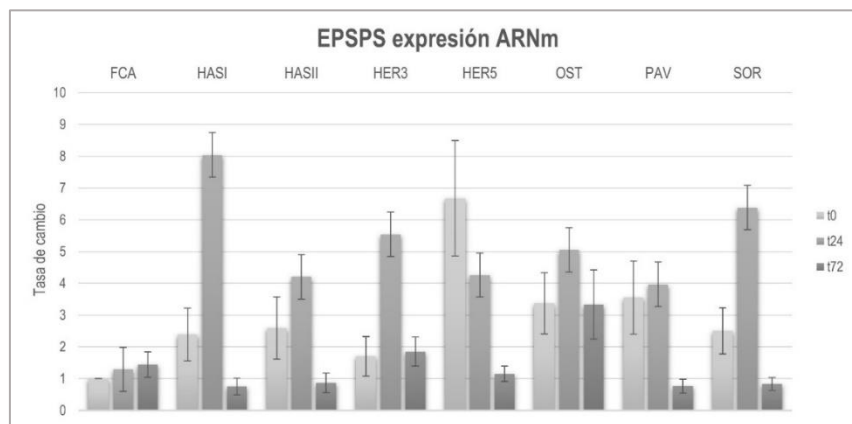


Figura 3. 14. Cuantificación del nivel de expresión de la EPSPS.
Susceptible: FCA, Resistentes: HASI, HASII, HER3, HER5, OST, PAV Y SOR.
Tasa de cambio= $R = \frac{\text{Eff}_{EPSPS} (Cq\ S - Cq\ T)}{\text{Eff}_{REF} (Cq\ S - Cq\ T)}$.

El biotipo HASI fue el que mayor expresión mostro con un valor de 8 a las 24 HPA; luego le siguen SOR (6,38), HER3 (5,54), OST (5,05), HASII (4,2), y PAV (3,97). Respecto a los niveles de expresión a las 72 HPA, solo para el biotipo de HER3 (1,85) mostró un nivel de expresión mayor que el susceptible a ese mismo tiempo (Figura 3. 14). No se observa una correlación positiva entre el número de copias genómico y el nivel de expresión (Figura 3. 15)

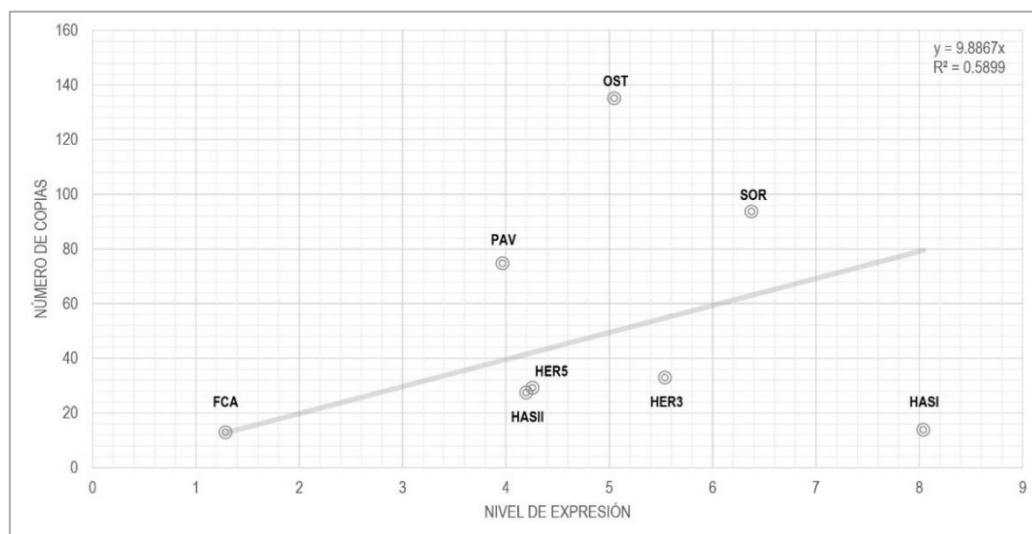


Figura 3. 15. Correlación entre el número de copias genómica y el nivel de expresión de la EPSPS a 24 HPA relativo a PP2A.

Discusión

La clasificación de los mecanismos de resistencia asociados al sitio blanco abarca tanto modificaciones estructurales de la proteína EPSPS, que pueden afectar la estabilidad de la unión del herbicida a la proteína resultando en una reducción de la sensibilidad al mismo, como también mecanismos que aumentan la síntesis de la proteína, ya sea por una amplificación de la copias en el genoma y/o una elevada expresión de ARNm, lo cual actuaría compensando la inhibición del herbicida (Délye *et al.*, 2013). En la actualidad se han reportado 28 casos de resistencia conferida por sustitución aminoacídica que inhibe la EPSPS. El primer reporte fue realizado en 2002 en *E. indica* y desde ese momento se fueron reportando diferentes mutaciones en los sitios 106, 103 y 102 (Gaines & Heap, 2022);

Los casos que involucran este tipo de mecanismo se han reportado tanto en monocotiledóneas: *Eleucina indica* (Thr 102 Ile), *E. indica* (Pro106 Ser), *E. indica* (Pro106 Thr), *Lolium rigidum* (Pro 106 Thr), *L. perenne* spp. *multiflorum* (Pro 106 Ser), *L. rigidum* (Pro 106 Ala), *L. perenne* spp. *multiflorum* (Pro 106 Ala), *L. rigidum* (Pro 106 Ser), *L. rigidum* (Pro 106 Leu), *Digitaria insularis* (Pro 106 Thr), *Echinochloa colona* (Pro 106 Ser), *E. colona* (Pro 106 Thr), *E. colona* (Pro 106 Leu), *E. indica* (Pro 106 Leu), *L. perenne* (Pro 106 Ser) y *Leptochloa virgata* (Pro 106 Ser) (Gaines & Heap, 2022), como en dicotiledóneas: *Bidens pilosa* (Thr 102 Ile), *Tridax procumbens* (Thr 102 Ser), *Bidens subalternans* (Thr 102 Ile), *Amarathus hybridus* (Thr 102 Ile), *A. hybridus* (Ala 103 Val), *Amaranthus tuberculatus* (Pro 106 Ser), *Parthenium hysterophorus* (Pro 106 Ser), *B. pilosa* (Pro 106 Ser), *Conyza canadensis* (Pro 106 Ser), *Amaranthus palmeri* (Pro 106 Ser), *Bidens subalternans* (Pro 106 Thr) y *A. hybridus* (Pro 106 Ser) (Gaines & Heap, 2022) .

En nuestro país, por ejemplo, se reportó resistencia a glifosato en raigrás en la provincia de Entre Ríos en tres poblaciones resistentes cercanas geográficamente. Se observó que mientras en el caso de la población susceptible el codón 106 codifica para una Pro (CCA), una de las poblaciones resistentes era portadora de la mutación Ser (TCG) y las otras dos presentaban la mutación Thr (ACA), siendo estas mutaciones el primer reporte para *L. multiflorum* en Argentina (Muñiz Padilla *et al.*, 2018). También se reportó el caso de resistencia a glifosato mediada por la mutación de la EPSPS en *Digitaria sanguinalis* donde se observó una mutación Pro 106 His (Yannicari *et al.*, 2022),

En el presente estudio, los fragmentos conteniendo el sitio 106 fueron clonados en el vector pGEM-T con la finalidad de tener representadas diferentes copias del gen dado el genoma tetraploide del sorgo de Alepo y así poder verificar si en diferentes complementos genómicos las copias variaban en secuencia para los sitios candidatos analizados. También el clonado facilitó el análisis y la visualización de las secuencias. Luego del análisis de los diferentes clones en los distintos biotipos, no se observaron diferencias en la región conteniendo los sitios reportados que confieren resistencia. Por lo que se puede inferir que no hay polimorfismos para los sitios en estudio entre los complementos del genoma tetraploide del sorgo de Alepo.

Este resultado difiere con lo observado en la maleza tetraploide *E. colona* (Han *et al.*, 2016). En este caso se observó en los electroferogramas que en el sitio 106 los individuos resistentes mostraban un doble pico debido a la presencia simultánea de los dos alelos, el silvestre y el mutado, aunque sin poder establecer si se trata de un “verdadero heterocigota” en uno de los genomas o un heterocigota homoalélico (homocigota resistente dentro un genoma, pero heterocigota a través de los genomas).

El análisis de las secuencias de los biotipos de sorgo de Alepo analizados no reveló variaciones entre susceptibles y resistentes ni respecto a las secuencias de las bases de datos de *S. bicolor* y *S. halepense* (Figura 3. 10). Por lo cual el mecanismo de resistencia en los biotipos estudiados no estaría dado por las mutaciones descritas para la enzima EPSPS.

Existen también otros casos de resistencia a glifosato en la literatura en los que no se encontraron mutaciones en la EPSPS como en los casos de *Kochia scoparia* (Wiersma *et al.*, 2015), *Bromus diandrus* (Malone *et al.*, 2016), *Hordeum glaucum* (Adu-Yeboah *et al.*, 2020), *Ambrosia artemisiifolia* (Ganie *et al.*, 2017), *Ipomoea purpurea* (Van Etten *et al.*, 2020) y *Bromus catharticus* (Yanniccari *et al.*, 2021). En nuestro país, el caso de *L. perenne* (Yanniccari *et al.*, 2017) tampoco presentó mutaciones en el sitio 106 de la EPSPS. En estos casos la resistencia al herbicida está dada por otro tipo de mecanismo.

En el presente trabajo se analizaron tanto el número de copias genómico como el nivel de expresión de la EPSPS. El rango de valores observados para el número de copias fue amplio en los biotipos resistentes, desde 13 a 134 (Figura 3. 13). En otras malezas resistentes a glifosato se ha observado el aumento en el número de copias genómica en la EPSPS, como por ejemplo en *L. perenne* spp. *multiflorum* (Salas *et al.*, 2012). El incremento fue de 10 a 25 y observaron una correlación positiva entre el aumento en el número de copias genómicas con el aumento en la actividad enzimática de la EPSPS y por lo tanto con el nivel de resistencia a glifosato. En *Chloris truncata* (Ngo *et al.*, 2018) el número de copias aumentó entre 16 a 48 veces. En el caso de *Kochia scoparia* (Gaines *et al.*, 2016) el rango promedio del aumento del número de copias fue de 0,7 a 11, y en este caso observaron una relación positiva entre el número de copias y el nivel de resistencia de los individuos testeados.

El nivel de expresión de la EPSPS también fue evaluado a través de qPCR y nos permitió observar el aumento en el nivel de expresión de todos los biotipos resistentes respecto al susceptible a las 24 HPA, así como también un aumento en el nivel de expresión entre previo a la aplicación y las 24 HPA en los biotipos HASI, HER3 y SOR (Figura 3. 14). Altos niveles de expresión de EPSPS también fueron observados en *L. perenne* resistente a glifosato (Yanniccari *et al.*, 2017) y en *C. canadensis* (Tani *et al.*, 2015) se observó un aumento de la expresión superior a dos veces en la población resistente frente a la población susceptible 24 HPA.

En el presente trabajo, el rango de valores para el número de copias genómico fue amplio, y en principio no se correlacionaría con los niveles de expresión cuantificados. Es decir, que no se observa que a medida que

aumenta el número de copias génicas también aumente el nivel de expresión. En particular, el caso de HASI no muestra diferencia en el número de copias genómicas respecto del susceptible. Sin embargo, el nivel de expresión a las 24 HPA es el mayor de todos los biotipos con un valor de tasa de cambio de 8 a las 24 HPA, la más elevada de todos los biotipos resistentes. Esto es comparable a lo que ocurre en *Hordeum glaucum* estudio en el cual los individuos con menor número de copias mostraron mayores niveles de expresión de EPSPS en las dos poblaciones resistentes estudiadas (Adu-Yeboah *et al.*, 2020) y también se observa comportamiento similar en *Bromus diandrus* donde individuos con menor número de copias genómicas mostraron mayores niveles de expresión de la EPSPS que aquellos individuos con mayor número de copias, y de forma contraria otro individuo mostró mayores niveles de expresión de EPSPS a pesar de tener menor número de copias. En ese sentido, los autores sugieren que no todas las copias de EPSPS estarían siendo expresadas (Malone *et al.*, 2016), debido a que la regulación de los procesos de transcripción, traducción y postraducción poseen un rol importante en la expresión génica y la posterior síntesis enzimática. Este fue el caso observado en *L. perenne ssp. multiflorum* (Salas *et al.*, 2015) donde individuos con similares números de copias no mostraban el mismo nivel de resistencia al herbicida demostrando el hecho de que no todas las copias génicas cuantificadas llegan a ser expresadas o que hay otros mecanismos involucrados en el proceso. Por otro lado los biotipos de PAV, OST y SOR muestran un elevado número de copias y también altos niveles de expresión de la EPSPS como en el caso de *Eleusine indica* (Chen *et al.*, 2015) donde hallaron que una de las tres poblaciones resistentes analizadas mostraba un alto número de copias génicas (89,1) y a la vez tenía el mayor nivel de expresión a todos los diferentes tiempos post-aplicación que se analizaron.

La herencia de la amplificación génica de la EPSPS es más compleja que la herencia de las mutaciones simples. En diferentes poblaciones en las cuales se reportó el mecanismo de amplificación génica parece ser diferente. Algunos de los casos analizados muestran: herencia nuclear, herencia poligénica o influenciada por herencia materna. En ese sentido, la heredabilidad y la genética poblacional es mucho más compleja que la de otros mecanismos de resistencia conocidos (Sammons & Gaines, 2014).

Capítulo 4:

Análisis de la expresión de transportadores

Introducción

Los mecanismos de resistencia a herbicidas no asociados al sitio blanco, NTSR (*Non Target Site Resistance*) son complejos y pueden involucrar varias familias de genes, lo que dificulta la identificación de las causas moleculares de la resistencia (Torra *et al.*, 2021).

La multiresistencia a fármacos, MDR (*Multiple Drug Resistance*) es la capacidad de las células a sobrevivir a una variedad de compuestos químicos que tengan una similitud en estructura y función (Conte & Lloyd, 2011). Se debe a la actividad de proteínas transportadoras pertenecientes a distintas familias. Una de las más conocidas es la superfamilia de las *ATP-binding cassette* (ABC) (Conte & Lloyd, 2011). Los procesos de transporte catalizados por estas proteínas están activados por la hidrólisis de la adenosina trifosfato (ATP). Las proteínas ABC pertenecen a una familia evolutivamente antigua que está presente en todos los organismos vivos, siendo las plantas las que contienen más proteínas ABC que el resto de los organismos (Amrhein & Martinoia, 2021).

La mayoría de los genes ABC codifican proteínas de membrana que participan directamente en el transporte de un amplio rango de moléculas y pueden ser categorizados como importadores o exportadores dependiendo de la dirección relativa del transporte hacia y desde el citoplasma. Están involucradas en el transporte de hormonas, lípidos, metales, metabolitos secundarios y xenobióticos como así también contribuyen en las interacciones planta-patógeno y en la modulación de canales iónicos (Do *et al.*, 2021; Verrier *et al.*, 2008).

La estructura de la mayoría de los transportadores ABC se caracteriza por la presencia de dos dominios citosólicos (NBD, *nucleotide binding domain*, por sus siglas en inglés) y dos hidrofóbicos transmembrana (TMD, *transmembrane domain*, por sus siglas en inglés) que constituyen el poro. Los dominios NBD contienen secuencias conservadas involucradas en la unión a ATP que provee la energía para el transporte y TMD es el núcleo de la estructura que reconoce y une los sustratos para facilitar el transporte a través de la membrana (Kang *et al.*, 2011).

La familia de proteínas ABC se divide en subclases desde las ABCA hasta las ABCI; no encontrándose en plantas las ABCH. Los miembros de la subclase ABCC hasta ahora solo se han localizado en la membrana vacuolar y son conocidos por transportar compuestos vegetales derivados y xenobióticos conjugados con glutatión, ácido glucurónico o glucosa. Sustratos adicionales para los ABCC de las plantas son los metabolitos de degradación de clorofila, las fitoquelatinas libres y los complejos fitoquelatina-metaloide y el fitato. Por lo

cual han sido descritas como transportadores involucrados en la detoxificación interna (Amrhein & Martinoia, 2021). En algunos casos, una única proteína media el transporte de muchos sustratos no relacionados químicamente; por lo cual es complicado evaluar la especificidad del rango de sustratos (Do *et al.*, 2021).

La mayoría de las plantas codifican entre 120 y 140 miembros de esta familia, pero en algunas plantas su número puede superar los 200 (Amrhein & Martinoia, 2021). En base a la estructura de sus dominios y la homología filogenética con *Arabidopsis*, las proteínas ABC son clasificadas en 8 subfamilias en concordancia con el sistema de nomenclatura para proteínas ABC animales (Verrier *et al.*, 2008). Las que están unidas a membrana consisten en cuatro subunidades mayores, dos dominios transmembrana (TMD) y dos de unión a nucleótidos (NBD) el cual coopera durante la hidrólisis de ATP para direccionar el transporte activo (J. Kang *et al.*, 2011).

Los transportadores juegan un rol importante en la resistencia a herbicidas. El glifosato es transportado activamente a través del floema. En *L. rigidum*, se postuló que la resistencia se debe a la translocación reducida del mismo (Conte & Lloyd, 2011). El glifosato utiliza los transportadores de los metabolitos de las plantas para moverse dentro de la misma y haciendo esto obstaculiza la función normal de los transportadores. El glifosato se acumula rápidamente en las vacuolas de *C. canadensis* resistentes, mecanismo que también fue sugerido para la resistencia a Paracuat (Conte & Lloyd, 2011).

Se ha estudiado en diversas malezas que la posible fuente de la tolerancia a glifosato sea el aumento de la expresión de diferentes tipos de transportadores del tipo ABC. En *C. canadensis* aumenta la expresión de M10 y M11 (Tani *et al.*, 2015), en *C. sumatrensis* (Schneider *et al.*, 2020) observaron el aumento de la expresión relativa de M11 y M7, en *Lolium spp* (Gerakari *et al.*, 2021) el nivel de transcritos de los transportadores ABC aumentó a tiempos tempranos postaplicación de glifosato.

La reducción de la translocación se ha atribuido a la sobreexpresión de transportadores que secuestran el glifosato dentro de las vacuolas, previniendo así que llegue hasta el cloroplasto (Jugulam & Shyam, 2019).

Se han reportado otra clase de genes dentro de este tipo de mecanismo NTSR, que actúan en la metabolización del herbicida reduciendo el impacto deletéreo del mismo. Este efecto de detoxificación esta generalmente dividido en tres fases. La Fase I involucra la adición de un grupo funcional al herbicida vía oxidación, frecuentemente ejecutado por el citocromo P450. La Fase II involucra cambios más complejos tales como la conjugación mediados por la Glutación S- Transferasa o glucosiltransferasas. El paso final, la fase III, involucra la compartimentalización de los metabolitos del herbicida a la vacuola o la incorporación en la pared celular (Gaines *et al.*, 2020) (Figura I. 18 y Figura I. 20)

En *L. rigidum* la resistencia a herbicidas ALS fue asociada al aumento de la expresión de citocromo P450 (C-P450), como así también en *Alopecurus myosuroides*. La superfamilia de las Glutación S- Transferasas (GST) se ha vinculado con la resistencia a atrazina en *Abutilon theophrasti* y *Amaranthus tuberculatus* (Ghanizadeh & Harrington, 2017) y en *C. canadensis* se estudió un transportador vacuolar, que en *Arabidopsis* fue

identificado como un transportador catiónico de aminoácidos (CAT), localizado primariamente en el tonoplasto volviéndolo un candidato para el secuestro vacuolar (Moretti *et al.*, 2017).

En este capítulo se evaluarán los niveles de expresión del ARNm de genes de detoxificación y genes de transportadores del tipo ABC ante el tratamiento a glifosato en sorgo de Alepo.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se recolectaron a campo muestras de sorgo de Alepo que presentaron resistencia a glifosato, también individuos susceptibles de manera de contar con genotipos resistentes y susceptibles a glifosato.

Luego de trasladar los ejemplares al invernáculo del Instituto de Biotecnología INTA (34°36'18.3" S; 58°40'24.0" O), los rizomas fueron cultivados bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo 16hs/8hs, temperatura 24 °C ± 3 °C y 140 µmol/ m⁻² s⁻¹ intensidad de luz.

Ensayo de aplicación del herbicida

Plantas genéticamente idénticas en igual estadio de crecimiento (3-4 hojas) fueron sometidas a una aplicación con glifosato (Glifosato SL at 48% p/V) a una dosis de 360 g ae ha⁻¹ (Round Up Activo). Se tomaron muestra a tres tiempos: previo a la aplicación (Tiempo 0) y a las 24 y 72 horas post-aplicación.

Tabla 4. 1. Sitios de muestreo y biotipos ensayados

ID		Sitio de recolección	Latitud	Longitud	Fenotipo
FCA	ERs02	Facultad; Entre Ríos	31°49'59"S	60°31' 28"O	susceptible
SOR	ERr03	Soresi; Entre Ríos	31°19'56"S	60°01'16"O	resistente
PAV	ERr04	Pavoti; Entre Ríos	31°18'48"S	59°46'30"O	resistente
OST	ERr10	Ortovsky; Entre Ríos	31°29'04"S	59°34'35"O	resistente
HASI	ERr05	Hasenkamp; Entre Ríos	31°27'20"S	59°52'54"O	resistente
HASII	ERr06	Hasenkamp; Entre Ríos	31°26'15"S	59°53'12"O	resistente
HER3	ERr08	Hernandarias; Entre Ríos	31°16'21"S	59°26'13"O	resistente
HER5	ERr07	Hernandarias; Entre Ríos	31°17'11"S	59°46'42"O	resistente

Se recolectaron muestras de hojas de 8 biotipos: 1 susceptibles y 7 resistentes (Tabla 4. 1). Para cada biotipo se realizaron tres clones por propagación vegetativa de los rizomas (replicas biológicas). Las muestras fueron colectadas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta la extracción de RNA.

Los clones de los biotipos susceptibles fueron usados como control para evaluar la eficacia de la aplicación del herbicida. Todas las réplicas fueron crecidas, aplicadas y muestreadas al mismo tiempo bajo las mismas condiciones.

Extracción de ARN:

La extracción de ARN se realizó mediante el *Kit Purelink RNA mini kit* (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La integridad del ARN fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %. La calidad y la cantidad del ARN se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific). Sólo se utilizaron para la síntesis de ADNc las muestras de ARN con valores de A260/A280 que oscilaron entre 1,80 y 2 y A260/A230 superiores a 2. El ADN genómico se eliminó después de un tratamiento con DNasa I durante 60 minutos a temperatura ambiente utilizando DNasa I (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU). Para cada muestra, se retrotranscribió 1 µg del ARN total utilizando un kit de transcripción M-MLV (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU) y cebadores hexaméricos aleatorios según las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

Selección de genes y diseño de oligonucleótidos

Para este estudio se seleccionaron 11 genes pertenecientes a la familia de los *ATP Binding cassette* y los genes de CAT, GST y P450 (

Tabla 4. 2). Los iniciadores para amplificar los genes de los transportadores M1, M2, M4, M6, M8, M9, M10, M11, P1, P3 y P6 fueron diseñados en base a la secuencia reportada para los iniciadores utilizados para amplificar los genes diferencialmente expresados en *C. canadensis* (Peng *et al* 2010). Para amplificar las secuencias de los genes CAT, GST y C-P450 se relevó en bases de datos las secuencias de estos genes reportadas para *S. bicolor*. En ambos casos las secuencias para diseñar los iniciadores fueron obtenidas por identidad a partir del genoma de *S. bicolor* utilizando la plataforma Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/>) (Goodstein *et al.*, 2012)

Los oligonucleótidos para la qPCR se diseñaron utilizando el programa informático Primer3 en línea (<http://primer3.ut.ee/>) con los siguientes parámetros: 55-65 °C de temperatura de annealing, 18-25 pb de longitud del cebador, 45-55% contenido de GC, 3 GC máx. en el extremo de 3' y 90-150 pb de longitud del fragmento. El resto de los parámetros utilizados se mantuvieron por defecto según lo determinado por el software.

Los iniciadores fueron diseñados en base a la secuencia CDS, y se verificó que el iniciador *forward* y el *reverse* hibridaran dentro del mismo exón (

Tabla 4. 2 y Tabla 4. 3). La especificidad fue corroborada *in silico* utilizando el software Primer BLAST y todos los oligonucleótidos hibridaron sobre la secuencia blanco. La especificidad del iniciador se evaluó mediante la realización de una PCR a tiempo final utilizando el ADNc del sorgo de Alepo como templado. El producto amplificado fue visualizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,1 µg/µl) con TAE 1X. (Figura 4. 3). Los fragmentos obtenidos se secuenciaron para confirmar la identidad en *S. halepense*.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit QIAquick PCR purification (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las purificaciones fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000

(Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático capilar ABI prism 3100 (Applied Biosystems) en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología INTA. Las secuencias fueron revisadas y analizadas con el software Bioedit (Hall, 1999) y posteriormente se realizó un análisis de similitud con las bases de datos de secuencias mediante el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabla 4. 3)

Tabla 4. 2. Genes de 12 transportadores, citocromo P450 y glutatión transferasa seleccionados para evaluar la expresión.

Gen	Función celular	ID Phytozome	Primers (F/R) (5"-3")
M1	<i>S. bicolor</i> ABC transporter C family member 2	Sobic.006G219300	CCACAATCCGTGCCTATAAAGC CACCTATTTGCACTCATGTTACA
M2	<i>S. bicolor</i> ABC transporter C family member 4	Sobic.006G022200	ATTCGTTCTTGCTGCCTGGA GTTTCTGCCCCACCACTGAGA
M4	<i>S. bicolor</i> ABC transporter C family member 15	Sobic.006G054200	GGTCGGCTCTGGAATCC CAGTTTGAGGAACATATGCTTTGC
M6	<i>S. bicolor</i> ABC transporter B family member 8	Sobic.003G281400	TTCCTCTGGTCTGCTTCTCAT GAATTCGCCTTGAGTACTCATG
M8	<i>S. bicolor</i> ABC transporter C family member 8	Sobic.010G169000	GCTCTTCTGGGCACTCAA CTGGTACCCCTGCAGCATTT
M9	<i>S. bicolor</i> ABC transporter C family member 10	Sobic.010G046700	CATGACCTGCGTTACGTTT GATCCGAGAATTGGCCAAGA
M10	<i>S. bicolor</i> ABC transporter C family member 14	Sobic.003G160200	GAGTGTGGACAACGGCAACT CTGGGAATCAACGGAAGCA
M11	<i>S. bicolor</i> ABC transporter C family member 3	Sobic.001G491200	AGCGAGGCATCAACCTTAGTG ATCCGGTATGCGCATCGA
P1	<i>S. bicolor</i> ABC transporter G family member 39	Sobic.005G183900	GATGCTTGTTGGCCAGCTA GTGGACCGACTGCCCTAGAGA
P3	<i>S. bicolor</i> ABC transporter G family member 36	Sobic.003G215800	AGGGAGAGCTATAGCAAATGAGCTT CTCCTTGCCACTCACACCATAC
P6	<i>S. bicolor</i> ABC transporter G family member 42	Sobic.010G165500	CATGGACAGTGTATGGGCTCAT TGTTACGTAGTAGCTAATCGTCTGCTT
C-P450	<i>S. bicolor</i> cytochrome P450 71A1	Sobic.009G196700	GGTGATTTCCTCGGCTTCCA CCGACATCCCTGCAATCGTA
CAT	<i>S. bicolor</i> cationic amino acid vacuolar 2,	Sobic.001G151000	CGGAGGATTACATGCCCTT TGCCAACCCTCATCCATGTG
GST	<i>S. bicolor</i> glutathione S-transferase	Sobic.008G074300	TCTTGCACCCAGATCCATG GGAGCCGCTACTTGAATGC

Calibración de oligonucleótidos y evaluación de la expresión diferencial

Para evaluar la eficiencia de la amplificación de cada gen candidato, a partir del ADNc se realizaron diluciones seriadas para generar curvas estándar de cuatro puntos (1; 1/10; 1/100 y 1/1000). Se incluyó un control negativo en cada amplificación para evaluar posibles contaminaciones.

Los coeficientes de correlación (R^2) y los valores de la pendiente se obtuvieron a partir de las curvas estándar, y las eficiencias de amplificación de la PCR (E) se calculó de acuerdo con $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$. (Tabla 4. 3). Una vez analizadas las eficiencias se realizó el análisis de la expresión diferencial de los genes transportadores candidatos utilizando como genes de referencia a PP2A y ARI8 cuya estabilidad fue evaluada en el capítulo 2.

Las reacciones se realizaron en un volumen total de 20 µl conteniendo 10 ng de ADNc, ROX 1X (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU), SYBR Green 2X (Life Technologies), 0,2 µM de cada iniciador, 2 mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de cada dNTP, buffer de reacción 1X, *Taq Platinum* 1 U (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU) y agua libre de nucleasas.

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, EE. UU.) con las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Luego se verificó la especificidad del amplicón mediante el análisis de la curva de disociación (60 °C a 95°C). El ensayo de qPCR se llevó a cabo utilizando tres réplicas biológicas para cada condición, y dos réplicas técnicas.

Tabla 4. 3. Información de los iniciadores y detalles de calibración.

EFF: Eficiencia porcentual; E (Eficiencia)= $10^{-1/\text{pendiente}}$

Gen	N° ID BLAST	Longitud del fragmento (pb)	Parámetros de curva estándar			
			Pendiente	R ²	Eff%	E= $10^{-1/\text{pend}}$
M1	XM_021462893.1	106	-3.346	0,969	99,02	1,99
M2	XM_002446079.2	100	-3.210	0,965	104,92	2,05
M4	XM_002446272.2	107	-3.457	0,998	91,38	1,95
M6	XM_002458379.2	100	-3.294	0,996	101,17	2,01
M8	XM_002437116.2	103	-3.311	0,995	100,45	2,00
M9	XM_021449003.1	100	-2.920	0,993	119,89	2,20
M10	XM_002457769.2	100	-3.529	0,994	92,00	1,92
M11	XM_021455612.1	123	-3.191	0,994	105,76	2,06
P1	XM_021461777.1	106	-3.256	0,994	102,81	2,03
P3	XM_021457298.1	100	-3.220	0,981	104,46	2,04
P6	XM_021449158.1	104	-3.370	0,995	98,02	1,98
C-P450	XM_002440027.2	117	-3.373	0,995	97,92	1,98
CAT	XM_002464103.2	146	-3.114	0,994	109,46	2,09
GST	XM_021446718.1	120	-3.323	0,991	99,97	2,00

Análisis de datos de la expresión diferencial de los genes transportadores

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa *LinRegPCR*, (Ruijter *et al.*, 2009). El análisis de la expresión de los genes transportadores se realizó según (Pfaffl, 2001):

$$R = \text{Eff}_{\text{EPSPS}} (Cq\ S - Cq\ T) / \text{Eff}_{\text{REF}} (Cq\ S - Cq\ T)$$

Siendo, R: Relación, Eff: la eficiencia de cada gen, REF: gen de referencia, Cq: se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo (*background*), S: susceptible y T: tratamiento.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa *fgStatistics*, este programa permite realizar un análisis de la varianza para cada una de las comparaciones y estimar los p-valores correspondientes (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Los datos presentados en este capítulo son en función del análisis realizado con el gen de referencia PP2A (Tabla Anexo 2). Adicionalmente, en la Tabla Anexo 3 y Figura Anexo 1 se muestran las tablas con los datos correspondientes y los gráficos de los niveles de expresión con el gen ARI8.

Resultados

Respuesta a la Aplicación del herbicida

A los clones de los diferentes biotipos en estudio se le aplicó el herbicida. Luego de los seis días posteriores a la aplicación, se observaron efectos sobre los individuos susceptibles que mostraron amarronamiento de las hojas. Este efecto no se visualizó en los individuos resistentes (Figura 4. 1). A los 10 días post aplicación se observó el efecto sobre los biotipos susceptibles a nivel de la planta completa, mientras que en los resistentes las plantas se conservaban verdes (Figura 4. 2)



Figura 4. 1. Imágenes de una hoja de un biotipo susceptible y uno resistente a 6 días post aplicación

Diseño de oligonucleótidos y calibración

Se realizó la búsqueda bibliográfica de 14 genes candidatos a conferir resistencia a glifosato por el mecanismo NTSR y luego por identidad con las secuencias del genoma de referencia de *S. bicolor* en *Phytozome* (Goodstein *et al.*, 2012). Se diseñaron 14 oligonucleótidos y se verificó *in silico* que los mismos hibridaran en las secuencias de interés utilizando la herramienta primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Además, se secuenciaron los fragmentos de amplificación y se realizó una búsqueda en las bases de datos de secuencias con la herramienta BLAST para confirmar su identidad. Tanto la verificación de los oligonucleótidos previo a la síntesis como la verificación de los fragmentos obtenidos a partir de la PCR fue acorde a lo esperado de acuerdo con la información de los genes analizados (Tabla 4. 2).



Figura 4. 2. Plantas de los biotipos susceptibles y resistentes 10 días post aplicación.
S: susceptibles; R: resistentes

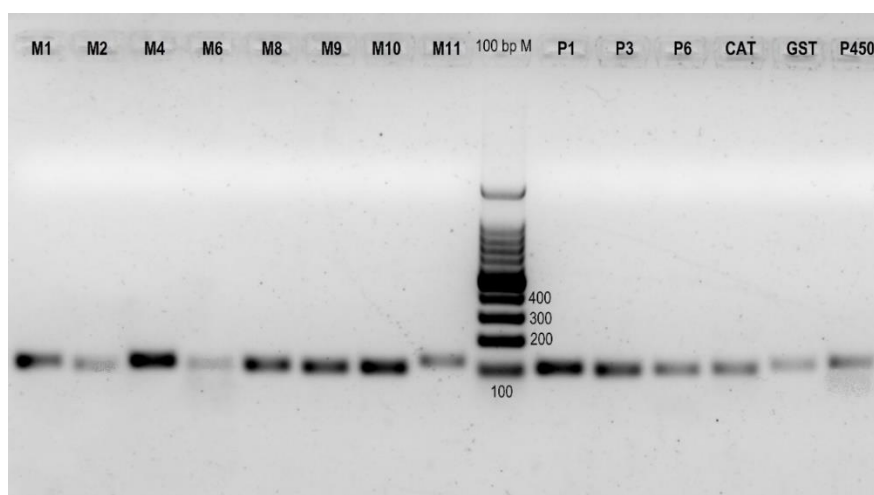


Figura 4. 3. Gel agarosa 2% teñido con bromuro de etidio de los 14 genes candidatos analizar

100 bp M: marcador de peso molecular 100 bp. Genes; C-P450: *S. bicolor* cytochrome P450 71A1; CAT: *S. bicolor* cationic amino acid vacuolar transporter 2, GST: *S. bicolor* glutathione S-transferase, M1: *S. bicolor* ABC transporter C family member 2, M2: *S. bicolor* ABC transporter C family member 4, M4: *S. bicolor* putative ABC transporter C family member 15, M6: *S. bicolor* putative ABC transporter B family member 8, M8: *S. bicolor* ABC transporter C family member 8, M9: *S. bicolor* ABC transporter C family member 10, M10: *S. bicolor* ABC transporter C family member 14, M11 *S. bicolor* ABC transporter C family member 3, P1: *S. bicolor* ABC transporter G family member 39, P3: *S. bicolor* ABC transporter G family member 36 y P6: *S. bicolor* ABC transporter G family member 42

En ese sentido, los productos de PCR obtenidos fueron fragmentos únicos que se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 4. 3), confirmado también mediante el análisis de las curvas de disociación de la qPCR en las que se observan picos únicos (Figura 4. 4). Las curvas de calibración fueron lineales (Figura 4. 5) y las eficiencias variaron entre 1,92 (M10) y 2,2 (M9).

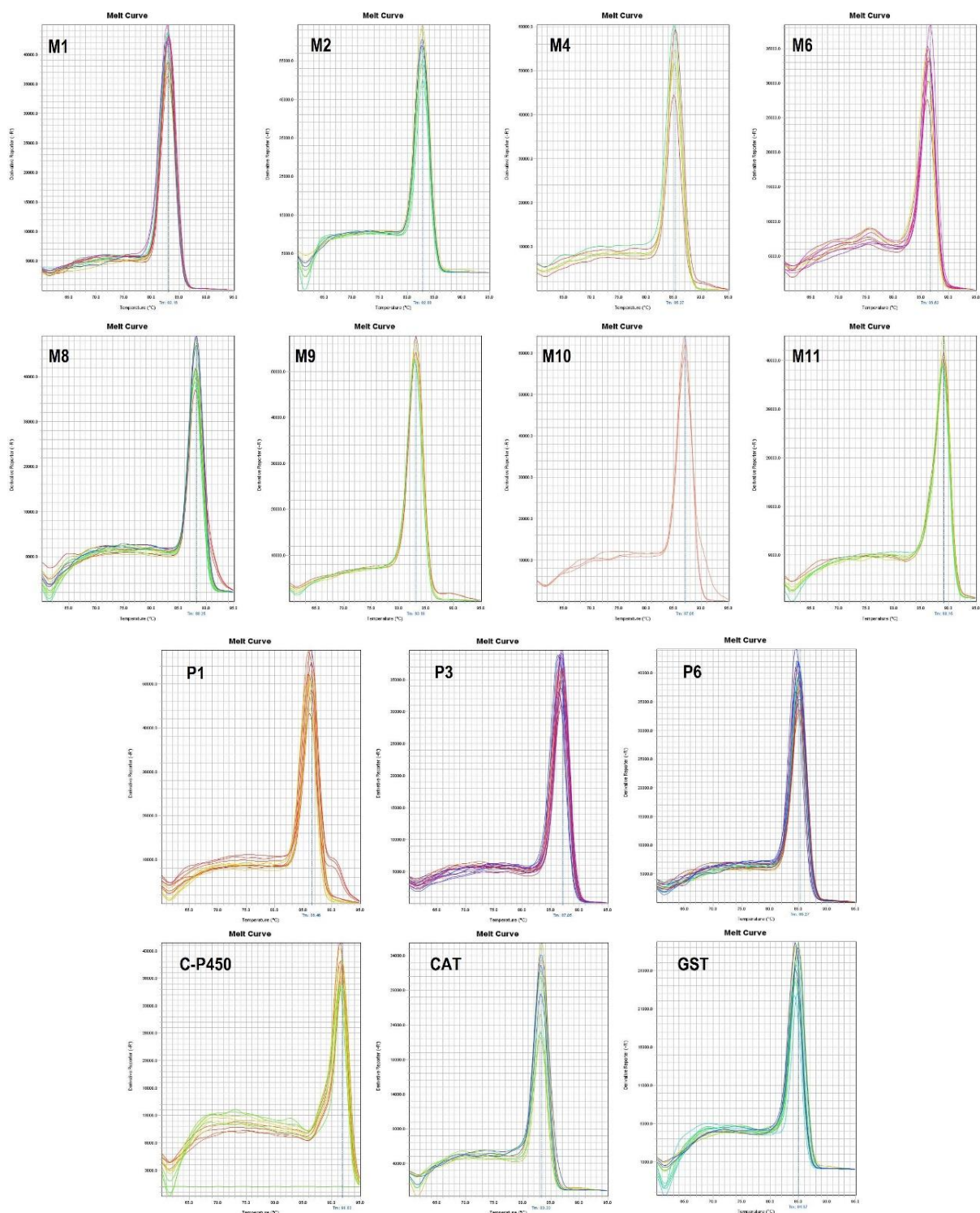


Figura 4. 4. Curvas de disociación de los genes de transportadores a evaluar

Genes; M1: *S. bicolor* ABC transporter C family member 2, M2: *S. bicolor* ABC transporter C family member 4, M4: *S. bicolor* putative ABC transporter C family member 15, M6: *S. bicolor* putative ABC transporter B family member 8, M8: *S. bicolor* ABC transporter C family member 8, M9: *S. bicolor* ABC transporter C family member 10, M10: *S. bicolor* ABC transporter C family member 14, M11: *S. bicolor* ABC transporter C family member 3, P1: *S. bicolor* ABC transporter G family member 39, P3: *S. bicolor* ABC transporter G family member 36, P6: *S. bicolor* ABC transporter G family member 42, C-P450: *S. bicolor* cytochrome P450 71A1; CAT: *S. bicolor* cationic amino acid vacuolar transporter 2, GST: *S. bicolor* glutathione S-transferase. Curvas de disociación Eje X: Temperatura, Eje Y: dF.

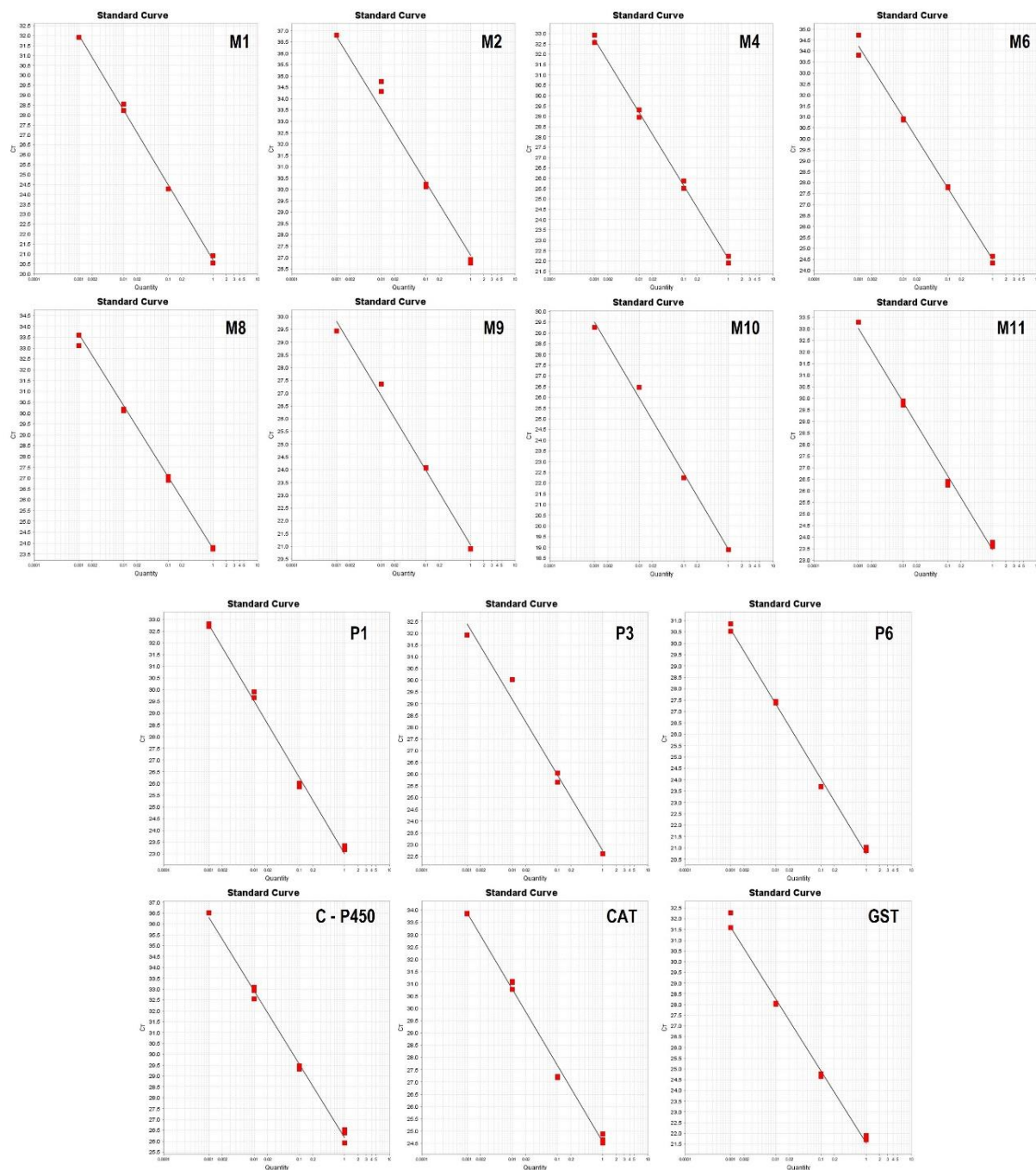


Figura 4. 5. Curvas estándar de los genes transportadores a evaluar

Genes; M1: *S. bicolor* ABC transporter C family member 2, M2: *S. bicolor* ABC transporter C family member 4, M4: *S. bicolor* putative ABC transporter C family member 15, M6: *S. bicolor* putative ABC transporter B family member 8, M8: *S. bicolor* ABC transporter C family member 8, M9: *S. bicolor* ABC transporter C family member 10, M10: *S. bicolor* ABC transporter C family member 14, M11: *S. bicolor* ABC transporter C family member 3, P1: *S. bicolor* ABC transporter G family member 39, P3: *S. bicolor* ABC transporter G family member 36, P6: *S. bicolor* ABC transporter G family member 42, C-P450: *S. bicolor* cytochrome P450 71A1; CAT: *S. bicolor* cationic amino acid vacuolar transporter 2, GST: *S. bicolor* glutathione S-transferase. Curva de calibración Eje X: cantidad (1; 0,1; 0,01 y 0,001), Eje Y: ciclos.

Análisis de expresión diferencial

Los niveles de expresión diferencial de los genes analizados varían entre los biotipos y a los diferentes tiempos (Figura 4. 6 a Figura 4. 9).

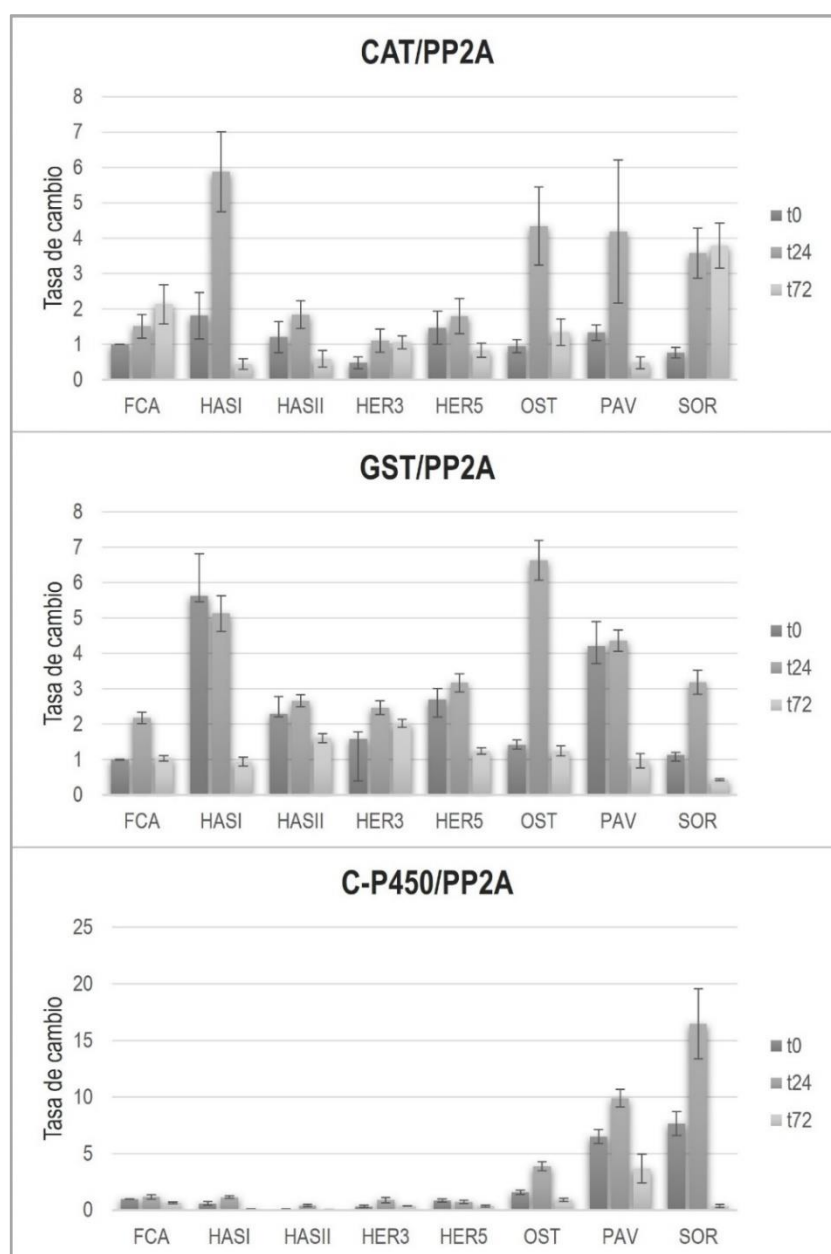


Figura 4. 6. Niveles de expresión de los genes CAT, C-P450 y GST.
Biotipo susceptible: FCA. Biotipos Resistentes: HASI, HASII, HER3, HER5, OST, PAV y SOR

La expresión diferencial del CAT supera el valor de 2 en la tasa de cambio para HASI, OST, PAV y SOR a las 24 HPA siendo ésta al mismo tiempo mayor que el valor de FCA (susceptible) y que el valor previo a la aplicación, en el caso de SOR el aumento se expresión también se observa a las 72 HPA. Para GST se observa un aumento en el nivel de expresión de OST t24 (6,63) siendo este superior que al punto previo de la aplicación y que, del susceptible al mismo tiempo. En el caso de C-P450 los valores de expresión son mayores a dos para OST (3,87), PAV (9,9) y SOR (16,47) a las 24 HPA, siendo mayor que el valor del susceptible y el valor previo a la aplicación; los niveles de expresión descienden a las 72 HPA. (Figura 4. 6)

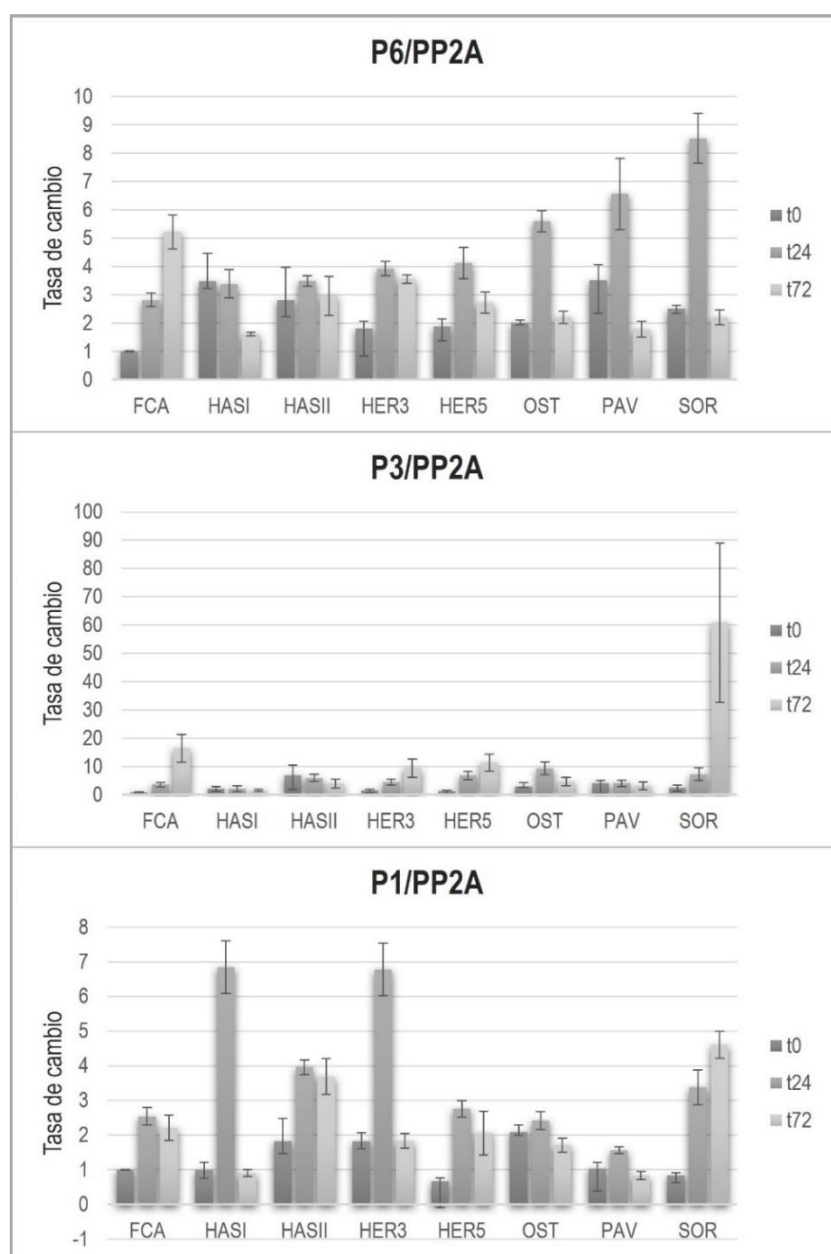


Figura 4. 7. Niveles de expresión de los genes P6, P3 y P2.
Biotipo susceptible: FCA. Biotipos Resistentes: HASI, HASII, HER3, HER5, OST, PAV y SOR

En el caso de los transportadores P (Figura 4. 7), para P6 observamos que los valores de expresión para FCA a las 24 y 72 HPA fueron de 2,82 y 5,22 respectivamente. Los biotipos que tuvieron nivel de expresión mayor que el susceptible a las 24 HPA fueron OST (5,6), PAV (6,57) y SOR (8,53) mientras que los biotipos HASI, HASII, HER3 y HER5 mostraron valores levemente mayores al susceptible. Todos los niveles de expresión bajaron a las 72 HPA excepto para FCA. Para el gen P3, los biotipos HASII, HER3, HER5 y OST a 24 HPA superan el valor del susceptible (3,63) y el valor previo a la aplicación. A las 72 HPA el nivel de expresión de FCA es de 16,42 y sólo es superado por el biotipo resistente SOR (60,79). Por último, para el caso de P1,

solamente superan el nivel de expresión de FCA (2,54), HASI, HASII, HER3 y SOR (6,85; 3,69; 6,78 y 3,38 respectivamente), así como también se observa una tasa de cambio mayor a 2 respecto a la expresión al tiempo 0.

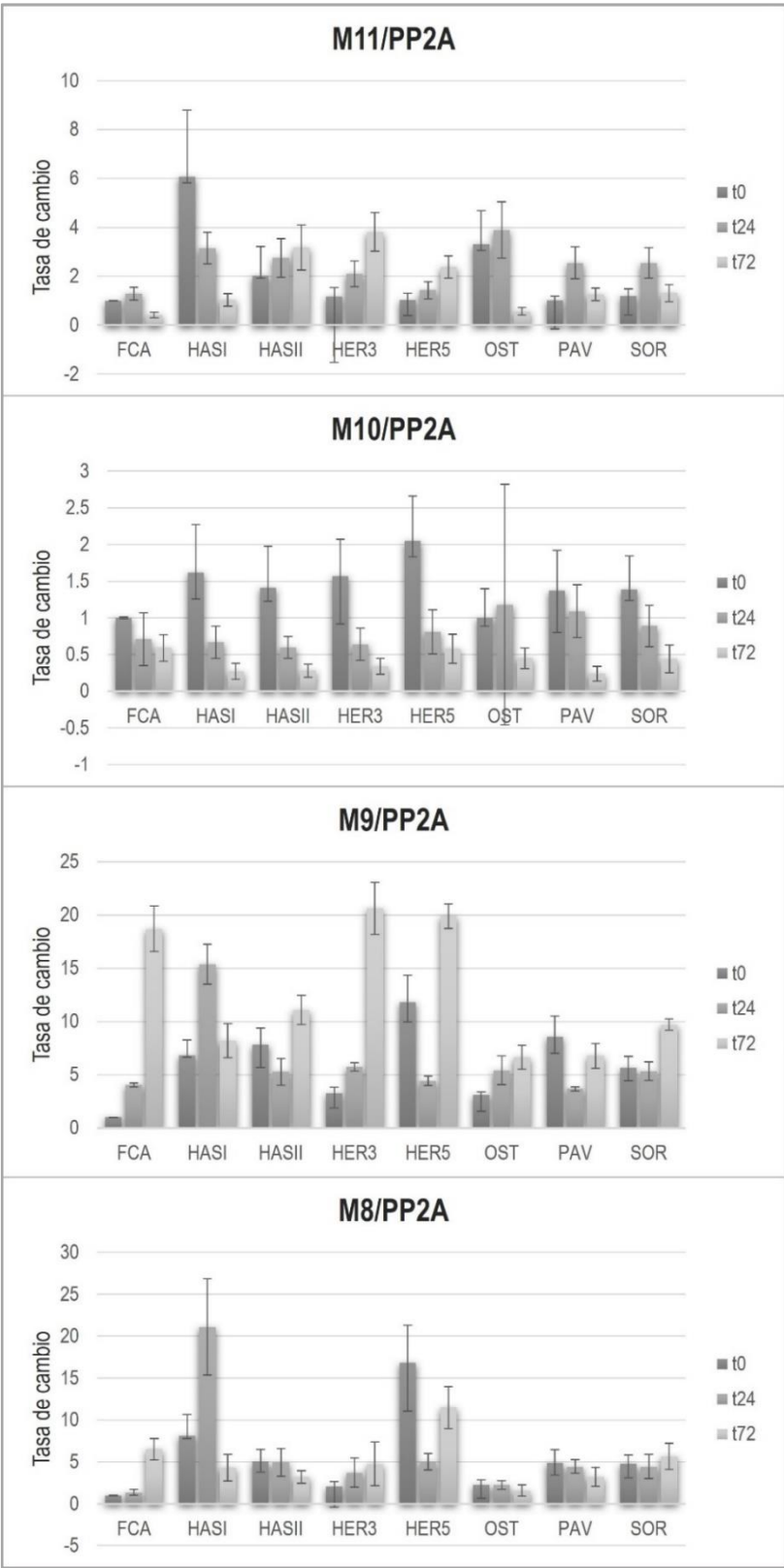


Figura 4. 8. Niveles de expresión de los genes M11, M10, M9 y M8.
Biotipo susceptible: FCA. Biotipos Resistentes: HASI, HASII, HER3, HER5, OST, PAV y SOR

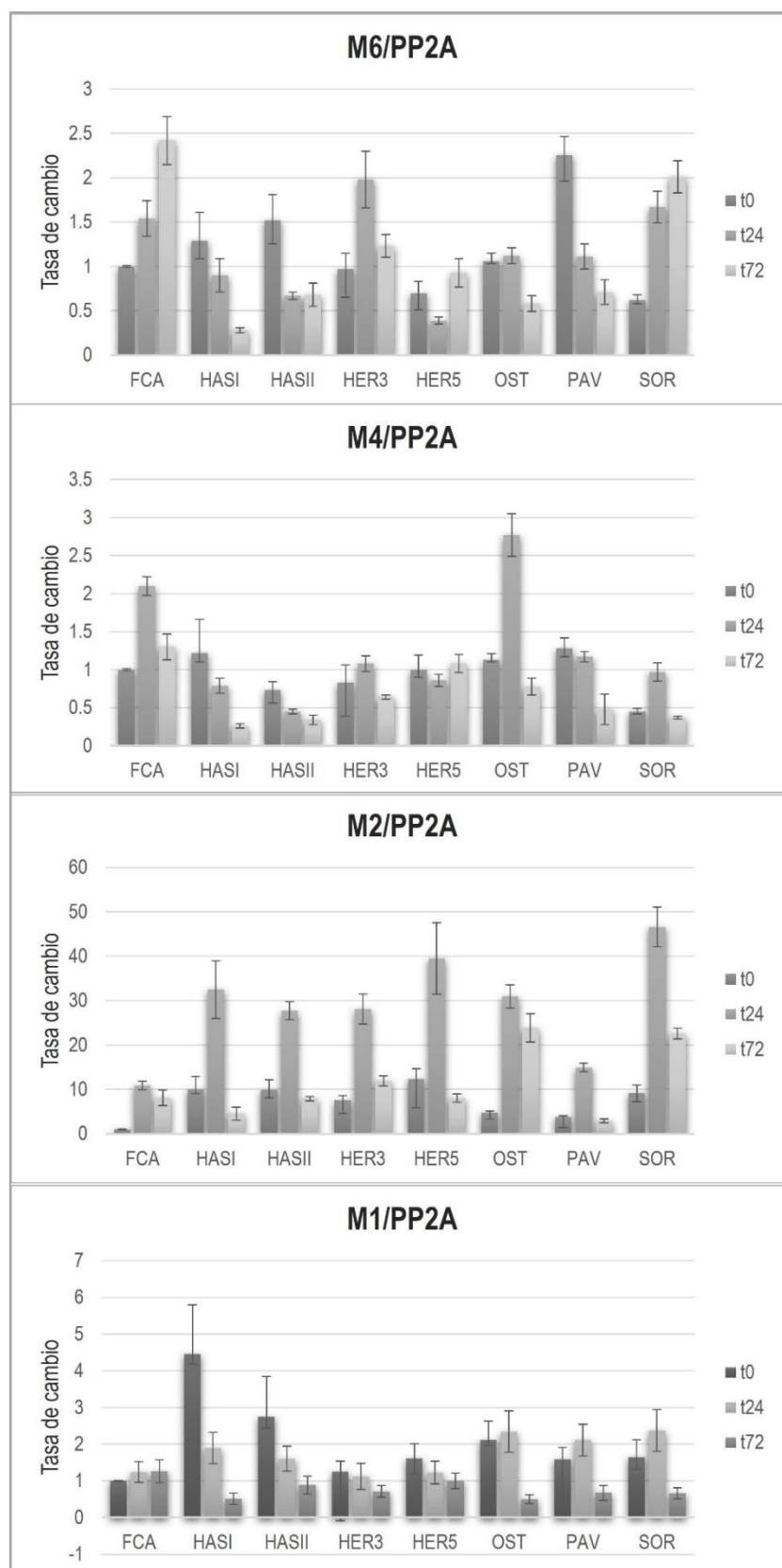


Figura 4. 9. Niveles de expresión de los genes M6, M4, M2 y M1.
Biotipo susceptible: FCA. Biotipos Resistentes: HASI, HASII, HER3, HER5, OST, PAV y SOR

En los genes M (Figura 4. 8 y Figura 4. 9) se observó variabilidad en los niveles de expresión. Para M11, HASII, HER3, OST, PAV y SOR tienen un nivel de expresión levemente mayor a FCA (1,29) y al tiempo 0 hs. Para M10 los niveles de expresión para el tiempo previo a la aplicación fue mayor en todos los biotipos. En el caso de M9 se observa variabilidad en los niveles de expresión a las 24 HPA. Respecto al gen M8 HASI presento una tasa de cambio de 21 a las 24 HPA (Figura 4. 8). En el caso de los genes M6 y M4 no se observaron diferencias en los niveles de expresión respecto al susceptible, ni respecto al tiempo 0 (Figura 4. 9). Para M2, aunque el nivel de expresión a las 24 HPA en FCA (10,87) es elevado, la expresión de todos los biotipos resistentes fue mayor HASI (32,9), HASII (27,72), HER3 (28,12), HER5 (39,51), OST (30,97), PAV (14,96) y SOR (46,62). En M1 los biotipos que tuvieron una expresión levemente mayor que FCA y que el tiempo 0 fueron OST, PAV y SOR.

Discusión

Los transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC son una superfamilia de proteínas grande y diversa, formada principalmente por proteínas ancladas a membrana, ubicuas en todos los organismos. En plantas el número de transportadores ABC puede llegar al ser el doble que en otros organismos. Se supone que esto puede deberse a la naturaleza sésil de las plantas y de su metabolismo y fotosíntesis, por lo que las plantas necesitan detoxificar tanto xenobióticos del ambiente como metabolitos tóxicos endógenos, y estas proteínas juegan un rol importante en la protección contra estreses bióticos y abióticos (Yazaki *et al.*, 2009).

Olawuyi y Ologidi (2018) realizaron la identificación y clasificación de los transportadores ABC en *S. bicolor*, agrupando a los miembros en 6 subfamilias (ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF y ABCI) en función de las características de sus dominios proteicos. La subfamilia ABCB tiene 33 miembros (también conocidas como MDR *multidrug resistance*) y es mayor que el número hallado en *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Vitis vinifera* los cuales tienen 21, 24, y 19 respectivamente. El número de proteínas ABCC y ABCI identificadas en *S. bicolor* fue de 26 para cada subfamilia, igual que en *V. vinifera* para las ABCC. Por otro lado, para ABCI el número identificado es mayor que para *A. thaliana*, de los cuales 23 tienen un dominio de unión a nucleótido. El número de ABCD fue de tres, igual que en *O. sativa*. Los miembros de la subfamilia ABCE y ABCF son proteínas solubles ya que carecen de dominio transmembrana y se identificaron cuatro miembros para la subfamilia E y uno para la F (Olawuyi & Ologidi, 2018).

La vacuola vegetal es la organela más importante en términos de detoxificación de xenobióticos, como por ejemplo los herbicidas, este proceso en general procede en tres pasos: modificación, conjugación y compartimentalización (Gaines *et al.*, 2020).

Los genes de las subfamilias ABCG y ABCB han sido reportados para la detoxificación vegetal y resistencia a pesticidas, en plantas estas subfamilias de transportadores están particularmente más desarrolladas (Hwang *et al.*, 2016).

La sobreexpresión de AtABCG19 en el híbrido *Populus canescens* × *P. grandidentata* confiere resistencia a kanamicina, neomicina, geneticina (G418) y paromomicina. Este transportador se lo localizó en la vacuola de tabaco, por lo tanto puede actuar secuestrando estos antibióticos del citoplasma transportándolos a través de la membrana del tonoplasto (Conte & Lloyd, 2011). Las proteínas ABCE y ABCF sólo están formadas por dominios NBD y, dependiendo de sus proteínas asociadas, desempeñan diferentes funciones como la regulación de la síntesis y estabilización de proteínas (Do *et al.*, 2021).

Las proteínas ABCI están involucradas en el transporte de moléculas lipídicas o iones metálicos al cloroplasto (Do *et al.*, 2021).

Los genes ABCG muestran variabilidad en cuanto a los órganos y el nivel de expresión en respuesta tanto a factores bióticos como abióticos, algunos de los cuales se expresan en tejidos específicos mientras que solo unos pocos se encuentran en todos los tejidos. Por ejemplo, AtPDR2, AtPDR6, AtPDR9, AtPDR13 se expresan exclusivamente en raíces, mientras que PgPDR1 lo hace en raíces, tallos, hojas y semillas. Por otro lado, se demostró que AtPDR9/AtABCG37 expulsa al 2,4 -D de las células de las raíces sin afectar el transporte de las auxinas endógenas, confiriendo así la resistencia a este herbicida, pero sin alterar la sensibilidad a IAA (ácido indol acético) endógena. AtABCG32/PEC otro transportador en *A. thaliana*, participa en la formación de la cutícula; los sustratos exportados por este transportador desde las células epidérmicas son los monómeros de cutina (Nuruzzaman *et al.*, 2014).

La subfamilia ABCC es capaz de transportar ácidos orgánicos solos o conjugados con glutatión o glucosa desde el citoplasma a la vacuola (Pan *et al.*, 2021). Se han caracterizado varias de estas proteínas localizadas en el tonoplasto como por ejemplo: AtABCC1–5 capaces de transportar conjugados de glutatión, AtABCC1 y 2 posiblemente responsables de la deposición de xenobióticos (Yazaki *et al.*, 2009). Otros estudios han observado que el glifosato migra (65-85 %) a la vacuola de plantas resistentes durante 24 horas de monitoreo, mientras está ausente en las vacuolas de plantas susceptibles en ese mismo tiempo; también observaron que luego que el glifosato atraviesa el tonoplasto queda atrapado, lo cual sugiere que hay un transportador en el tonoplasto para glifosato (Ge *et al.*, 2010). Peng y colaboradores (2010) hallaron en *C. canadensis* resistente a glifosato sobreexpresados transportadores ABC, glutatión S transferasas (GST), glicosiltransferasas y citocromos P450.

El análisis de los niveles de expresión de los transportadores ABC se ha utilizado en diferentes malezas como medio para evaluar si estos están involucrados en la resistencia a herbicidas, como por ejemplo: en *C. sumatrensis* se analizaron M11 y M7 (ambos pertenecientes a la familia ABCC) (Schneider *et al.*, 2020), en *Lolium spp* se analizaron *LpABCIII*, *Lpmultidrugprotein*, *LpM10* y *LpironinhibitedABC* (Gerakari *et al.*, 2021),

en *C. canadensis* realizaron un estudio transcriptómico y utilizaron la información obtenida para explorar el comportamiento de los transportadores ABC M1 a M11 y P1 a P6 (Peng *et al.*, 2010; Tani *et al.*, 2015), en *E. colona* analizaron la expresión de *EcABCC8* y además transformaron arroz con este gen y evaluaron su expresión corroborando que el mismo se volvía resistente a glifosato (Pan *et al.*, 2021)

En el presente estudio se propuso analizar la expresión de 14 genes candidatos a estar involucrados en la resistencia a glifosato, para ello se realizó la aplicación de una dosis recomendada a biotipos resistentes y a un biotipo susceptible y se tomaron muestras previo a la aplicación y a las 24 y 72 HPA. Se observó que los niveles de expresión de los transportadores fueron variables tanto entre los transportadores como entre los diferentes biotipos. Los genes GST, CAT, C-P450, P6, P3, P1 y M2 mostraron niveles de expresión mayores al biotipo susceptible y al momento previo a la aplicación (0 HPA) para algunos de los biotipos resistentes en estudio.

Varios trabajos reportan el aumento de la expresión de los transportadores M10 (ABCC14) y M11 (ABCC3) luego de la aplicación de glifosato en *C. canadensis* (Moretti *et al.*, 2017; Nol *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2010; Tani *et al.*, 2015). En este estudio M10 (SbABCC14) tiene mayores niveles de expresión previo a la aplicación que post-aplicación y en M11 (SbABCC3), si bien algunos valores de expresión de los biotipos resistentes son mayores que en el susceptible, las diferencias no son tan amplias respecto al tiempo previo a la aplicación (0 HPA). Para M9 (SbABCC10) y M8 (SbABCC8) solo HASI superó el nivel de expresión de FCA de forma significativa. Por otro lado, según la identificación de genes ABC en *S. bicolor* SbABCB9 presentaría actividad de transporte de xenobióticos prometedora y el incremento de la expresión de SbABCB4 brindaría protección contra el daño de herbicidas (Olawuyi & Ologidi, 2018). En este estudio se analizó la expresión de M6 (SbABCB8) y sólo HER3 y SOR mostraron una diferencia de 1 tasa de cambio en el nivel de expresión respecto al susceptible al mismo tiempo de evaluación. Por otro lado, observamos que para M2 (SbABCC4) los niveles de expresión a las 24 HPA se elevan notoriamente respecto al susceptible (FCA) y también respecto a las 0 HPA en los biotipos resistentes analizados.

Un estudio sobre *C. canadensis*, mediante ensayos de discos de hoja, muestra que hay un aumento de la expresión de M10 y M11 a tiempos post aplicación muy tempranos a las 6 horas y que a las 24 y 72 horas los niveles de expresión disminuyen (González-Torralva *et al.*, 2017). En *Lolium* spp. (Gerakari *et al.*, 2021) la expresión de *LpM10* muestra una acumulación temprana a las 3 horas de aplicado el glifosato, ya que habían intentado analizar la expresión a las 24 HPA y no observaban acumulación, llegando a la conclusión que en *Lolium* spp. la inducción es más rápida que en *Conyza* spp; lo que podría explicar lo observado en el presente análisis en cuanto a la variabilidad en los niveles de expresión y que en líneas generales se observó que hay mayor expresión a las 24 HPA.

En *C. canadensis* (Peng *et al.*, 2010) los niveles de expresión para los transportadores del tipo P no están elevados en los biotipos resistentes, ya que tanto los individuos susceptibles a los que se les aplicó el

herbicida como los individuos resistentes sin aplicación muestran similares niveles de expresión. Tani y colaboradores (2015) observaron que P3 (ABCG36) está únicamente sobreexpresado a tiempos tempranos en *C. canadensis*, también observaron que el tipo de respuesta para los transportadores es diferente, algunos con respuesta temprana P3 y M7 y otros con respuesta más prolongada como M10 (ABCC14), los que les indicaría que esta familia de genes contribuye de manera diferencial al mecanismo de resistencia. En el presente estudio, el gen P1 (ABCG39) en HASI y II, HER3 y SOR está sobreexpresado a 24 HPA, HASII y SOR con un valor de 3 y HASI y HER3 por encima de 6 y en P3 (ABCG36) HER5 y OST alcanzan valores mayores a 4 de tasa de cambio (Tabla Anexo 2) y para P6 (ABCG42) se observa que los biotipos de OST, PAV y SOR tienen una tasa de cambio mayor a 5 a las 24 HPA.

Un estudio de transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT) en *A. thaliana* (Su *et al.*, 2004) ubica a CAT2 en la membrana del tonoplasto. El análisis de la función de este gen asoció la pérdida de CAT2 con el aumento de los niveles de los aminoácidos más abundantes, como Glu, Gln, Ser y Thr, y también mayor nivel de Arg, sugiriendo que está críticamente involucrado en la regulación de los niveles de aminoácidos en las hojas (Yang *et al.*, 2014). En otros estudios de este gen en *Coniza canadensis* y *Conyza bonariensis*, no se observó aumento en la expresión en los niveles de CAT a las 24 HPA en individuos resistentes a glifosato y paraquat (Moretti *et al.*, 2017). En el presente estudio, los biotipos resistentes HASI, OST, PAV y SOR duplican el nivel de expresión del susceptible a las 24 HPA y el valor de expresión previo a la aplicación del glifosato.

Otra familia de genes conocida por estar involucrada en los mecanismos no dirigidos son las de la GST y en algunos casos se observa que la resistencia está acompañada de un aumento en la expresión (Yuan *et al.*, 2007) y juega un rol importante en la detoxificación de herbicidas como la atrazina en maíz y en *Amaranthus tuberculatus* (Ghanizadeh & Harrington, 2017). En nuestro análisis se observó que únicamente OST a 24 HPA tiene un nivel de expresión elevado respecto del tiempo previo a la aplicación y al susceptible; en la bibliografía aún no se encontraron reportes de sobreexpresión de GST relacionada con la resistencia a glifosato.

El sistema de los citocromos P450 está también asociado a la resistencia a herbicidas en malezas. Estas proteínas se encuentran en varios reinos, incluyendo el animal, vegetal y fúngico; aunque el número y la diversidad hallada en plantas es superior (Ghanizadeh & Harrington, 2017). Se ha reportado que la actividad de las proteínas P450 está involucrada en la detoxificación de herbicidas con diferentes modos de acción creando un modelo complejo de resistencia cruzada (Gaines *et al.*, 2020). Se sabe que participan en reacciones de hidroxilación y desalquilación para modificar a los herbicidas, reduciendo de esta manera la fitotoxicidad de los mismos (Conte & Lloyd, 2011). En este trabajo se evaluó la expresión de C-P450 luego del tratamiento con glifosato. En los biotipos PAV y SOR se observó una tasa de cambio de 9,9 y 16,47 respectivamente a las 24 HPA. En el estudio del transcriptoma de *C. canadensis* (Peng *et al.*, 2010) se

propuso que P450 podría estar asociado a la resistencia a glifosato, sin embargo, no se realizaron estudios para analizar la expresión del mismo.

En función de los 14 genes analizados, se observaron niveles de expresión variables entre los diferentes genes, así como también entre los biotipos. Resumiendo. los biotipos con una tasa de cambio elevada a 24 HPA fueron:

- para M2 todos los biotipos analizados HASI, HASII, HER3, HER5, OST, PAV y SOR;
- para M4 OST;
- para M8 HASI;
- para P1 HASI, HASII, HER3 y SOR;
- para P3 HER5 y OST
- para P6 OST, PAV y SOR; para GST OST y SOR;
- para CAT HASI, OST, PAV y SOR
- para C-P450 SOR;
- para los genes M1, M6, M9, M10 y M11 ninguno de los biotipos en estudio mostró sobreexpresión al aplicar glifosato.

Capítulo 5:

Análisis transcriptómico de Sorgo de Alepo resistente a glifosato

Introducción

Los métodos como la genómica, transcriptómica y proteómica posibilitan la realización de caracterizaciones globales de genes u otras moléculas biológicas, lo cual los convierte en las herramientas ideales para el descubrimiento de los mecanismos NTSR involucrados en la resistencia a glifosato (Giacomini *et al.*, 2018).

Una de estas herramientas, la secuenciación del ARN (RNAseq) fue introducida por primera vez en 2008 y durante la década pasada su aplicación se extendió al disminuirse los costos de la secuenciación. Es una herramienta poderosa que difiere de los análisis de laboratorio de rutina ya que genera una gran cantidad de datos que no pueden ser interpretados sin un análisis exhaustivo, requiriendo recursos computacionales y desarrollos en bioinformática (Koch *et al.*, 2018). Este método incluye procesos que generan secuencias de ADN copia derivadas de moléculas de ARN, seguido por la construcción de una genoteca y secuenciación masiva. Se conoce que la expresión génica es dependiente del tratamiento y del estadio de desarrollo, el tipo de célula o tejido y estímulos ambientales (Han *et al.*, 2015). El RNAseq a diferencia de otras técnicas transcriptómicas produce la cuantificación absoluta de los transcritos expresados, así como también se pueden analizar variaciones en las secuencias. Todos los genes expresados pueden ser estudiados en función de su regulación y varios genes pueden ser examinados para encontrar mutaciones que podrían conferir resistencia (Maroli *et al.*, 2018). De esta manera estos estudios pueden revelar genes involucrados en NTSR al proporcionar comparaciones de transcriptomas completos entre plantas resistentes a herbicidas (HR) y susceptibles a herbicidas (HS). Estos datos pueden detectar potencialmente cualquier diferencia en la expresión génica, así como cambios en la secuencia de nucleótidos en los genes responsables de la disminución de la sensibilidad a los herbicidas. Los mecanismos NTSR contemplan la captación y translocación diferencial del herbicida, el secuestro vacuolar, la resistencia metabólica por degradación del herbicida o protección contra el estrés oxidativo. La complejidad que estos mecanismos representan la diversidad de maneras en que las malezas han evolucionado ante el estrés causado por los herbicidas (Cechin *et al.*, 2020).

Los métodos para la obtención y la preparación del ARN pueden variar en función de las diferentes plataformas de secuenciación y los propósitos de esta. Sin embargo, la calidad de las muestras son siempre determinantes para la adquisición de datos de confiables (Han *et al.*, 2015). El proceso de secuenciación de lecturas cortas involucra dos aspectos consecutivos: amplificación clonal y secuenciación (Figura 5. 1). La amplificación clonal involucra la amplificación en fase sólida de fragmentos para generar una señal fuerte y

detectable durante la secuenciación. En el caso de la secuenciación por la plataforma de Illumina el fragmento se une a la superficie de una fase sólida (la celda de flujo) y por una PCR puente se lo amplifica obteniendo millones de copias separadas espacialmente para luego dar lugar a la secuenciación por síntesis (Hu *et al.*, 2021). La secuenciación Illumina está fundamentada en la secuenciación por síntesis y la lectura óptica de la incorporación de un terminador reversible marcado fluorescentemente por una ADN polimerasa. Durante cada ciclo se incorpora a la cadena de ácido nucleico un único dNTP y se registra la señal fluorescente resultante. Posteriormente el terminador marcado es clivado para permitir la unión del siguiente nucleótido marcado (Goodwin *et al.*, 2016). Esta plataforma también es capaz de secuenciar ambos extremos del fragmento (*paired-end*) generando así secuencias de alta calidad con una cobertura profunda y gran cantidad de lecturas (Hu *et al.*, 2021)

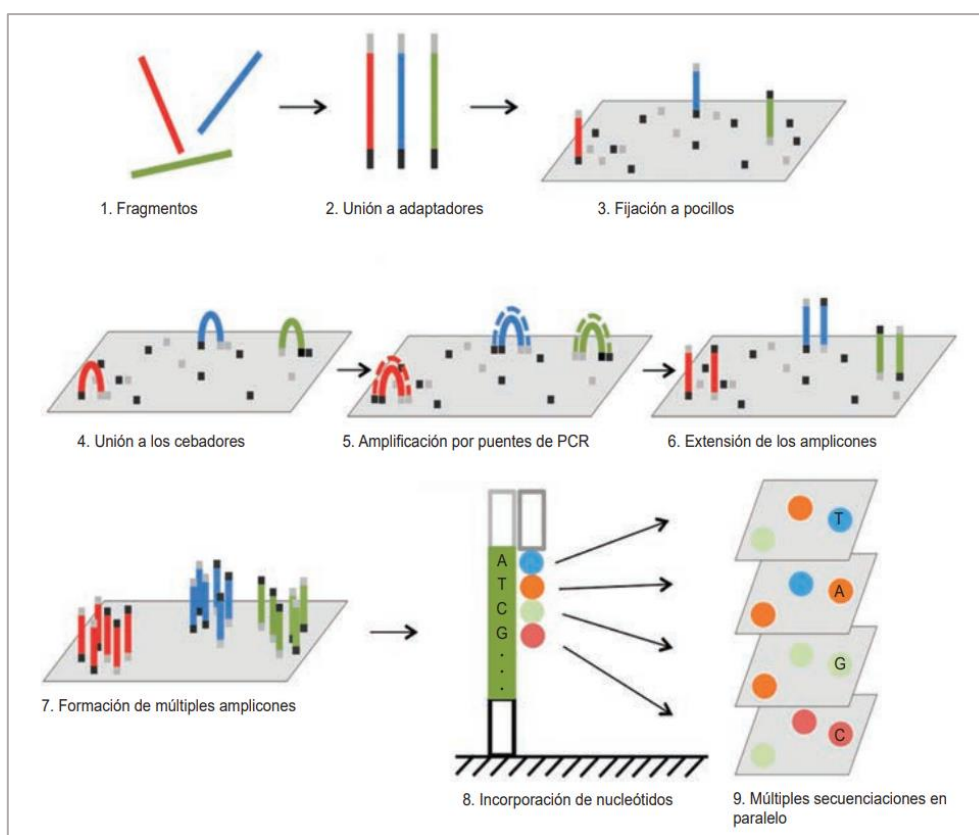


Figura 5. 1. Pasos de la secuenciación plataforma Illumina.
Adaptado de Ball & Pinedo-Donelli, 2020

El transcriptoma es la totalidad de los transcriptos en una población de células y su análisis brinda información acerca de la identidad y la cantidad de todas las moléculas de ARN. Una de las aplicaciones más importantes es realizar comparaciones en diferentes estados de desarrollo, estudiar un caso de enfermedad respecto al estado normal o en el caso de estímulos experimentales específicos versus condiciones fisiológicas, permitiendo la identificación de los genes y la evaluación precisa de su abundancia comparando dos o múltiples muestras (Han *et al.*, 2015).

El RNAseq ha sido gradualmente adoptado por la comunidad que estudia las malezas, dado que permite comparar el transcriptoma completo entre los biotipos resistentes y los susceptibles. La comparación de estos datos posibilita la detección de diferencias en la expresión génica resultando en una lista de genes diferencialmente expresados (DEGs, *differentially expressed genes*, por sus siglas en inglés) que muestran diferencias estadísticas en la expresión entre los fenotipos (Giacomini *et al.*, 2018).

Este tipo de estudios se llevó a cabo en distintas especies de malezas resistentes a glifosato: *C. bonariensis* (Piasecki *et al.*, 2019), *L. multiflorum* (Cechin *et al.*, 2020), *C. canadensis* (Peng *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2021) y *E. indica* (Chen *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021).

A medida que se identifiquen genes NTSR específicos, los investigadores podrán avanzar en el conocimiento de regulación de estos, determinar mutaciones involucradas en la variación molecular (como la variación del número de copias o los cambios en los promotores de los genes) y la relación entre el genoma de la maleza y su fenotipo de resistencia. Estos conocimientos servirán para diseñar programas de gestión de malezas específicos para diferentes tipos de mecanismos de resistencia (Ravet *et al.*, 2018).

En este capítulo se evaluarán los genes diferencialmente expresados en biotipos susceptibles y resistentes ante el tratamiento a glifosato en sorgo de Alepo mediante el análisis de RNAseq.

Materiales y Métodos

Material vegetal y preparación de muestras

A partir del ensayo de aplicación de herbicida realizado para la evaluación de los transportadores del capítulo anterior, de manera simultánea se recolectaron muestras de hojas previo a la aplicación y 72 horas post-aplicación de la dosis recomendada de glifosato de un biotipo susceptible (OV, Oro Verde, Entre Ríos. GPS: 31°49'58"S; 60°31'27"O) y uno resistente (HASI, Hasenkamp; Entre Ríos. GPS: 31°27'20"S; 59°52'54"O). Las muestras fueron colectadas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta la extracción de ARN.

El ARN fue extraído a partir de hojas de tres replicas biológicas independientes. La extracción se realizó mediante el Kit Purelink RNA mini kit (Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %. La calidad y la cantidad del ARN se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Construcción de las genotecas y secuenciación del ARN

Se realizaron las 12 genotecas correspondientes a 12 muestras: tres réplicas biológicas de dos biotipos a dos tiempos. La calidad de las extracciones de ARN fue determinada mediante el equipo Bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer System, Agilent Technologies, Alemania) resultando en un valor de RIN (*RNA Integrity Number*) > 7. Este valor muestra una calidad óptima para la construcción de las genotecas. Las genotecas fueron

preparadas con el Kit TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation (Illumina). La secuenciación de las genotecas fue *single-end* 1x75 pb en un equipo Next Seq HO 500 (Illumina). La calidad de las lecturas se verificó visualmente utilizando el programa FastQC (Andrews *et al.*, 2019). Luego se recortaron las secuencias adaptadoras y filtraron las secuencias de baja calidad utilizando Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) con los parámetros 'ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE. fa:2:30:10 LEADING:21 TRAILING:21 MINLEN:30'. Para remover las lecturas correspondientes a los ARN ribosomales, las lecturas fueron alineadas a bases de datos específicas de sorgo con Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012), con los parámetros por defecto.

Ensamblado de transcriptos e identificación

Las lecturas ya filtradas fueron alineadas sobre el genoma de *S. bicolor* (Sbicolor_454_v3.0.1) (McCormick *et al.*, 2018) utilizando STAR aligner (Dobin *et al.*, 2013) con los siguientes parámetros: '--alignIntronMin 20 --alignIntronMax 20,000 --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --outReadsUnmapped Fastx'. Posteriormente las lecturas alineadas fueron ensambladas mediante StringTie (Pertea *et al.*, 2015) y los nuevos transcriptos fueron extraídos y anotados utilizando el software GffCompare (Pertea & Pertea, 2020) (GffCompare classes "u", "x", para el ajuste). Solo los nuevos transcriptos cuyas longitudes fueron mayores a 200 nucleótidos fueron mantenidos. La clasificación de los nuevos transcriptos fue realizada de la siguiente forma: (1) codificantes: si su predicho *open reading frame* (ORF) fue mayor de 120 aa o si fueran predichos como codificante por el CPC2 calculator (Kang *et al.*, 2017); (2) estructural: en caso de homología con ARN estructural (ARNt, ARNr, ARNsn, ARNsno) posterior al análisis con Rfam (Nawrocki & Eddy, 2013); y (3) no codificante, si fueron predichos como no codificantes por CPC2 calculator o en caso de homología con ARN no codificantes conocidos en Rfam (precursores ARNm, lncRNA). Para cada uno de los transcriptos, el ORF más largo en la hebra sentido con al menos 70 aminoácidos fue predicho utilizando TransDecoder ("-S -m 50", v5.5.0) (Haas *et al.*, 2013). A continuación, se buscó cada ORF en UniRef90 utilizando DIAMOND v2.0.6 (Buchfink *et al.*, 2014). Los resultados con un *e-value* < 1e-10 se consideraron positivos.

Análisis de expresión diferencial

Se realizó el conteo del número de lecturas que alinearon con cada gen en la anotación de *S. bicolor* (Sbicolor_454_v3.1.1) enriquecida con los nuevos transcriptos identificados en el punto anterior mediante el programa featureCounts (Liao *et al.*, 2014) incluido en el paquete de Rsubread (Liao *et al.*, 2019). Los recuentos normalizados obtenidos (mediana de las proporciones) (Anders & Huber, 2010) se utilizaron para el análisis de expresión diferencial con DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Los genes fueron considerados diferencialmente expresados si tenían un *p value* ajustado (Bonferroni) < 0,01 y FC>2. Los diagramas de Venn fueron realizados con Venny v2.1 (Oliveros, 2007). El análisis de enriquecimiento funcional y los correspondientes gráficos se realizaron con ShinyGO 0.76 (Ge *et al.*, 2020). Los términos fueron ordenados en función del valor de FE (por sus siglas en inglés, *fold enrichment*), el mismo se obtiene comparando la

frecuencia del fondo (*background*) del total de genes anotados en la referencia contra el número de los anotados en la muestra de interés que correspondan al mismo termino.

Para visualizar los genes diferencialmente expresados DEGs se realizó un volcano plot con la aplicación web VolcaNoseR (<https://huygens.science.uva.nl/VolcaNoseR2/>) (Goedhart & Luijsterburg, 2020).

El análisis de los datos de secuenciación fue realizado en colaboración con el Dr. Diego Lijavetzky (IBAM-CONICET-UNCUYO, Instituto de Biología Agrícola de Mendoza).

Resultados

Análisis de la expresión diferencial

Se generaron 12 genotecas *single end* de tres réplicas biológicas de los biotipos OV (susceptible) y HASI (resistente) con la aplicación de glifosato (72HPA) y previamente a la aplicación (0 HPA). Se realizó un análisis global de las secuencias de las genotecas y se lo representó mediante un gráfico de componentes principales, donde se puede observar que los cuatro tratamientos se diferencian y que las réplicas biológicas son consistentes entre sí. La componente 1 (PC1), que explica el 47 % de la varianza, separa los tratamientos por aplicación de glifosato y la componente 2 (PC2), que explica el 30 % de la varianza, separa los biotipos por susceptible (OV) y resistente (HasI) (Figura 5. 2).

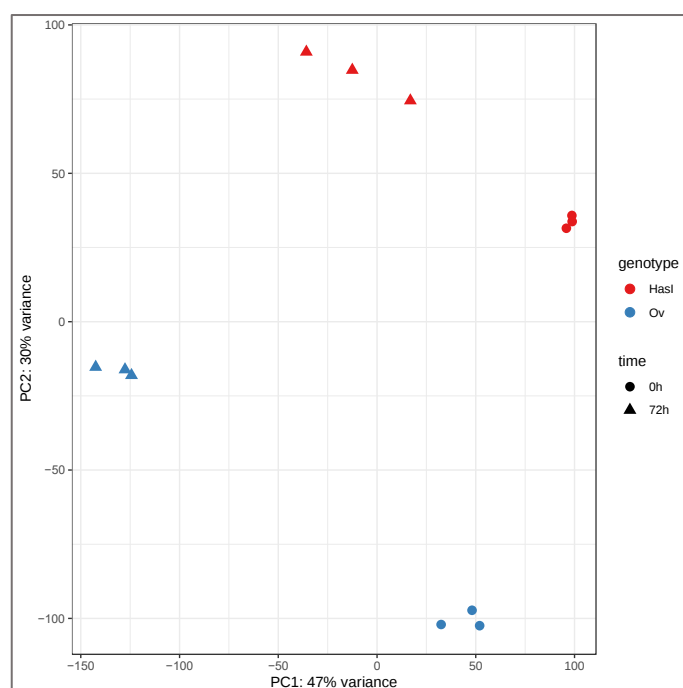


Figura 5. 2. Gráfico de componentes principales (PCA) de las secuencias obtenidas por RNAseq para los dos biotipos (HASI y OV) y los dos tratamientos (0 y 72 HPA)

Una vez verificada la robustez de los datos, se realizaron cuatro comparaciones: OV 0 HPA vs OV 72 HPA; HASI 0 HPA vs HASI 72 HPA, HASI 72 HPA vs OV 72 HPA y HASI 0 HPA vs OV 0 HPA. Los genes diferencialmente expresados (DEGs) (*Differentially expressed genes*, por sus siglas en inglés) para las

comparaciones se muestran en un diagrama de Venn (Figura 5.3 a y b). Los genes diferencialmente expresados en respuesta al tratamiento a glifosato fueron en total 9183 (contando las comparaciones HasI t0_t72 y OV t0_t72) en ambos biotipos, de los cuales 5456 fueron sobreexpresados y 3727 fueron subexpresados. Contabilizando los genes en función del biotipo, los genes diferencialmente expresados en OV (susceptible) en respuesta al tratamiento con glifosato fueron 3312 sobreexpresados y 2506 subexpresados y para HASI (resistente) fueron 2144 sobreexpresados y 1221 subexpresados. Los genes coexpresados en ambos biotipos fueron 1422 sobreexpresados y 894 subexpresados (Figura 5. 3 y Tabla 5. 1).

Tabla 5. 1. Genes diferencialmente expresados a 72 HPA.

	OV (S)	HasI (R)	Total	Coexpresados
Sobreexpresados	3312	2144	5456	1422
Subexpresados	2506	1221	3727	894
Total	5818	3365	9183	2316

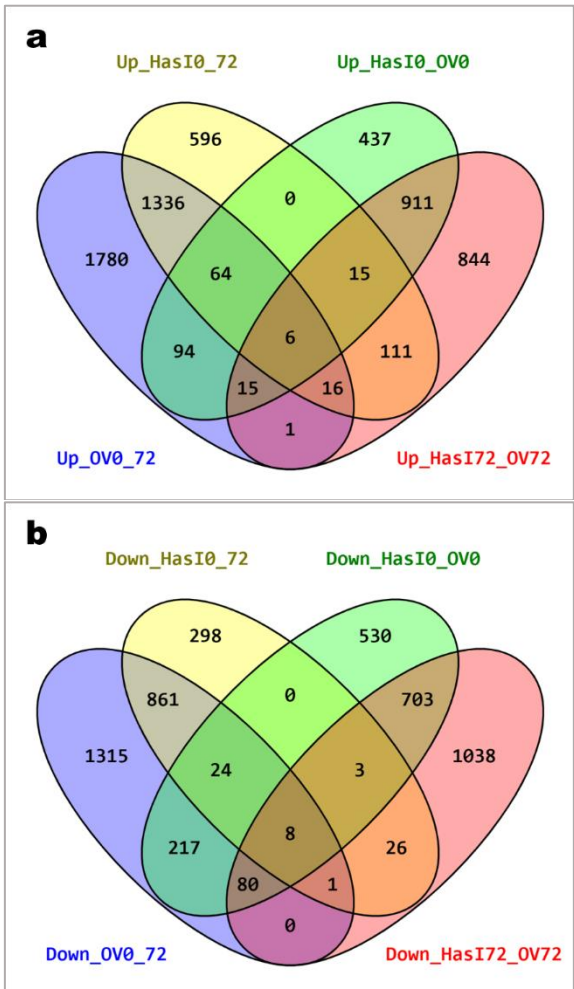


Figura 5. 3. Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados en sorgo de Alepo para los biotipos OV y HASI y los dos tratamientos (O y 72 HPA).

(a) genes sobreexpresados y (b) genes subexpresados en respuesta al tratamiento a glifosato.
Amarillo: DEGs HasI0_HasI72; Violeta: DEGs OV0_OV72, Verde: DEGs HasI0_OV0 y Rojo: DEGs HasI72_OV72

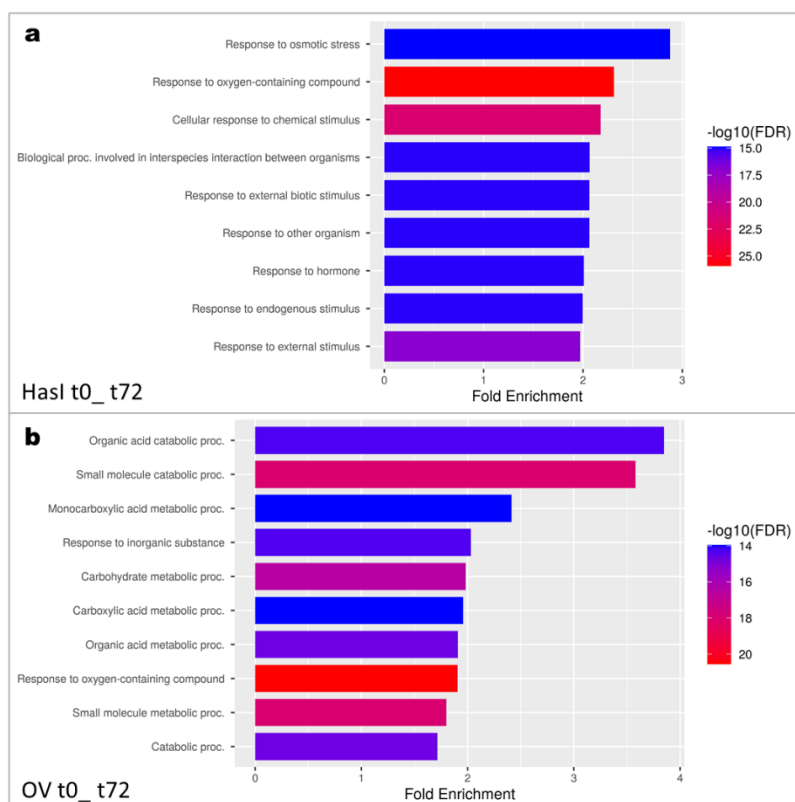


Figura 5. 4. Resumen de los 10 primeros términos GO correspondientes a genes sobreexpresados en los biotipos (a) HASI y (b) OV de sorgo de Alepo.
Las secuencias anotadas fueron clasificadas en Procesos biológicos (PB)

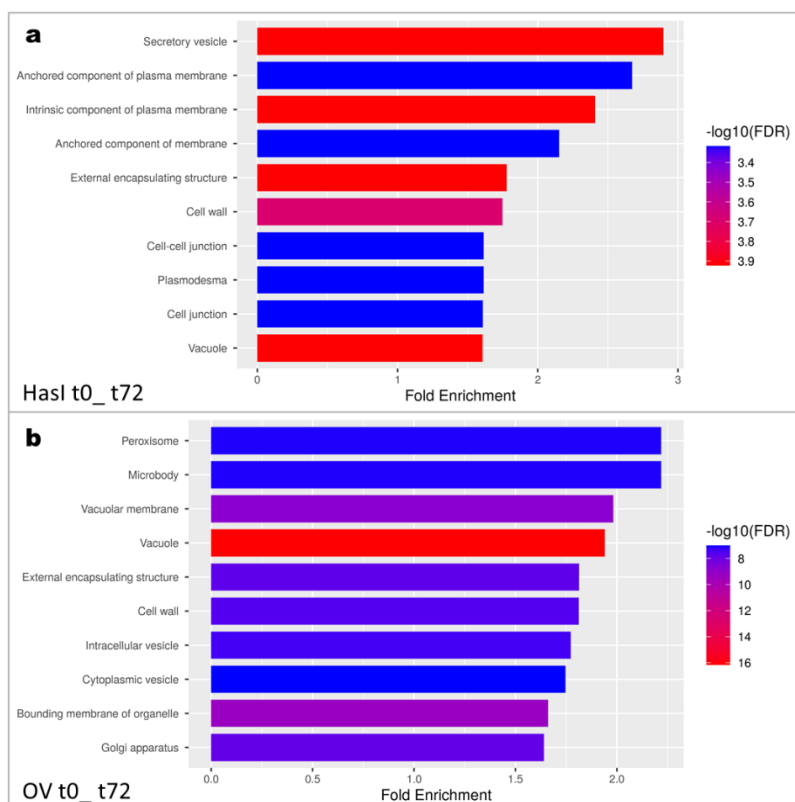


Figura 5. 5. Resumen de los 10 primeros términos GO correspondientes a genes sobreexpresados en los biotipos (a) HASI y (b) OV de sorgo de Alepo.
Las secuencias anotadas fueron clasificadas en Componente Celular (CC)

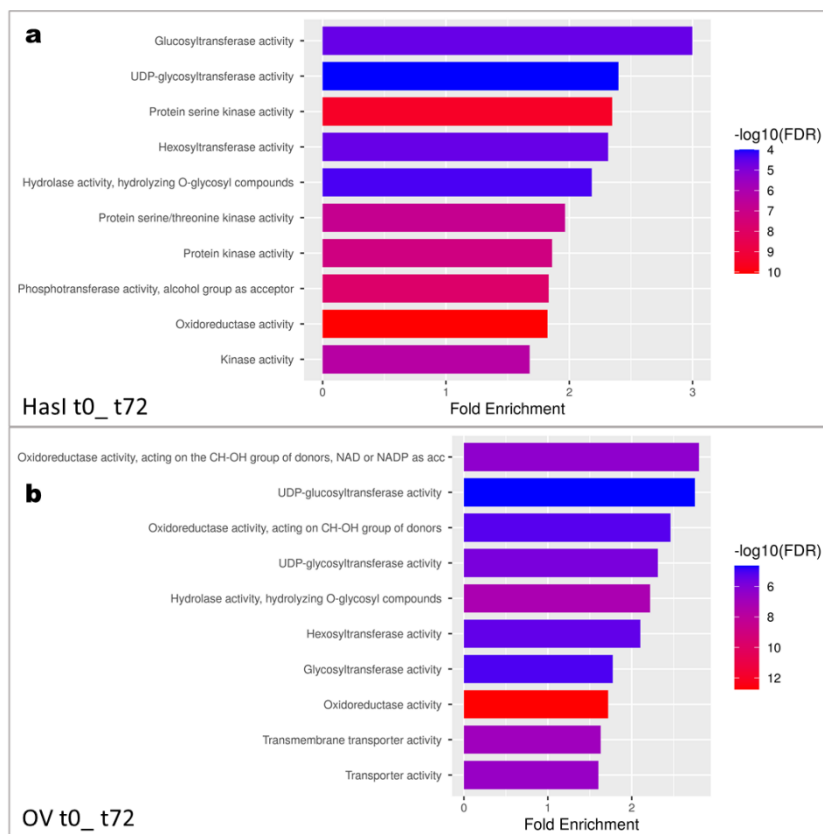


Figura 5. 6. Resumen de los 10 primeros términos GO correspondientes a genes sobreexpresados en los biotipos (a) HASI y (b) OV de sorgo de Alepo.

Las secuencias anotadas fueron clasificadas en Función Molecular (MF)

Se realizó un análisis de ontología génica GO (por sus siglas en inglés: *Gene ontology*) a fin de establecer las diferencias globales de los transcriptomas analizando los siguientes términos: procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC) y función molecular (MF) en respuesta al tratamiento con glifosato en los biotipos resistente y susceptible. Los términos GO para los genes sobreexpresados en procesos biológicos (BP) más destacados fueron respuesta a estrés osmótico y respuesta a componentes oxigenados para HASI y para OV, procesos catabólicos para ácidos orgánicos y procesos catabólicos de moléculas pequeñas con FE (por sus siglas en inglés, *Fold Enrichment*) de 3,8 y 3,55 (Figura 5. 4). Para componentes celular los términos más abundantes fueron vesículas secretorias y componentes anclados a membrana plasmática con FE de 2,8 y 2,6 respectivamente en HASI; y peroxisoma y microcuerpos ambos con un FE de 2,4 en OV (Figura 5. 5). Para función molecular (MF) fueron para HASI, la actividad glicosil transferasa donde se observa un FE de 3 y en segundo lugar UDP-glicosil transferasa con un valor de 2,4 de FE. Para OV los dos términos más abundantes son la oxido reductasa y UDP-glicosil transferasa con FE de 2,8 (Figura 5. 6).

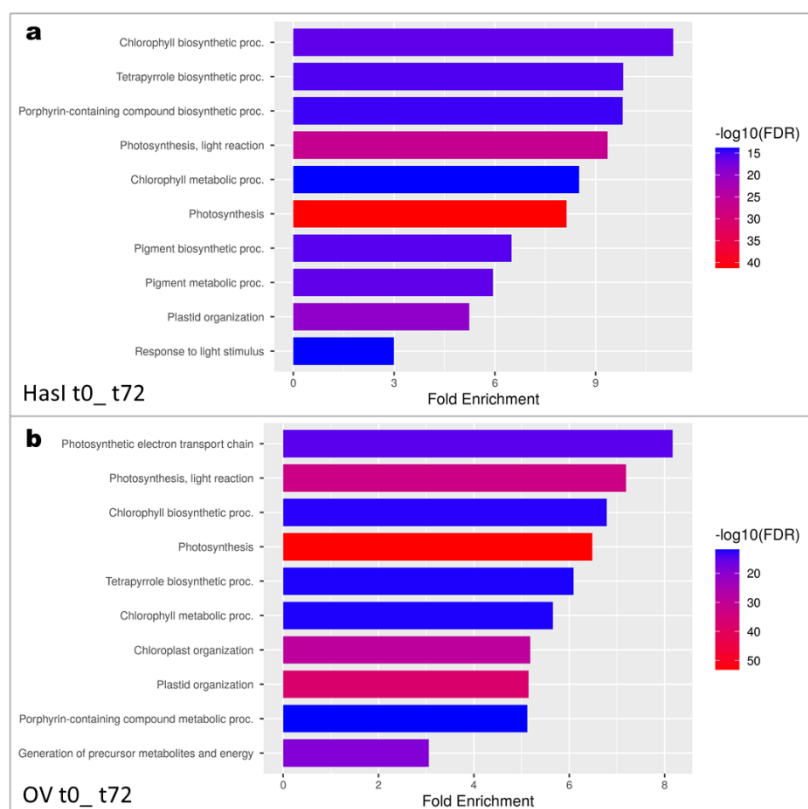


Figura 5. 7. Resumen de los 10 primeros términos GO correspondientes a genes subexpresados en los biotipos (a) HASI y (b) OV de sorgo de Alepo.

Las secuencias anotadas fueron clasificadas en Procesos biológicos (PB)

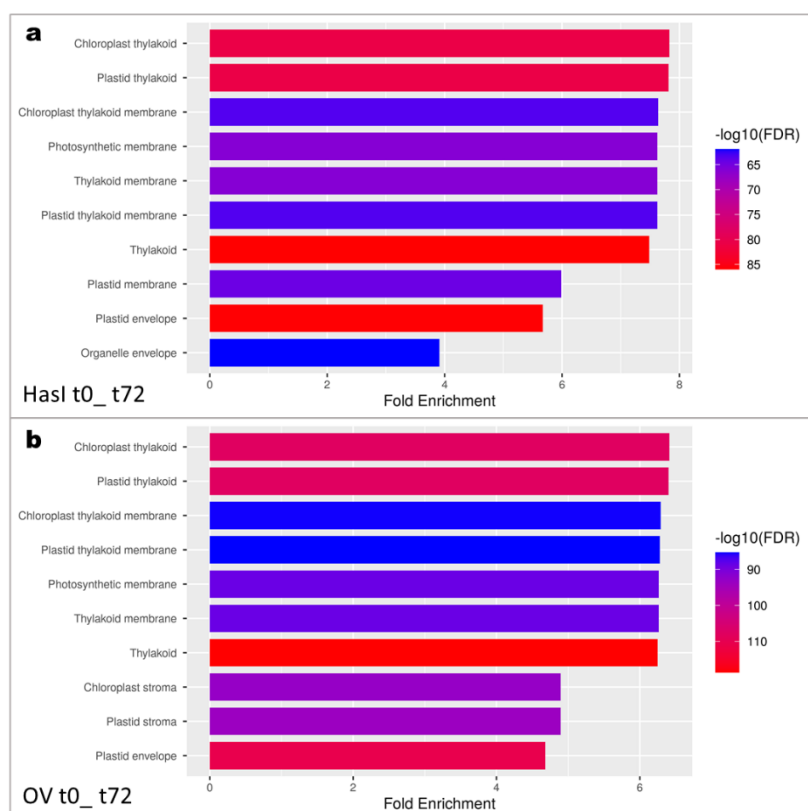


Figura 5. 8. Resumen de los 10 primeros términos GO correspondientes a genes subexpresados en los biotipos (a) HASI y (b) OV de sorgo de Alepo.

Las secuencias anotadas fueron clasificadas en Componente Celular (CC)

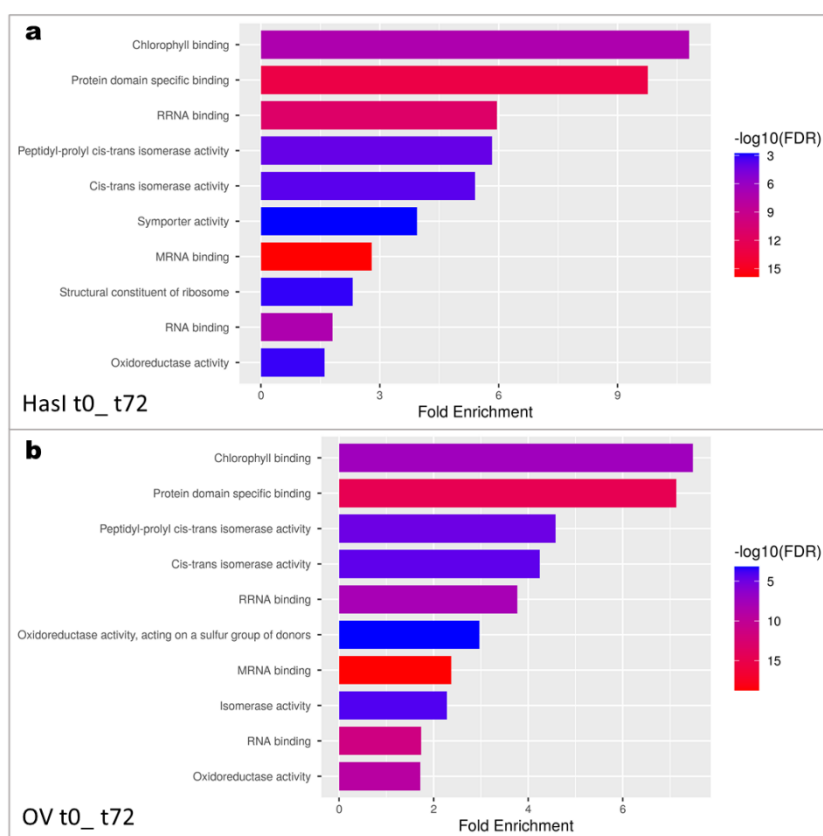


Figura 5. 9. Resumen de los 10 primeros términos GO correspondientes a genes subexpresados en los biotipos (a) HASI y (b) OV de sorgo de Alepo.
Las secuencias anotadas fueron clasificadas en Función Molecular (MF)

La función de genes subexpresados más representados fueron los procesos biológicos con los términos procesamiento de biosíntesis de clorofila en HASI (FE: 9,7) y cadena de transporte de electrones fotosintética en OV (FE: 8,2) (Figura 5. 7.) Para ambos biotipos los términos GO más representados de genes subexpresados en la función componente celular fueron los tilacoides cloroplásticos (Figura 5. 8) y para función molecular también para ambos biotipos el termino más representado de genes subexpresado fue la unión a clorofila (Figura 5. 9).

En la Tabla 5. 2 se presenta una lista de los primeros 10 DEGs sobreexpresados y subexpresados para cada comparación analizada. No todos los genes poseen una función descrita en el genoma de *S. bicolor* utilizado como referencia, algunos presentan similitud a genes de *Oryza sativa*. En estas 10 posiciones destacadas no se observan genes relacionados con NTSR descriptos.

Tabla 5. 2. Los primeros 10 DEGs sobreexpresados y subexpresados de cada una de las comparaciones analizadas. La descripción de la función fue obtenida a partir del Phytozome v.13. NA: función no asignada.

	ID	log2FC	padj	Descripción
Top 10 DEGs UP Has1 t0_t72	Sobic.010G041900	10,122	6,97E-06	weakly similar to Dehydrin
	Sobic.007G035300	9,163	3,36E-08	similar to Putative uncharacterized protein
	Sobic.009G010150	8,624	1,38E-08	(1 of 39) PF00280 - Potato inhibitor I family (potato_inhibit)
	Sobic.006G218300	8,492	1,38E-08	(1 of 130) PF02365 - No apical meristem (NAM) protein (NAM)
	Sobic.001G034900	8,452	1,76E-27	similar to Actin-depolymerizing factor 3
	Sobic.002G107900	8,429	2,96E-12	similar to Putative uncharacterized protein
	Sobic.003G236551	8,427	4,69E-13	similar to Little protein 1
	Sobic.001G384100	8,382	1,50E-37	similar to 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
	Sobic.007G143200	8,318	2,62E-29	similar to Putative uncharacterized protein
	Sobic.003G270200	8,220	7,54E-15	(1 of 4) PF00257 - Dehydrin (Dehydrin)
Top 10 DEGs DOWN Has1 t0_t72	Sobic.004G340000	-6,211	5,57E-05	NA
	Sobic.009G244600	-6,307	6,13E-05	(1 of 7) PTHR24078:SF177 - PROTEIN DNJ-23-RELATED
	Sobic.002G208000	-6,663	1,42E-06	NA
	Sobic.001G068400	-7,021	1,67E-06	NA
	Sobic.003G021800	-7,249	4,33E-07	(1 of 2) PTHR13301//PTHR13301:SF50 - X-BOX TRANSCRIPTION FACTOR-RELATED
	Sobic.003G379500	-7,261	1,49E-29	similar to Gibberellin 20 oxidase 2
	Sobic.002G272700	-7,323	7,40E-12	similar to Putative uncharacterized protein
	Sobic.006G090300	-7,978	6,63E-09	similar to TypeA response regulator 1
	Sobic.004G112800	-8,422	1,54E-08	NA
	Sobic.006G029550	-8,908	1,05E-20	NA
	ID	log2FC	padj	Descripción
Top 10 DEGs UP OV t0_t72	Sobic.002G324000	16,141	1,53E-33	similar to Isocitrate lyase
	Sobic.004G236000	15,550	2,89E-33	(1 of 8) PTHR11709//PTHR11709:SF118 - MULTI-COPPER OXIDASE
	Sobic.009G009300	15,471	1,21E-29	(1 of 7) 4.2.3.123 - Beta-sesquiphellandrene synthase / Tps1
	Sobic.008G090800	14,503	5,75E-09	similar to Laccase-25 precursor
	Sobic.007G035000	14,151	1,49E-28	similar to Tryptophan decarboxylase
	Sobic.006G127100	13,586	7,57E-30	similar to Malate synthase, glyoxysomal
	Sobic.002G118300	13,473	5,08E-21	similar to Hydrophobic LEA-like protein
	Sobic.003G085300	13,268	8,63E-37	NA
	Sobic.001G483500	13,047	5,77E-22	(1 of 1) PTHR31087:SF3 - PROTEIN LURP-ONE-RELATED 16-RELATED
	Sobic.007G003200	12,533	3,81E-06	(1 of 13) 1.3.3.8 - Tetrahydroberberine oxidase / THB oxidase
Top 10 DEGs DOWN OV t0_t72	Sobic.005G210100	-8,384	8,42E-10	similar to Chromosome chr7 scaffold_42, whole genome shotgun sequence
	Sobic.002G322100	-8,554	3,35E-08	NA
	Sobic.003G231800	-8,582	3,37E-37	similar to 10A19I.8
	Sobic.005G220900	-8,735	3,85E-39	similar to Putative uncharacterized protein
	Sobic.004G267000	-8,924	4,31E-33	similar to Putative myb-related protein
	Sobic.003G379500	-9,196	5,96E-29	similar to Gibberellin 20 oxidase 2
	Sobic.005G204000	-9,759	3,27E-12	similar to Glutaredoxin-C10
	Sobic.003G237600	-10,639	9,71E-06	NA
	Sobic.006G029550	-11,155	3,37E-16	NA
	Sobic.002G272700	-11,464	5,93E-77	similar to Putative uncharacterized protein

Tabla 5. 3. (continuación) Los primeros 10 DEGs sobreexpresados y subexpresados de cada una de las comparaciones analizadas. La descripción de la función fue obtenida a partir del Phytozome v.13. NA: función no asignada.

	ID	log2FC	padj	Descripción
Top 10 DEGs UP Hasl t72_OVt72	Sobic.001G386500	11,886	8,78E-20	(1 of 6) PF14200 - Ricin-type beta-trefoil lectin domain-like (RicinB_lectin_2)
	Sobic.004G007300	11,729	7,77E-20	NA
	Sobic.003G075300	11,633	8,10E-19	(1 of 303) PF00646 - F-box domain (F-box)
	Sobic.001G064200	11,344	1,63E-36	NA
	Sobic.003G191200	11,312	8,40E-18	(1 of 74) PTHR12606 - SENTRIN/SUMO-SPECIFIC PROTEASE
	Sobic.004G230000	11,304	6,08E-18	similar to NAM-like protein
	Sobic.008G003800	10,705	8,01E-17	NA
	Sobic.004G078200	10,653	3,20E-16	NA
	Sobic.010G245100	10,619	3,06E-21	(1 of 50) PF00069//PF00139 - Protein kinase domain (Pkinase) // Legume lectin domain
	Sobic.001G002050	10,260	8,84E-15	NA
Top 10 DEGs DOWN Hasl t72_OVt72	Sobic.001G195600	-10,476	2,04E-14	(1 of 22) PTHR12606:SF1 - GH15225P
	Sobic.002G079300	-10,573	5,66E-15	similar to Os08g0169300 protein
	Sobic.005G085500	-10,580	4,19E-15	NA
	Sobic.001G052000	-10,607	4,32E-07	Predicted protein
	Sobic.008G166700	-10,833	7,81E-17	(1 of 1200) 2.7.11.1 - Non-specific serine/threonine protein kinase
	Sobic.001G075400	-10,840	6,36E-17	similar to Expressed protein
	Sobic.002G403833	-11,146	2,73E-18	NA
	Sobic.009G086600	-11,686	4,46E-20	(1 of 3) PF02721//PF08646 - Domain of unknown function DUF223 (DUF223) // Replication factor-A C terminal domain (Rep_fac-A_C)
	Sobic.002G403966	-11,797	4,24E-20	NA
	Sobic.005G057700	-12,347	1,70E-21	similar to Putative uncharacterized protein
	ID	log2FC	padj	Descripción
Top 10 DEGs UP Hasl t0_OVt0	Sobic.008G003800	13,119	1,25E-25	NA
	Sobic.004G230000	12,229	1,45E-22	similar to NAM-like protein
	Sobic.001G064200	11,313	4,92E-65	NA
	Sobic.001G344900	11,304	2,09E-19	similar to High light protein
	Sobic.004G007300	10,926	4,19E-18	NA
	Sobic.007G164200	10,891	1,57E-17	(1 of 68) PF07762 - Protein of unknown function (DUF1618) (DUF1618)
	Sobic.005G220620	10,768	2,39E-17	NA
	Sobic.002G393900	10,763	5,97E-17	similar to Putative uncharacterized protein
	Sobic.005G139800	10,745	3,59E-17	(1 of 4) PTHR13634 - RIBOSOME BIOGENESIS PROTEIN BRIX
	Sobic.010G240100	10,605	4,92E-16	NA
Top 10 DEGs DOWN Hasl t0_OVt0	Sobic.006G255500	-11,437	3,17E-19	similar to H1005F08.5 protein
	Sobic.007G186600	-11,678	1,24E-20	weakly similar to Pi-b protein
	Sobic.010G149700	-11,865	5,08E-21	similar to Putative uncharacterized protein
	Sobic.001G075400	-11,955	1,58E-21	similar to Expressed protein
	Sobic.002G403966	-12,072	4,47E-22	NA
	Sobic.005G079300	-12,289	1,04E-11	similar to OSJNBa0027H06.5 protein
	Sobic.002G403833	-12,550	7,26E-24	NA
	Sobic.005G057700	-12,663	2,42E-24	similar to Putative uncharacterized protein
	Sobic.009G086600	-12,781	9,36E-25	(1 of 3) PF02721//PF08646 - Domain of unknown function DUF223 (DUF223) // Replication factor-A C terminal domain (Rep_fac-A_C)
	Sobic.005G087666	-13,060	1,04E-25	(1 of 3) PTHR13832//PTHR13832:SF327 - PROTEIN PHOSPHATASE 2C // SUBFAMILY NOT NAMED

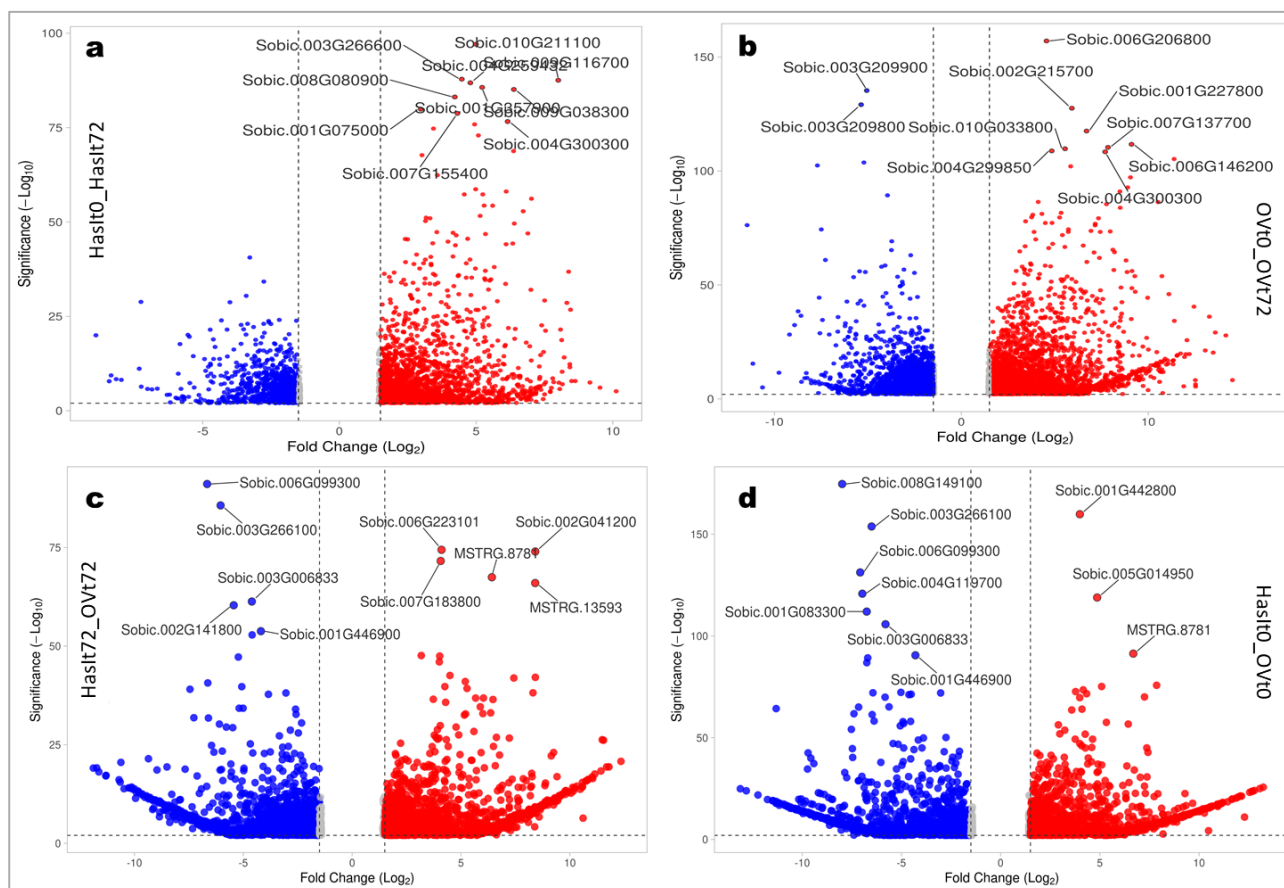


Figura 5. 10. Volcano plots de las diferentes comparaciones analizadas.

(a) HasIt0_HasIt72, (b) OvIt0_OvIt72, (c) HasIt72_OvIt72 y (d) HasIt0_OvIt0

Se muestran los 10 hits más significativos. Se utilizó la distancia Eucladiana como criterio para ordenar los hits.

Ser realizaron gráficos de tipo volcano de los genes diferencialmente expresados de cada una de las comparaciones analizadas. En los gráficos basados en una distancia euclidiana se muestran los ID de los 10 hits más significativos (Figura 5. 10). En las tablas 5.2 a 5.5 se muestran los 20 más significativos de cada gráfico y las asignaciones de las funciones anotadas para cada gen. Varios de los hits con mayor significancia son no codificantes o no tienen una proteína asignada, algunos incluso, los identificados como MSTRG no están anotados en el genoma de referencia. Para la comparación HASI t0_t72 de los 20 más significativos todos corresponden a genes sobreexpresados, de los cuales hay seis que tiene función asignada (Tabla 5. 2). Para la comparación OV t0_t72, 5 genes están subexpresados y 15 genes presentan sobreexpresión, de todos ellos hay 16 con función asignada (Tabla 5. 4). Para la comparación HASI t72_OV t72 hay 12 genes sobreexpresados, 8 genes subexpresados, de los cuales en total hay 6 que no están anotados en la base de datos de la referencia y cinco que tienen función asignada (Tabla 5. 6). Para la comparación HASI t0_OV t0, se observan 12 genes subexpresados y 8 sobreexpresados, de todos ellos hay 1 que no está anotado en la referencia y 11 que tienen funciones descriptas (Tabla 5. 7).

Tabla 5. 4. Función de los 20 DEGs del análisis Hasl 0 HPA vs Hasl 72 HPA obtenidos a partir del VolcaNoseR.
La descripción de la función a partir del Phytozome v.13; FC: *Fold Change* (log2); S: significancia y NA: función no asignada.

ID	Cambio	FC	S	Distancia Euclídeana	Descripción
Sobic.010G211100	Aumento	4,99	97,08	97,21	similar to Putative uncharacterized protein
Sobic.003G266600	Aumento	4,47	87,83	87,95	similar to Phosphoethanolamine N-methyltransferase
Sobic.009G116700	Aumento	8,00	87,55	87,91	similar to Dehydrin DHN1
Sobic.004G259432	Aumento	4,78	86,87	87,00	NA
Sobic.001G357900	Aumento	5,22	85,65	85,81	similar to Putative glucanase
Sobic.009G038300	Aumento	6,37	85,11	85,35	NA
Sobic.008G080900	Aumento	4,21	83,11	83,22	similar to Expressed protein
Sobic.001G075000	Aumento	2,97	79,89	79,94	similar to Lectin receptor kinase 7, putative, expressed
Sobic.007G155400	Aumento	4,31	78,77	78,89	(1 of 21) PF03763 - Remorin, C-terminal region (Remorin_C)
Sobic.004G300300	Aumento	6,15	76,61	76,86	similar to Putative uncharacterized protein
Sobic.001G075600	Aumento	4,94	75,85	76,02	similar to Putative uncharacterized protein
Sobic.010G088700	Aumento	3,43	74,73	74,81	similar to Os02g0756800 protein
Sobic.005G224500	Aumento	5,08	72,92	73,10	weakly similar to Putative uncharacterized protein
Sobic.001G409400	Aumento	6,37	68,77	69,06	similar to Putative uncharacterized protein
Sobic.006G185900	Aumento	3,01	67,69	67,76	similar to OSJNBa0019K04.13 protein
Sobic.008G021800	Aumento	3,58	62,40	62,50	similar to NAC domain transcription factor, putative, expressed
Sobic.003G323500	Aumento	4,98	58,66	58,87	similar to Os01g0794400 protein
Sobic.009G142200	Aumento	6,09	58,08	58,40	similar to Putative uncharacterized protein
Sobic.006G034300	Aumento	5,24	57,30	57,54	similar to OSIGBa0139I12.3 protein
Sobic.006G272700	Aumento	4,56	57,30	57,48	similar to Putative uncharacterized protein OSJNBb0004A06.18

Tabla 5. 5. Función de los 20 DEGs del análisis OV 0 HPA vs OV 72 HPA obtenidos a partir del VolcaNoseR.
La descripción de la función a partir del Phytozome v.13; FC: *Fold Change* (log2); S: significancia y NA: función no asignada.

ID	Cambio	FC	S	Distancia Euclídeana	Descripción
Sobic.006G206800	Aumento	4,55	157,07	157,14	similar to Cation-transporting ATPase
Sobic.003G209900	Descenso	-5,06	135,31	135,41	similar to Chlorophyll a-b binding protein 1, chloroplast precursor
Sobic.003G209800	Descenso	-5,36	129,10	129,22	similar to Chlorophyll A-B binding protein (CAB), putative
Sobic.002G215700	Aumento	5,91	127,55	127,68	similar to Aldehyde dehydrogenase
Sobic.001G227800	Aumento	6,69	117,54	117,73	similar to Uncharacterized conserved protein, putative, expressed
Sobic.006G146200	Aumento	9,10	111,71	112,08	similar to OSIGBa0140J09.1 protein
Sobic.007G137700	Aumento	7,84	110,37	110,65	similar to S-like RNase
Sobic.010G033800	Aumento	5,54	109,76	109,90	similar to Putative sulfate transporter Sultr3
Sobic.004G299850	Aumento	4,83	108,81	108,92	(1 of 1) PTHR19359/PTHR19359:SF30 - CYTOCHROME B5 // SUBFAMILY NOT NAMED
Sobic.004G300300	Aumento	7,69	108,42	108,69	similar to Putative uncharacterized protein
Sobic.009G116700	Aumento	11,38	105,27	105,88	similar to Dehydrin DHN1
Sobic.008G149100	Descenso	-5,21	103,71	103,85	similar to B3 DNA binding domain containing protein, expressed
Sobic.005G099500	Descenso	-7,70	102,43	102,72	similar to GDA1/CD39 family protein
Sobic.001G089000	Aumento	5,84	102,05	102,21	similar to Exhydrolase II
Sobic.003G422200	Aumento	9,04	97,21	97,63	(1 of 61) 3.2.1.39 - Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase / Laminarinase
Sobic.001G027800	Aumento	8,90	92,78	93,21	(1 of 7) K19355 - mannan endo-1,4-beta-mannosidase (MAN)
Sobic.003G292400	Aumento	8,48	91,03	91,42	similar to Oxidoreductase precursor
Sobic.002G001800	Descenso	-3,95	89,31	89,40	similar to Putative potassium transporter
Sobic.004G154000	Aumento	10,52	86,37	87,01	(1 of 13) 3.2.1.8 - Endo-1,4-beta-xylanase
Sobic.009G100900	Aumento	4,11	86,42	86,52	similar to Putative uncharacterized protein

Tabla 5. 6. Función de los 20 DEGs del análisis Has1 72 HPA vs OV 72 HPA obtenidos a partir del VolcaNoseR.
La descripción de la función a partir del Phytozome v.13; FC: *Fold Change* (log2); S: significancia y NA: función no asignada.

ID	Cambio	FC	S	Distancia Euclídeana	Descripción
Sobic.006G099300	Descenso	-6,65	91,10	91,35	NA
Sobic.003G266100	Descenso	-6,04	85,67	85,89	(1 of 3) K06100 - symplekin (SYMPK)
Sobic.006G223101	Aumento	4,10	74,42	74,53	weakly similar to NBS-LRR disease resistance protein homologue
Sobic.002G041200	Aumento	8,41	73,99	74,46	similar to Putative uncharacterized protein
Sobic.007G183800	Aumento	4,06	71,59	71,70	similar to Os08g0542700 protein
MSTRG.8781	Aumento	6,41	67,45	67,76	NA
MSTRG.13593	Aumento	8,40	65,99	66,52	NA
Sobic.003G006833	Descenso	-4,60	61,30	61,47	similar to Os08g0542700 protein
Sobic.002G141800	Descenso	-5,43	60,35	60,59	NA
Sobic.001G446900	Descenso	-4,18	53,78	53,94	(1 of 2) PTHR11956 - ARGINYL-TRNA SYNTHETASE
Sobic.003G225700	Descenso	-4,59	52,83	53,03	weakly similar to Chromosome chr6 scaffold_3, whole genome shotgun sequence
MSTRG.11588	Aumento	3,17	47,60	47,71	NA
MSTRG.6071	Aumento	4,02	47,46	47,63	NA
MSTRG.14203	Descenso	-5,22	47,22	47,51	NA
Sobic.002G104400	Aumento	4,00	46,00	46,18	(1 of 3) PF00931//PF03106 - NB-ARC domain (NB-ARC) // WRKY DNA -binding domain (WRKY)
Sobic.008G125300	Aumento	8,41	42,08	42,91	(1 of 4) PF02721 - Domain of unknown function DUF223 (DUF223)
Sobic.001G397800	Aumento	4,49	42,54	42,78	(1 of 3) K10728 - topoisomerase (DNA) II binding protein 1 (TOPBP1)
Sobic.004G234832	Aumento	7,42	41,90	42,55	(1 of 22) PTHR12606:SF1 - GH15225P
Sobic.001G287000	Aumento	5,19	41,01	41,33	NA
MSTRG.22355	Descenso	-6,63	40,65	41,19	NA

Tabla 5. 7. Función de los 20 DEGs del análisis Has1 0 HPA vs OV 0 HPA obtenidos a partir del VolcaNoseR.
La descripción de la función a partir del Phytozome v.13; FC: *Fold Change* (log2); S: significancia y NA: función no asignada.

ID	Cambio	FC	S	Distancia Euclídeana	Descripción
Sobic.008G149100	Descenso	-7,98	174,66	174,84	similar to B3 DNA binding domain containing protein,
Sobic.001G442800	Aumento	3,99	159,81	159,86	similar to Microtubule associated protein family protein,
Sobic.003G266100	Descenso	-6,50	153,78	153,92	(1 of 3) K06100 - symplekin (SYMPK)
Sobic.006G099300	Descenso	-7,07	131,21	131,40	NA
Sobic.004G119700	Descenso	-6,97	120,76	120,96	similar to OSJNBa0083N12.7 protein
Sobic.005G014950	Aumento	4,86	118,88	118,98	(1 of 11) PF00646//PF03478 - F-box domain (F-box) // Protein of unknown function (DUF295) (DUF295)
Sobic.001G083300	Descenso	-6,74	111,96	112,16	MITOTIC CHECKPOINT PROTEIN BUB3.3
Sobic.003G006833	Descenso	-5,80	105,75	105,90	(1 of 4) Asparaginase / L-asparagine amidohydrolase
MSTRG.8781	Aumento	6,68	91,31	91,55	NA
Sobic.001G446900	Descenso	-4,29	90,50	90,60	(1 of 2) PTHR11956 - ARGINYL-TRNA SYNTHETASE
MSTRG.7224	Descenso	-6,69	89,20	89,45	NA
Sobic.003G134500	Descenso	-6,74	86,86	87,12	similar to Cyclin type B-like
MSTRG.13593	Aumento	7,85	75,75	76,15	NA
Sobic.009G034800	Aumento	5,08	75,15	75,32	(1 of 97) PF03106 - WRKY DNA -binding domain (WRKY)
Sobic.007G183800	Aumento	4,16	73,49	73,61	similar to Os08g0542700 protein
MSTRG.7185	Aumento	3,77	72,65	72,75	NA
Sobic.003G354600	Descenso	-5,02	72,27	72,45	weakly similar to Putative uncharacterized protein
Sobic.007G034700	Descenso	-6,43	72,06	72,34	(1 of 8) K15803 - (-)-germacrene D synthase (GERD)
Sobic.007G203000	Descenso	-3,02	71,98	72,04	similar to Os08g0520100 protein
Sobic.008G026900	Aumento	4,33	71,59	71,72	(1 of 8) PTHR23155//PTHR23155:SF627 - LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING PROTEIN

En la comparación HASI t0_t72 hubo un total de 3365 DEGs y en la comparación OV t0_t72 5818 DEGs. Dentro de estas listas se realizó una búsqueda de los genes reportados en otras malezas que suelen estar diferencialmente expresados ante el tratamiento con glifosato. Para la comparación HasI t0_t72 se hallaron sobreexpresadas 20 genes CYT P450, 5 pertenecientes a transportadores del tipo ABC, 4 GST, 3 glicosil transferasas, 3 glucosil transferasas, 1 catalasa, 5 peroxidasas, 1 transportador catiónico (TkrkH), 2 oxidoreductasa y 1 fosfoenolpiruvato carboxilasa (Tabla Anexo 4). Para la comparación OV t0_t72 se hallaron sobreexpresados 38 genes CYT P450, 15 transportadores del tipo ABC, 8 GST, 8 glicosiltransferasas, 5 glucosiltransferasas, 1 catalasa, 5 peroxidasas, 1 transportador catiónico (TkrkH), 6 oxidoreductasas y 2 fosfoenolpiruvato carboxilasa (Tabla Anexo 5). En la Tabla 5. 8 se muestran los DEGs sobreexpresados tanto en OV como HASI (en función de su ID) en ambos biotipos ante el tratamiento a glifosato: 14 CYT P450, 5 transportadores ABC, 1 glicosiltransferasa, 1 glucosiltransferasa, 1 catalasa, 2 peroxidasas, 1 transportador catiónico, 1 oxidoreductasa y 1 fosfoenolpiruvato carboxilasa. Se puede observar que los valores de log2FC tiene valores similares entre ambos biotipos en algunos casos, pero en la mayoría se observa que el valor del Log2FC es mayor en OV t0_t72 (susceptible) que en HASI t0_t72 (resistente).

Se realizó la búsqueda de los genes DEGs de la intersección HASI t0_OV t0 y HASI t72_OVt72 (Figura 5. 3). De los 911 genes de la intersección, 456 no están anotados en el genoma de referencia. Entre los genes anotados se observaron dos genes de aldo ceto reductasa; ID: Sobic.003G355400; Descripción: similar to Aldose reductase) con un log2FC=3,5 (HasI t72_OVt72) e ID: Sobic.006G095800, Descripción: aldo/keto reductase con un log2FC=2,5 (HasI t72_OVt72), un gen Sobic.003G166875 que corresponde a una Transposasa vegetal perteneciente a la familia PttA/En/Spm con un Log2FC= 9,79 (HasI t72_OVt72). También se encontraron 3 genes de CYT-P450 (Sobic.003G166875, Sobic.009G064400 y Sobic.010G055300), 4 GST (Sobic.001G249600, Sobic.001G318432, Sobic.003G187100 y Sobic.007G095850) y un gen PDR (Sobic.002G321300).

Discusión

El glifosato es un herbicida de amplio espectro, de uso global en la agricultura, la evolución de las malezas resistentes a herbicidas plantea una problemática para los sistemas productivos, por lo cual una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de la resistencia contribuirá a la toma de decisiones, así como también la prevención de la aparición de nuevas resistencias.

En el caso de que la resistencia este dada por mecanismos NTSR el descubrimiento de cuáles son los genes o proteínas involucrados se vuelve complejo dado que puede involucrar muchas familia de genes simultáneamente (Gaines *et al.*, 2020). Por lo cual poder realizar una visualización general de los genes expresados en condiciones de aplicación del herbicida es importante para poder llegar a descubrir los

procesos involucrados. En lo que respecta al estudio de las malezas, la genómica y la transcriptómica han sido muy utilizadas para la investigación de la resistencia a herbicidas (Patterson *et al.*, 2019). Se han publicado genomas ensamblados de malezas como *C. canadensis*, *Echinochloa cruz-galli*, *Thlaspi arvense* y *Raphanus raphanistrum* (Ravet *et al.*, 2018). Están por completarse los genomas de otras malezas o se encuentran en diferentes grado de ensamblaje por ejemplo *Erigeron canadensis*, *Bassia scoparia* y *Eleusine indica* (Patterson *et al.*, 2019). También se han analizado el transcriptoma de varias malezas resistentes a glifosato para poder entender la base de los mecanismos NTSR en *C. canadensis* (Peng *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2021), *C. bonariensis* (Piasecki *et al.*, 2019), *L. multiflorum* (Cechin *et al.*, 2020), *Ipomea purpurea* (Leslie & Baucom, 2014) y *E. indica* (Chen *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021).

Tabla 5. 8. Consenso de los DEGs sobreexpresados involucrados en la resistencia NTSR en otras especies luego del tratamiento a glifosato.

ID	Description	HAS t0_t72		OV t0_t72	
		log2FC	padj	log2FC	padj
Sobic.001G147500	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	4,396	1,14E-10	5,178	1,95E-12
Sobic.001G147650	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	2,852	6,20E-04	2,923	0,004088
Sobic.001G164200	similar to Putative cytochrome P450-like protein	4,985	0,001087	12,518	6,16E-09
Sobic.001G172400	similar to Cytochrome P450 85A1	3,385	5,73E-05	3,678	2,00E-12
Sobic.001G192200	similar to Putative cytochrome P450	2,808	3,28E-08	3,665	1,76E-12
Sobic.001G213300	CYTOCHROME P450 86B1-RELATED	3,573	3,66E-05	6,586	3,96E-09
Sobic.001G359500	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed	2,515	8,85E-17	2,657	7,20E-13
Sobic.001G451700	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed	2,642	1,95E-09	2,829	6,55E-21
Sobic.001G510400	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed	2,393	3,99E-09	1,865	4,88E-05
Sobic.002G389100	similar to Putative cytochrome P450	2,484	0,001918	9,995	2,91E-14
Sobic.006G044100	similar to Putative cytochrome P450 71C4	6,988	5,39E-05	8,422	4,25E-08
Sobic.006G114600	similar to Cytochrome P450 724B1	2,251	0,009602	3,657	2,83E-05
Sobic.007G128000	similar to P450	6,195	3,56E-05	9,354	1,19E-09
Sobic.010G182966	similar to Putative cytochrome P-450 protein	4,459	4,51E-06	7,921	4,25E-26
Sobic.003G180400	similar to MDR-like ABC transporter	3,416	1,08E-08	8,188	5,85E-34
Sobic.009G034500	similar to MDR-like ABC transporter	1,929	4,15E-10	1,609	4,88E-05
Sobic.003G216232	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3	4,362	1,10E-09	6,430	4,04E-21
Sobic.003G216166	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3	3,516	1,09E-04	5,688	2,67E-14
Sobic.003G215800	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3	2,720	2,25E-04	3,794	3,70E-10
Sobic.003G047500	UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 73C7	3,948	1,49E-12	2,480	2,01E-12
Sobic.001G164900	UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 92A1	1,982	6,11E-14	1,729	0,009528
Sobic.003G368400	similar to Putative UDP-glucose:sterol glucosyltransferase	2,626	5,09E-17	2,514	3,88E-26
Sobic.010G274500	similar to Catalase isozyme 1	1,548	8,12E-07	3,123	1,82E-65
Sobic.010G115700	similar to Putative Peroxidase 49	5,082	3,09E-09	9,856	7,30E-13
Sobic.010G161600	similar to Peroxidase precursor	3,864	6,61E-24	2,500	0,00338
Sobic.006G208100	Cation transport protein (TrkH)	6,833	0,001659	10,736	8,39E-17
Sobic.001G526900	similar to Oxidoreductase,	4,050	2,70E-08	5,714	6,62E-22
Sobic.004G219900	similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 3	4,364	1,33E-31	4,768	7,18E-12

El RNAseq mide la abundancia de los transcriptos en un momento dado, los datos pueden ser utilizados para varios análisis, tales como la identificación de genes diferencialmente expresados entre tratamientos, análisis de variantes de secuencia o caracterización de *splicing* alternativo (Maroli *et al.*, 2018).

En el presente trabajo se realizó un ensayo de RNAseq en sorgo de Alepo resistente a glifosato contemplando un biotipo susceptible y uno resistente bajo tratamiento a glifosato para poder estudiar los genes diferencialmente expresados en dos condiciones: una previo a la aplicación del herbicida (0 HPA) y otra a 72 horas posteriores al tratamiento (72 HPA). Hasta el momento no se encontraron reportes de estudios transcriptómicos en esta maleza para la resistencia a glifosato.

La anotación de los genes se realizó utilizando el genoma de *S. bicolor* como referencia. Se detectaron 4887 transcriptos (codificados como MSTRG) que no están en la anotación original. De estos, 4352 son genes no codificantes y 535 genes codificantes. El número de transcriptos que no están en la anotación original puede deberse al hecho que se está utilizando un genoma diploide de otra especie como referencia o que algunos transcriptos codificantes no están en la referencia porque solo se expresan en las condiciones de tratamiento con glifosato. Aun así, esta es la referencia genómica emparentada más cercana dado que es uno de los complementos del genoma tetraploide del sorgo de Alepo. Un número importante de genes fueron diferencialmente expresados (p value ajustado (Bonferroni) $< 0,01$ y $FC > 2$) ante la aplicación de glifosato tanto en el biotipo susceptible como en el resistente. Al analizar el número de genes diferencialmente expresados en ambos biotipos en respuesta al tratamiento con glifosato se observa que el número de DEGs fue mayor en el biotipo susceptible (5818) vs resistente (3365) (Figura 5. 3 y Tabla 5. 1). De la totalidad de estos genes se seleccionaron los 10 con mayor nivel de sobreexpresión y los 10 con mayor nivel subexpresados (Tabla 5. 2). Varios de los genes no tienen descrita una función. Para el análisis de HASI con tratamiento se observa que el gen más sobreexpresado es una dehidrina, la misma pertenece a una familia de enzimas que juegan un rol importante en la tolerancia a estreses abióticos (respuesta a estrés por deshidratación), aunque también se las halló distribuidas en los tejidos vegetativos de las plantas en condiciones normales de crecimiento. Los mecanismos funcionales que se le atribuyen son: i) unión a iones metálicos, los cuales pueden inhibir la producción de ROS (especies reactivas del oxígeno), ii) el gran contenido de aminoácidos antioxidantes, como lisina, histidina y glicina pueden neutralizar las ROS mediante modificación oxidativa, iii) se pueden unir de forma no específica a proteínas y membranas de forma que puede proteger a las proteínas o membranas del daño generado por el estrés ambiental y iv) pueden unirse a ADN para protegerlo del daño (Liu *et al.*, 2017). Hay 4 genes de dehidrinas sobreexpresados en respuesta al glifosato en HASI con valores de $\log_2FC$ entre 5 y 10, en OV también hay 4 genes sobreexpresados y sus valores de $\log_2FC$ se encuentran entre 6 y 11. Los 4 genes son los mismos en ambos biotipos. En los genes subexpresados se encuentran una proteína DNJ, un factor de transcripción X-BOX y giberalina oxidasa. Entre los 10 primeros genes sobreexpresados ante la aplicación de glifosato, en el biotipo susceptible se encuentra

una isocitrato liasa, que es una enzima involucrada en el ciclo del glioxilato. En arroz se observó que hay sobreexpresión de esta enzima ante estrés salino y que se expresa en altos niveles en hojas senescentes comparado con hojas jóvenes no estresadas (Yuenyong *et al.*, 2019). Otro gen sobreexpresado es una triptófano decarboxilasa, una enzima citosólica, la cual es la primera en la síntesis de melatonina, importante para el desarrollo vegetal y la respuesta a estrés (Pang *et al.*, 2018). Entre los genes subexpresados se encuentra una giberlina oxidasa y una glutaredoxina es una tiol-disulfido oxidorreductasa, involucrada en respuesta a estrés con un rol clave como reguladora del metabolismo redox del cloroplastos (Couturier *et al.*, 2011).

La resistencia NTSR puede ser causada por un proceso de detoxificación que consta de 3 fases. La fase I, involucra la adición de un grupo funcional al herbicida vía reducción, oxidación o hidrólisis, que frecuentemente esta mediado por citocromo P450 (Gaines *et al.*, 2020). La Fase II, incluye una conjugación de una molécula hidrofílica como glutatión o glucosa, pasos que están mediados por glutatión S transferasas y glucosiltransferasas (Ghanizadeh & Harrington, 2017). La Fase III, compartimentalización del herbicida, involucra el transporte del herbicida hacia la vacuola o al espacio extracelular por transporte activo, función atribuida a transportadores del tipo ABC. Como se mencionó en el capítulo anterior, hay una diversa familia de genes que median el transporte utilizando la hidrólisis del ATP (Yuan *et al.*, 2007). Un mecanismo descubierto recientemente en *E. colona* involucra elevados niveles de aldo ceto reductasa, resultando en metabolizar más rápido el glifosato en AMPA (Gaines *et al.*, 2020)

El RNAseq es valioso para el estudio de familias de genes complejas, tales como las involucradas en la resistencia metabólica aumentada como citocromo P450, glutatión S transferasa, glucosiltransferasa o transportadores ABC (Maroli *et al.*, 2018)

En el análisis de términos GO la función con los mayores valores de enriquecimiento fue la de función molecular (MF) en el biotipo resistente (Figura 5. 6) siendo la actividad glucosiltransferasa y UDP-glicosiltransferasa los términos más enriquecidos, ambos involucrados en fase II. En fase II, GSTs y GTs detoxifican herbicidas conjugándolos con una amplia variedad de sustratos. Las GSTs están presentes en el citoplasma en altas concentraciones y catalizan la conjugación de glutatión produciendo un producto polar. La sobreexpresión de GST y GT en los biotipos resistentes podría indicar un incremento en la actividad de estas enzimas para lidiar con la acción del glifosato (Piasecki *et al.*, 2019). En el presente estudio observamos esto tanto en el análisis GO (Figura 5. 10) como en las listas de DEGs (Tabla 5. 8)

En los volcano plot se grafica la significación estadística frente al log2FC, brindando una visualización sencilla de los genes con mayores cambios y que también sean estadísticamente significativos (Figura 5. 10). Se realizó una lista con los 20 genes más significativos de cada una de las comparaciones estudiadas (Tabla 5. 4

a

Tabla 5. 7). Varios de estos genes codifican para proteínas sin caracterizar, algunos no tienen descripción asignada en la referencia y unos pocos no están anotados (MSTRG). Entre los más significativos para HASI (biotipo resistente) frente a la aplicación de glifosato encontramos una dehidrina sobreexpresada (Tabla 5. 4). Para OV el más significativo es un transportador catiónico sobreexpresado, según la base Uniprot su función es catalizar la hidrólisis de ATP acoplado al transporte de calcio, seguido por dos proteínas de unión a clorofila subexpresadas, se puede observar una dehidrina y también una oxidorreductasa (

Tabla 5. 5). Para los otros dos análisis en los cuales se comparan HASI y OV a 72 HPA (Figura 5. 10 c y Tabla 5. 6) y HASI y OV a 0 HPA (Figura 5. 10 d y

Tabla 5. 7) la cantidad de genes sin descripción o no anotados aumenta.

Adicionalmente se realizó una búsqueda en los DEGs en respuesta al tratamiento con glifosato de las familias de genes reportadas en otras malezas como responsables de la NTSR, genes de detoxificación de fase I, II y III (Cechin *et al.*, 2020; Gaines *et al.*, 2020; Ghanizadeh & Harrington, 2017; Peng *et al.*, 2010; Piasecki *et al.*, 2019; Rigon *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2007). Se pudieron identificar familias de genes de citocromo P450, transportadores ABC (descritos como *Pleiotropic drug resistance protein* y *MDR-like ABC transporter*), glutatión S transferasas, glicosiltransferasas, glucosiltransferasas, catalasa, peroxidasa, transportador catiónico, oxidorreductasas y también fosfoenolpiruvato carboxilasas (Tabla Anexo 4 y Tabla Anexo 5) algunos de los cuales fueron evaluados en simultáneo por qPCR a 24 y 72 HPA. Se observó que dentro de cada una de las familias había mayor cantidad de genes para el biotipo OV (susceptible) que para HASI (resistente). Adicionalmente también se evaluó entre estas dos listas si los genes encontrados estaban presentes en ambos biotipos en respuesta a glifosato (comparando por el número de ID) y varios eran compartidos (Tabla 5. 8) y al comparar los valores de log2FC entre resistente y susceptible se observó que estos valores son más altos en el susceptible en la mayoría de los casos. Se destacan los genes Sobic.003G047500 (UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 73C7) y Sobic.010G161600 (similar to Peroxidase precursor) para los cuales los valores de expresión son mayores en el biotipo resistente.

Otro gen reportado recientemente para resistencia metabólica a glifosato es la aldo ceto reductasa (Deng *et al.*, 2022; Pan *et al.*, 2019). Dos de estos genes se encontraron en la intersección HASI t0_OV t0 y HASI t72_OVt72 (Figura 5. 3). La aldo ceto reductasa (AKRs) es una superfamilia multigénica de oxidorreductasas dependientes de NADPH que median la detoxificación y el metabolismo en plantas (Krishnamurthy *et al.*, 2022). La sobreexpresión de EcAKR4-1 metaboliza glifosato para producir AMPA y glioxilato, lo que le confiere resistencia a glifosato en *E. colona* (Pan *et al.*, 2019). En *E. indica* el gen AKR se sobreexpresó postaplicación de glifosato en 2 de los 5 biotipos estudiados y un análisis de la proteína les arrojó un 66,1 % de identidad con la proteína de *E. colona* (Deng *et al.*, 2022).

También en esa intersección con un Log2FC= 9,79 se encontró sobreexpresado un gen de elementos transponibles pertenecientes a la subclase *En/Spm* (*enhancer/suppressor mutator element*) también

sobrexpresado. Las proteínas transposasas son necesarias para una transposición eficiente de los fragmentos de ADN. Esta familia incluye varias transposasas vegetales de las familias Pta y *En/Spm* (Blum *et al.*, 2021). Algunos de estos elementos transponibles (TE) *En/Spm* han sido reportados recientemente en la bibliografía mostrando estar sobrexpresados en *Alopecurus myosuroides* frente al tratamiento con herbicidas (clorotoluron y fenoxaprop) (Franco-Ortega *et al.*, 2021). También fueron identificados transcritos *En/Spm* en *Ipomea purpurea* resistente a glifosato (Leslie & Baucom, 2014). Los elementos transponibles son catalizadores de la variación genética y se sabe que se activan por el estrés ambiental, desempeñando papeles críticos en la adaptación de las plantas al estrés abiótico (Franco-Ortega *et al.*, 2021). En *K. scoparia* con amplificación en el número de copias de la EPSPS analizaron los genes coduplicados y hallaron bordes duplicados a ambos lados de la región amplificada, así como un elemento genético móvil asociado a la duplicación. Estos elementos móviles se hallaban flanqueando la región duplicada, con lo cual esta inserción de dos elementos móviles podría facilitar los eventos de *crossing-over* (Patterson *et al.*, 2019).

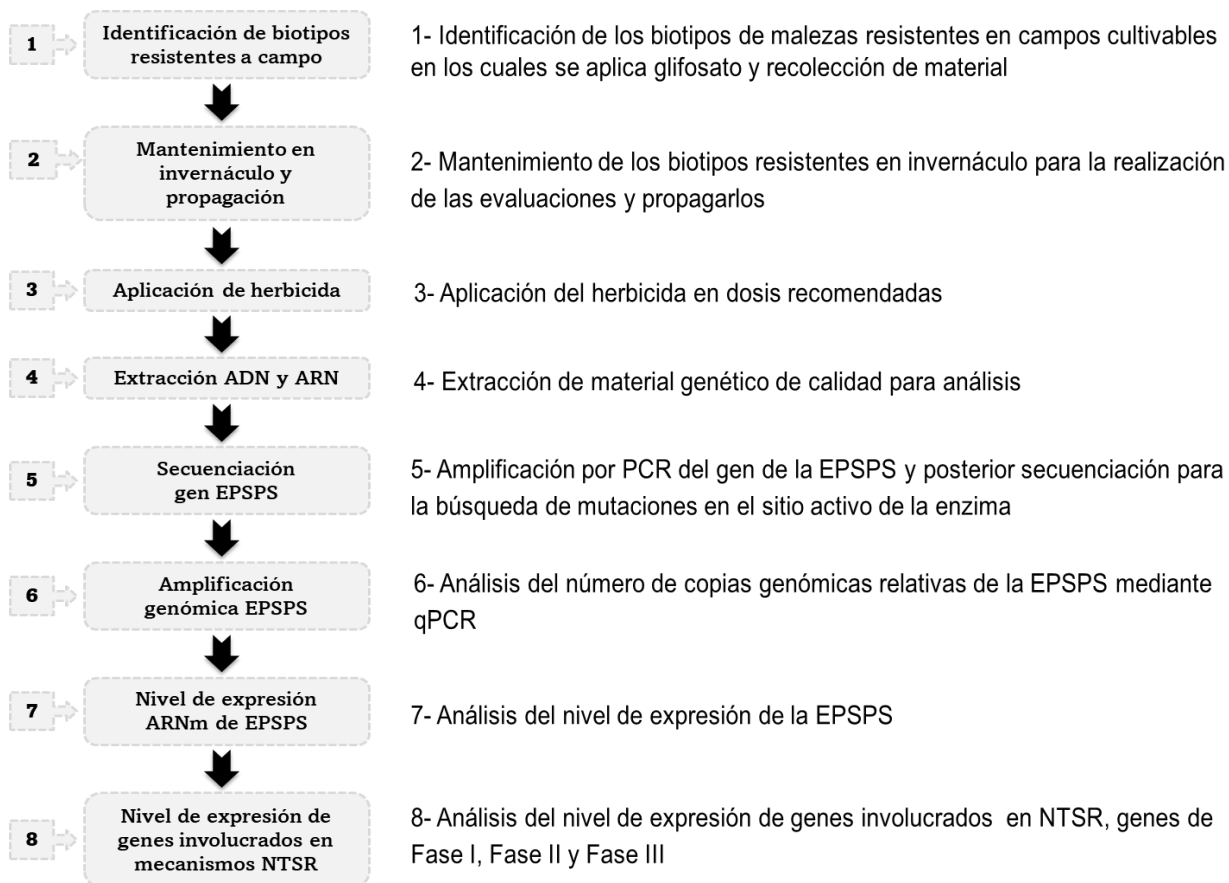
Giacomini y colaboradores en su revisión (Giacomini *et al.*, 2018) comentan la dificultad de detectar los verdaderos genes de resistencia entre las comparaciones de biotipos resistentes y susceptibles ante el tratamiento con el herbicida y explican que una de las razones de esta dificultad es que algunos genes NTSR van a ser sobrexpresados en ambos biotipos, pero que en el resistente la expresión se induce más rápido evitando así el daño letal, con lo cual encontrar el punto de tiempo en el que sólo el biotipo resistente muestra una mayor expresión no es trivial y probablemente requerirá de analizar la expresión en un rango de tiempo amplio. También en el estudio de *C. bonaerensis* (Piasecki *et al.*, 2019) realizaron un análisis transcriptómico y evaluaron genes mediante qPCR observando que para los transportadores ABC un incremento en los valores de la expresión de algunos de estos genes puede variar a lo largo del tiempo postaplicación del herbicida. Este punto se puede relacionar con lo observado al estudiar la expresión de los transportadores ABC en el capítulo anterior en el cual la tasa de cambio en algunos casos era menor a las 72 HPA que al momento previo a la aplicación; lo que también se observa en el número total de DEGs contabilizados en cada comparación, OV 5818 genes y HASI 3365.

En ese sentido, los resultados de los experimentos de RNA-Seq por sí solos no son suficientes para demostrar la existencia de un mecanismo candidato, deben ser considerados como una aproximación. El RNA-Seq permite generar hipótesis sólidas sobre la función de los genes candidatos; posteriormente es necesaria una validación para verificar la función (Maroli *et al.*, 2018). A partir de este trabajo, y de acuerdo con lo comentado anteriormente, se plantearon diferentes posibilidades en cuanto a los genes involucrados en la resistencia a glifosato que deberán ser evaluadas en trabajos futuros.

Conclusiones

- El análisis mediante marcadores moleculares permitió corroborar la hipótesis del origen múltiple de la resistencia a glifosato en las muestras estudiadas provenientes de distintas regiones del país. Luego de la implementación de los marcadores SSR se pudo establecer que los individuos resistentes comparten un fondo genético similar con los individuos susceptibles de su misma localidad en mayor medida que con los individuos resistentes de localidades más lejanas.
- A través de dos ensayos de ddRADseq se obtuvieron 11047 SNP y 264 SSR especie- específicos. Contar con marcadores desarrollados para sorgo de Alepo, constituye una valiosa herramienta para estudiar el genoma tetraploide de la especie. Una vez validados podrán ser utilizados para análisis de diversidad genética constituyendo una herramienta para continuar con los estudios de epidemiología molecular.
- El estudio de las secuencias nucleotídicas para el gen de la EPSPS no evidenció mutaciones en los sitios 101,102 y/o 106, descartando estas mutaciones del sitio blanco como causantes de la resistencia en los biotipos analizados.
- Se validaron genes de referencia estables para el análisis de expresión de genes mediante qPCR, bajo tratamiento con glifosato, siendo la primera vez que se reporta este tipo de análisis en la especie. Se analizaron 9 genes de referencia por diversos métodos y se determinó que los genes ARI8 y PP2A son los más adecuados para la realización de estos estudios.
- El análisis del número de copias del gen de la EPSPS mostró en algunos biotipos analizados un aumento significativo de la cantidad de copias, como por ejemplo en biotipos OST, SOR y PAV.
- El análisis del nivel de expresión de la EPSPS evidencio aumento en la expresión en biotipos HASI, HER 3 y SOR.

-
- El análisis en conjunto del número de copias genómico y del nivel de expresión de la EPSPS evidencio que los biotipos PAV, OST y SOR muestran un elevado número de copias y también altos niveles de expresión de la EPSPS
 - El análisis por qPCR de los genes transportadores del tipo ABC (i.e. MDR y PDR) y genes de detoxificación (C-P450, GST y CAT) a diferentes tiempos post aplicación de glifosato, evidenciaron niveles de expresión variable entre los diferentes genes y biotipos; en función de los genes analizados, los biotipos con una tasa de cambio elevada fueron:
 - En los genes MDR, para M2: todos los biotipos analizados HASI, HASII, HER3, HER5, OST, PAV y SOR; para M4: OST y para M8: HASI;
 - En los genes PDR, para P1: HASI, HASII, HER3 y SOR; para P3: HER5 y OST y para P6: OST, PAV y SOR;
 - En los genes de detoxificación, para GST: OST y SOR; para CAT: HASI, OST, PAV y SOR y para C-P450: SOR.
 - A partir del análisis del RNAseq se pudieron determinar genes candidatos diferencialmente expresados a ser validados, como el gen de la dehidrina, aldo-ceto reductasa y transposasa que se vieron sobreexpresados en el biotipo resistente. También se encontraron diferencialmente expresados genes responsables de los mecanismos reportados como NTSR como por ejemplo C-P450 (Fase I), glicosiltransferasa, catalasa, peroxidasa, oxidorreductasa (Fase II) y transportadores del tipo ABC (Fase III).
 - A partir del presente estudio se propone un procedimiento (*pipeline*) basado en herramientas genómicas para la identificación de las bases moleculares de la resistencia a glifosato. Estas herramientas moleculares pueden contribuir al monitoreo del surgimiento de la resistencia siendo de utilidad para los organismos de control y para el establecimiento de Políticas Públicas. El procedimiento involucra los siguientes pasos:



Referencias

- Aballay, M. M., Aguirre, N. C., Filippi, C. V., Valentini, G. H., & Sánchez, G. (2021). Fine-tuning the performance of ddRAD-seq in the peach genome. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85815-0>
- Adu-Yeboah, P., Malone, J. M., 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(4), 1214–1221. <https://doi.org/10.1002/ps.5671>
- Aguirre, N. C. (2020). *Desarrollo y aplicación de metodologías genómicas para el mejoramiento molecular de Eucalyptus dunnii mediante Mapeo por Asociación y Selección Genómica*. Universidad de Buenos Aires.
- Aguirre, N., Filippi, C., Zaina, G., Rivas, J., Acuña, C., Villalba, P., García, M., González, S., Rivarola, M., Martínez, M., Puebla, A., Morgante, M., Hopp, H., Paniego, N., & Marcucci Poltri, S. (2019). Optimizing ddRADseq in Non-Model Species: A Case Study in *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Agronomy*, 9(9), 484. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090484>
- Alarcón-Reverte, R., García, A., Watson, S. B., Abdallah, I., Sabaté, S., Hernández, M. J., Dayan, F. E., & Fischer, A. J. (2015). Concerted action of target-site mutations and high EPSPS activity in glyphosate-resistant junglerice (*Echinochloa colona*) from California. *Pest Management Science*, 71(7), 996–1007. <https://doi.org/10.1002/ps.3878>
- Amrhein, N., & Martinoia, E. (2021). An ABC transporter of the ABCC subfamily localized at the plasma membrane confers glyphosate resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(18), 1–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104746118>
- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11(10), R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Andreakis, N., Kooistra, W. H. C. F., & Procaccini, G. (2009). High genetic diversity and connectivity in the polyploid invasive seaweed *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniales) in the Mediterranean, explored with microsatellite alleles and multilocus genotypes. *Molecular Ecology*, 18(2), 212–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04022.x>
- Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., & Montgomery, J. (2019). *FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data*. (FastQC v0.11.9 was released on Aug 01, 2019). <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

-
- Argenbio. (n.d.). *Las plantas transgénicas*. Biotecnología. Retrieved November 25, 2022, from <https://www.argenbio.org/biotecnologia/la-biotecnologia?start=5>
- Au, A. M. (2003). PESTICIDES AND HERBICIDES | Types, Uses, and Determination of Herbicides. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 4483–4487). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00910-X>
- Baek, Y., Bobadilla, L. K., Giacomini, D. A., Montgomery, J. S., Murphy, B. P., & Tranel, P. J. (2021). *Evolution of Glyphosate-Resistant Weeds* (pp. 93–128). https://doi.org/10.1007/398_2020_55
- Baer, K. N., & Marcel, B. J. (2014). Glyphosate. In *Encyclopedia of Toxicology* (Vol. 2, pp. 767–769). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00148-2>
- Ball, E., & Pinedo-Donelli, S. (2020). Secuenciación de nueva generación: utilidad en dermatología. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 48(1), 47–62. <https://doi.org/10.35366/93979>
- Beckie, H. J. (2020). Herbicide resistance in plants. *Plants*, 9(4), 7–10. <https://doi.org/10.3390/plants9040435>
- Beckie, H. J., Ashworth, M. B., & Flower, K. C. (2019). Herbicide Resistance Management: Recent Developments and Trends. *Plants*, 8(6), 161. <https://doi.org/10.3390/plants8060161>
- Beres, Z. T., Giese, L. A., Mackey, D. M., Owen, M. D. K., Page, E. R., & Snow, A. A. (2020). Target-site EPSPS Pro-106-Ser mutation in *Conyza canadensis* biotypes with extreme resistance to glyphosate in Ohio and Iowa, USA. *Scientific Reports*, 10(1), 7577. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64458-7>
- Binimelis, R., Pengue, W., & Monterroso, I. (2009). “Transgenic treadmill”: Responses to the emergence and spread of glyphosate-resistant johnsongrass in Argentina. *Geoforum*, 40(4), 623–633. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2009.03.009>
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasaamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>
- Bo, A. B., Won, O. J., Sin, H. T., Lee, J. J., & Park, K. W. (2017). Mechanisms of herbicide resistance in weeds. *Korean Journal of Agricultural Science*, 44(1), 1–15. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20170001>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bonatelli, I. A. S., Carstens, B. C., & Moraes, E. M. (2015). Using Next Generation RAD Sequencing to Isolate Multispecies Microsatellites for *Pilosocereus* (Cactaceae). *PLOS ONE*, 10(11), e0142602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142602>
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2014). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12(1), 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
-

-
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cechin, J., Piasecki, C., Benemann, D. P., Kremer, F. S., Galli, V., Maia, L. C., Agostinetto, D., & Vargas, L. (2020). Transcriptome Analysis Identifies Candidate Target Genes Involved in Glyphosate-Resistance Mechanism in *Lolium multiflorum*. *Plants*, 9(6), 685. <https://doi.org/10.3390/plants9060685>
- Celario, R. P. (1958). Cytotaxonomic Notes on the Subsection Halepensis of the Genus *Sorghum*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 85(1), 49. <https://doi.org/10.2307/2482449>
- Chauhan, B. S. (2020). Grand Challenges in Weed Management. *Frontiers in Agronomy*, 1(January), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fagro.2019.00003>
- Chen, J., Huang, H., Zhang, C., Wei, S., Huang, Z., Chen, J., & Wang, X. (2015). Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta*, 242(4), 859–868. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2324-2>
- Chen, J., Huang, Z., Huang, H., Wei, S., Liu, Y., Jiang, C., Zhang, J., & Zhang, C. (2017). Selection of relatively exact reference genes for gene expression studies in goosegrass (*Eleusine indica*) under herbicide stress. *Scientific Reports*, 7(1), 46494. <https://doi.org/10.1038/srep46494>
- Chilton, M.-D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11(2), 263–271. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043-5)
- Clapp, J. (2021). Explaining Growing Glyphosate Use: The Political Economy of Herbicide-Dependent Agriculture. *Global Environmental Change*, 67(April 2020), 102239. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102239>
- Conte, S. S., & Lloyd, A. M. (2011). Exploring multiple drug and herbicide resistance in plants—Spotlight on transporter proteins. *Plant Science*, 180(2), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.10.015>
- Convention on Biological Diversity. (1992). *Cartagena Protocol on Biosafety*. <https://bch.cbd.int/protocol/text/>
- Couturier, J., Ströher, E., Albetel, A.-N., Roret, T., Muthuramalingam, M., Tarrago, L., Seidel, T., Tsan, P., Jacquot, J.-P., Johnson, M. K., Dietz, K.-J., Didierjean, C., & Rouhier, N. (2011). Arabidopsis Chloroplastic Glutaredoxin C5 as a Model to Explore Molecular Determinants for Iron-Sulfur Cluster Binding into Glutaredoxins. *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27515–27527. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228726>
- Crisci, J. V., & López Armengol, M. F. (1983). *Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica*. 128.
- Cultivos Genéticamente Modificados. (2021). *Cultivos Genéticamente Modificados*.
-

https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/biotecnologia/conabia/_pdf/Cultivos_GM.pdf

- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., & Durbin, R. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12(7), 499–510. <https://doi.org/10.1038/nrg3012>
- De Spiegelaere, W., Dern-Wieloch, J., Weigel, R., Schumacher, V., Schorle, H., Nettersheim, D., Bergmann, M., Brehm, R., Kliesch, S., Vandekerckhove, L., & Fink, C. (2015). Reference Gene Validation for RT-qPCR, a Note on Different Available Software Packages. *PLOS ONE*, 10(3), e0122515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122515>
- Délye, C. (2013). 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(2), 176–187. <https://doi.org/10.1002/ps.3318>
- Délye, C., Jasieniuk, M., & Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), 649–658. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.001>
- Deng, W., Duan, Z., Li, Y., Peng, C., & Yuan, S. (2022). Multiple Resistance Mechanisms Involved in Glyphosate Resistance in *Eleusine indica*. *Plants*, 11(23), 3199. <https://doi.org/10.3390/plants11233199>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). Infostat statistical software. *InfoStat Group, FCA, National University of Córdoba, Argentina*.
- Do, T. H. T., Martinoia, E., Lee, Y., & Hwang, J.-U. (2021). 2021 update on ATP-binding cassette (ABC) transporters: how they meet the needs of plants. *Plant Physiology*, 187(4), 1876–1892. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab193>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319–325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>
- Eventos con autorización comercial. (2022). *Eventos con autorización comercial en Argentina*. <https://www.argentina.gob.ar/agricultura/alimentos-y-bioeconomia/ogm-vegetal-eventos-con-autorizacion-comercial>
- Fernández, L., de Haro, L. A., Distefano, A. J., Carolina Martínez, M., Lía, V., Papa, J. C., Olea, I., Tosto, D., & Esteban Hopp, H. (2013). Population genetics structure of glyphosate-resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense* L. Pers.) does not support a single origin of the resistance. *Ecology and Evolution*, 3(10), n/a–

n/a. <https://doi.org/10.1002/ece3.671>

- Fernandez, O., Leguizamón, E., & Acciaresi, O. (2018). Malezas e invasoras de la Argentina. Tomo III: historia y biología. In *Editorial de la Universidad Nacional del Sur*. (I). Editorial de la Universidad Nacional del Sur.
- Fonseca, E. C. M., da Costa, K. S., Lameira, J., Alves, C. N., & Lima, A. H. (2020). Investigation of the target-site resistance of EPSP synthase mutants P106T and T102I/P106S against glyphosate. *RSC Advances*, 10(72), 44352–44360. <https://doi.org/10.1039/D0RA09061A>
- Franco-Ortega, S., Goldberg-Cavalleri, A., Walker, A., Brazier-Hicks, M., Onkokesung, N., & Edwards, R. (2021). Non-target Site Herbicide Resistance Is Conferred by Two Distinct Mechanisms in Black-Grass (*Alopecurus myosuroides*). *Frontiers in Plant Science*, 12(March), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.636652>
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., & Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13010–13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603638103>
- Gaines, T. ., & Heap, I. . (2022). *Mutations in herbicide-resistant weeds to Inhibition of Enolpyruvyl Shikimate Phosphate Synthase*. Online [Http://www.Weedscience.Com](http://www.weedscience.com).
- Gaines, T. A., Barker, A. L., Patterson, E. L., Westra, E. P., & Kniss, A. R. (2016). EPSPS Gene copy number and whole-plant glyphosate resistance level in *kochia scoparia*. *PLoS ONE*, 11(12), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168295>
- Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A. G., Tranel, P. J., Küpper, A., & Dayan, F. E. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30), 10307–10330. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013572>
- Gaines, T. A., Patterson, E. L., & Neve, P. (2019). Molecular mechanisms of adaptive evolution revealed by global selection for glyphosate resistance. *New Phytologist*, 223(4), 1770–1775. <https://doi.org/10.1111/nph.15858>
- Gaines, T. A., Slavov, G. T., Hughes, D., Küpper, A., Sparks, C. D., Oliva, J., Vila-Aiub, M. M., Garcia, M. A., Merotto, A., & Neve, P. (2021). Investigating the origins and evolution of a glyphosate-resistant weed invasion in South America. *Molecular Ecology*, 30(21), 5360–5372. <https://doi.org/10.1111/mec.16221>
- Gaines, T. A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S. T., Shaner, D. L., Nissen, S. J., Patzoldt, W. L., Tranel, P. J., Culpepper, A. S., Grey, T. L., Webster, T. M., Vencill, W. K., Sammons, R. D., Jiang, J., Preston, C., Leach, J. E., & Westra, P. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 1029–1034. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906649107>
- Galeano, E., Barroso, A. A. M., Vasconcelos, T. S., López-Rubio, A., Albrecht, A. J. P., Victoria Filho, R., &

-
- Carrer, H. (2016). EPSPS variability, gene expression, and enzymatic activity in glyphosate-resistant biotypes of *Digitaria insularis*. *Genetics and Molecular Research*, 15(3), 1–15. <https://doi.org/10.4238/gmr.15038730>
- Ganie, Z., Jugulam, M., Varanasi, V., & Jhala, A. J. (2017). Investigating mechanism of glyphosate resistance in a common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) biotype from Nebraska. *Canadian Journal of Plant Science*, 97(6), CJPS-2017-0036. <https://doi.org/10.1139/CJPS-2017-0036>
- Ge, S. X., Jung, D., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Ge, X., D'Avignon, D. A., Ackerman, J. J. H., & Sammons, R. D. (2010). Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science*, 66(4), 345–348. <https://doi.org/10.1002/ps.1911>
- Gerakari, M., Cheimona, N., Tani, E., Travlos, I., Chachalis, D., Loddó, D., Mathiassen, S. K., Gitsopoulos, T. K., Scarabel, L., Panozzo, S., Kristensen, M., Kudsk, P., & Sattin, M. (2021). Biochemical and Rapid Molecular Analyses to Identify Glyphosate Resistance in *Lolium* spp. *Agronomy*, 12(1), 40. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010040>
- Ghanizadeh, H., & Harrington, K. C. (2017). Non-target Site Mechanisms of Resistance to Herbicides. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36(1), 24–34. <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1316134>
- Gherekhloo, J., Fernández-Moreno, P. T., Alcántara-de la Cruz, R., Sánchez-González, E., Cruz-Hipólito, H. E., Domínguez-Valenzuela, J. A., & De Prado, R. (2017). Pro-106-Ser mutation and EPSPS overexpression acting together simultaneously in glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*). *Scientific Reports*, 7(1), 6702. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06772-1>
- Ghersa, C. M., Satorre, E. H., Van Esso, M. L., Pataro, A., & Elizagaray, R. (1990). The use of thermal calendar models to improve the efficiency of herbicide applications in *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Weed Research*, 30(3), 153–160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1990.tb01699.x>
- Giacomini, D. A., Gaines, T., Beffa, R., & Tranel, P. J. (2018). Optimizing RNA-seq studies to investigate herbicide resistance. *Pest Management Science*, 74(10), 2260–2264. <https://doi.org/10.1002/ps.4822>
- Goedhart, J., & Luijsterburg, M. S. (2020). VolcanoR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Scientific Reports*, 10(1), 20560. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76603-3>
- González-Torralva, F., Brown, A. P., & Chivasa, S. (2017). Comparative proteomic analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) biotypes identifies candidate proteins for glyphosate resistance. *Scientific Reports*, 7(1), 42565. <https://doi.org/10.1038/srep42565>
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1178–D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
-

-
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Gower, J. C. (1971). A General Coefficient of Similarity and Some of Its Properties. *Biometrics*, 27(4), 857. <https://doi.org/10.2307/2528823>
- Green, J. M. (2014). Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Management Science*, 70(9), 1351–1357. <https://doi.org/10.1002/ps.3727>
- Green, J. M. (2018). The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science*, 74(5), 1035–1039. <https://doi.org/10.1002/ps.4462>
- Gutiérrez, A., Filippi, C., Aguirre, N., Puebla, A., Acuña, C., Taboada, G., & Ortega-Baes, F. (2021). Development of novel SSR molecular markers using a Next-Generation Sequencing approach (ddRADseq) in *Stetsonia coryne* (Cactaceae). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 93(suppl 3). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201778>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Hall, T. A. (1999). BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Han, H., Yu, Q., Widderick, M. J., & Powles, S. B. (2016). Target-site EPSPS Pro-106 mutations: sufficient to endow glyphosate resistance in polyploid *Echinochloa colona* ? *Pest Management Science*, 72(2), 264–271. <https://doi.org/10.1002/ps.4038>
- Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W., & Zhou, B. (2015). Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9s1, BBI.S28991. <https://doi.org/10.4137/BBI.S28991>
- Harlan, J., & DeWet, J. (1965). Some Thoughts about Weeds. *Economic Botany*, 19, 16–24. <https://www.jstor.org/stable/4252561>
- Heap. (2014). Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Management Science*, 70(9), 1306–1315. <https://doi.org/10.1002/ps.3696>
- Heap. (2022). *The international herbicide-resistant weed database*. 2010. www.weedscience.org
- Heap, I., & Duke, S. O. (2018). Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Management Science*, 74(5), 1040–1049. <https://doi.org/10.1002/ps.4760>
- Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science*, 17(10), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.008>
- Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J. V., & Herberger, J. P. (1977). *The world's worst weeds. Distribution*
-

and biology. University press of Hawaii.

- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Hwang, J.-U., Song, W.-Y., Hong, D., Ko, D., Yamaoka, Y., Jang, S., Yim, S., Lee, E., Khare, D., Kim, K., Palmgren, M., Yoon, H. S., Martinoia, E., & Lee, Y. (2016). Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle. *Molecular Plant*, 9(3), 338–355. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.02.003>
- Idrees, M., & Irshad, M. (2014). Molecular Markers in plants for analysis of genetic diversity: A review. *European Academic Research*, 2(1), 1513–1540.
- ISAAA. (2019). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019*. 55, 2017. https://www.isaaa.org/resources/infographics/doyouknowwherebiotechcropsaregrown/2019_Do_You_Know_Where_Biotech_Crops_Are_Grown.pdf
- ISAAA Database. (2022). *GM Approval Database*. <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>
- James, C. (2015). *ISAAA Briefs 20 Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015 BRIEF 51* (Issue 51).
- Johnson, W. G., Davis, V. M., Kruger, G. R., & Weller, S. C. (2009). Influence of glyphosate-resistant cropping systems on weed species shifts and glyphosate-resistant weed populations. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.03.008>
- Jugulam, & Shyam. (2019). Non-Target-Site Resistance to Herbicides: Recent Developments. *Plants*, 8(10), 417. <https://doi.org/10.3390/plants8100417>
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., & Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. *The Arabidopsis Book*, 9, e0153. <https://doi.org/10.1199/tab.0153>
- Kang, Y. J., Yang, D. C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y. Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: A fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W12–W16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx428>
- Kassambara, A., & Mundt, F. (2017). *Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R Package Version 1.0.7*. (R Package Version 1.0.7.; pp. 337–354). <https://cran.r-project.org/package=factoextra>
- Kaundun, S. S., Dale, R. P., Zelaya, I. A., Dinelli, G., Marotti, I., McIndoe, E., & Cairns, A. (2011). A Novel P106L Mutation in EPSPS and an Unknown Mechanism(s) Act Additively To Confer Resistance to Glyphosate in a South African *Lolium rigidum* Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3227–3233. <https://doi.org/10.1021/jf104934j>
- Koch, C. M., Chiu, S. F., Akbarpour, M., Bharat, A., Ridge, K. M., Bartom, E. T., & Winter, D. R. (2018). A Beginner's Guide to Analysis of RNA Sequencing Data. *American Journal of Respiratory Cell and*

Molecular Biology, 59(2), 145–157. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0430TR>

- Kordrostami, M., & Rahimi, M. (2015). Molecular markers in plants: Concepts and applications. *Genetics in the Third Millennium*, 13(2), 4024–4031.
- Kreiner, J. M., Stinchcombe, J. R., & Wright, S. I. (2018). Population Genomics of Herbicide Resistance: Adaptation via Evolutionary Rescue. *Annual Review of Plant Biology*, 69(November 2017), 611–635. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040038>
- Krishnamurthy, P., Pothiraj, R., Suthanthiram, B., Somasundaram, S. M., & Subbaraya, U. (2022). Phylogenomic classification and synteny network analyses deciphered the evolutionary landscape of aldo-keto reductase (AKR) gene superfamily in the plant kingdom. *Gene*, 816, 146169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146169>
- Kuester, A., Chang, S., & Baucom, R. S. (2015). The geographic mosaic of herbicide resistance evolution in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*: Evidence for resistance hotspots and low genetic differentiation across the landscape. *Evolutionary Applications*, 8(8), 821–833. <https://doi.org/10.1111/eva.12290>
- Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A. K., Singh, A., Jha, A. K., Yadava, P., Choudhary, M., & Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251(4), 91. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8>
- Küpper, A., Manmathan, H. K., Giacomini, D., Patterson, E. L., McCloskey, W. B., & Gaines, T. A. (2018). Population Genetic Structure in Glyphosate-Resistant and -Susceptible Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) Populations Using Genotyping-by-sequencing (GBS). *Frontiers in Plant Science*, 9(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00029>
- Lange, V., Böhme, I., Hofmann, J., Lang, K., Sauter, J., Schöne, B., Paul, P., Albrecht, V., Andreas, J. M., Baier, D. M., Nething, J., Ehninger, U., Schwarzelt, C., Pingel, J., Ehninger, G., & Schmidt, A. H. (2014). Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics*, 15(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-63>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Leguizamón, E. (2012). Sorgo de Alepo. Bases para su manejo y control en sistemas de producción. In *Manejo de malezas problema*. REM - AAPRESID.
- Leslie, T., & Baucom, R. S. (2014). De novo assembly and annotation of the transcriptome of the agricultural weed *Ipomoea purpurea* uncovers gene expression changes associated with herbicide resistance. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(10), 2035–2047. <https://doi.org/10.1534/g3.114.013508>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923–930.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>

- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2019). The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*, 47(8). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>
- Liu, Y., Song, Q., Li, D., Yang, X., & Li, D. (2017). Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, 8(June), 2015–2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01018>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Malone, J. M., Morran, S., Shirley, N., Boutsalis, P., & Preston, C. (2016). EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Bromus diandrus*. *Pest Management Science*, 72(1), 81–88. <https://doi.org/10.1002/ps.4019>
- Maroli, A. S., Gaines, T. A., Foley, M. E., Duke, S. O., Dođramaci, M., Anderson, J. V., Horvath, D. P., Chao, W. S., & Tharayil, N. (2018). Omics in Weed Science: A Perspective from Genomics, Transcriptomics, and Metabolomics Approaches. *Weed Science*, 66(6), 681–695. <https://doi.org/10.1017/wsc.2018.33>
- Martin, S. L., Benedict, L., Wei, W., Sauder, C. A., Beckie, H. J., & Hall, L. M. (2020). High gene flow maintains genetic diversity following selection for high EPSPS copy number in the weed kochia (Amaranthaceae). *Scientific Reports*, 10(1), 18864. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75345-6>
- McCormick, R. F., Truong, S. K., Sreedasyam, A., Jenkins, J., Shu, S., Sims, D., Kennedy, M., Amirebrahimi, M., Weers, B. D., McKinley, B., Mattison, A., Morishige, D. T., Grimwood, J., Schmutz, J., & Mullet, J. E. (2018). The *Sorghum bicolor* reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome organization. *The Plant Journal*, 93(2), 338–354. <https://doi.org/10.1111/tpj.13781>
- Moretti, M. L., Alárcon-Reverte, R., Pearce, S., Morran, S., & Hanson, B. D. (2017). Transcription of putative tonoplast transporters in response to glyphosate and paraquat stress in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* and selection of reference genes for qRT-PCR. *PLOS ONE*, 12(7), e0180794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180794>
- Muñiz Padilla, E., Ulrich, N., Gieco, L., Ayala, F., Fresoli, D., Tuesca, D., & Tosto, D. (2018). Caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a glifosato en cuatro poblaciones de raigras (*Lolium multiflorum* L.) de Entre Ríos. *II Congreso Argentino de Malezas “ASACIM” Malezas 2018*, 328. <http://www.asacim.org.ar/wp-content/uploads/2019/10/Argentina-2018.pdf>
- Murphy, B. P., & Tranel, P. J. (2019). Target-Site Mutations Conferring Herbicide Resistance. *Plants*, 8(10), 382. <https://doi.org/10.3390/plants8100382>
- Nawrocki, E. P., & Eddy, S. R. (2013). Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics*,

-
- 29(22), 2933–2935. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt509>
- Neve, P., Busi, R., Renton, M., & Vila-Aiub, M. M. (2014). Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. *Pest Management Science*, 70(9), 1385–1393. <https://doi.org/10.1002/ps.3757>
- Ngo, T. D., Malone, J. M., Boutsalis, P., Gill, G., & Preston, C. (2018). EPSPS gene amplification conferring resistance to glyphosate in windmill grass (*Chloris truncata*) in Australia. *Pest Management Science*, 74(5), 1101–1108. <https://doi.org/10.1002/ps.4573>
- Noguera, M. M., Porri, A., Werle, I. S., Heiser, J., Brändle, F., Lerchl, J., Murphy, B., Betz, M., Gatzmann, F., Penkert, M., Tuerk, C., Meyer, L., & Roma-Burgos, N. (2022). Involvement of glutamine synthetase 2 (GS2) amplification and overexpression in *Amaranthus palmeri* resistance to glufosinate. *Planta*, 256(3), 57. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03968-2>
- Nol, N., Tsikou, D., Eid, M., Livieratos, I. C., & Giannopolitis, C. N. (2012). Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript levels of EPSPS and ABC transporter genes. *Weed Research*, 52(3), 233–241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2012.00911.x>
- Nuruzzaman, M., Zhang, R., Cao, H.-Z., & Luo, Z.-Y. (2014). Plant Pleiotropic Drug Resistance Transporters: Transport Mechanism, Gene Expression, and Function. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(8), 729–740. <https://doi.org/10.1111/jipb.12196>
- Oksanen, A. J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P. R., Hara, R. B. O., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., & Szoecs, E. (2013). *Package ‘vegan’*. January, 0–291.
- Olawuyi, & Ologidi. (2018). Genomic Survey of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Plant Sciences and Crop Protection*, 1(1), 1–13. <https://doi.org/10.15744/2639-3336.1.102>
- Oliveros, J. C. (2007). *Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn’s diagrams*. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Page, E. R., Grainger, C. M., Laforest, M., Nurse, R. E., Rajcan, I., Bae, J., & Tardif, F. J. (2018). Target and Non-target site Mechanisms Confer Resistance to Glyphosate in Canadian Accessions of *Conyza canadensis*. *Weed Science*, 66(2), 234–245. <https://doi.org/10.1017/wsc.2017.69>
- Pan, L., Yu, Q., Han, H., Mao, L., Nyporko, A., Fan, L., Bai, L., & Powles, S. (2019). Aldo-keto Reductase Metabolizes Glyphosate and Confers Glyphosate Resistance in *Echinochloa colona*. *Plant Physiology*, 181(4), 1519–1534. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00979>
- Pan, L., Yu, Q., Wang, J., Han, H., Mao, L., Nyporko, A., Maguza, A., Fan, L., Bai, L., & Powles, S. (2021). An ABCC-type transporter endowing glyphosate resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(16), 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100136118>
-

-
- Pang, X., Wei, Y., Cheng, Y., Pan, L., Ye, Q., Wang, R., Ruan, M., Zhou, G., Yao, Z., Li, Z., Yang, Y., Liu, W., & Wan, H. (2018). The tryptophan decarboxylase in *solanum lycopersicum*. *Molecules*, 23(5), 22–25. <https://doi.org/10.3390/molecules23050998>
- Paterson, A. H., Kong, W., Johnston, R. M., Nabukalu, P., Wu, G., Poehlman, W. L., Goff, V. H., Isaacs, K., Lee, T.-H., Guo, H., Zhang, D., Sezen, U. U., Kennedy, M., Bauer, D., Feltus, F. A., Weltzien, E., Rattunde, H. F., Barney, J. N., Barry, K., ... Scanlon, M. J. (2020). The Evolution of an Invasive Plant, *Sorghum halepense* L. ('Johnsongrass'). *Frontiers in Genetics*, 11(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00317>
- Paterson, A. H., Schertz, K. F., Lin, Y. R., Liu, S. C., & Chang, Y. L. (1995). The weediness of wild plants: molecular analysis of genes influencing dispersal and persistence of johnsongrass, *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), 6127–6131. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.6127>
- Patterson, E. L., Pettinga, D. J., Ravet, K., Neve, P., & Gaines, T. A. (2018). Glyphosate Resistance and EPSPS Gene Duplication: Convergent Evolution in Multiple Plant Species. *Journal of Heredity*, 109(2), 117–125. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx087>
- Patterson, E. L., Saski, C. A., Sloan, D. B., Tranel, P. J., Westra, P., & Gaines, T. A. (2019). The Draft Genome of *Kochia scoparia* and the Mechanism of Glyphosate Resistance via Transposon-Mediated EPSPS Tandem Gene Duplication. *Genome Biology and Evolution*, 11(10), 2927–2940. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz198>
- Patterson, E. L., Saski, C., Küpper, A., Beffa, R., & Gaines, T. A. (2019). Omics Potential in Herbicide-Resistant Weed Management. *Plants*, 8(12), 607. <https://doi.org/10.3390/plants8120607>
- Peng, Y., Abercrombie, L. L. G., Yuan, J. S., Riggins, C. W., Sammons, R. D., Tranel, P. J., & Stewart, C. N. (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(10), 1053–1062. <https://doi.org/10.1002/ps.2004>
- Perotti, V. E., Larran, A. S., Palmieri, V. E., Martinatto, A. K., Alvarez, C. E., Tuesca, D., & Permingeat, H. R. (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(5), 1242–1251. <https://doi.org/10.1002/ps.5303>
- Pertea, G., & Pertea, M. (2020). GFF Utilities: GffRead and GffCompare [version 1; peer review: awaiting peer review]. *F1000Research*, 9(304), 304.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290–295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>
-

-
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS ONE*, 7(5), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Petit, C., Pernin, F., Heydel, J.-M., & Délye, C. (2012). Validation of a set of reference genes to study response to herbicide stress in grasses. *BMC Research Notes*, 5(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-18>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- Piasecki, C., Yang, Y., Benemann, D. P., Kremer, F. S., Galli, V., Millwood, R. J., Cechin, J., Agostinetto, D., Maia, L. C., Vargas, L., & Neal Stewart Jr, C. (2019). *Transcriptomic Analysis Identifies New Non-Target Site Glyphosate-Resistance Genes in Conyza bonariensis*. 8, 157. <https://doi.org/10.3390/plants8060157>
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., & Siddiq, E. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9–17.
- R Core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>.
- Radosevich, S. R., Holt, J. S., & Ghera, C. M. (2007). Ecology of Weeds and Invasive Plants. In *Ecology of Weeds and Invasive Plants*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470168943>
- Ravet, K., Patterson, E. L., Krähmer, H., Hamouzová, K., Fan, L., Jasieniuk, M., Lawton-Rauh, A., Malone, J. M., McElroy, J. S., Merotto, A., Westra, P., Preston, C., Vila-Aiub, M. M., Busi, R., Tranel, P. J., Reinhardt, C., Saski, C., Beffa, R., Neve, P., & Gaines, T. A. (2018). The power and potential of genomics in weed biology and management. *Pest Management Science*, 74(10), 2216–2225. <https://doi.org/10.1002/ps.5048>
- Ravet, K., Sparks, C. D., Dixon, A. L., Küpper, A., Westra, E. P., Pettinga, D. J., Tranel, P. J., Felix, J., Morishita, D. W., Jha, P., Kniss, A., Stahlman, P. W., Neve, P., Patterson, E. L., Westra, P., & Gaines, T. A. (2021). Genomic-based epidemiology reveals independent origins and gene flow of glyphosate resistance in *Bassia scoparia* populations across North America. *Molecular Ecology*, 30(21), 5343–5359. <https://doi.org/10.1111/mec.16215>
- Reineke, A., & Devi, K. U. (2013). *Genetic Fingerprinting Techniques for Molecular Characterisation of Microbes* (Issue January 2018, pp. 37–72). https://doi.org/10.1007/978-3-642-34410-7_4
- REM. (2021). *Malezas: continúa el avance de las resistencias*. Aapresid.
-

<https://www.aapresid.org.ar/blog/malezas-continua-avance-resistencias>

REM. (2022). Aapresid. <https://www.aapresid.org.ar/rem-malezas/mapa-malezas>

Riar, D. S., Norsworthy, J. K., Johnson, D. B., Scott, R. C., & Bagavathiannan, M. (2011). Glyphosate Resistance in a Johnsongrass (*Sorghum halepense*) Biotype from Arkansas. *Weed Science*, 59(3), 299–304. <https://doi.org/10.1614/WS-D-10-00150.1>

Rigon, C. A. G., Gaines, T. A., Küpper, A., & Dayan, F. E. (2020). Metabolism-based herbicide resistance, the major threat among the non-target site resistance mechanisms. *Outlooks on Pest Management*, 31(4), 162–168. https://doi.org/10.1564/v31_aug_04

Rodzen, J. (2004). Estimation of parentage and relatedness in the polyploid white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci. *Aquaculture*, 232(1–4), 165–182. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00450-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00450-2)

Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), e45–e45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>

Salas, R. A., Dayan, F. E., Pan, Z., Watson, S. B., Dickson, J. W., Scott, R. C., & Burgos, N. R. (2012). EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. multiflorum) from Arkansas. *Pest Management Science*, 68(9), 1223–1230. <https://doi.org/10.1002/ps.3342>

Salas, R. A., Scott, R. C., Dayan, F. E., & Burgos, N. R. (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(25), 5885–5893. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00018>

Sammons, R. D., & Gaines, T. A. (2014). Glyphosate resistance: State of knowledge. *Pest Management Science*, 70(9), 1367–1377. <https://doi.org/10.1002/ps.3743>

Satorre, E. H. (2017). Ciencia y Tecnología en el problema de las malezas de los cultivos extensivos de granos. *Anales de La Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*, LXX, 102–117.

Schneider, T., Rizzardi, M. A., Grando, M. F., Ceccon, C. C., Nunes, A. L., & Didone, D. (2020). Expression of genes related to the mechanism of resistance of *Conyza sumatrensis* to glyphosate. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 43, e44824. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.44824>

Shaner, D. L., Lindenmeyer, R. B., & Ostlie, M. H. (2012). What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? *Pest Management Science*, 68(1), 3–9. <https://doi.org/10.1002/ps.2261>

Sharma, G., Barney, J. N., Westwood, J. H., & Haak, D. C. (2021). Into the weeds: new insights in plant stress. *Trends in Plant Science*, 26(10), 1050–1060. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.06.003>

Shimono, A., Kanbe, H., Nakamura, S., Ueno, S., Yamashita, J., & Asai, M. (2020). Initial invasion of glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri* around grain-import ports in Japan. *PLANTS, PEOPLE,*

-
- PLANET*, 2(6), 640–648. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10156>
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
- Spooner, D., van Treuren, R., & de Vicente, M. (2005). Molecular markers for genebank management. *IPGRI Technical Bulletin*, 10. https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Molecular_markers_for_genebank_management_1082.pdf
- Su, X., Lu, L., Li, Y., Zhen, C., Hu, G., Jiang, K., Yan, Y., Xu, Y., Wang, G., Shi, M., Chen, X., & Zhang, B. (2020). Reference gene selection for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) expression analysis in *Galium aparine* L. *PLOS ONE*, 15(2), e0226668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226668>
- Su, Y.-H., Frommer, W. B., & Ludewig, U. (2004). Molecular and Functional Characterization of a Family of Amino Acid Transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(2), 3104–3113. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045278>
- Sudhakar Reddy, P., Srinivas Reddy, D., Sivasakthi, K., Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. K. (2016). Evaluation of *Sorghum* [*Sorghum bicolor* (L.)] Reference Genes in Various Tissues and under Abiotic Stress Conditions for Quantitative Real-Time PCR Data Normalization. *Frontiers in Plant Science*, 7(APR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00529>
- Sundaram, V. K., Sampathkumar, N. K., Massaad, C., & Grenier, J. (2019). Optimal use of statistical methods to validate reference gene stability in longitudinal studies. *PLOS ONE*, 14(7), e0219440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219440>
- Tani, E., Chachalis, D., & Travlos, I. S. (2015). A Glyphosate Resistance Mechanism in *Conyza canadensis* Involves Synchronization of EPSPS and ABC-transporter Genes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(6), 1721–1730. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0868-8>
- Torales, S. L., Rivarola, M., Gonzalez, S., Inza, M. V., Pomponio, M. F., Fernández, P., Acuña, C. V., Zelener, N., Fornés, L., Hopp, H. E., Paniego, N. B., & Marcucci Poltri, S. N. (2018). De novo transcriptome sequencing and SSR markers development for *Cedrela balansae* C.DC., a native tree species of northwest Argentina. *PLOS ONE*, 13(12), e0203768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203768>
- Torra, J., Gonzalez, I., Recasens, J., Clemente, B., García, C., & Montul, J. (2022). Nuevos mecanismos de acción herbicida y actualización de su sistema de clasificación. *PHYTOMA*, February.
- Torra, J., Osuna, M. D., Merotto, A., & Vila-Aiub, M. (2021). Editorial: Multiple Herbicide-Resistant Weeds and Non-target Site Resistance Mechanisms: A Global Challenge for Food Production. *Frontiers in Plant Science*, 12(October), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.763212>
- Tranel, P. J. (2017). Herbicide-resistance mechanisms: gene amplification is not just for glyphosate. *Pest*
-

Management Science, 73(11), 2225–2226. <https://doi.org/10.1002/ps.4679>

- Ulrich, M. N., Muñiz-Padilla, E., Corach, A., Hopp, E., & Tosto, D. (2021). Validation of Reference Genes for Quantitative PCR in Johnsongrass (*Sorghum halepense* L.) under Glyphosate Stress. *Plants*, 10(8), 1555. <https://doi.org/10.3390/plants10081555>
- Ustarroz, D. (2015). *Resistencia múltiple de Sorghum halepense (sorgo de Alepo) a glifosato y haloxifop R-metil en la provincia de Córdoba, Argentina*. <http://weedscience.org/documents/showdocuments.aspx?DocumentID=1372>
- Van Etten, M., Lee, K. M., Chang, S.-M., & Baucom, R. S. (2020). Parallel and nonparallel genomic responses contribute to herbicide resistance in *Ipomoea purpurea*, a common agricultural weed. *PLOS Genetics*, 16(2), e1008593. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008593>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., Åman, P., Semb, H., Powers, D., Aurias, A., & Thomas, G. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Vats, S. (2015). *Herbicides: History, Classification and Genetic Manipulation of Plants for Herbicide Resistance* (pp. 153–192). https://doi.org/10.1007/978-3-319-09132-7_3
- Vazquez-Garcia, J. G., Palma-Bautista, C., Rojano-Delgado, A. M., De Prado, R., & Menendez, J. (2020). The First Case of Glyphosate Resistance in Johnsongrass (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) in Europe. *Plants*, 9(3), 313. <https://doi.org/10.3390/plants9030313>
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. P., Yazaki, K., & Theodoulou, F. L. (2008). Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, 13(4), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.02.001>
- Vila-Aiub, M. M., Balbi, M. C., Gundel, P. E., Ghersa, C. M., & Powles, S. B. (2007). Evolution of Glyphosate-Resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense*) in Glyphosate-Resistant Soybean. *Weed Science*, 55(6), 566–571. <https://doi.org/10.1614/WS-07-053.1>
- Wang, Z., Chen, Y., Fang, H., Shi, H., Chen, K., Zhang, Z., & Tan, X. (2014). Selection of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in *Brassica napus* under various stress conditions. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 289(5), 1023–1035. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0853-1>
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). DNA Fingerprinting in Plants. In *DNA Fingerprinting in Plants*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420040043>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>

-
- Wiersma, A. T., Gaines, T. A., Preston, C., Hamilton, J. P., Giacomini, D., Robin Buell, C., Leach, J. E., & Westra, P. (2015). Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. *Planta*, 241(2), 463–474. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2197-9>
- Wrzesińska, B., Kierzek, R., & Obrępańska-Stęplowska, A. (2016). Evaluation of six commonly used reference genes for gene expression studies in herbicide-resistant *Avena fatua* biotypes. *Weed Research*, 56(4), 284–292. <https://doi.org/10.1111/wre.12209>
- WSSA. (1998). Herbicide Resistance and Herbicide Tolerance Definitions. *Weed Technology*, 12(4), 789. <https://wssa.net/wssa/weed/resistance/herbicide-resistance-and-herbicide-tolerance-definitions/>
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Xu, L., Xu, H., Cao, Y., Yang, P., Feng, Y., Tang, Y., Yuan, S., & Ming, J. (2017). Validation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR during Bicolor Tepal Development in Asiatic Hybrid Lilies (*Lilium* spp.). *Frontiers in Plant Science*, 8(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00669>
- Xu, X., Liu, X., Chen, S., Li, B., Wang, X., Fan, C., Wang, G., & Ni, H. (2016). Selection of relatively exact reference genes for gene expression studies in flaxweed (*Descurainia sophia*) by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 127, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.09.007>
- Yang, H., Krebs, M., Stierhof, Y.-D., & Ludewig, U. (2014). Characterization of the putative amino acid transporter genes AtCAT2, 3 & 4: The tonoplast localized AtCAT2 regulates soluble leaf amino acids. *Journal of Plant Physiology*, 171(8), 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.11.012>
- Yang, Y., Gardner, C., Gupta, P., Peng, Y., Piasecki, C., Millwood, R. J., Ahn, T.-H., & Stewart, C. N. (2021). Novel Candidate Genes Differentially Expressed in Glyphosate-Treated Horseweed (*Conyza canadensis*). <https://doi.org/10.3390/genes12101616>
- Yannicari, M., Gómez-Lobato, M. E., Istilart, C., Natalucci, C., Giménez, D. O., & Castro, A. M. (2017). Mechanism of Resistance to Glyphosate in *Lolium perenne* from Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5(OCT), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00123>
- Yannicari, M., Vázquez-García, J. G., Gómez-Lobato, M. E., Rojano-Delgado, A. M., Alves, P. L. da C. A., & De Prado, R. (2021). First Case of Glyphosate Resistance in *Bromus catharticus* Vahl.: Examination of Endowing Resistance Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 12(February). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.617945>
- Yannicari, M., Vázquez-García, J. G., Gigón, R., Palma-Bautista, C., Vila-Aiub, M., & De Prado, R. (2022). A novel EPSPS Pro-106-His mutation confers the first case of glyphosate resistance in *Digitaria sanguinalis*. *Pest Management Science*, 78(7), 3135–3143. <https://doi.org/10.1002/ps.6940>
-

-
- Yazaki, K., Shitan, N., Sugiyama, A., & Takanashi, K. (2009). Chapter 6 Cell and Molecular Biology of ATP-Binding Cassette Proteins in Plants. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 276, Issue C, pp. 263–299). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(09\)76006-X](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(09)76006-X)
- Yuan, J. S., Tranel, P. J., & Stewart, C. N. (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science*, 12(1), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.001>
- Yuenyong, W., Sirikantaramas, S., Qu, L. J., & Buaboocha, T. (2019). Isocitrate lyase plays important roles in plant salt tolerance. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2086-2>
- Zalapa, J. E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown, B., Harbut, R., & Simon, P. (2012). Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany*, 99(2), 193–208. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100394>
- Zhang, C., Yu, C. jie, Zhang, T. jie, Guo, W. lei, & Tian, X. shan. (2021). Transcriptomic analysis reveals the transcription factors involved in regulating the expression of EPSPS gene, which confers glyphosate resistance of goosegrass (*Eleusine indica*). *Journal of Integrative Agriculture*, 20(8), 2180–2194. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(21\)63682-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63682-1)
- Zhang, Han, Chen, Zheng, He, Liu, Qiao, Wang, & Zhuo. (2017). Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR gene expression analysis in *Salix matsudana* under different abiotic stresses. *Scientific Reports*, 7(1), 40290. <https://doi.org/10.1038/srep40290>
- Zhang, J., Gao, Y.-Y., Huang, Y.-Q., Fan, Q., Lu, X.-T., & Wang, C.-K. (2018). Selection of housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in yellow-feathered broilers. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 540–546. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1365633>
- Zhao, D., Wang, X., Chen, J., Huang, Z., Huo, H., Jiang, C., Huang, H., Zhang, C., & Wei, S. (2019). Selection of reference genes for qPCR normalization in buffalobur (*Solanum rostratum* Dunal). *Scientific Reports*, 9(1), 6948. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43438-6>

Anexos

Tabla Anexo 1. Eventos con autorización comercial en Argentina (Fuente: Ministerio de economía, Subsecretaría de Alimentos Bioeconomía y Desarrollo regional)

Especie	Característica introducida	Evento de transformación	Solicitante	Resolución
Soja	Tolerancia a glifosato	40-3-2	Nidera S. A.	SAPyA N° 167 (25-3-96)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros	176	Ciba-Geigy S.A.	SAGPyA N° 19 (16-1-98)
Maíz	Tolerancia a Glufosinato de Amonio	T25*	AgrEvo S.A.	SAGPyA N° 372 (23-6-98)
Algodón	Resistencia a Lepidópteros	MON531	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA N° 428 (16-7-98)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros	MON810	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA N° 429 (16-7-98)
Algodón	Tolerancia a glifosato	MON1445	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA N° 32 (25-4-01)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros	Bt11	Novartis Agrosem S.A.	SAGPyA N° 392 (27-7-01)
Maíz	Tolerancia a glifosato	NK603	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA N° 640 (13-7-04)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a Glufosinato de Amonio	TC1507	Dow AgroSciences y Pioneer Argentina	SAGPyA N°143 (15-03-05)
Maíz	Tolerancia a Glifosato	GA21	Syngenta Seeds S.A.	SAGPyA N°640 (22-08-05)
Maíz	Tolerancia a glifosato y resistencia a Lepidópteros	NK603xMON810	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA N°78 (28-08-07)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a Glufosinato de Amonio y Glifosato	1507xNK603	Dow AgroSciences y Pioneer Arg S.A	SAGPyA N°434 (28/05/08)
Algodón	Resistencia a Lepidópteros y Tolerancia a glifosato	MON531xMON1445	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA N°82 (10/02/09)
Maíz	Tolerancia a glifosato y Resistencia a Lepidópteros	Bt11xGA21	Syngenta Agro S.A.	SAGPyA N°235 (21/12/09)
Maíz	Tolerancia a glifosato y Resistencia a Coleópteros	MON88017	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA N°640 (07/10/10)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros	MON89034	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA N°641 (07/10/10)
Maíz	Tolerancia a glifosato y resistencia a Lepidópteros y Coleópteros	MON89034 x MON88017	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA N°642 (07/10/10)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros	MIR162	Syngenta Agro S.A.	SAGPyA N°266 (19/05/11)
Soja	Tolerancia a glufosinato de	A2704-12	Bayer S.A.	SAGPyA N°516 (23/08/11)

	amonio				
Soja	Tolerancia a glufosinato de amonio	A5547-127	Bayer S.A.		SAGPyA N°516 (23/08/11)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a glifosato y a glufosinato de amonio	Bt11xGA21xMIR162	Syngenta S.A.	Agro	SAGPyA N°684 (27/10/11)
Maíz	Tolerancia a glifosato y a herbicidas que inhiben la enzima acetolactato sintasa	DP-098140-6	Pioneer Argentina S.R.L.		SAGyP N° 797 (01/12/11)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y todas las combinaciones intermedias	Bt11xMIR162xMIR604xGA21	Syngenta S.A.	Agro	SAGyP N° 111
Maíz	Resistencia a Coleópteros	MIR604	Syngenta S.A.	Agro	SAGyP N° 111 (15/03/12)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a Glufosinato de Amonio y Glifosato	MON89034xTC1507xNK603	Dow AgroSciences y Monsanto Argentina S.A.I.C		SAGyP N° 382 (23/07/12)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a Glifosato	MON89034xNK603	Monsanto Argentina S.A.I.C		SAGyP N° 382 (23/07/12)
Soja	Resistencia a Lepidópteros y Tolerancia a glifosato	MON87701xMON89788	Monsanto Argentina S.A.I.C		SAGyP N° 446 (10/08/12)
Soja	Tolerancia a herbicidas de la clase de las imidazolinonas	CV127	BASF S.A.	Argentina	SAGyP N° 119 (07/03/13)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a glufosinato de amonio y glifosato	TC1507xMON810xNK603 TC 1507xMON810 y todos los acumulados intermedios	Pioneer Argentina S.R.L.		SAGyP N° 417 (15/10/13)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a glifosato y a glufosinato de amonio	Bt11xMIR162xTC1507xGA21 y todos los acumulados intermedios	Syngenta S.A.	Agro	SAGyP N° 88 (11/04/14)
Soja	Tolerancia a 2,4 D, glufosinato de amonio y glifosato	DAS-44406-6	Dow AgroSciences Argentina S.A.		SAGYP N° 98 (09-04-15)
Soja	Alto contenido de ácido oleico y tolerancia a glifosato	DP-305423-1 x MON-04032-6	Pioneer Argentina S.R.L.		SAGyP N° 398 (01/10/15)
Algodón	Tolerancia a glifosato y a glufosinato de amonio	BCS-GHØØ2-5 x ACS-GHØØ1-3 GHB614xLLCotton25 y todos los acumulados intermedios	Bayer S.A.		SAGPyA N° 503 (02/11/15)
Soja	Resistencia a sequía y tolerancia a glufosinato	IND-00410-5	INDEAR S.A.		SAGyP N° 397 (01/10/15)
Papa	Resistencia a virosis	TIC-AR233-5	Tecnoplant S.A.		SAGyP N° 399 (01/10/15)
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a glufosinato de	TC1507xMON810xMIR162xN K603 y todos los acumulados	Pioneer Argentina S.R.L.	Resolución SAV N° 25 (28/03/16)	

	amonio y a glifosato	intermedios			
Soja	Tolerancia a glifosato	MON-89788-1	Monsanto Argentina S.R.L.	SAV N°59 (27/07/16)	
Soja	Resistencia a Lepidópteros	MON-87701-2	Monsanto Argentina S.R.L.	SAV N°59 (27/07/16)	
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a glufosinato de amonio y a glifosato	MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6 x SYN-IR162-5 y todos los acumulados intermedios	Dow AgroSciences Argentina S.R.L.	SAV N° 85 (31/10/16)	
Soja	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a glufosinato de amonio y a glifosato	DAS-81419-2 x DAS-44406-6 DAS-81419-2 y todos los acumulados intermedios	Dow AgroSciences Argentina S.R.L.	SAV N° 84 (31/10/16)	
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y tolerancia a glufosinato de amonio y a glifosato	SYN-BT011-1 x SYN-IR162-4 x MON-89034-3 x MON-00021-9 y todos los acumulados intermedios	Syngenta S.A.	SAV N° 96 (17/11/16)	Agro
Soja	Con tolerancia a los herbicidas a base de glufosinato de amonio e inhibidores de la enzima p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD)	SYN-000H2-5	Syngenta S.A. y Bayer S.A.	RESO-2017-83-APN-SECAV#MA (17/11/17)	Agro
Cártamo	Con expresión de pro-quimosina bovina en semilla	IND-10003-4, IND-10015-7, IND-10003-4 x IND-10015-7 y todos los acumulados intermedios	INDEAR AgroSciences Argentina S.R.L.	RESOL-2017-103-APN-SECAV#MA (07/12/17)	Dow
Maíz	Tolerancia a herbicidas a base de 2,4 D y herbicidas de la familia de los ariloxifenoxi, a glufosinato de amonio y a glifosato. Resistencia a Lepidópteros	DAS-40278-9 MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6 x DAS-40278-9 y todos los acumulados intermedios	Dow AgroSciences Argentina S.R.L.	RESOL-2018-28-APN-SECCYDT#MA (02-03-2018)	
Soja	Tolerancia al herbicida isoxaflutole, glifosato y glufosinato de amonio	MST-FG072-2 y MST-FG072-2xACS-GM006-4	Bayer S.A.	RESOL-2018-27-APN-SECCYDT#MA (02-03-2018)	
Maíz	Tolerancia a glifosato y a glufosinato de amonio y con Resistencia a Lepidópteros y Coleópteros	SYN-05307-1 y SYN-BT011-1xSYN-IR162-4xSYN-IR604-5xDAS-01507- 1xSYN-05307-1xMON-00021-9 y todos los acumulados intermedios	Syngenta S.A.	RESOL-2018-26-APN-SECCYDT#MA (02-03-2018)	Agro
Maíz	Tolerancia a glifosato y con Resistencia a Lepidópteros y a Coleópteros	MON-87427-7, MON-87411-9, MON-87427-7 x MON-89034-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 y todos los	Monsanto Argentina S.R.L.	RESOL-2018-19-APN-SAYBI#MA (03-05-2018)	

acumulados intermedios					
Alfalfa	Tolerancia a glifosato y disminución en el contenido de lignina.	MON-ØØ179-5, MON-ØØ1Ø1-8 y MON-ØØ179-5 x MON-ØØ1Ø1-8	INDEAR	RESOL-2018-33-APN-SAYBI#MA (07-06-2018)	
Soja	Solo para procesamiento.	MON-877Ø8-9 x MON-89788-1	MONSANTO	RESOL-2018-30-APN-SAYBI#MA (04-06-2018)	
Papa	Resistencia a virosis	TIC-AR233-5	Tecnoplant S.A.	RESOL-2018-65-APN-SAYBI#MA (05/08/18)	
Maíz	Tolerancia a glifosato, resistencia a insectos Lepidópteros y Coleópteros	MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x MON-88Ø17-3	MONSANTO ARGENTINA S.R.L.	RESOL-2018-61-APN-SAYBI#MA (03-08-2018)	
Soja	Tolerancia a glifosato y glufosinato, resistencia a sequía	IND-ØØ41Ø-5 x MON-Ø4Ø32-6 (OCDE)	INDEAR	RESOL-15-2018 (12-10-2018)	
Algodón	Tolerancia a glifosato y herbicidas inhibidores de la HPPD	BCS-GH811-4	Basf Agricultural Solutions	RESOL-2019-10-APN-SAYBI#MPYT (05-02-19)	
Soja	Tolerancia a glifosato y glufosinato	DBN-Ø9ØØ4-6	INDEAR S.A.	RESOL-2019-17-APN-SAYBI#MPYT (26-02-2019)	
Maíz	Tolerancia a herbicidas formulados en base a productos de la familia de ariloxifenoxi y al 2,4-D, glufosinato de amonio y glifosato, y resistencia a Lepidópteros.	MON-89Ø34-3 x DAS-Ø15Ø7 x MON-ØØ6Ø3-6 x SYN-IR162-4 x DAS-4Ø278-9	Dow AgroSciences Argentina S.R. L	RESOL-2019-20-APN-SAYBI#MPYT	
Algodón	Tolerancia a glufosinato de amonio, a glifosato y Resistencia a Lepidópteros.	SYN-IR1Ø2-7 y BCS-GHØØ2-5 x BCS-GHØØ4-7 x BCS-GHØØ5-8 x SYN-IR1Ø2-7, los acumulados intermedios y los eventos BCS-GHØØ4-7 y BCS-GHØØ5-8	Basf Agricultural Solutions S.A.U.	SAYBI N° 31 (11/06/19)	
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y Coleópteros, y tolerancia a glufosinato de amonio y a glifosato.	MON-89Ø34-3 x DAS-Ø15Ø7-1 x MON-88Ø17-3 x DAS-59122-7	Monsanto Argentina S.R.L., Dow AgroSciences Argentina S.R.L. y Pioneer Argentina S.R.L.	RESOL-2019-59-APN-SAYBI#MPYT (09-08-2019)	
Maíz	Resistencia a Lepidópteros y Coleópteros, y tolerancia a glufosinato de amonio y a glifosato.	MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x DAS-Ø15Ø7-1 x MON-88Ø17-3 x DAS-59122-7	Monsanto Argentina S.R.L.	RESOL-2019-60-APN-SAYBI#MPYT (09-08-2019)	

Maíz	Resistencia a Lepidópteros y Coleópteros, y tolerancia a glufosinato de amonio y a glifosato.	MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x MON-ØØ6Ø3-6	Monsanto Argentina S.R.L.	RESOL-2019-61-APN-SAYBI#MPYT (09-08-2019)
Maíz	Con Protección contra Lepidópteros y tolerancia a glifosato	MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-ØØ6Ø3-6	Monsanto Argentina S.R.L.	RESOL-2019-103-APN-SAYBI#MPYT (30/09/2019)
Algodón	Protección contra insectos Lepidópteros	SYN-IR1Ø2-7	Syngenta Agro S.A.	SAYBI N° 117 (17-10-19)
Trigo	Con tolerancia a sequía y tolerancia a glufosinato de amonio	IND- ØØ412-7	INDEAR S.A.	RESOL-2020-41- APN-SABYDR#MAGYP (07-10-2020)
Maíz	Resistencia Lepidopteros y Coleopteros, tolerancia a herbicidas a base de glifosato, glufosinato de amonio y a dicamba.	MON-87427-7 x MON-89Ø34-3 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 x MON-87419-8 x MON-87419-8 x MON-ØØ81Ø-6	MONSANTO ARGENTINA S.R. L	Resolución 138/2021 (17/11/21)
Alfalfa	Tolerancia a glifosato	MON-ØØ163-7	INDEAR S. A	Resolución 139/2021 (17/11/21)
Maíz	Tolerancia a herbicidas a base de glifosato, glufosinato de amonio y dicamba	MON-87427-7 x MON-87419-8 x MON ØØ6Ø3-6	MONSANTO ARGENTINA S.R.L.	Resolución 141/2021 (19/11/2021)
Trigo	Tolerancia a sequía y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	IND- ØØ412-7	INDEAR S.A.	Res. N°27/2022 (11/05/2022)
Soja	Procesamiento agroindustrial	MON-87751-7	MONSANTO ARGENTINA S.R.L.	Res. N° 28/2022 (12/05/2022)

Tabla Anexo 2. Tasa de cambio del análisis de expresión de los genes transportadores en función del gen de referencia PP2A.
PP2A_ GST

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	2.18	0.16	1.12	0.15	0.0281
FCA t0	FCA t72	1.04	0.08	0.05	0.18	0.4401
FCA t0	HASI t0	5.62	1.2	2.49	0.43	0.0147
FCA t0	HASI t24	5.13	0.5	2.36	0.25	0.0105
FCA t0	HASI t72	0.94	0.12	-0.09	0.23	0.414
FCA t0	HASII t0	2.29	0.49	1.2	0.35	0.027
FCA t0	HASII t24	2.66	0.17	1.41	0.15	0.0216
FCA t0	HASII t72	1.61	0.13	0.69	0.18	0.0676
FCA t0	HER3 t0	1.59	0.2	0.67	0.27	0.0951
FCA t0	HER3 t24	2.47	0.2	1.31	0.13	0.0237
FCA t0	HER3 t72	2.03	0.11	1.02	0.13	0.0367
FCA t0	HER5 t0	2.7	0.31	1.43	0.18	0.021
FCA t0	HER5 t24	3.17	0.26	1.66	0.18	0.0142
FCA t0	HER5 t72	1.24	0.09	0.31	0.16	0.2089
FCA t0	OST t0	1.42	0.14	0.51	0.17	0.123
FCA t0	OST t24	6.63	0.56	2.73	0.18	0.0078
FCA t0	OST t72	1.24	0.14	0.3	0.21	0.2178
FCA t0	PAV t0	4.2	0.7	2.07	0.25	0.0119
FCA t0	PAV t24	4.36	0.3	2.12	0.14	0.0091
FCA t0	PAV t72	0.96	0.2	-0.07	0.41	0.438
FCA t0	SOR t0	1.13	0.08	0.18	0.13	0.2796
FCA t0	SOR t24	3.19	0.34	1.67	0.26	0.0203
FCA t0	SOR t72	0.43	0.03	-1.23	0.15	0.0174

PP2A_ CAT

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.51	0.34	0.59	0.29	0.084
FCA t0	FCA t72	2.13	0.56	1.09	0.31	0.0327
FCA t0	HASI t0	1.81	0.66	0.86	0.47	0.0717
FCA t0	HASI t24	5.88	1.13	2.56	0.38	0.0175
FCA t0	HASI t72	0.44	0.15	-1.17	0.43	0.0525
FCA t0	HASII t0	1.2	0.44	0.26	0.43	0.298
FCA t0	HASII t24	1.84	0.39	0.88	0.4	0.094
FCA t0	HASII t72	0.59	0.23	-0.75	0.45	0.0805
FCA t0	HER3 t0	0.48	0.17	-1.07	0.39	0.0238
FCA t0	HER3 t24	1.1	0.33	0.14	0.32	0.3578
FCA t0	HER3 t72	1.06	0.18	0.09	0.3	0.4157
FCA t0	HER5 t0	1.47	0.46	0.56	0.35	0.1061
FCA t0	HER5 t24	1.8	0.5	0.85	0.33	0.053
FCA t0	HER5 t72	0.83	0.2	-0.27	0.29	0.292
FCA t0	OST t0	0.95	0.19	-0.07	0.31	0.4181
FCA t0	OST t24	4.34	1.1	2.12	0.36	0.0122
FCA t0	OST t72	1.34	0.37	0.42	0.34	0.1609
FCA t0	PAV t0	1.33	0.22	0.41	0.3	0.1985
FCA t0	PAV t24	4.19	2.02	2.07	0.58	0.0217
FCA t0	PAV t72	0.48	0.17	-1.05	0.54	0.0593
FCA t0	SOR t0	0.77	0.15	-0.37	0.29	0.1757
FCA t0	SOR t24	3.58	0.71	1.84	0.35	0.0198
FCA t0	SOR t72	3.79	0.64	1.92	0.3	0.0193

PP2A _ C-P450

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.18	0.2	0.24	0.28	0.2491
FCA t0	FCA t72	0.64	0.07	-0.65	0.18	0.0509
FCA t0	HAS1 t0	0.58	0.16	-0.79	0.38	0.0366
FCA t0	HAS1 t24	1.16	0.13	0.22	0.24	0.2901
FCA t0	HAS1 t72	0.12	0.01	-3.09	0.13	0.0058
FCA t0	HASII t0	0.09	0.03	-3.55	0.37	0.0066
FCA t0	HASII t24	0.42	0.09	-1.25	0.35	0.025
FCA t0	HASII t72	0.05	0.03	-4.4	0.7	0.0062
FCA t0	HER3 t0	0.33	0.1	-1.58	0.48	0.0204
FCA t0	HER3 t24	0.88	0.23	-0.18	0.28	0.3806
FCA t0	HER3 t72	0.36	0.02	-1.46	0.12	0.007
FCA t0	HER5 t0	0.87	0.15	-0.2	0.44	0.3761
FCA t0	HER5 t24	0.72	0.14	-0.48	0.34	0.08
FCA t0	HER5 t72	0.36	0.09	-1.48	0.37	0.0177
FCA t0	OST t0	1.59	0.17	0.67	0.18	0.0311
FCA t0	OST t24	3.87	0.38	1.95	0.17	0.0087
FCA t0	OST t72	0.91	0.14	-0.14	0.22	0.3927
FCA t0	PAV t0	6.51	0.64	2.7	0.18	0.0092
FCA t0	PAV t24	9.9	0.8	3.31	0.14	0.0089
FCA t0	PAV t72	3.67	1.27	1.88	0.48	0.01
FCA t0	SOR t0	7.65	1.04	2.94	0.22	0.0076
FCA t0	SOR t24	16.47	3.1	4.04	0.37	0.0076
FCA t0	SOR t72	0.37	0.13	-1.45	0.36	0.0353

PP2A _ P6

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	2.82	0.24	1.5	0.21	0.011
FCA t0	FCA t72	5.22	0.6	2.38	0.21	0.008
FCA t0	HAS1 t0	3.47	0.99	1.8	0.53	0.0329
FCA t0	HAS1 t24	3.38	0.5	1.76	0.37	0.0236
FCA t0	HAS1 t72	1.61	0.07	0.68	0.08	0.0338
FCA t0	HASII t0	2.82	1.15	1.5	0.69	0.0137
FCA t0	HASII t24	3.49	0.18	1.8	0.12	0.0113
FCA t0	HASII t72	2.96	0.69	1.56	0.35	0.0308
FCA t0	HER3 t0	1.82	0.25	0.87	0.26	0.0493
FCA t0	HER3 t24	3.93	0.25	1.98	0.12	0.009
FCA t0	HER3 t72	3.56	0.15	1.83	0.07	0.0162
FCA t0	HER5 t0	1.87	0.27	0.9	0.27	0.025
FCA t0	HER5 t24	4.12	0.55	2.04	0.31	0.0082
FCA t0	HER5 t72	2.72	0.37	1.44	0.28	0.0136
FCA t0	OST t0	2	0.11	1	0.07	0.0178
FCA t0	OST t24	5.6	0.37	2.48	0.14	0.0076
FCA t0	OST t72	2.2	0.21	1.14	0.21	0.0166
FCA t0	PAV t0	3.5	0.57	1.81	0.33	0.0083
FCA t0	PAV t24	6.57	1.26	2.72	0.33	0.0097
FCA t0	PAV t72	1.78	0.28	0.83	0.31	0.0198
FCA t0	SOR t0	2.51	0.12	1.33	0.1	0.0089
FCA t0	SOR t24	8.53	0.88	3.09	0.24	0.0056
FCA t0	SOR t72	2.2	0.27	1.14	0.18	0.0384

PP2A_P3

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	3.63	0.84	1.86	0.31	0.0095
FCA t0	FCA t72	16.42	4.99	4.04	0.32	0.0087
FCA t0	HAS1 t0	2.15	0.85	1.1	0.56	0.0092
FCA t0	HAS1 t24	2.24	1	1.17	0.64	0.0813
FCA t0	HAS1 t72	1.56	0.45	0.64	0.3	0.1027
FCA t0	HASII t0	6.84	3.68	2.77	0.42	0.0195
FCA t0	HASII t24	6	1.27	2.58	0.58	0.0228
FCA t0	HASII t72	3.99	1.49	2	0.47	0.0106
FCA t0	HER3 t0	1.55	0.43	0.63	0.45	0.0267
FCA t0	HER3 t24	4.42	1.06	2.14	0.37	0.0065
FCA t0	HER3 t72	9.43	3.2	3.24	0.45	0.0118
FCA t0	HER5 t0	1.4	0.19	0.48	0.36	0.1696
FCA t0	HER5 t24	6.86	1.47	2.78	0.35	0.0059
FCA t0	HER5 t72	11.46	3	3.52	0.31	0.0084
FCA t0	OST t0	3.07	1.39	1.62	0.48	0.0205
FCA t0	OST t24	9.38	2.3	3.23	0.32	0.0076
FCA t0	OST t72	4.71	1.43	2.24	0.42	0.0079
FCA t0	PAV t0	4.12	1	2.04	0.29	0.0087
FCA t0	PAV t24	4.09	1.11	2.03	0.37	0.0081
FCA t0	PAV t72	3.17	1.37	1.66	0.4	0.0349
FCA t0	SOR t0	2.53	0.9	1.34	0.42	0.0197
FCA t0	SOR t24	7.3	2.29	2.87	0.5	0.0061
FCA t0	SOR t72	60.79	28.17	5.93	0.55	0.0093

PP2A_P1

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	2.54	0.25	1.34	0.23	0.0189
FCA t0	FCA t72	2.21	0.36	1.14	0.29	0.0357
FCA t0	HAS1 t0	1	0.22	-0.00071	0.39	0.4976
FCA t0	HAS1 t24	6.85	0.76	2.78	0.26	0.009
FCA t0	HAS1 t72	0.91	0.1	-0.13	0.23	0.3734
FCA t0	HASII t0	1.83	0.65	0.88	0.38	0.114
FCA t0	HASII t24	3.96	0.21	1.99	0.16	0.011
FCA t0	HASII t72	3.69	0.51	1.88	0.2	0.02
FCA t0	HER3 t0	1.83	0.24	0.87	0.3	0.0527
FCA t0	HER3 t24	6.78	0.76	2.76	0.17	0.0093
FCA t0	HER3 t72	1.83	0.21	0.87	0.26	0.0356
FCA t0	HER5 t0	0.67	0.1	-0.57	0.23	0.0761
FCA t0	HER5 t24	2.76	0.24	1.46	0.21	0.0143
FCA t0	HER5 t72	2.06	0.63	1.04	0.65	0.1022
FCA t0	OST t0	2.09	0.2	1.06	0.17	0.0232
FCA t0	OST t24	2.42	0.26	1.28	0.22	0.0207
FCA t0	OST t72	1.71	0.2	0.77	0.25	0.0394
FCA t0	PAV t0	1.04	0.17	0.06	0.36	0.4449
FCA t0	PAV t24	1.56	0.1	0.64	0.18	0.1277
FCA t0	PAV t72	0.83	0.12	-0.26	0.25	0.2432
FCA t0	SOR t0	0.84	0.07	-0.26	0.16	0.2354
FCA t0	SOR t24	3.38	0.5	1.76	0.38	0.0134
FCA t0	SOR t72	4.61	0.39	2.21	0.15	0.0109

PP2A _ M11

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.29	0.26	0.37	0.38	0.1487
FCA t0	FCA t72	0.42	0.12	-1.24	0.44	0.027
FCA t0	HASi t0	6.08	2.7	2.61	0.76	0.0228
FCA t0	HASi t24	3.14	0.65	1.65	0.45	0.0201
FCA t0	HASi t72	1.03	0.25	0.05	0.38	0.4527
FCA t0	HASii t0	2.04	1.17	1.03	0.64	0.0349
FCA t0	HASii t24	2.75	0.79	1.46	0.44	0.0195
FCA t0	HASii t72	3.18	0.92	1.67	0.38	0.0106
FCA t0	HER3 t0	1.17	0.36	0.22	0.46	0.2746
FCA t0	HER3 t24	2.1	0.53	1.07	0.41	0.0207
FCA t0	HER3 t72	3.81	0.79	1.93	0.39	0.0096
FCA t0	HER5 t0	1.04	0.26	0.05	0.41	0.4284
FCA t0	HER5 t24	1.43	0.35	0.52	0.43	0.1088
FCA t0	HER5 t72	2.38	0.46	1.25	0.39	0.0189
FCA t0	OST t0	3.31	1.36	1.72	0.45	0.0131
FCA t0	OST t24	3.9	1.15	1.96	0.42	0.0096
FCA t0	OST t72	0.56	0.16	-0.84	0.54	0.0554
FCA t0	PAV t0	1.01	0.18	0.02	0.4	0.4788
FCA t0	PAV t24	2.55	0.65	1.35	0.44	0.0163
FCA t0	PAV t72	1.26	0.26	0.34	0.44	0.2047
FCA t0	SOR t0	1.19	0.29	0.25	0.38	0.237
FCA t0	SOR t24	2.54	0.62	1.35	0.52	0.0385
FCA t0	SOR t72	1.31	0.35	0.39	0.37	0.1732

PP2A _ M10

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	0.71	0.36	-0.5	0.62	0.0925
FCA t0	FCA t72	0.59	0.18	-0.76	0.43	0.0032
FCA t0	HASi t0	1.62	0.65	0.7	0.6	0.0799
FCA t0	HASi t24	0.67	0.22	-0.58	0.6	0.0845
FCA t0	HASi t72	0.27	0.11	-1.9	0.53	0.0006
FCA t0	HASii t0	1.41	0.57	0.49	0.55	0.0219
FCA t0	HASii t24	0.6	0.15	-0.73	0.48	0.0316
FCA t0	HASii t72	0.28	0.09	-1.82	0.42	0.0034
FCA t0	HER3 t0	1.57	0.5	0.65	0.53	0.0313
FCA t0	HER3 t24	0.64	0.22	-0.64	0.46	0.0027
FCA t0	HER3 t72	0.34	0.11	-1.55	0.49	0.0036
FCA t0	HER5 t0	2.05	0.61	1.03	0.44	0.0029
FCA t0	HER5 t24	0.81	0.3	-0.3	0.46	0.0707
FCA t0	HER5 t72	0.58	0.2	-0.78	0.47	0.0138
FCA t0	OST t0	1	0.4	0.002	0.55	0.4965
FCA t0	OST t24	1.18	1.64	0.24	1.31	0.2269
FCA t0	OST t72	0.45	0.14	-1.16	0.47	0.0061
FCA t0	PAV t0	1.37	0.55	0.46	0.47	0.1064
FCA t0	PAV t24	1.09	0.36	0.12	0.46	0.3294
FCA t0	PAV t72	0.24	0.1	-2.07	0.56	0.0011
FCA t0	SOR t0	1.39	0.45	0.47	0.48	0.0792
FCA t0	SOR t24	0.89	0.28	-0.17	0.53	0.2762
FCA t0	SOR t72	0.44	0.19	-1.17	0.56	0.0014

PP2A _ M9

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2(Ratio))	p-value
FCA t0	FCA t24	4.03	0.18	2.01	0.09	0.0053
FCA t0	FCA t72	18.69	2.13	4.22	0.16	0.0075
FCA t0	HASi t0	6.82	1.42	2.77	0.35	0.0094
FCA t0	HASi t24	15.38	1.87	3.94	0.26	0.0059
FCA t0	HASi t72	8.19	1.58	3.03	0.3	0.01
FCA t0	HASii t0	7.82	1.56	2.97	0.37	0.006
FCA t0	HASii t24	5.27	1.24	2.4	0.57	0.0187
FCA t0	HASii t72	11.07	1.38	3.47	0.25	0.0063
FCA t0	HER3 t0	3.29	0.52	1.72	0.25	0.0117
FCA t0	HER3 t24	5.72	0.38	2.51	0.1	0.0082
FCA t0	HER3 t72	20.61	2.43	4.37	0.25	0.0061
FCA t0	HER5 t0	11.82	2.51	3.56	0.23	0.0098
FCA t0	HER5 t24	4.42	0.43	2.14	0.17	0.0068
FCA t0	HER5 t72	19.89	1.15	4.31	0.09	0.0095
FCA t0	OST t0	3.12	0.24	1.64	0.09	0.0133
FCA t0	OST t24	5.41	1.35	2.44	0.36	0.0104
FCA t0	OST t72	6.62	1.13	2.73	0.29	0.006
FCA t0	PAV t0	8.57	1.96	3.1	0.41	0.0083
FCA t0	PAV t24	3.67	0.2	1.88	0.12	0.0078
FCA t0	PAV t72	6.76	1.18	2.76	0.26	0.0099
FCA t0	SOR t0	5.66	1.06	2.5	0.25	0.0098
FCA t0	SOR t24	5.34	0.87	2.42	0.32	0.0087
FCA t0	SOR t72	9.7	0.53	3.28	0.11	0.0064

PP2A _ M8

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2(Ratio))	p-value
FCA t0	FCA t24	1.37	0.34	0.45	0.51	0.1828
FCA t0	FCA t72	6.52	1.28	2.71	0.36	0.0064
FCA t0	HASi t0	8.11	2.53	3.02	0.47	0.0077
FCA t0	HASi t24	21.09	5.75	4.4	0.59	0.0091
FCA t0	HASi t72	4.3	1.59	2.11	0.35	0.0207
FCA t0	HASii t0	5.04	1.46	2.33	0.6	0.0144
FCA t0	HASii t24	4.93	1.67	2.3	1.02	0.0617
FCA t0	HASii t72	3.18	0.75	1.67	0.46	0.0205
FCA t0	HER3 t0	2.09	0.58	1.06	0.54	0.0749
FCA t0	HER3 t24	3.72	1.75	1.89	0.48	0.0227
FCA t0	HER3 t72	4.74	2.62	2.25	0.64	0.0303
FCA t0	HER5 t0	16.81	4.48	4.07	0.39	0.0057
FCA t0	HER5 t24	5.02	0.96	2.33	0.36	0.0063
FCA t0	HER5 t72	11.47	2.5	3.52	0.34	0.0075
FCA t0	OST t0	2.26	0.62	1.18	0.42	0.027
FCA t0	OST t24	2.26	0.52	1.17	0.43	0.0188
FCA t0	OST t72	1.57	0.66	0.65	0.48	0.1146
FCA t0	PAV t0	4.91	1.53	2.29	0.49	0.006
FCA t0	PAV t24	4.45	0.82	2.15	0.36	0.007
FCA t0	PAV t72	3.22	1.14	1.69	0.51	0.0081
FCA t0	SOR t0	4.76	1.09	2.25	0.39	0.0072
FCA t0	SOR t24	4.44	1.44	2.15	0.42	0.0062
FCA t0	SOR t72	5.67	1.56	2.5	0.41	0.0084

PP2A _ M6

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.54	0.2	0.62	0.22	0.091
FCA t0	FCA t72	2.42	0.27	1.28	0.21	0.0209
FCA t0	HASi t0	1.29	0.32	0.37	0.38	0.1728
FCA t0	HASi t24	0.9	0.19	-0.14	0.39	0.4096
FCA t0	HASi t72	0.28	0.03	-1.83	0.14	0.0138
FCA t0	HASii t0	1.52	0.29	0.6	0.37	0.1456
FCA t0	HASii t24	0.67	0.04	-0.57	0.14	0.0914
FCA t0	HASii t72	0.68	0.13	-0.55	0.42	0.2204
FCA t0	HER3 t0	0.97	0.18	-0.05	0.3	0.4601
FCA t0	HER3 t24	1.98	0.32	0.99	0.3	0.0296
FCA t0	HER3 t72	1.23	0.13	0.3	0.2	0.1991
FCA t0	HER5 t0	0.7	0.13	-0.51	0.3	0.1102
FCA t0	HER5 t24	0.39	0.04	-1.35	0.2	0.0244
FCA t0	HER5 t72	0.93	0.16	-0.1	0.49	0.4486
FCA t0	OST t0	1.06	0.09	0.08	0.16	0.3956
FCA t0	OST t24	1.12	0.09	0.17	0.2	0.3753
FCA t0	OST t72	0.58	0.09	-0.77	0.26	0.0934
FCA t0	PAV t0	2.25	0.21	1.17	0.19	0.0206
FCA t0	PAV t24	1.11	0.14	0.15	0.22	0.372
FCA t0	PAV t72	0.71	0.14	-0.49	0.34	0.102
FCA t0	SOR t0	0.62	0.06	-0.7	0.18	0.0572
FCA t0	SOR t24	1.67	0.18	0.74	0.26	0.0982
FCA t0	SOR t72	2.01	0.18	1.01	0.13	0.0306

PP2A _ M4

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	2.1	0.12	1.07	0.1	0.0082
FCA t0	FCA t72	1.3	0.17	0.38	0.18	0.0741
FCA t0	HASi t0	1.22	0.44	0.29	0.39	0.314
FCA t0	HASi t24	0.79	0.1	-0.34	0.23	0.2198
FCA t0	HASi t72	0.26	0.03	-1.92	0.15	0.0059
FCA t0	HASii t0	0.73	0.11	-0.45	0.32	0.1568
FCA t0	HASii t24	0.45	0.03	-1.16	0.12	0.0119
FCA t0	HASii t72	0.34	0.06	-1.57	0.2	0.0132
FCA t0	HER3 t0	0.83	0.23	-0.27	0.38	0.2614
FCA t0	HER3 t24	1.08	0.1	0.11	0.11	0.3758
FCA t0	HER3 t72	0.64	0.03	-0.65	0.06	0.017
FCA t0	HER5 t0	1	0.19	-0.003	0.22	0.4937
FCA t0	HER5 t24	0.86	0.08	-0.22	0.14	0.0939
FCA t0	HER5 t72	1.08	0.12	0.11	0.21	0.3631
FCA t0	OST t0	1.13	0.08	0.18	0.09	0.1312
FCA t0	OST t24	2.77	0.28	1.47	0.14	0.0093
FCA t0	OST t72	0.78	0.11	-0.35	0.24	0.0436
FCA t0	PAV t0	1.28	0.14	0.35	0.18	0.0651
FCA t0	PAV t24	1.17	0.07	0.23	0.09	0.07
FCA t0	PAV t72	0.48	0.2	-1.06	0.59	0.03
FCA t0	SOR t0	0.45	0.04	-1.14	0.13	0.0086
FCA t0	SOR t24	0.97	0.12	-0.04	0.23	0.4527
FCA t0	SOR t72	0.37	0.02	-1.42	0.1	0.0118

PP2A _ M2

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	10.87	0.95	3.44	0.16	0.0076
FCA t0	FCA t72	8.1	1.75	3.02	0.23	0.0121
FCA t0	HASi t0	9.99	2.94	3.32	0.49	0.0121
FCA t0	HASi t24	32.49	6.45	5.02	0.39	0.0058
FCA t0	HASi t72	4.52	1.43	2.18	0.52	0.0189
FCA t0	HASii t0	9.84	2.36	3.3	0.35	0.0098
FCA t0	HASii t24	27.72	2.01	4.79	0.17	0.0075
FCA t0	HASii t72	7.91	0.52	2.98	0.12	0.0071
FCA t0	HER3 t0	7.53	1.07	2.91	0.33	0.0126
FCA t0	HER3 t24	28.12	3.38	4.81	0.18	0.0072
FCA t0	HER3 t72	11.89	1.13	3.57	0.18	0.0076
FCA t0	HER5 t0	12.33	2.37	3.62	0.18	0.0085
FCA t0	HER5 t24	39.51	8.1	5.3	0.4	0.0081
FCA t0	HER5 t72	8.05	0.95	3.01	0.25	0.0082
FCA t0	OST t0	4.71	0.36	2.24	0.11	0.0096
FCA t0	OST t24	30.97	2.62	4.95	0.17	0.0068
FCA t0	OST t72	23.87	3.21	4.58	0.24	0.0072
FCA t0	PAV t0	3.79	0.27	1.92	0.12	0.0108
FCA t0	PAV t24	14.96	0.99	3.9	0.12	0.0071
FCA t0	PAV t72	2.93	0.43	1.55	0.28	0.0125
FCA t0	SOR t0	9.25	1.74	3.21	0.3	0.0077
FCA t0	SOR t24	46.62	4.46	5.54	0.24	0.006
FCA t0	SOR t72	22.59	1.2	4.5	0.12	0.0061

PP2A _ M1

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.24	0.28	0.31	0.41	0.2158
FCA t0	FCA t72	1.26	0.31	0.34	0.45	0.2357
FCA t0	HASi t0	4.46	1.34	2.16	0.58	0.0197
FCA t0	HASi t24	1.89	0.43	0.91	0.51	0.104
FCA t0	HASi t72	0.51	0.16	-0.98	0.41	0.0375
FCA t0	HASii t0	2.75	1.09	1.46	0.64	0.0159
FCA t0	HASii t24	1.6	0.34	0.68	0.4	0.0798
FCA t0	HASii t72	0.89	0.24	-0.16	0.47	0.3686
FCA t0	HER3 t0	1.25	0.28	0.32	0.52	0.2999
FCA t0	HER3 t24	1.12	0.36	0.16	0.48	0.365
FCA t0	HER3 t72	0.71	0.16	-0.5	0.41	0.1106
FCA t0	HER5 t0	1.61	0.41	0.69	0.41	0.082
FCA t0	HER5 t24	1.22	0.31	0.29	0.42	0.2334
FCA t0	HER5 t72	1	0.21	0.0042	0.37	0.4966
FCA t0	OST t0	2.12	0.5	1.08	0.43	0.0311
FCA t0	OST t24	2.34	0.56	1.23	0.45	0.0316
FCA t0	OST t72	0.5	0.12	-0.99	0.43	0.0409
FCA t0	PAV t0	1.59	0.32	0.67	0.42	0.0934
FCA t0	PAV t24	2.11	0.43	1.07	0.41	0.0349
FCA t0	PAV t72	0.67	0.2	-0.58	0.51	0.0725
FCA t0	SOR t0	1.65	0.47	0.72	0.41	0.0796
FCA t0	SOR t24	2.37	0.57	1.25	0.46	0.0422
FCA t0	SOR t72	0.66	0.15	-0.59	0.4	0.0634

Tabla Anexo 3. Tasa de cambio del análisis de expresión de los genes transportadores en función del gen de referencia ARI8.
ARI8 _ GST

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	2.24	0.45	1.16	0.34	0.0182
FCA t0	FCA t72	1.14	0.24	0.19	0.34	0.3195
FCA t0	HASI t0	1.68	0.38	0.75	0.41	0.09
FCA t0	HASI t24	1.25	0.28	0.32	0.37	0.258
FCA t0	HASI t72	0.8	0.24	-0.31	0.39	0.2467
FCA t0	HASII t0	1.09	0.28	0.13	0.38	0.3708
FCA t0	HASII t24	1.79	0.36	0.84	0.33	0.0591
FCA t0	HASII t72	1.44	0.29	0.52	0.34	0.1258
FCA t0	HER3 t0	0.85	0.15	-0.23	0.32	0.3015
FCA t0	HER3 t24	1.83	0.43	0.87	0.34	0.0559
FCA t0	HER3 t72	0.91	0.17	-0.14	0.37	0.3815
FCA t0	HER5 t0	0.86	0.2	-0.21	0.32	0.3233
FCA t0	HER5 t24	1.98	0.41	0.98	0.33	0.0389
FCA t0	HER5 t72	0.52	0.1	-0.95	0.33	0.0655
FCA t0	OST t0	0.69	0.14	-0.52	0.34	0.1315
FCA t0	OST t24	3.02	0.54	1.6	0.34	0.0127
FCA t0	OST t72	0.92	0.2	-0.11	0.31	0.3894
FCA t0	PAV t0	1.71	0.67	0.78	0.39	0.0906
FCA t0	PAV t24	1.38	0.38	0.46	0.35	0.1666
FCA t0	PAV t72	0.89	0.24	-0.16	0.5	0.3691
FCA t0	SOR t0	1.04	0.26	0.05	0.32	0.4386
FCA t0	SOR t24	0.79	0.16	-0.33	0.33	0.2532
FCA t0	SOR t72	0.59	0.16	-0.77	0.34	0.0938

ARI8 _ CAT

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.55	0.58	0.63	0.42	0.0341
FCA t0	FCA t72	2.35	1.15	1.23	0.42	0.0107
FCA t0	HASI t0	0.54	0.2	-0.89	0.39	0.0101
FCA t0	HASI t24	1.43	0.54	0.51	0.5	0.0844
FCA t0	HASI t72	0.38	0.21	-1.4	0.53	0.0165
FCA t0	HASII t0	0.57	0.25	-0.81	0.43	0.0171
FCA t0	HASII t24	1.23	0.49	0.3	0.49	0.2424
FCA t0	HASII t72	0.53	0.33	-0.92	0.52	0.0332
FCA t0	HER3 t0	0.26	0.12	-1.96	0.41	0.0066
FCA t0	HER3 t24	0.82	0.41	-0.29	0.44	0.1161
FCA t0	HER3 t72	0.47	0.17	-1.08	0.46	0.0245
FCA t0	HER5 t0	0.47	0.22	-1.08	0.46	0.0098
FCA t0	HER5 t24	1.12	0.54	0.17	0.43	0.3079
FCA t0	HER5 t72	0.35	0.14	-1.53	0.43	0.0067
FCA t0	OST t0	0.47	0.15	-1.1	0.41	0.0138
FCA t0	OST t24	1.98	0.73	0.98	0.47	0.0217
FCA t0	OST t72	1	0.39	-0.00078	0.4	0.4833
FCA t0	PAV t0	0.54	0.19	-0.88	0.39	0.014
FCA t0	PAV t24	1.32	1.02	0.4	0.67	0.2131
FCA t0	PAV t72	0.45	0.19	-1.14	0.63	0.0423
FCA t0	SOR t0	0.71	0.26	-0.5	0.43	0.038
FCA t0	SOR t24	0.89	0.34	-0.17	0.4	0.1816
FCA t0	SOR t72	5.2	2.04	2.38	0.44	0.0067

ARI8 _ C-P450

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.22	0.38	0.28	0.4	0.1716
FCA t0	FCA t72	0.7	0.19	-0.51	0.34	0.0304
FCA t0	HASi t0	0.17	0.04	-2.53	0.32	0.0087
FCA t0	HASi t24	0.28	0.07	-1.82	0.38	0.0069
FCA t0	HASi t72	0.1	0.04	-3.32	0.34	0.0063
FCA t0	HASii t0	0.04	0.02	-4.62	0.38	0.0097
FCA t0	HASii t24	0.28	0.12	-1.83	0.44	0.0115
FCA t0	HASii t72	0.04	0.03	-4.57	0.74	0.0072
FCA t0	HER3 t0	0.18	0.07	-2.48	0.51	0.0075
FCA t0	HER3 t24	0.65	0.3	-0.62	0.42	0.1409
FCA t0	HER3 t72	0.16	0.04	-2.63	0.37	0.009
FCA t0	HER5 t0	0.28	0.06	-1.84	0.51	0.0442
FCA t0	HER5 t24	0.45	0.16	-1.16	0.44	0.0148
FCA t0	HER5 t72	0.15	0.06	-2.75	0.48	0.0063
FCA t0	OST t0	0.78	0.2	-0.36	0.32	0.0515
FCA t0	OST t24	1.77	0.37	0.82	0.33	0.0074
FCA t0	OST t72	0.68	0.19	-0.55	0.31	0.0822
FCA t0	PAV t0	2.65	0.76	1.41	0.33	0.0124
FCA t0	PAV t24	3.12	0.91	1.64	0.35	0.0104
FCA t0	PAV t72	3.44	1.41	1.78	0.56	0.0065
FCA t0	SOR t0	7.02	2.09	2.81	0.36	0.0056
FCA t0	SOR t24	4.1	1.47	2.03	0.42	0.0076
FCA t0	SOR t72	0.5	0.36	-0.99	0.48	0.1206

ARI8 _ P6

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	2.9	0.54	1.54	0.36	0.0198
FCA t0	FCA t72	5.75	1.52	2.52	0.33	0.0075
FCA t0	HASi t0	1.04	0.32	0.05	0.51	0.4575
FCA t0	HASi t24	0.82	0.23	-0.28	0.48	0.2255
FCA t0	HASi t72	1.38	0.36	0.46	0.32	0.1492
FCA t0	HASii t0	1.34	0.62	0.43	0.7	0.2428
FCA t0	HASii t24	2.34	0.47	1.23	0.31	0.0299
FCA t0	HASii t72	2.63	1.06	1.4	0.44	0.0498
FCA t0	HER3 t0	0.98	0.2	-0.03	0.31	0.4579
FCA t0	HER3 t24	2.91	0.57	1.54	0.34	0.0185
FCA t0	HER3 t72	1.59	0.41	0.67	0.36	0.1106
FCA t0	HER5 t0	0.6	0.13	-0.74	0.39	0.0762
FCA t0	HER5 t24	2.57	0.64	1.36	0.42	0.0215
FCA t0	HER5 t72	1.13	0.27	0.18	0.4	0.3466
FCA t0	OST t0	0.98	0.23	-0.03	0.29	0.4595
FCA t0	OST t24	2.55	0.44	1.35	0.31	0.0154
FCA t0	OST t72	1.65	0.3	0.72	0.31	0.0526
FCA t0	PAV t0	1.43	0.47	0.51	0.44	0.1383
FCA t0	PAV t24	2.07	0.78	1.05	0.46	0.0631
FCA t0	PAV t72	1.67	0.37	0.74	0.42	0.046
FCA t0	SOR t0	2.31	0.5	1.2	0.32	0.0182
FCA t0	SOR t24	2.12	0.45	1.08	0.31	0.0342
FCA t0	SOR t72	3.03	1.17	1.6	0.36	0.0469

ARI8 _ P3

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	3.73	1.49	1.9	0.44	0.0141
FCA t0	FCA t72	18.09	10.36	4.18	0.41	0.0079
FCA t0	HASi t0	0.64	0.27	-0.64	0.55	0.1422
FCA t0	HASi t24	0.54	0.4	-0.88	0.7	0.1028
FCA t0	HASi t72	1.34	0.79	0.42	0.43	0.2425
FCA t0	HASii t0	3.26	2.04	1.71	0.45	0.047
FCA t0	HASii t24	4.02	1.45	2.01	0.62	0.0367
FCA t0	HASii t72	3.55	1.97	1.83	0.56	0.0175
FCA t0	HER3 t0	0.83	0.33	-0.27	0.48	0.296
FCA t0	HER3 t24	3.27	1.31	1.71	0.49	0.0144
FCA t0	HER3 t72	4.2	2.23	2.07	0.57	0.0278
FCA t0	HER5 t0	0.45	0.09	-1.16	0.43	0.0916
FCA t0	HER5 t24	4.28	1.63	2.1	0.45	0.0108
FCA t0	HER5 t72	4.77	1.99	2.25	0.42	0.0091
FCA t0	OST t0	1.5	0.9	0.59	0.57	0.1605
FCA t0	OST t24	4.28	1.67	2.1	0.42	0.0123
FCA t0	OST t72	3.52	1.47	1.82	0.48	0.0154
FCA t0	PAV t0	1.68	0.81	0.75	0.42	0.1404
FCA t0	PAV t24	1.29	0.68	0.37	0.49	0.2495
FCA t0	PAV t72	2.97	1.55	1.57	0.5	0.0435
FCA t0	SOR t0	2.32	1.45	1.22	0.52	0.0473
FCA t0	SOR t24	1.81	0.9	0.86	0.54	0.0772
FCA t0	SOR t72	83.48	69.63	6.38	0.62	0.0088

ARI8 _ P1

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	2.61	0.48	1.38	0.38	0.0143
FCA t0	FCA t72	2.44	0.74	1.28	0.39	0.0098
FCA t0	HASi t0	0.3	0.06	-1.74	0.32	0.0083
FCA t0	HASi t24	1.66	0.43	0.73	0.4	0.0196
FCA t0	HASi t72	0.78	0.2	-0.35	0.39	0.1198
FCA t0	HASii t0	0.87	0.37	-0.19	0.39	0.3465
FCA t0	HASii t24	2.66	0.44	1.41	0.34	0.0099
FCA t0	HASii t72	3.28	1.05	1.71	0.33	0.0199
FCA t0	HER3 t0	0.98	0.18	-0.03	0.33	0.4571
FCA t0	HER3 t24	5.01	1.34	2.33	0.35	0.0074
FCA t0	HER3 t72	0.81	0.2	-0.3	0.44	0.139
FCA t0	HER5 t0	0.22	0.05	-2.21	0.37	0.0077
FCA t0	HER5 t24	1.72	0.33	0.78	0.35	0.0185
FCA t0	HER5 t72	0.85	0.35	-0.23	0.73	0.299
FCA t0	OST t0	1.02	0.23	0.03	0.32	0.4311
FCA t0	OST t24	1.1	0.23	0.14	0.35	0.2521
FCA t0	OST t72	1.28	0.25	0.35	0.34	0.1181
FCA t0	PAV t0	0.42	0.14	-1.24	0.45	0.023
FCA t0	PAV t24	0.49	0.09	-1.02	0.37	0.0432
FCA t0	PAV t72	0.78	0.16	-0.36	0.39	0.1163
FCA t0	SOR t0	0.77	0.18	-0.38	0.34	0.0893
FCA t0	SOR t24	0.84	0.22	-0.25	0.43	0.1776
FCA t0	SOR t72	6.34	1.97	2.66	0.35	0.0099

ARI8 _ M11

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.32	0.42	0.4	0.49	0.2462
FCA t0	FCA t72	0.46	0.22	-1.11	0.54	0.0743
FCA t0	HASi t0	1.82	0.94	0.86	0.78	0.1519
FCA t0	HASi t24	0.76	0.28	-0.4	0.51	0.2464
FCA t0	HASi t72	0.89	0.38	-0.17	0.5	0.3696
FCA t0	HASii t0	0.97	0.64	-0.04	0.66	0.4745
FCA t0	HASii t24	1.83	0.96	0.87	0.51	0.13
FCA t0	HASii t72	2.82	1.28	1.5	0.5	0.0367
FCA t0	HER3 t0	0.63	0.27	-0.68	0.49	0.1491
FCA t0	HER3 t24	1.54	0.6	0.62	0.52	0.144
FCA t0	HER3 t72	1.7	0.58	0.77	0.53	0.1074
FCA t0	HER5 t0	0.33	0.11	-1.6	0.47	0.0415
FCA t0	HER5 t24	0.89	0.36	-0.17	0.51	0.3663
FCA t0	HER5 t72	0.99	0.29	-0.01	0.48	0.4923
FCA t0	OST t0	1.62	0.88	0.7	0.55	0.1385
FCA t0	OST t24	1.77	0.74	0.83	0.5	0.1004
FCA t0	OST t72	0.41	0.15	-1.27	0.59	0.0732
FCA t0	PAV t0	0.41	0.13	-1.29	0.52	0.0548
FCA t0	PAV t24	0.8	0.37	-0.32	0.55	0.3012
FCA t0	PAV t72	1.18	0.3	0.24	0.51	0.3575
FCA t0	SOR t0	1.09	0.49	0.12	0.47	0.4155
FCA t0	SOR t24	0.63	0.24	-0.66	0.56	0.1596
FCA t0	SOR t72	1.8	0.96	0.85	0.47	0.1188

ARI8 _ M10

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	0.83	0.19	-0.27	0.43	0.257
FCA t0	FCA t72	1.23	0.33	0.3	0.42	0.2446
FCA t0	HASi t0	5.68	1.97	2.5	0.56	0.0136
FCA t0	HASi t24	2.49	0.6	1.31	0.46	0.0477
FCA t0	HASi t72	0.32	0.09	-1.65	0.41	0.0144
FCA t0	HASii t0	2.5	0.86	1.32	0.57	0.0289
FCA t0	HASii t24	1.07	0.24	0.1	0.45	0.426
FCA t0	HASii t72	0.5	0.14	-0.99	0.45	0.0491
FCA t0	HER3 t0	1.56	0.49	0.64	0.54	0.1501
FCA t0	HER3 t24	1.13	0.3	0.18	0.42	0.3354
FCA t0	HER3 t72	0.8	0.18	-0.32	0.41	0.2324
FCA t0	HER5 t0	2.38	0.67	1.25	0.41	0.0359
FCA t0	HER5 t24	1.41	0.39	0.49	0.46	0.1504
FCA t0	HER5 t72	1.07	0.23	0.1	0.39	0.4002
FCA t0	OST t0	2.36	0.58	1.24	0.42	0.0293
FCA t0	OST t24	1.57	0.44	0.65	0.43	0.1028
FCA t0	OST t72	0.83	0.24	-0.26	0.45	0.2535
FCA t0	PAV t0	2.75	0.75	1.46	0.52	0.0305
FCA t0	PAV t24	1.32	0.26	0.4	0.41	0.2009
FCA t0	PAV t72	0.42	0.18	-1.24	0.59	0.0318
FCA t0	SOR t0	1.82	0.45	0.86	0.4	0.0666
FCA t0	SOR t24	1.56	0.35	0.64	0.47	0.1516
FCA t0	SOR t72	0.87	0.18	-0.2	0.39	0.3132

ARI8 _ M9

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	4.14	0.79	2.05	0.32	0.006
FCA t0	FCA t72	20.6	6.71	4.36	0.32	0.0069
FCA t0	HASI t0	2.04	0.4	1.03	0.31	0.0142
FCA t0	HASI t24	3.73	1.01	1.9	0.39	0.0067
FCA t0	HASI t72	7.03	2.67	2.81	0.43	0.0077
FCA t0	HASII t0	3.73	0.88	1.9	0.4	0.0125
FCA t0	HASII t24	3.54	1.44	1.82	0.62	0.0292
FCA t0	HASII t72	9.86	2.38	3.3	0.39	0.0054
FCA t0	HER3 t0	1.77	0.43	0.82	0.3	0.027
FCA t0	HER3 t24	4.22	1.02	2.08	0.33	0.0078
FCA t0	HER3 t72	9.17	2.3	3.2	0.43	0.0062
FCA t0	HER5 t0	3.79	1.36	1.92	0.36	0.0185
FCA t0	HER5 t24	2.76	0.7	1.46	0.32	0.0089
FCA t0	HER5 t72	8.27	2	3.05	0.31	0.0065
FCA t0	OST t0	1.53	0.41	0.61	0.3	0.0663
FCA t0	OST t24	2.47	0.92	1.3	0.44	0.0209
FCA t0	OST t72	4.95	1.3	2.31	0.37	0.0059
FCA t0	PAV t0	3.49	1.36	1.8	0.5	0.016
FCA t0	PAV t24	1.16	0.26	0.21	0.35	0.2239
FCA t0	PAV t72	6.33	1.58	2.66	0.39	0.0094
FCA t0	SOR t0	5.19	2.18	2.38	0.4	0.0113
FCA t0	SOR t24	1.33	0.41	0.41	0.38	0.1474
FCA t0	SOR t72	13.32	3.67	3.74	0.32	0.0066

ARI8 _ M8

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.41	0.52	0.49	0.59	0.2463
FCA t0	FCA t72	7.19	2.56	2.85	0.46	0.0102
FCA t0	HASI t0	2.42	0.82	1.28	0.48	0.0401
FCA t0	HASI t24	5.12	2.32	2.36	0.65	0.0182
FCA t0	HASI t72	3.69	2.6	1.88	0.47	0.0404
FCA t0	HASII t0	2.4	0.8	1.26	0.62	0.0924
FCA t0	HASII t24	3.31	1.79	1.73	1.03	0.1077
FCA t0	HASII t72	2.83	0.98	1.5	0.56	0.0401
FCA t0	HER3 t0	1.12	0.4	0.17	0.57	0.3981
FCA t0	HER3 t24	2.75	1.76	1.46	0.57	0.0632
FCA t0	HER3 t72	2.11	1.68	1.08	0.72	0.1282
FCA t0	HER5 t0	5.39	1.97	2.43	0.45	0.0122
FCA t0	HER5 t24	3.13	1.04	1.65	0.46	0.0274
FCA t0	HER5 t72	4.77	1.61	2.25	0.44	0.0148
FCA t0	OST t0	1.11	0.41	0.14	0.52	0.4107
FCA t0	OST t24	1.03	0.33	0.04	0.51	0.4818
FCA t0	OST t72	1.17	0.66	0.23	0.53	0.348
FCA t0	PAV t0	2	1.1	1	0.58	0.0753
FCA t0	PAV t24	1.4	0.53	0.49	0.49	0.1977
FCA t0	PAV t72	3.02	1.3	1.59	0.57	0.0276
FCA t0	SOR t0	4.36	1.83	2.13	0.48	0.0176
FCA t0	SOR t24	1.1	0.58	0.14	0.46	0.4086
FCA t0	SOR t72	7.79	4.16	2.96	0.5	0.0114

ARI8 _ M6

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	1.58	0.44	0.66	0.37	0.0558
FCA t0	FCA t72	2.67	0.7	1.42	0.34	0.0088
FCA t0	HASi t0	0.39	0.09	-1.38	0.31	0.0232
FCA t0	HASi t24	0.22	0.09	-2.19	0.51	0.0107
FCA t0	HASi t72	0.24	0.08	-2.05	0.34	0.0139
FCA t0	HASii t0	0.72	0.16	-0.46	0.39	0.1685
FCA t0	HASii t24	0.45	0.11	-1.15	0.34	0.0238
FCA t0	HASii t72	0.61	0.18	-0.72	0.51	0.1501
FCA t0	HER3 t0	0.52	0.13	-0.94	0.34	0.0394
FCA t0	HER3 t24	1.46	0.41	0.55	0.43	0.1136
FCA t0	HER3 t72	0.55	0.15	-0.87	0.41	0.039
FCA t0	HER5 t0	0.22	0.06	-2.15	0.42	0.0101
FCA t0	HER5 t24	0.24	0.06	-2.03	0.34	0.0107
FCA t0	HER5 t72	0.39	0.1	-1.37	0.57	0.0984
FCA t0	OST t0	0.52	0.11	-0.95	0.32	0.0437
FCA t0	OST t24	0.51	0.08	-0.97	0.34	0.07
FCA t0	OST t72	0.44	0.1	-1.19	0.34	0.0317
FCA t0	PAV t0	0.92	0.25	-0.13	0.34	0.3671
FCA t0	PAV t24	0.35	0.11	-1.51	0.4	0.0273
FCA t0	PAV t72	0.66	0.17	-0.59	0.45	0.0743
FCA t0	SOR t0	0.56	0.14	-0.82	0.36	0.0408
FCA t0	SOR t24	0.42	0.09	-1.27	0.33	0.0257
FCA t0	SOR t72	2.76	1.07	1.47	0.34	0.0226

ARI8 _ M4

Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2)	p-value
FCA t0	FCA t24	2.15	0.49	1.11	0.32	0.012
FCA t0	FCA t72	1.43	0.48	0.52	0.35	0.0868
FCA t0	HASi t0	0.36	0.13	-1.46	0.35	0.0256
FCA t0	HASi t24	0.19	0.06	-2.39	0.37	0.0086
FCA t0	HASi t72	0.23	0.08	-2.14	0.35	0.0082
FCA t0	HASii t0	0.35	0.06	-1.51	0.34	0.0321
FCA t0	HASii t24	0.3	0.07	-1.74	0.33	0.0088
FCA t0	HASii t72	0.3	0.12	-1.74	0.34	0.0162
FCA t0	HER3 t0	0.44	0.16	-1.17	0.42	0.0233
FCA t0	HER3 t24	0.8	0.25	-0.32	0.33	0.1977
FCA t0	HER3 t72	0.28	0.08	-1.81	0.36	0.0088
FCA t0	HER5 t0	0.32	0.11	-1.64	0.36	0.0096
FCA t0	HER5 t24	0.54	0.14	-0.9	0.31	0.02
FCA t0	HER5 t72	0.45	0.11	-1.15	0.37	0.036
FCA t0	OST t0	0.55	0.14	-0.85	0.3	0.0165
FCA t0	OST t24	1.26	0.33	0.34	0.31	0.093
FCA t0	OST t72	0.59	0.14	-0.77	0.33	0.0319
FCA t0	PAV t0	0.52	0.17	-0.94	0.34	0.0208
FCA t0	PAV t24	0.37	0.11	-1.44	0.34	0.0119
FCA t0	PAV t72	0.45	0.22	-1.15	0.65	0.0407
FCA t0	SOR t0	0.42	0.14	-1.26	0.33	0.015
FCA t0	SOR t24	0.24	0.06	-2.05	0.3	0.0087
FCA t0	SOR t72	0.51	0.14	-0.97	0.32	0.0197

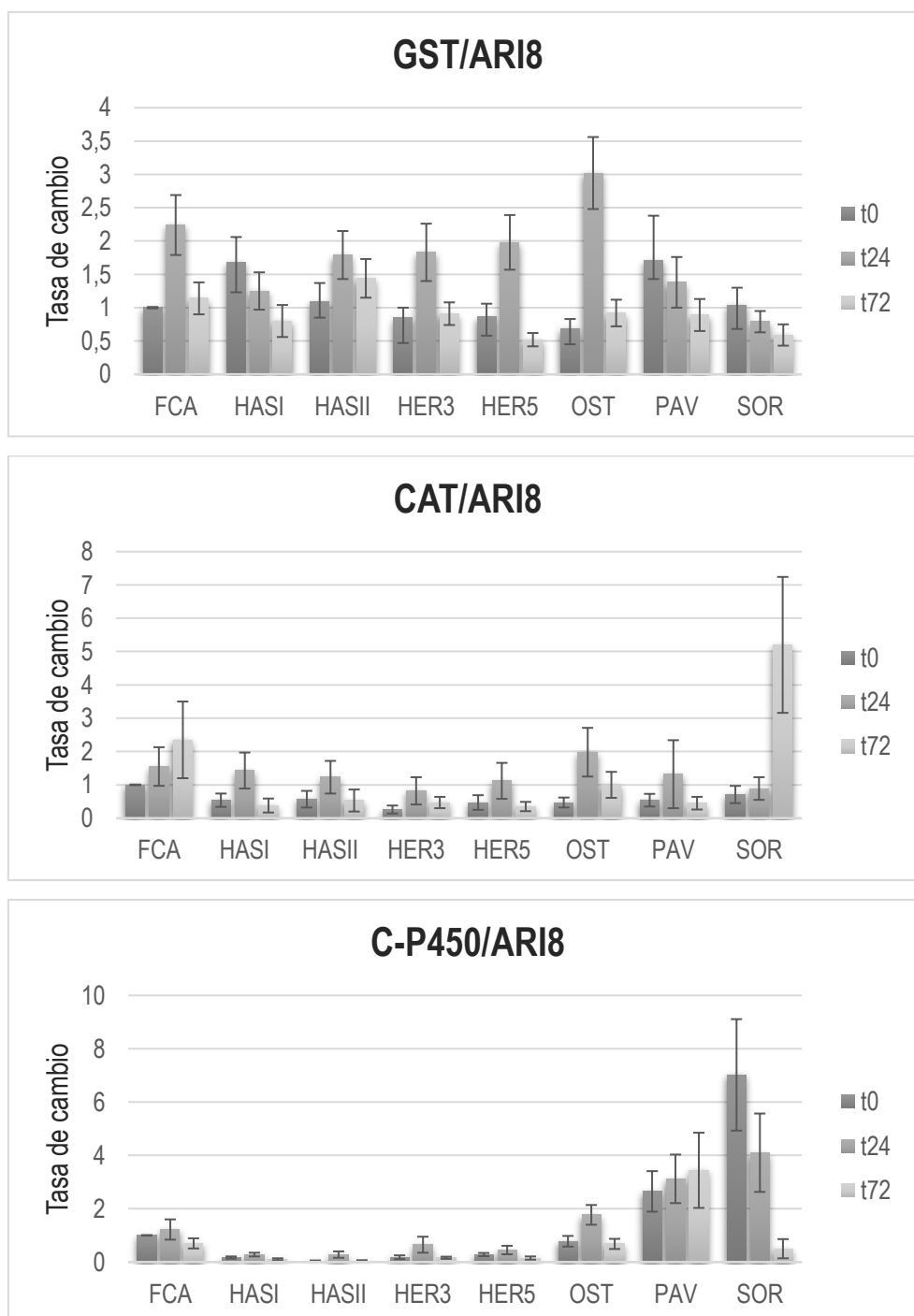
ARI8 _ M2

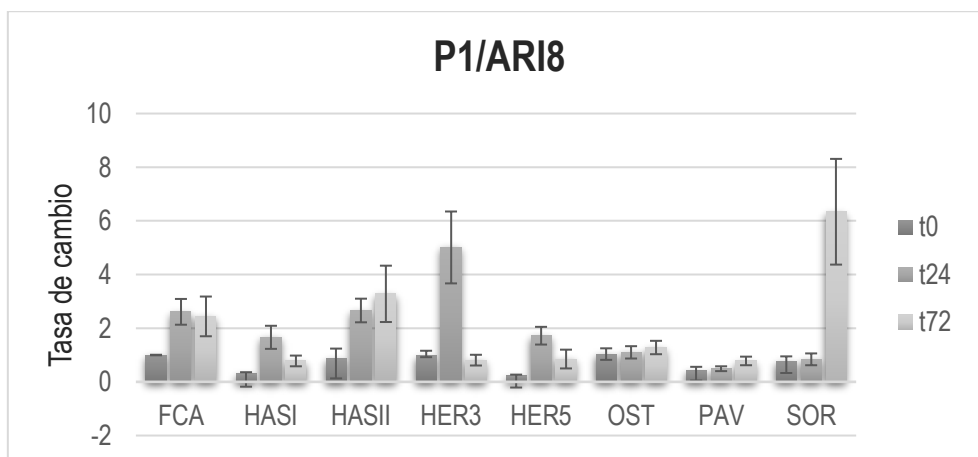
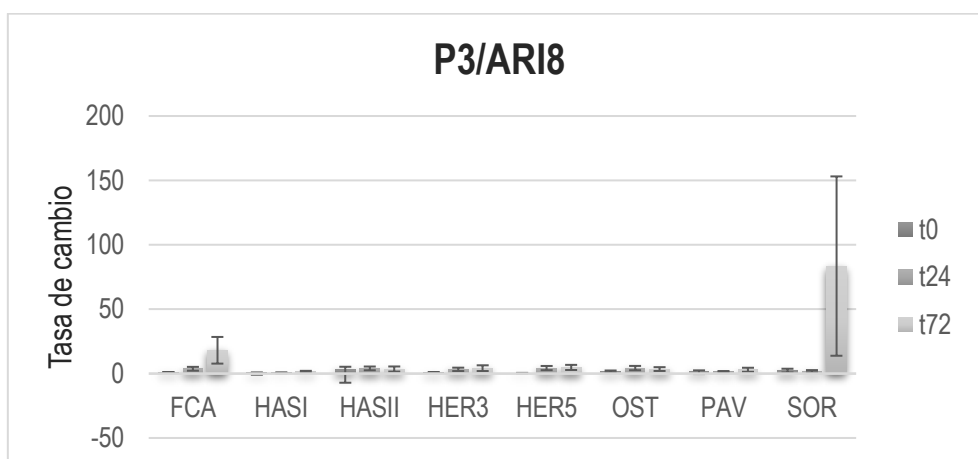
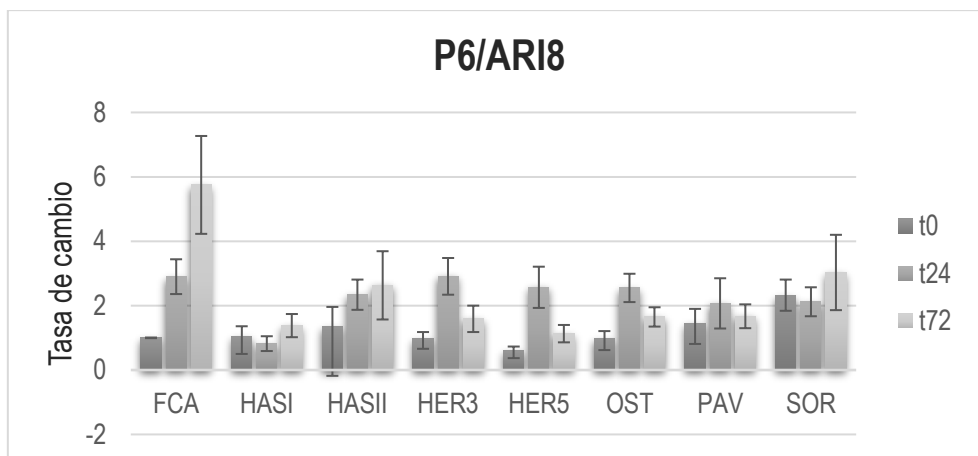
Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2(Ratio))	p-value
FCA t0	FCA t24	11.17	2.51	3.48	0.35	0.0067
FCA t0	FCA t72	8.92	4.16	3.16	0.34	0.0105
FCA t0	HASi t0	2.98	0.95	1.58	0.47	0.0188
FCA t0	HASi t24	7.88	2.92	2.98	0.49	0.0063
FCA t0	HASi t72	3.88	1.92	1.96	0.6	0.0173
FCA t0	HASii t0	4.69	1.31	2.23	0.38	0.0094
FCA t0	HASii t24	18.6	4.15	4.22	0.33	0.0076
FCA t0	HASii t72	7.04	1.42	2.82	0.31	0.0063
FCA t0	HER3 t0	4.05	0.78	2.02	0.38	0.012
FCA t0	HER3 t24	20.78	6.21	4.38	0.36	0.0075
FCA t0	HER3 t72	5.29	1.37	2.4	0.39	0.0078
FCA t0	HER5 t0	3.95	1.5	1.98	0.31	0.0122
FCA t0	HER5 t24	24.63	8.65	4.62	0.49	0.0085
FCA t0	HER5 t72	3.35	0.74	1.74	0.38	0.0089
FCA t0	OST t0	2.3	0.54	1.2	0.31	0.0292
FCA t0	OST t24	14.12	2.67	3.82	0.32	0.0064
FCA t0	OST t72	17.85	4.18	4.16	0.33	0.0071
FCA t0	PAV t0	1.55	0.42	0.63	0.32	0.101
FCA t0	PAV t24	4.72	1.36	2.24	0.34	0.0063
FCA t0	PAV t72	2.75	0.6	1.46	0.4	0.0115
FCA t0	SOR t0	8.48	3.1	3.08	0.4	0.007
FCA t0	SOR t24	11.6	2.17	3.54	0.31	0.0064
FCA t0	SOR t72	31.02	7.28	4.96	0.33	0.0057

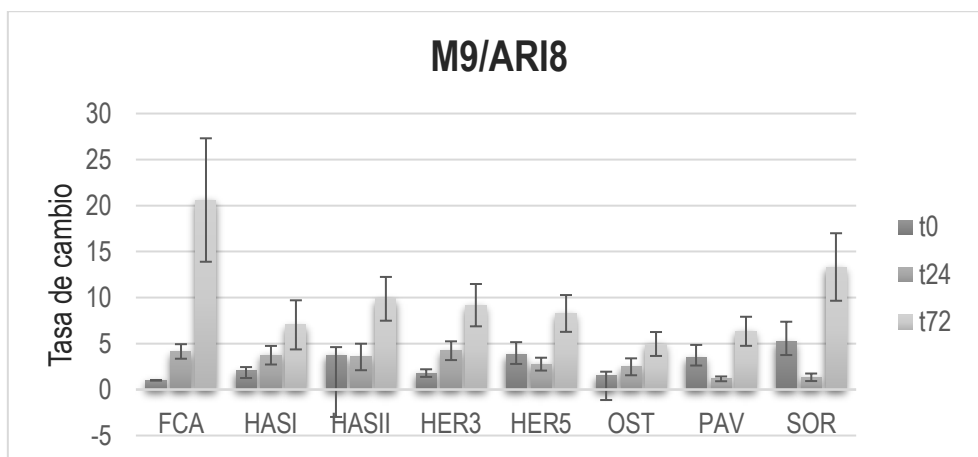
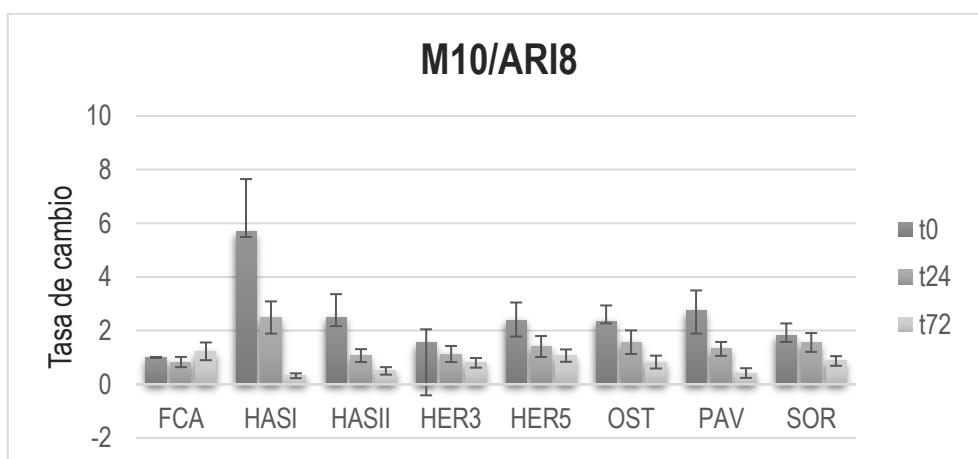
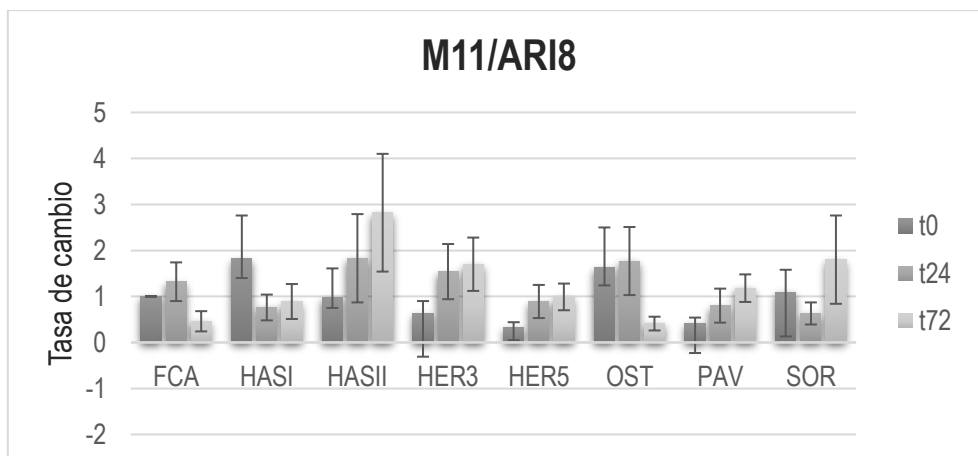
ARI8 _ M1

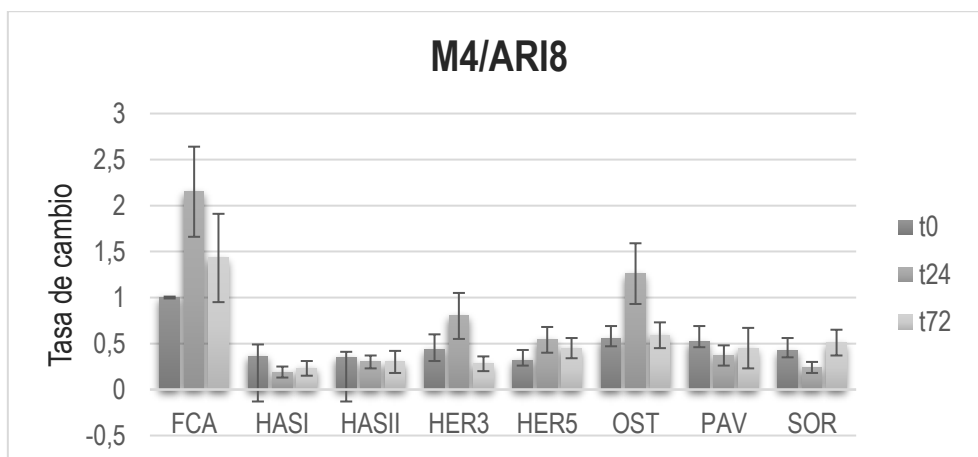
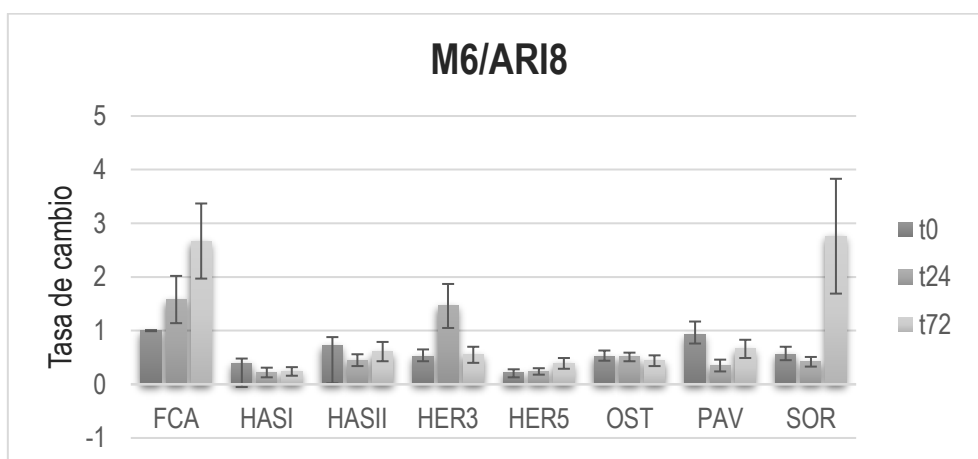
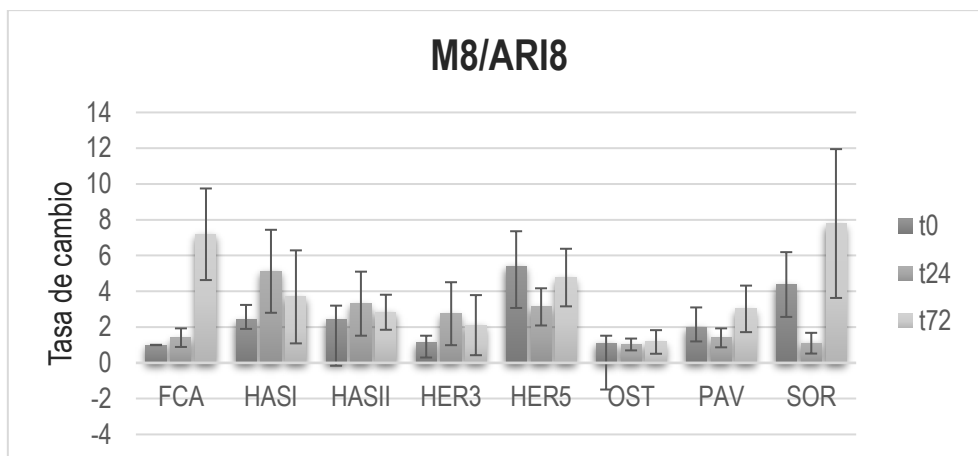
Control	Sample	Ratio	S.E.	Log2(Ratio)	S.E.(Log2(Ratio))	p-value
FCA t0	FCA t24	1.28	0.43	0.35	0.5	0.0443
FCA t0	FCA t72	1.39	0.58	0.48	0.52	0.0298
FCA t0	HASi t0	1.33	0.42	0.41	0.51	0.075
FCA t0	HASi t24	0.46	0.19	-1.13	0.61	0.0095
FCA t0	HASi t72	0.44	0.22	-1.2	0.52	0.0138
FCA t0	HASii t0	1.31	0.6	0.39	0.64	0.0977
FCA t0	HASii t24	1.07	0.44	0.1	0.51	0.3062
FCA t0	HASii t72	0.8	0.32	-0.33	0.53	0.1461
FCA t0	HER3 t0	0.67	0.18	-0.58	0.54	0.0535
FCA t0	HER3 t24	0.83	0.4	-0.28	0.57	0.161
FCA t0	HER3 t72	0.31	0.11	-1.67	0.54	0.006
FCA t0	HER5 t0	0.52	0.18	-0.95	0.51	0.0083
FCA t0	HER5 t24	0.76	0.31	-0.39	0.5	0.0426
FCA t0	HER5 t72	0.42	0.14	-1.26	0.5	0.0099
FCA t0	OST t0	0.56	0.21	-0.85	0.5	0.0082
FCA t0	OST t24	1.15	0.42	0.2	0.58	0.217
FCA t0	OST t72	0.71	0.28	-0.49	0.53	0.0488
FCA t0	PAV t0	0.65	0.25	-0.63	0.49	0.0065
FCA t0	PAV t24	0.66	0.25	-0.59	0.52	0.0175
FCA t0	PAV t72	0.63	0.23	-0.68	0.58	0.0169
FCA t0	SOR t0	1.51	0.72	0.6	0.52	0.0446
FCA t0	SOR t24	0.59	0.26	-0.76	0.5	0.0244
FCA t0	SOR t72	0.91	0.46	-0.13	0.51	0.3138

Figura Anexo 1. Gráficos de nivel de expresión de los genes transportadores en función del gen de referencia ARI8









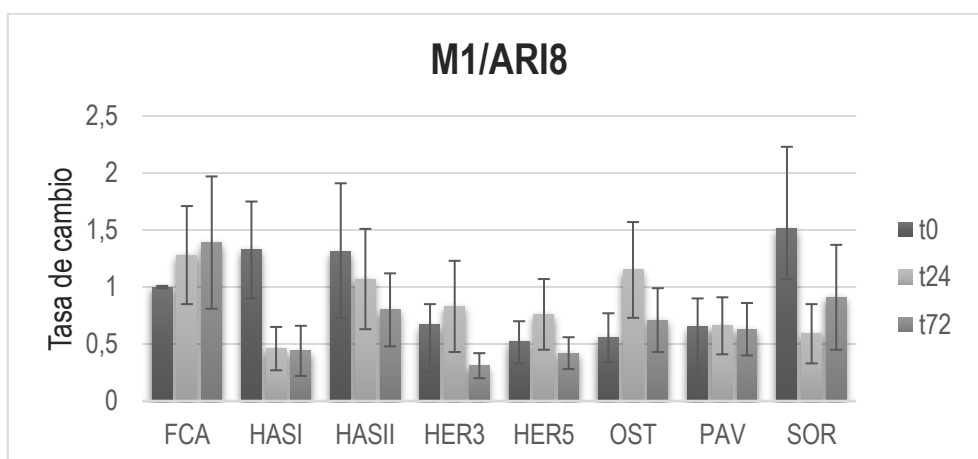
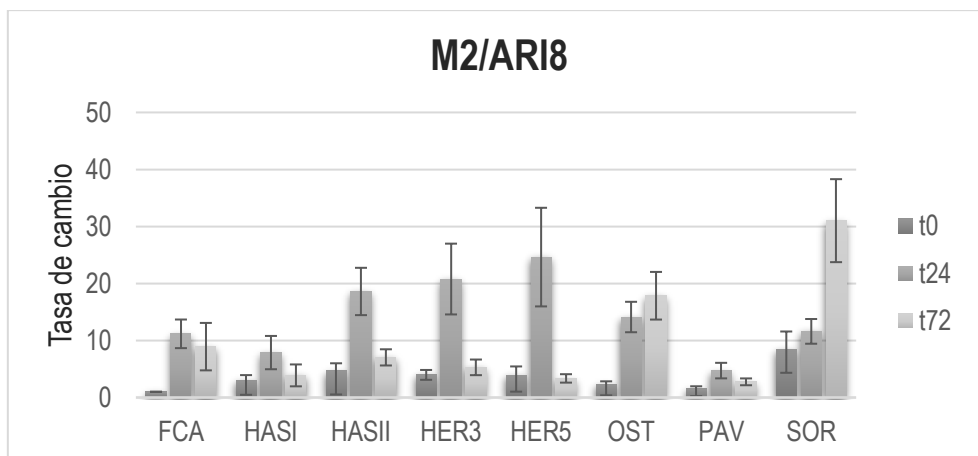


Tabla Anexo 4. Genes involucrados en la resistencia NTSR en otras especies diferencialmente expresados ante el tratamiento a glifosato.

Análisis Hasl (Hasl t0_t72). Log2 FC>1,5. La descripción de la función fue obtenida a partir del Phytozome v.13.

ID	log2FC	padj	Description
Sobic.006G044100	6,988	5,39E-05	similar to Putative cytochrome P450 71C4
Sobic.007G128000	6,195	3,56E-05	similar to P450
Sobic.001G164200	4,985	0,001087	similar to Putative cytochrome P450-like protein
Sobic.010G182966	4,459	4,51E-06	similar to Putative cytochrome P-450 protein
Sobic.001G147500	4,396	1,14E-10	(1 of 119) KOG0157 - Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
Sobic.008G036000	3,892	1,41E-04	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.005G109000	3,760	1,93E-10	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.001G213300	3,573	3,66E-05	(1 of 1) PTHR24296:SF3 - CYTOCHROME P450 86B1-RELATED
Sobic.001G172400	3,385	5,73E-05	similar to Cytochrome P450 85A1
Sobic.001G147650	2,852	6,20E-04	(1 of 119) KOG0157 - Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
Sobic.001G192200	2,808	3,28E-08	similar to Putative cytochrome P450
Sobic.001G451700	2,642	1,95E-09	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.003G228200	2,627	1,25E-10	similar to Cytochrome P450
Sobic.001G359500	2,515	8,85E-17	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.002G389100	2,484	0,001918	similar to Putative cytochrome P450
Sobic.001G510400	2,393	3,99E-09	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.002G110200	2,352	2,05E-35	4-hydroxyphenylacetaldehyde oxime monooxygenase / Cytochrome P450-II-dependent monooxygenase
Sobic.006G114600	2,251	0,009602	similar to Cytochrome P450 724B1
Sobic.001G510300	2,061	1,15E-06	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.001G195100	2,021	1,07E-08	similar to Putative cytochrome P450
Sobic.003G216232	4,362	1,10E-09	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3
Sobic.003G216166	3,516	1,09E-04	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3
Sobic.003G180400	3,416	1,08E-08	similar to MDR-like ABC transporter
Sobic.003G215800	2,720	2,25E-04	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3
Sobic.009G034500	1,929	4,15E-10	similar to MDR-like ABC transporter
Sobic.001G310300	5,856	4,58E-04	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, GST, SUPERFAMILY, GST DOMAIN CONTAINING
Sobic.001G066000	3,114	0,001227	similar to Glutathione-S-transferase
Sobic.006G216300	2,078	2,61E-11	similar to Glutathione-S-transferase 19E50
Sobic.008G079300	1,476	2,38E-04	similar to Glutathione-S-transferase 19E50
Sobic.003G129400	4,687	4,69E-25	similar to Glycosyltransferase
Sobic.003G047500	3,948	1,49E-12	(1 of 2) PTHR11926:SF248 - UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 73C7
Sobic.001G164900	1,982	6,11E-14	(1 of 4) PTHR11926:SF159 - UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 92A1
Sobic.003G047600	3,996	2,87E-08	similar to Putative UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase
Sobic.001G012400	3,209	0,001053	similar to UDP-glucose glucosyltransferase
Sobic.003G368400	2,626	5,09E-17	similar to Putative UDP-glucose:sterol glucosyltransferase
Sobic.010G274500	1,548	8,12E-07	similar to Catalase isozyme 1
Sobic.001G277000	5,729	0,004632	similar to Peroxidase 53, putative, expressed
Sobic.010G115700	5,082	3,09E-09	similar to Putative Peroxidase 49
Sobic.010G161600	3,864	6,61E-24	similar to Peroxidase precursor
Sobic.010G161700	3,461	2,93E-16	similar to Peroxidase precursor
Sobic.001G080300	2,535	2,89E-04	similar to Peroxidase 51, putative, expressed
Sobic.006G208100	6,833	0,001659	(1 of 4) PF02386 - Cation transport protein (TrkH)
Sobic.006G190000	4,430	3,49E-04	OXIDOREDUCTASE, 2OG-Fe II OXYGENASE FAMILY PROTEIN // SUBFAMILY NOT NAMED
Sobic.001G526900	4,050	2,70E-08	similar to Oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein, expressed
Sobic.004G219900	4,364	1,33E-31	similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 3

Tabla Anexo 5. Genes involucrados en la resistencia NTSR en otras especies, diferencialmente expresados ante el tratamiento a glifosato.

Análisis OV (OV t0_t72). Log2 FC>1,5. La descripción de la función fue obtenida a partir del Phytozome v.13.

ID	log2FC	padj	Description
Sobic.001G164200	12,518	6,16E-09	similar to Putative cytochrome P450-like protein
Sobic.001G164100	10,133	1,51E-10	similar to Putative cytochrome P450-like protein
Sobic.002G389100	9,995	2,91E-14	similar to Putative cytochrome P450
Sobic.007G128000	9,354	1,19E-09	similar to P450
Sobic.006G044100	8,422	4,25E-08	similar to Putative cytochrome P450 71C4
Sobic.010G182966	7,921	4,25E-26	similar to Putative cytochrome P-450 protein
Sobic.004G288500	6,922	1,78E-05	similar to Cytochrome P450
Sobic.001G213300	6,586	3,96E-09	(1 of 1) PTHR24296:SF3 - CYTOCHROME P450 86B1-RELATED
Sobic.001G147900	6,311	0,009087	similar to Putative cytochrome P450-like protein
Sobic.001G147500	5,178	1,95E-12	(1 of 119) KOG0157 - Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
Sobic.001G235500	5,088	1,21E-38	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.002G216100	4,954	3,62E-04	similar to Cytochrome P450 monooxygenase CYP92A1
Sobic.007G071800	4,900	2,52E-06	(1 of 2) PTHR24298:SF182 - CYTOCHROME P450 71A12-RELATED
Sobic.001G270200	4,543	0,003195	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.001G319800	4,380	6,67E-07	similar to Cytochrome P450-like protein
Sobic.001G451600	4,079	3,31E-11	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.008G107200	3,730	7,08E-15	similar to Putative cytochrome P450
Sobic.001G172400	3,678	2,00E-12	similar to Cytochrome P450 85A1
Sobic.001G192200	3,665	1,76E-12	similar to Putative cytochrome P450
Sobic.006G114600	3,657	2,83E-05	similar to Cytochrome P450 724B1
Sobic.001G196300	3,427	6,43E-28	similar to Cytochrome P450 84A1, putative, expressed
Sobic.001G338900	3,425	7,91E-06	similar to Putative cytochrome P450
Sobic.007G003500	3,278	2,36E-06	similar to Putative cytochrome P450 71C4
Sobic.008G144000	3,089	4,64E-09	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.001G147650	2,923	0,004088	(1 of 119) KOG0157 - Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies
Sobic.009G181800	2,845	4,32E-09	similar to Cytochrome P450 98A1
Sobic.001G451700	2,829	6,55E-21	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.004G057900	2,810	6,51E-07	(1 of 1) PTHR24291:SF46 - CYTOCHROME P450 97B3, CHLOROPLASTIC
Sobic.001G359500	2,657	7,20E-13	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.001G445900	2,407	7,28E-10	similar to Cytochrome P450
Sobic.010G007700	2,192	0,002088	similar to Cytochrome P450 88A1
Sobic.001G359400	2,137	1,06E-09	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.002G126600	1,956	7,92E-11	similar to Cytochrome P450
Sobic.001G510400	1,865	4,88E-05	similar to Cytochrome P450 family protein, expressed
Sobic.002G110200	1,851	5,62E-12	(1 of 8) 1.14.13.68 - 4-hydroxyphenylacetaldehyde oxime monooxygenase / Cytochrome P450-II-dependent monooxygenase
Sobic.002G419600	1,723	8,74E-05	CYTOCHROME P450 FAMILY MEMBER // SUBFAMILY NOT NAMED
Sobic.010G203600	1,654	0,005386	similar to Putative cytochrome P450
Sobic.001G319900	1,583	0,001011	similar to Cytochrome P450-like protein
Sobic.003G180400	8,188	5,85E-34	similar to MDR-like ABC transporter
Sobic.003G216232	6,430	4,04E-21	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3
Sobic.003G216166	5,688	2,67E-14	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3
Sobic.004G254100	5,260	0,002805	(1 of 4) PTHR19241:SF219 - ABC TRANSPORTER G FAMILY MEMBER 38
Sobic.003G216000	4,621	1,31E-08	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3
Sobic.003G267700	4,289	3,14E-17	similar to MDR-like ABC transporter
Sobic.003G215800	3,794	3,70E-10	similar to Pleiotropic drug resistance protein 3
Sobic.002G234400	3,730	2,00E-08	similar to Putative ABC transporter
Sobic.005G061000	3,185	5,81E-43	similar to ABC transporter protein, putative
Sobic.004G089300	2,015	6,28E-04	ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER SUBFAMILY A ABCA // SUBFAMILY NOT NAMED
Sobic.003G045700	1,880	0,002263	similar to Pleiotropic drug resistance protein 6
Sobic.001G103300	1,699	1,14E-14	(1 of 1) 3.6.3.35 - Manganese-transporting ATPase / ABC-type manganese permease complex
Sobic.001G280100	1,623	4,18E-04	similar to ABC1 family protein-like
Sobic.007G119800	1,614	1,91E-05	similar to Putative ABC transporter
Sobic.009G034500	1,609	4,88E-05	similar to MDR-like ABC transporter

Sobic.001G319600	8,225	4,04E-09	similar to Glutathione S-transferase GSTU31
Sobic.003G164800	4,589	2,50E-12	similar to Glutathione S-transferase GST 8
Sobic.001G319500	3,879	4,38E-11	similar to Glutathione S-transferase GST 31
Sobic.001G318900	3,663	2,37E-24	similar to Glutathione S-transferase GST 42
Sobic.001G318500	3,627	1,91E-47	similar to Glutathione S-transferase GST 42
Sobic.004G182800	1,735	5,81E-14	similar to Glutathione S-transferase GST 17
Sobic.002G231600	1,508	1,87E-05	similar to Glutathione S-transferase GST 36
Sobic.006G209600	3,009	9,97E-07	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, GST, SUPERFAMILY, GST DOMAIN CONTAINING
Sobic.004G320600	7,789	2,74E-06	PTHR20961//PTHR20961:SF23 - GLYCOSYLTRANSFERASE // SUBFAMILY NOT NAMED
Sobic.003G095400	3,358	9,94E-08	PTHR20961//PTHR20961:SF28 - GLYCOSYLTRANSFERASE // SUBFAMILY NOT NAMED
Sobic.006G242900	3,140	0,002455	(1 of 2) PTHR11926:SF253 - UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 89B1
Sobic.006G242100	2,962	4,83E-32	similar to Glycosyltransferase
Sobic.010G144400	2,810	7,14E-39	similar to Glycosyltransferase
Sobic.003G047500	2,480	2,01E-12	(1 of 2) PTHR11926:SF248 - UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 73C7
Sobic.001G164900	1,729	0,009528	(1 of 4) PTHR11926:SF159 - UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 92A1
Sobic.002G208200	1,477	9,99E-04	(1 of 1) PTHR32044:SF13 - XYLOGLUCAN GLYCOSYLTRANSFERASE 5-RELATED
Sobic.010G179400	3,144	3,15E-04	similar to UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase family protein, expressed
Sobic.003G368400	2,514	3,88E-26	similar to Putative UDP-glucose:sterol glucosyltransferase
Sobic.005G173200	1,627	2,05E-06	similar to UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase family protein, expressed
Sobic.005G172900	1,542	1,14E-05	similar to UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase family protein, expressed
Sobic.004G071200	1,445	3,06E-08	(1 of 4) PTHR11926:SF167 - UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 84A1-RELATED
Sobic.010G274500	3,123	1,82E-65	similar to Catalase isozyme 1
Sobic.010G115700	9,856	7,30E-13	similar to Putative Peroxidase 49
Sobic.001G528100	3,767	9,10E-30	similar to Peroxidase family protein, expressed
Sobic.010G245800	2,762	7,76E-30	similar to Peroxidase 16 protein
Sobic.010G161600	2,500	0,00338	similar to Peroxidase precursor
Sobic.009G055300	2,457	0,00515	similar to Peroxidase
Sobic.006G208100	10,736	8,39E-17	(1 of 4) PF02386 - Cation transport protein (TrkH)
Sobic.003G292400	8,483	9,24E-92	similar to Oxidoreductase precursor
Sobic.005G121500	6,657	1,97E-04	similar to Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein, expressed
Sobic.001G407800	3,458	0,00126	similar to Oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein, expressed
Sobic.001G314300	1,949	0,00467	similar to Oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein, expressed
Sobic.001G475800	1,918	9,29E-06	similar to Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein, expressed
Sobic.001G526900	5,714	6,62E-22	similar to Oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein, expressed
Sobic.004G219900	4,768	7,18E-12	similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 3
Sobic.004G338000	2,587	3,42E-14	similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 1
