



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y BIOQUÍMICA DEL ALELO *Ahas1-4* CON
RESISTENCIA A INHIBIDORES DE AHAS EN GIRASOL (*Helianthus annuus L.*)**

Ing. Agr. LAURA NOELIA GIANOTTO

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL

DIRECTORA: Ing. Agr. MSc. Graciela Nestares

CONSEJEROS: Dra. Gabriela Breccia; Dra. Tatiana Vega; Lic. Mariano Bulos

2016

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y BIOQUÍMICA DEL ALELO *Ahas1-4* CON
RESISTENCIA A INHIBIDORES DE AHAS EN GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)**

LAURA NOELIA GIANOTTO

Ingeniera Agrónoma - Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre el 18 de Diciembre de 2012 y el 18 de Diciembre de 2014 bajo la dirección de la Ing. Agr. MSc. Graciela Nestares.

Nombre y firma del Maestrando:

Nombre y firma del Director:

Nombre y firma de los Consejeros:

Defendida:de 2016.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Ing. Agr. MSc. Graciela Nestares por su valiosa dirección, su dedicación, sus conocimientos, su paciencia y motivación han sido fundamentales para culminar con éxito este trabajo de tesis.

A mis consejeros Lic. Mariano Bulos por su importante aporte y participación durante el desarrollo de esta tesis, Dra. Tatiana Vega por las correcciones realizadas en el presente manuscrito y en especial a la Dra. Gabriela Breccia por su predisposición, participación y acompañamiento en todas las etapas de este trabajo.

A mis compañeras del grupo de girasol de la Cátedra de Genética y a las ayudantes Celina Mansilla y María Belén Bisio.

A la Secretaría de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias y la Fundación de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario por haberme otorgado la Beca para el cursado de la Maestría en Genética Vegetal y a la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe por la beca de Proyectos de Innovación Tecnológica.

A mis compañeros de cursado y profesores quienes hicieron de esta etapa una grata experiencia.

A mi familia y amigos por estar presente y acompañarme en todo momento... ¡Gracias!

*A mis padres por su amor y
su apoyo incondicional.*

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Trabajos publicados como resumen

- Gianotto, L.; Breccia, G.; Bisio, M.B.; Vega, T.; Altieri, E.; Bulos, M.; Nestares, G.; “*Phenotypic characterization of metsulfuron-methyl resistance conferred by Ahas1-4 allele in Sunflower*”. Biocell, Vol. 38, N° 5, Abstract A56, 2014. ISSN: 0327-9545 (printed version), ISSN 1667-5746 (online version). http://www.cricyt.edu.ar/biocell/vol/38_5.html

Comunicaciones a congresos y jornadas

- Gianotto, L.; Breccia, G.; Bisio, M.B.; Vega, T.; Altieri, E.; Bulos, M.; Nestares, G. “*Caracterización de la resistencia a imazapir y metsulfurón metil conferida por el alelo Ahas1-4 en girasol*”. XLIV Congreso Argentino de Genética, 13 al 16 de Septiembre de 2015. Pág. 191. ISSN: 1852-6233

- Breccia, G.; Gianotto, L.; Altieri, E.; Bulos, M.; Nestares, G. “*Actividad enzimática AHAS y niveles de dominancia en isolíneas de girasol que portan distintos alelos para el locus Ahas1*”. XLIV Congreso Argentino de Genética, 13 al 16 de Septiembre de 2015. Pág. 156. ISSN: 1852-6233

- Gianotto, L.; Breccia, G.; Bisio, M.B.; Vega, T.; Altieri, E.; Bulos, M.; Nestares, G. “*Caracterización fenotípica de la resistencia al herbicida metsulfurón metil conferida por el alelo Ahas1-4 en girasol*”. XVI Congreso-XXXIV Reunión Anual-Sociedad de Biología de Rosario. Argentina, 4 y 5 de diciembre de 2014. Pág. 74, ISSN: 2314-1484

- Gianotto, L., Breccia, G.; Masilla C.; Vega, T.; Altieri, E.; Bulos, M.; Nestares, G. “*Estudios fenotípicos y bioquímicos para el desarrollo de pruebas diagnóstico de resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS en girasol*”. VIII Jornada de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, 9 de octubre de 2014.

- Gianotto, L. “*Estudios fenotípicos y bioquímicos para el desarrollo de pruebas diagnóstico de resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS en girasol*”. Encuentro de Jóvenes Investigadores, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, 4 de septiembre de 2014. http://www.unl.edu.ar/categories/view/ingenierias#.VZB22vl_Oko

- Gianotto, L., Breccia, G., Mansilla, C., Vega, T., Altieri, E., Bulos, M., Nestares, G. “*Caracterización de la resistencia a imazapir conferida por el alelo Ahas1-4 a través de bioensayo germinativo*”. 6to. Congreso Argentino de Girasol ASAGIR, Hotel Sheraton, Buenos Aires, Argentina, 27 de Mayo de 2014.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Material Vegetal	11
Herbicidas	11
Metodología.....	12
Ensayo de germinación en multimacetas	12
Cuantificación de actividad AHAS.....	15
Estimación de las relaciones de dominancia entre los alelos <i>Ahas1-1</i> , <i>Ahas1-4</i> y <i>ahas1</i>	17
Análisis Estadístico.....	18
RESULTADOS	19
Ensayo de germinación en multimacetas durante siete días.....	19
Ensayo de germinación en multimacetas durante 14 días.....	27
Estimación de correlaciones entre variables de crecimiento radical de los ensayos de germinación de siete y 14 días de duración.....	40
Cuantificación de actividad AHAS.....	41
Estimación de las relaciones de dominancia entre los alelos <i>Ahas1-1</i> , <i>Ahas1-4</i> y <i>ahas1</i>	44
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXO.....	70

ABREVIATURAS

AF	Área foliar total
AHAS	Acetohidroxiácido sintasa
ALS	Acetolactato sintasa
ANOVA	Análisis de la variancia
cm	Centímetro
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
GR ₅₀	Concentración de herbicida que ocasiona reducción del crecimiento de 50%
HEPES	4-(2-Hidroxietil) piperazina-1-etano ácido sulfónico
i.a.	Ingrediente activo
I ₅₀	Concentración de herbicida que ocasiona reducción de la actividad enzimática de 50%
IMI	Imidazolinonas
LF	Longitud promedio del primer par de hojas
LL	Longitud de raíz lateral más larga
LP	Longitud de raíz principal
LPb	Longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm
mM	Milimolar
N	Normal
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
POB	Pirimidiniltio (u oxi) benzoatos
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SCT	Sulfonilaminocarboniltriazolinonas
SU	Sulfonilureas
TP	Triazolopirimidinas
TPP	Pirofosfato de tiamina
ThDP	Tiamina difosfato
μmol	Micromol
μM	Micromolar
μl	Microlitro

RESUMEN

Caracterización fenotípica y bioquímica del alelo *Ahas1-4* con resistencia a inhibidores de AHAS en girasol (*Helianthus annuus L.*)

El locus multialélico *Ahas1* determina el nivel de resistencia/susceptibilidad a herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en girasol. Recientemente se ha encontrado un alelo que confiere resistencia cruzada a distintas familias químicas de inhibidores de AHAS: imidazolinonas (IMI), sulfonilureas (SU), triazolopirimidinas (TP) y pirimidiniltio (u oxi) benzoatos (POB), denominado *Ahas1-4*, que se corresponde con la sustitución Trp574Leu. La evaluación en las etapas de germinación y la caracterización bioquímica de *Ahas1-4*, así como las relaciones de dominancia con otros alelos del locus *Ahas1* no se han realizado hasta el momento. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar el crecimiento de plántulas y la actividad enzimática AHAS en respuesta a los herbicidas imazapir y metsulfurón metil de genotipos de girasol que portan diferentes combinaciones de los alelos *Ahas1-1*, *Ahas1-4* y *ahas1* y determinar las relaciones de dominancia entre los alelos mencionados en respuesta a diferentes concentraciones de imazapir y metsulfurón metil. Dentro de los ensayos de germinación, en presencia del herbicida imazapir, los genotipos *Ahas1-4/Ahas1-4* y *Ahas1-1/Ahas1-4* presentaron los mayores valores de GR₅₀ para las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb), longitud de raíz lateral más larga (LL), área foliar total (AF) y longitud promedio del primer par de hojas (LF), hasta 6000 veces superior al genotipo susceptible *ahas1/ahas1* y hasta 15 veces superior al genotipo *Ahas1-1/Ahas1-1* que confiere resistencia sólo a IMI. Al realizar la comparación dentro de cada variable y entre los genotipos evaluados se encontraron diferencias significativas excepto al comparar los genotipos *Ahas1-4/Ahas1-4* y *Ahas1-1/Ahas1-4*. Con el herbicida metsulfurón metil se observó que los genotipos que portaban al menos un alelo *Ahas1-4* presentaron los mayores GR₅₀ dentro de las variables radicales evaluadas. Sin embargo, dentro de las variables foliares el genotipo *Ahas1-4/Ahas1-4* mostró un GR₅₀ seis veces superior para área foliar total y cuatro veces superior para longitud promedio del primer par de hojas respecto al genotipo *Ahas1-1/Ahas1-4*. A nivel de actividad enzimática, con ambos herbicidas, el genotipo *Ahas1-4/Ahas1-4* presentó el mayor valor de I₅₀ y en la comparación con el resto de los genotipos las diferencias fueron significativas. Respecto a las relaciones de dominancia, tomando dos alelos, tanto para resistencia a imazapir como a metsulfurón metil, las mismas varían desde sobredominancia a recesividad dentro de cada variable evaluada y concentración de herbicida aplicada. En base

a los resultados obtenidos se concluye que el alelo *Ahas1-4* confiere resistencia al herbicida metsulfurón metil y resistencia superior a la conferida por el alelo *Ahas1-1* al herbicida imazapir y que la relación de dominancia entre dos alelos puede variar dependiendo del tipo de herbicida presente, de la concentración de herbicida y de la variable evaluada.

ABSTRACT

Phenotypic and biochemical characterization of *Ahas1* 1-4 allele resistant to AHAS inhibitors in sunflower (*Helianthus annuus* L.).

The multiallelic locus *Ahas1* determines the level of resistance/susceptibility to acetohydroxyacid synthase (AHAS) inhibiting herbicides in sunflower. Recently an allele that confers cross-resistance to different chemical families of AHAS inhibitors, called *Ahas1-4*, has been found. The goals of this study were to characterize seedling growth and AHAS enzyme activity in response to herbicides imazapyr and metsulfuron methyl of sunflower genotypes which carry different combinations of alleles *Ahas1-1*, *Ahas1-4* and *ahas1* and to determine the dominance relationships between these alleles. In germination assays genotypes *Ahas1-4/Ahas1-4* and *Ahas1-1/Ahas1-4* had the highest GR₅₀ for all variables in presence of imazapyr. When comparing within each variable and between genotypes significant differences were found except when comparing *Ahas1-4/Ahas1-4* and *Ahas1-1/Ahas1-4*. With metsulfuron methyl, genotypes carrying at least one allele *Ahas1-4* showed the highest GR₅₀ in root variables. However, in leaf variables, *Ahas1-4/Ahas1-4* showed higher GR₅₀ values than *Ahas1-1/Ahas1-4*. Regarding enzyme activity level, with both herbicides, *Ahas1-4/Ahas1-4* had the highest I₅₀ and differences were significant among genotypes. The degree of dominance for two resistant alleles vary from overdominance to recessivity depending on evaluated variable and herbicide concentration. It is concluded that (1) allele *Ahas1-4* confers resistance to metsulfuron methyl and superior resistance than that conferred by allele *Ahas1-1* to imazapyr, and (2) dominance relationship between two given alleles can vary depending on type and concentration of herbicide and variable evaluated.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de girasol (*Helianthus annuus L.*) es de gran importancia económica a nivel mundial, con una producción promedio de 40 millones de toneladas (National Sunflower Association, 2014/2015). Se comercializan principalmente los subproductos de su molienda, de los cuales el aceite es el más importante. En Argentina, es sembrado en diversas áreas, abarcando diferentes ambientes edafoclimáticos. Por ello, la implementación de distintas tecnologías de producción es un factor de gran importancia para incrementar la productividad, la calidad y competitividad del cultivo. Uno de los factores reductores del rendimiento es la competencia con las malezas. Las mismas causan considerables pérdidas de rendimiento en el cultivo de girasol (20% a 70%) debido a la competencia por luz, agua y nutrientes (Blamey *et al.*, 1997). La reducción de rendimiento varía según las especies de malezas presentes, la densidad y distribución de las mismas en el lote y el estado fenológico en el que se encuentren éstas y el cultivo. A nivel nacional, se determinaron pérdidas de rendimiento por competencia con malezas gramíneas anuales entre 4 y 78 % con un promedio de 38%, y 20-35% para el caso de competencia con malezas perennes como gramón (*Cynodon dactylon*) (Gries, 2003). La etapa crítica de interferencia de las malezas ocurre durante la implantación del cultivo hasta el estadio V6 (Schneiter y Miller, 1981), donde el cultivo define el área foliar a partir de la cual se determinan los componentes del rendimiento. Si bien el girasol posee una alta tasa de crecimiento inicial y una rápida exploración radical del perfil del suelo, que le otorga una ventaja competitiva frente a las malezas, es necesario realizar controles sobre las poblaciones de diversas malezas.

La aplicación de herbicidas es uno de los métodos más utilizados para el control de malezas, sobre todo en sistemas de siembra directa. Sin embargo, los herbicidas aplicados en pre-emergencia del cultivo de girasol presentan riesgos de control incompleto (Lange, 2012). Si bien existen herbicidas post-emergentes efectivos para el control de malezas gramíneas, los productores de girasol cuentan con pocos herbicidas disponibles para controlar malezas de hoja ancha (Bruniard y Miller, 2001). Los herbicidas del grupo de inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS, EC 2.2.1.6), también conocida como acetolactato sintasa (ALS), son de amplio espectro, es decir, controlan especies de malezas de diversas familias botánicas. Además son efectivos a bajas dosis de aplicación dada su alta potencia biológica y poseen baja toxicidad sobre mamíferos debido a que éstos no poseen vías metabólicas que involucren dicha enzima. Este grupo de herbicidas comprende cinco familias químicas: imidazolinonas (IMI), sulfonilureas (SU), triazolopirimidinas (TP), pirimidiniltio (u oxi) benzoatos (POB) y sulfonilaminocarbonil triazolinonas (SCT). Las SU son las más numerosas

en cuanto a ingredientes activos, seguidas por las IMI (Tan *et al.*, 2006), por ello han sido el centro de las investigaciones para proveer estrategias para el control de malezas con organismos no genéticamente modificados (Sala *et al.*, 2012a). Existen distintas técnicas para la generación y selección de genotipos resistentes a IMI, como selección por cultivo de células y mutagénesis de polen, mutagénesis química de semillas, y selección fenotípica de mutantes espontáneos (Tan *et al.*, 2005).

La enzima AHAS cataliza las dos primeras reacciones paralelas en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina (Duggleby *et al.*, 2008). En la Figura 1 se ilustra la vía metabólica de la síntesis de los aminoácidos mencionados. La enzima AHAS cataliza la síntesis de 2-aceto-2-hidroxi-butirato a partir de 2-cetobutirato y la descarboxilación de una molécula de piruvato, el cual es un producto intermedio en la síntesis de isoleucina, y al mismo tiempo cataliza la síntesis de 2-acetolactato a partir de la descarboxilación de una molécula de piruvato y la condensación con una segunda molécula del mismo compuesto, el cual se utilizará tanto para la síntesis de valina como de leucina. La enzima AHAS está compuesta por dos tipos de subunidades: catalítica y reguladora. Para realizar su actividad, la subunidad catalítica requiere como cofactores a la tiamina difosfato (ThDP), al catión magnesio (Mg^{2+}) y al dinucleótido de flavina y adenina (FAD), y se ha encontrado que cristaliza como tetrámero (Duggleby *et al.*, 2008). Esta enzima es inhibida por los productos finales de la vía metabólica en la que realiza su actividad de catálisis, es decir, por los aminoácidos de cadena ramificada, los cuales se unen a la subunidad reguladora. Cada polipéptido de la subunidad catalítica de AHAS posee tres dominios de similar tamaño, α , β y γ (Duggleby *et al.*, 2003). El sitio de unión de los herbicidas inhibidores de esta enzima se encuentra cerca del sitio activo de la misma en la interfaz entre dos monómeros de la subunidad catalítica. La actividad de la enzima AHAS se localiza en los cloroplastos, y si bien la biosíntesis se lleva a cabo en toda la planta, ocurre una mayor expresión en los tejidos más jóvenes de la misma (Singh y Shaner, 1995). Los herbicidas capaces de inhibir esta enzima se unen al canal de acceso del sustrato (Duggleby *et al.*, 2008), y de esta manera inhiben la actividad de la enzima bloqueando el acceso del sustrato a su sitio activo. Los primeros síntomas que se observan ante la falta de los aminoácidos de cadena ramificada son la reducción en el crecimiento de hojas jóvenes, raíces y tallos debido a la inhibición de la división celular (Tuesca y Nisensohn, 2004). La inhibición de esta enzima conduce a la muerte de la planta, principalmente por la falta de aminoácidos y en segundo lugar por la interrupción en la síntesis de proteínas y del transporte de fotosintatos (Shaner, 1991).

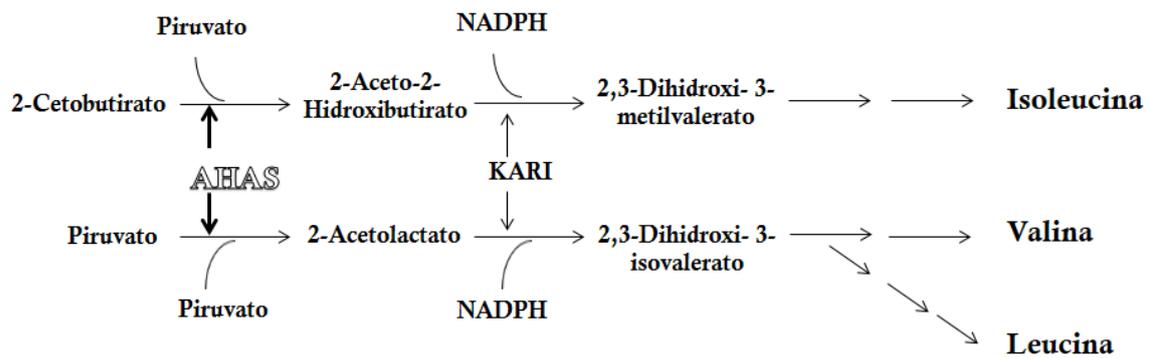


Figura 1. Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina (adaptado de Duggleby *et al.*, 2008)

El girasol es sensible a todos los herbicidas inhibidores de la enzima AHAS; sin embargo, en la actualidad se dispone de diversas fuentes de resistencia. El principal mecanismo de resistencia se debe a modificaciones en la subunidad catalítica de AHAS que confiere una menor sensibilidad a la inhibición de los herbicidas (Sala *et al.*, 2012a). Las sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a los inhibidores de AHAS se ubican en el sitio de unión a herbicidas de la subunidad catalítica. En girasol se han identificado tres genes que codifican la subunidad catalítica de AHAS (Kolkman *et al.*, 2004). Sin embargo, todas las mutaciones puntuales que confieren resistencia a herbicidas se han encontrado en uno de los genes, denominado *Ahas1* (Sala *et al.*, 2012b). Estas mutaciones pueden conferir resistencia cruzada entre las distintas familias químicas de inhibidores de AHAS o ser específicas para alguna en particular. La primera de las sustituciones identificadas fue Ala205Val, la cual confiere resistencia a herbicidas de la familia química de las imidazolinonas (White *et al.*, 2003; Kolkman *et al.*, 2004). Dicha sustitución se corresponde con el alelo denominado *Ahas1-1* y se encontró originalmente en una población de girasol silvestre (ANN-PUR) la cual había sido tratada con el herbicida imazetapir durante siete años consecutivos (Al-Khatib *et al.*, 1998). En la Universidad Estatal de Dakota del Norte este alelo fue incorporado a la línea susceptible HA89 utilizando una estrategia de retrocruzamiento. La línea resistente a imazetapir obtenida se denominó HA425 y en un estudio de herencia se determinó que la resistencia de la misma estaba dada por un gen semidominante, *Ahas1-1*, el cual fue nombrado inicialmente *Imr1* y un segundo gen modificador denominado *Imr2* (Bruniard y Miller, 2001). La sustitución Pro197Leu (Kolkman *et al.*, 2004; Hawley, 2005) confiere resistencia a sulfonilureas y fue denominada *Ahas1-2*. La misma también fue hallada en una población de girasol silvestre (ANN-KAN) que había sido tratada en sucesivas generaciones con el herbicida clorsulfurón. Posteriormente, un nuevo alelo de resistencia a imidazolinonas fue obtenido por medio de

mutagénesis con etilmetanosulfonato y selección con el herbicida imazapir (Sala *et al.* 2008a,b). Este alelo denominado *Ahas1-3*, corresponde a la sustitución Ala122Thr y confiere altos niveles de resistencia a IMI. Recientemente se ha encontrado un alelo del gen *Ahas1* que confiere resistencia cruzada a distintas familias químicas de inhibidores de AHAS: IMI, SU, TP y POB (Sala y Bulos, 2012). Este nuevo alelo denominado *Ahas1-4*, se corresponde con la sustitución Trp574Leu y fue encontrado en una población de girasol silvestre en la localidad de Jovita (provincia de Córdoba, Argentina).

De acuerdo a lo expuesto, el locus multialélico *Ahas1* determina el nivel de resistencia/susceptibilidad a herbicidas inhibidores AHAS en girasol. Actualmente, el desarrollo de híbridos de girasol en Argentina se basa principalmente en el uso de los alelos *Ahas1-1* (tecnología Clearfield ®) y *Ahas1-3* (tecnología ClearfieldPlus ®), ambos con resistencia a IMI. En el mercado europeo y en algunos países de América del Norte, se dispone además de la tecnología ExpressSun ®, la cual utiliza el alelo *Ahas1-2* con resistencia a SU. El alelo *Ahas1-4*, por tratarse de un material de reciente obtención, aún no se ha caracterizado en forma completa y no se encuentra disponible en el mercado.

Diversos autores indican que la mayoría de las resistencias a herbicidas son caracteres de herencia dominante o parcialmente dominante. El nivel de dominancia de un alelo que confiere resistencia se puede describir teóricamente como una medida de la posición relativa del fenotipo del heterocigota en relación a los fenotipos de los homocigotas (Bourguet *et al.*, 2000). Dentro de la serie alélica de *Ahas1*, el alelo *Ahas1-3* mostró dominancia sobre el alelo *Ahas1-1* en ensayos fenotípicos y bioquímicos con diferentes dosis de imidazolinonas (Sala *et al.*, 2012c) y el alelo *Ahas1-2*, en presencia de herbicidas sulfonilureas mostró dominancia sobre el alelo *Ahas1-1* (Miller y Zollinger, 2004). Estudios realizados anteriormente sobre el grado de dominancia de la resistencia a herbicidas han sido diseñados para evaluar la herencia de la mutación que confiere resistencia y generalmente se utiliza una sola dosis de herbicida para determinar las relaciones de dominancia entre los alelos. Por ello se postula que las relaciones de dominancia entre los alelos de la serie podrían variar desde dominancia a recesividad en función del tipo de herbicida y de la dosis evaluada (Roux *et al.*, 2005; Sala *et al.*, 2012c). Este aspecto, que es de importancia para desarrollar pruebas diagnósticas, ha sido muy poco explorado aún en la literatura y posee implicancias prácticas interesantes en los programas de mejoramiento de este cultivo. Por lo tanto, la determinación de las relaciones de dominancia entre los alelos permitiría definir la constitución alélica apropiada de los progenitores para el desarrollo de híbridos comerciales con resistencia a un determinado inhibidor de AHAS.

Los programas de mejoramiento que buscan incorporar en sus materiales los genes de resistencia a herbicidas, realizan la identificación fenotípica de los genotipos resistentes a campo mediante la aplicación foliar del herbicida en el estadio V6 del cultivo (Bruniard y Miller, 2001) o en plantas que crecen en invernáculo en estadios tempranos de crecimiento, usualmente V2-V4 (Sala *et al.*, 2012d). Es una realidad que los programas de mejoramiento involucran la evaluación de un gran número de individuos y para la realización de la misma a campo es necesario disponer de una gran cantidad de recursos. Las metodologías alternativas de evaluación de materiales, que permitan la identificación de forma eficiente en etapas tempranas del crecimiento de la planta de aquellos individuos que porten genes de resistencia, se traducirían en un ahorro de tiempo y recursos.

El grupo de trabajo de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario ha realizado estudios que constituyen un valioso aporte al desarrollo de pruebas diagnósticas para identificación de plantas resistentes a imidazolinonas en girasol (Vega *et al.*, 2009; Breccia *et al.*, 2009; 2011). Dentro de estos estudios se encuentran los ensayos de germinación en los que se evalúan parámetros de crecimiento que son afectados por la presencia de los herbicidas inhibidores de AHAS, como la longitud de las raíces principales y laterales, la longitud de las hojas, el área foliar total de las plántulas y el grado de clorosis de las hojas. Estas metodologías, que resultaron efectivas para la clasificación de individuos con distintos grados de resistencia conferida por los alelos *Ahas1-1* y *Ahas1-3*, incluyen la evaluación en la etapa de germinación en presencia de herbicida (Vega *et al.*, 2009; Breccia *et al.*, 2011; Gil *et al.*, 2012) y las pruebas de actividad enzimática AHAS mediante un protocolo *in vivo* (Vega *et al.*, 2012). El presente trabajo pretende extender estos estudios al nuevo alelo *Ahas1-4* con resistencia a otros inhibidores AHAS como las sulfonilureas y, a su vez, evaluar los niveles de dominancia entre este nuevo alelo y los alelos *Ahas1-1* y *ahas1*.

HIPÓTESIS

- La selección por resistencia a inhibidores de AHAS en girasol puede realizarse según:
 - (a) variables de crecimiento aéreo: i) área foliar total, ii) longitud promedio del primer par de hojas y iii) tonalidad de color promedio del primer par de hojas;
 - (b) variables de crecimiento radical: i) longitud de raíz principal, ii) longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm y iii) longitud de raíz lateral más larga
 - (c) actividad enzimática.

- Las relaciones de dominancia entre los alelos del locus *Ahas1* varían en función de:
 - (a) la concentración del herbicida utilizado;
 - (b) el tipo de herbicida utilizado;
 - (c) el momento de evaluación de síntomas en plántulas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar los patrones de resistencia cruzada y las relaciones de dominancia entre los alelos que confieren resistencia a inhibidores de AHAS en girasol.

Objetivos específicos

- Caracterizar el crecimiento de plántulas y la actividad enzimática AHAS en respuesta a los herbicidas imazapir y metsulfurón metil de genotipos de girasol portadores de diferentes combinaciones de los alelos *Ahas1-1*, *Ahas1-4* y *ahas1*.
- Determinar las relaciones de dominancia entre los alelos *Ahas1-1*, *Ahas1-4* y *ahas1* en respuesta a diferentes concentraciones de imazapir y metsulfurón metil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron tres isólinas desarrolladas por el Departamento de Biotecnología de Nidera S.A. y los híbridos derivados del cruzamiento entre ellas (Tabla 1). Estos materiales difieren a nivel del *locus Ahas1*, el cual determina la resistencia a inhibidores de AHAS.

Tabla 1. Genotipos de girasol utilizados para la caracterización de la resistencia a inhibidores de AHAS.

Material vegetal	Genotipo		Abreviatura
B7 WT	<i>ahas1</i>	<i>ahas1</i>	0-0
B7 Imisun	<i>Ahas1-1</i>	<i>Ahas1-1</i>	1-1
B7 AIR	<i>Ahas1-4</i>	<i>Ahas1-4</i>	4-4
B7 WT x B7 Imisun	<i>ahas1</i>	<i>Ahas1-1</i>	0-1
B7 WT x B7 AIR	<i>ahas1</i>	<i>Ahas1-4</i>	0-4
B7 Imisun x B7 AIR	<i>Ahas1-1</i>	<i>Ahas1-4</i>	1-4

Herbicidas

Se utilizaron dos herbicidas pertenecientes al grupo de inhibidores de AHAS. Sus ingredientes activos son imazapir (ácido 2-[(*RS*)-4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il] nicotínico) y metsulfurón metil (metil 2-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-ilcarbamoilsulfamoil) benzoato), los cuales pertenecen a la familia de las imidazolinonas y las sulfonilureas, respectivamente (Fig. 2).

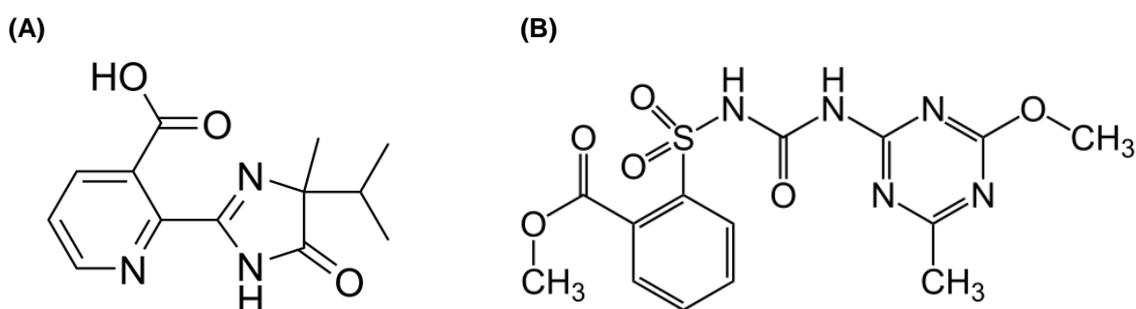


Figura 2. Estructuras químicas de los herbicidas (A) imazapir y (B) metsulfurón metil

Metodología

Ensayo de germinación en multimacetas

Las cipselas de los genotipos descritos se sembraron en germinadores tipo multimacetas utilizando perlita como soporte inerte. La incubación se realizó en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo e intensidad lumínica (25 ± 2 °C, 16/8 horas luz/oscuridad y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente) para dos períodos de duración: siete y 14 días (Fig. 3). Los riegos se realizaron por capilaridad con una solución nutritiva formulada sobre la base salina de Murashige y Skoog (1962) al 25% y suplementada con diferentes concentraciones de herbicida. Las mismas variaron en función del grado de resistencia del genotipo, del período de incubación y del herbicida utilizado según se detalla en la Tabla 2. Los controles para cada genotipo se regaron por capilaridad con la solución nutritiva sin agregado de herbicida. El diseño experimental fue de bloques completos aleatorizados con tres repeticiones para cada combinación de genotipo y concentración de herbicida. Cada repetición consistió en 12 plántulas.

(A)



(B)



Figura 3. Plántulas de girasol obtenidas en los ensayos de germinación de **(A)** siete días y **(B)** 14 días.

Tabla 2. Concentraciones de los herbicidas imazapir (IMI) y metsulfurón metil (SU) aplicadas a cada uno de los genotipos evaluados.

Genotipo	IMI		SU	
	7 días	14 días	7 días	14 días
0-0	0,1 - 0,316 - 1 - 10 μM	0,001- 0,01- 0,1 - 0,316 - 1 - 10 μM	0,001 - 0,01 - 0,1 - 0,316 - 1 nM – 10nM	
0-1 1-1	1 - 3,16 - 10 - 31,6 - 100 μM		0,001 - 0,01 - 0,1 - 0,316 - 1 - 3,16 - 10 nM	
0-4 1-4 4-4	1 - 3,16 - 10 - 31,6 - 100 - 1000 μM .		0,1 - 0,316 - 1- 3,16 - 10 - 100 - 1000 nM	

Las variables evaluadas al finalizar ambos períodos de incubación fueron: longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb), longitud de la raíz lateral más larga (LL). Para los ensayos con período de incubación de 14 días se evaluaron otras tres variables relacionadas con el crecimiento y la presencia de síntomas en la parte aérea de las plántulas: área foliar total (AF), longitud promedio del primer par de hojas (LF) y tonalidad de color promedio del primer par de hojas (Hue) (Fig. 4). Los datos se expresaron por planta individual en porcentaje respecto al control (en el ANEXO se muestran los valores absolutos de las variables para los tratamientos control). La medición de todas las variables se realizó mediante análisis digital de imágenes. Las imágenes digitales se procesaron mediante dos programas informáticos, las correspondientes a las variables relacionadas al sistema radical de las plántulas se analizaron con el programa *Image J* (Abramoff *et al.*, 2004) y el plugin *Smart Root* (Lobet *et al.*, 2011) (Fig. 5) y las correspondientes a las variables foliares fueron analizadas con el programa *Tomato Analyzer* (Rodríguez *et al.*, 2010) (Fig. 6).

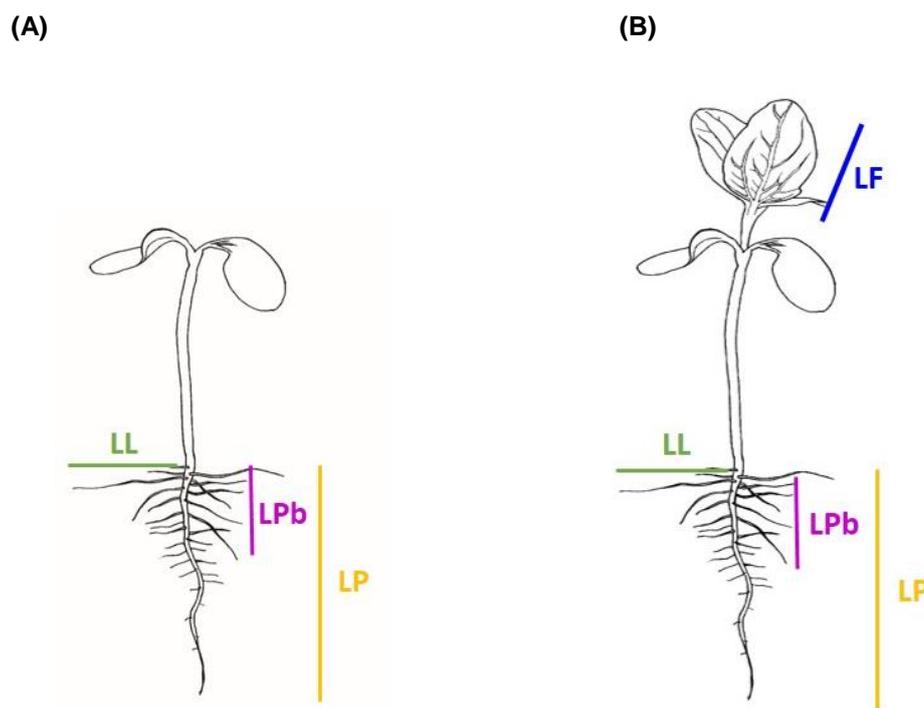


Figura 4. Variables evaluadas al finalizar el período de incubación de **(A)** siete días y **(B)** 14 días. longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb), longitud de la raíz lateral más larga (LL), longitud promedio del primer par de hojas (LF).

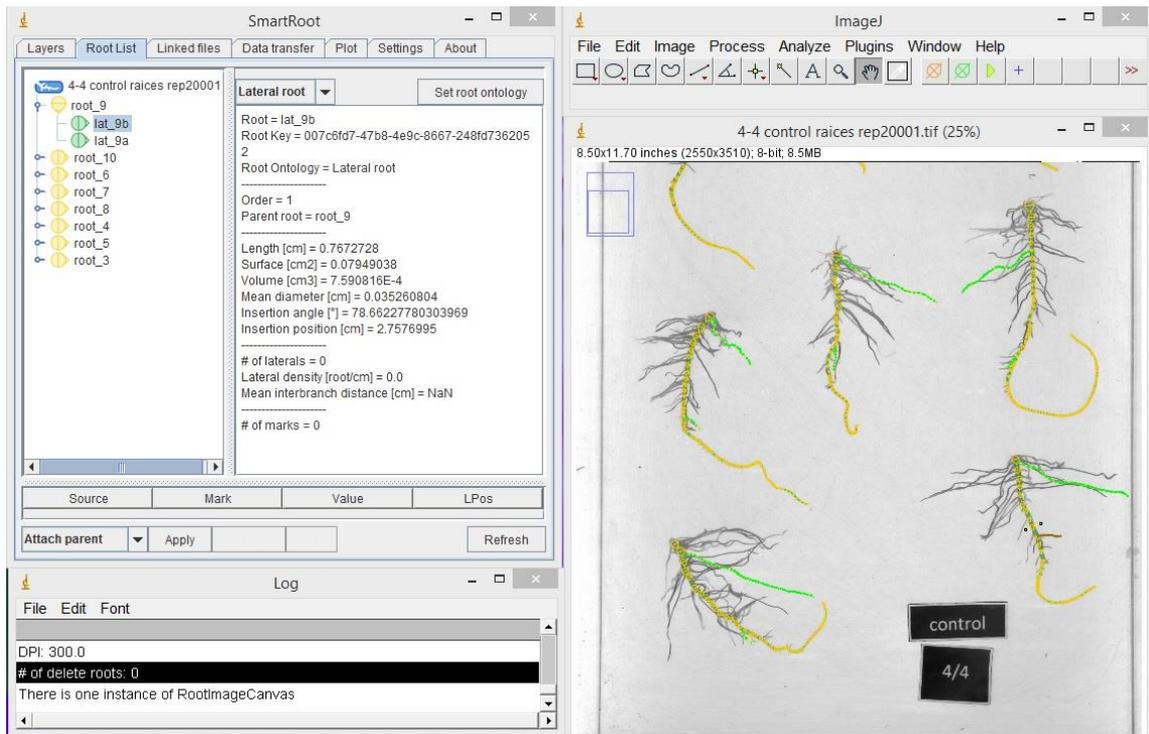


Figura 5. Medición de las variables del sistema radical con el software Image J y el plugin Smart Root.

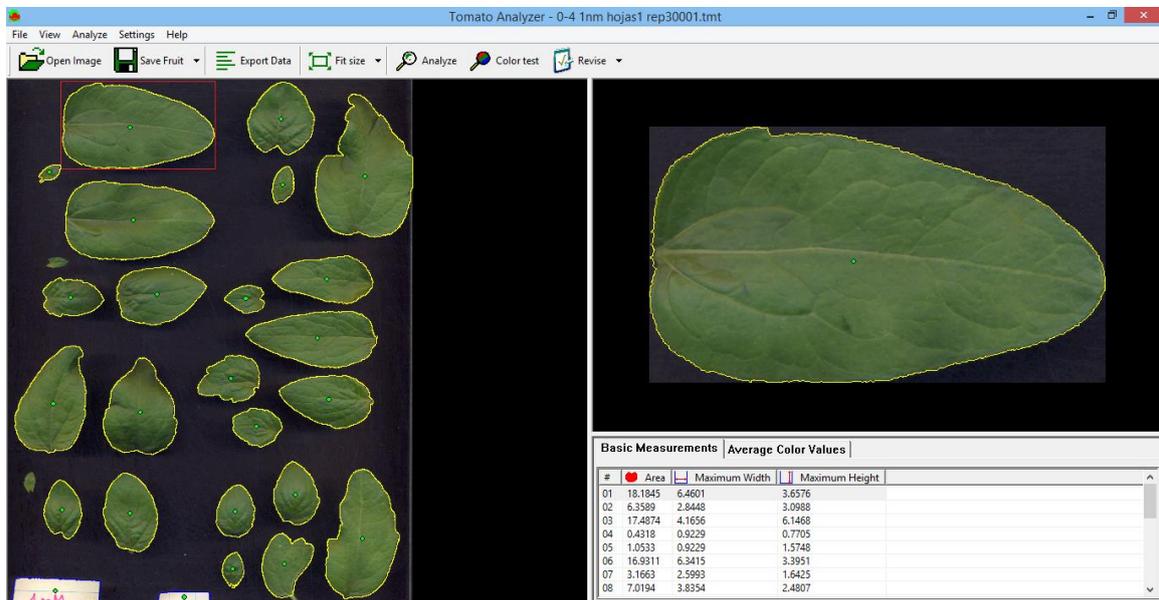


Figura 6. Medición de las variables de crecimiento aéreo con el software Tomato Analyzer.

Cuantificación de actividad AHAS

Se implementó un protocolo que mide actividad AHAS en condiciones *in vitro* descrito por Yu *et al.* (2003) y Yu *et al.* (2010) con modificaciones. Las hojas de plántulas de los genotipos descritos en estadio V2 (Schneider y Miller, 1981), fueron pesadas, congeladas en nitrógeno líquido y molidas en mortero. El tejido fue homogeneizado en una solución de reacción (50 mM HEPES pH=7, 200 mM piruvato de sodio, 20 mM MgCl₂, 2 mM TPP y 20 μM FAD) en una relación de 5 ml por gramo de tejido (Fig. 7). La solución de reacción fue preparada inmediatamente antes de ser utilizada. Se adicionó PVPP en una relación 6:1. Todas las operaciones fueron realizadas manteniendo los reactivos y el material vegetal a 4 °C. El homogeneizado fue centrifugado a 27.000 g por 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, el cual fue centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones (Fig. 8). El sobrenadante fue utilizado inmediatamente como extracto crudo y medio de reacción para el ensayo enzimático: 100 μl del sobrenadante se incubaron con el mismo volumen de diferentes concentraciones de herbicida (Tabla 3) durante 60 minutos a 37 °C. Para la descarboxilación del acetolactato producido a acetoína, se agregaron 40 μl de H₂SO₄ 5,5 N logrando el medio ácido necesario para que ocurra la reacción. Se utilizó un tubo control con medio básico que fue considerado control de producción de acetoína endógena, al cual se adicionaron 40 μl de NaOH 2,5 N. Los tubos fueron incubados 15 minutos a 60 °C. Para el dosaje de acetoína por la reacción de Westerfeld (1945), se adicionaron 190 μl de una solución de creatina (0,5% p/v) y 190 μl de α-naftol (5 % p/v) ambos preparados en NaOH 2,5 N justo antes de ser utilizados. Los tubos se incubaron a 60 °C por 15 minutos. A continuación, los tubos fueron centrifugados a temperatura ambiente por cinco minutos a 20.000 g y el sobrenadante fue recuperado para la medición de absorbancia a 530 nm (Fig. 9). Para cada combinación de genotipo-concentración de herbicida se realizaron tres repeticiones y cada experimento se llevó a cabo por duplicado. Los datos obtenidos se expresaron en porcentaje respecto al control (en el ANEXO se muestran los valores absolutos de las variables para los tratamientos control).

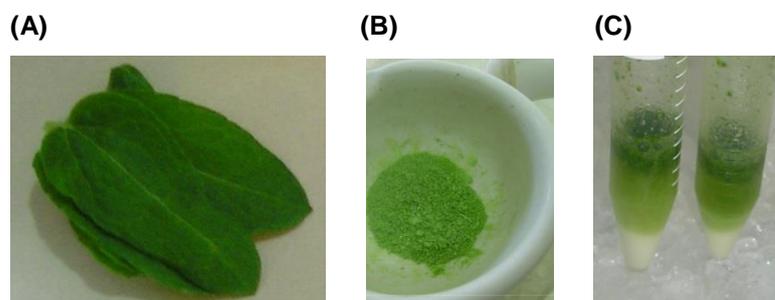


Figura 7. (A) Hojas de plántulas de girasol en estadio V2 (B) Molienda de hojas congeladas en nitrógeno líquido. (C) Tejido homogeneizado en solución de reacción.

(A)



(B)



Figura 8. Solución de reacción. **(A)** Homogeneizado luego de una primera centrifugación. **(B)** Posterior a una segunda centrifugación del sobrenadante recuperado luego de la primer centrifugación.

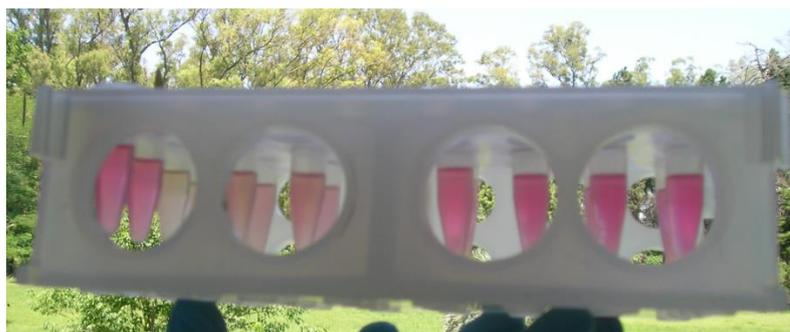


Figura 9. Sobrenadante recuperado luego de la centrifugación para la medición de absorbancia.

Tabla 3. Concentraciones de los herbicidas imazapir (IMI) y metsulfurón metil (SU) aplicadas al extracto enzimático de cada uno de los genotipos evaluados.

Genotipo	IMI	SU
0-0	0 - 0,1 - 1 - 3,16 - 10 - 100 μ M	0 - 1 - 3,16 - 10 - 100 - 316 - 1000 - 10000 nM
0-1	0 - 0,1 - 1 - 10 - 31,6 - 100 - 1000 μ M	
0-4	0 - 1 - 10 - 100 - 316 - 1000 - 3160 μ M	
1-4	0 - 1 - 10 - 100 - 316 - 1000 - 3160 μ M	
4-4	0 - 1 - 10 - 100 - 316 - 1000 - 3160 μ M	

Estimación de las relaciones de dominancia entre los alelos *Ahas1-1*, *Ahas1-4* y *ahas1*

Se realizó la estimación de dominancia efectiva de la resistencia a herbicidas, la cual evalúa el nivel de mortalidad relativa a una concentración de herbicida dada (Bourguet *et al.*, 2000). Para el cálculo de dominancia se consideraron aquellas concentraciones de herbicida para las cuales el alelo resistente confirió una ventaja con respecto al carácter bajo estudio. Para ello, se tuvo en cuenta la relación entre los homocigotas resistente y susceptible (R/S) o entre los homocigotas de mayor y menor nivel de resistencia (para el caso de los alelos *Ahas1-4* y *Ahas1-1* para el herbicida imazapir). Para dicho cálculo se consideraron los valores expresados como porcentaje respecto al control estimados para cada concentración de herbicida aplicada y para cada una de las variables estudiadas. Si el valor de la relación entre los homocigotas para distintos alelos fue superior a dos ($R/S > 2$) se consideró que existía una ventaja en cuanto a la resistencia y se procedió al cálculo de dominancia (Roux *et al.*, 2005). Los valores de las variables para las distintas concentraciones de herbicida se estimaron con la función *predict* el paquete *drc* (Ritz y Streibig, 2005) dentro del programa estadístico R (R Development Core Team, 2012). Para el cálculo de la dominancia de la resistencia a herbicidas se utilizó la siguiente fórmula (Bourguet *et al.*, 2000):

$$D = (RS - SS)/(RR - SS)$$

donde RR representa el valor estimado para el genotipo homocigota resistente, RS del heterocigota y SS del homocigota susceptible o aquel de menor nivel de resistencia (en el caso de la relación de dominancia entre *Ahas1-4* y *Ahas1-1* para imazapir). Se definieron seis categorías de acuerdo a Sala *et al.* (2012c):

- $D > 1$, sobredominancia
- $D \approx 1$, dominancia
- $0,5 < D < 1$, semidominancia
- $D = 0,5$, codominancia
- $0 < D < 0,5$, semirecesividad
- $D \approx 0$, recesividad

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en cada ensayo se analizaron por regresión no lineal, utilizando el paquete *drc* (Ritz y Streibig, 2005) dentro del programa estadístico R (R Development Core Team, 2012). Las curvas dosis-respuesta fueron ajustadas al modelo log-logístico de tres parámetros, dado por la siguiente fórmula (Seefeldt *et al.*, 1995):

$$f(x, (b, d, e)) = \frac{d}{1 + \exp \{b(\log(x) - \log(e))\}}$$

donde **b** es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, **d** el límite superior (respuesta al tratamiento control) y **e** la concentración de herbicida que reduce la variable respuesta al 50%, el cual se nombró GR₅₀ para las variables que evalúan crecimiento e I₅₀ para la actividad enzimática AHAS. Para determinar si los datos ajustaban apropiadamente al modelo, se llevó a cabo la prueba F de falta de ajuste, la cual compara el modelo de regresión no lineal utilizado con uno que toma a cada dosis como un tratamiento independiente. Un valor de probabilidad asociado a F no significativo ($p > 0,05$) indica que el modelo de regresión no lineal provee una descripción aceptable de los datos (Ritz y Streibig, 2005). Se analizaron las variancias por medio del gráfico de residuos frente a los valores ajustados y en los casos donde el modelo no era apropiado para los datos se realizó la transformación de Box-Cox para homogeneizar las varianzas (Box y Cox, 1964). La comparación de los parámetros estimados entre genotipos se realizó mediante la función *compParm* del paquete estadístico *drc*.

El modelo de regresión no lineal no describió adecuadamente los datos ($p < 0,05$) para la variable tonalidad de color, por ello los mismos fueron analizados a través del análisis de la variancia (ANOVA) para cada genotipo, utilizando el paquete *agricolae* (De Mendiburu, 2014) dentro del programa estadístico R (R Development Core Team, 2012). Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para confirmar la normalidad de la variable y de los residuales del modelo y la prueba de Bartlett para la evaluación de la homogeneidad de variancias. La comparación de los valores medios entre las distintas concentraciones de herbicida se realizó mediante la prueba de Tukey (Sokal y Rolhf, 1969).

Se estimaron las correlaciones de Spearman entre las variables de crecimiento radical de los ensayos de siete y 14 días de duración utilizando el programa estadístico R (R Development Core Team, 2012).

RESULTADOS

Ensayo de germinación en multimacetas durante siete días

El crecimiento de las plántulas varió en función del tipo de herbicida presente y de la combinación de alelos de resistencia en cada genotipo evaluado. En presencia del herbicida imazapir, las plántulas mayormente afectadas fueron las del genotipo portador del alelo *ahas1* en homocigosis, con un crecimiento de la raíz principal inferior al resto de los genotipos (menor a 1 cm en concentraciones de herbicida a partir 10 μ M) y sin crecimiento de raíces laterales (Fig. 10). Los genotipos con al menos un alelo *Ahas1-4* se vieron afectados en menor medida por el herbicida (para concentraciones de herbicida de 10 μ M no se observó reducción de crecimiento con respecto al control) y mostraron un crecimiento radical mayor que los genotipos *ahas1/Ahas1-1* y *Ahas1-1/Ahas1-1*.

Se realizó el análisis de regresión no lineal y los datos obtenidos de las tres variables evaluadas en el ensayo ajustaron a un modelo log-logístico de tres variables (Fig. 11). Se estimaron los valores de GR_{50} , es decir, la concentración de herbicida que provoca una reducción del crecimiento en un 50%, para las tres variables en los seis genotipos (Tabla 4). Los genotipos 4-4 y 1-4 mostraron los mayores valores de GR_{50} , para la variable longitud de raíz principal (LP). Los mismos fueron nueve veces superiores al valor del genotipo 1-1 y 6000 veces superiores al valor del genotipo 0-0. Similares diferencias se observaron entre los valores de GR_{50} de los mismos genotipos para las variables longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb) y longitud de la raíz lateral más larga (LL).

La comparación de los valores de GR_{50} entre los genotipos arrojó diferencias significativas, excepto para las comparaciones entre los genotipos 1-1 vs 0-1, 1-1 vs 0-4, 4-4 vs 0-4 y 4-4 vs 1-4 para la variable LP; 1-1 vs 0-1, 4-4 vs 0-4 y 4-4 vs 1-4 para la variable LPb y 1-1 vs 0-1, 4-4 vs 0-1, 4-4 vs 0-4 y 4-4 vs 1-4 para la variable LL (Tabla 5).

(A)



(B)

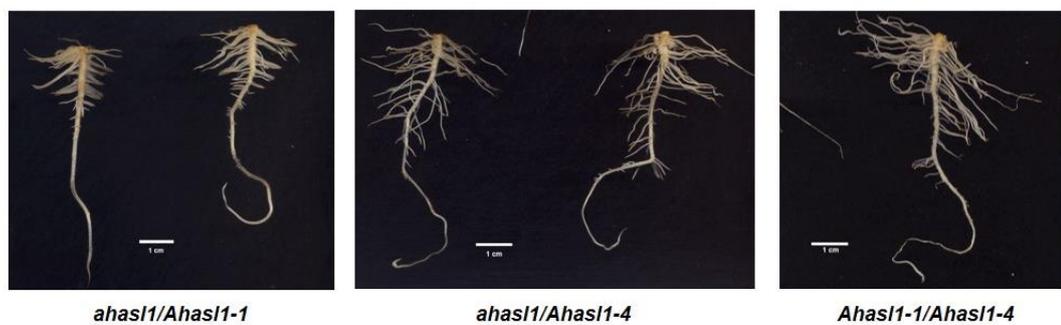
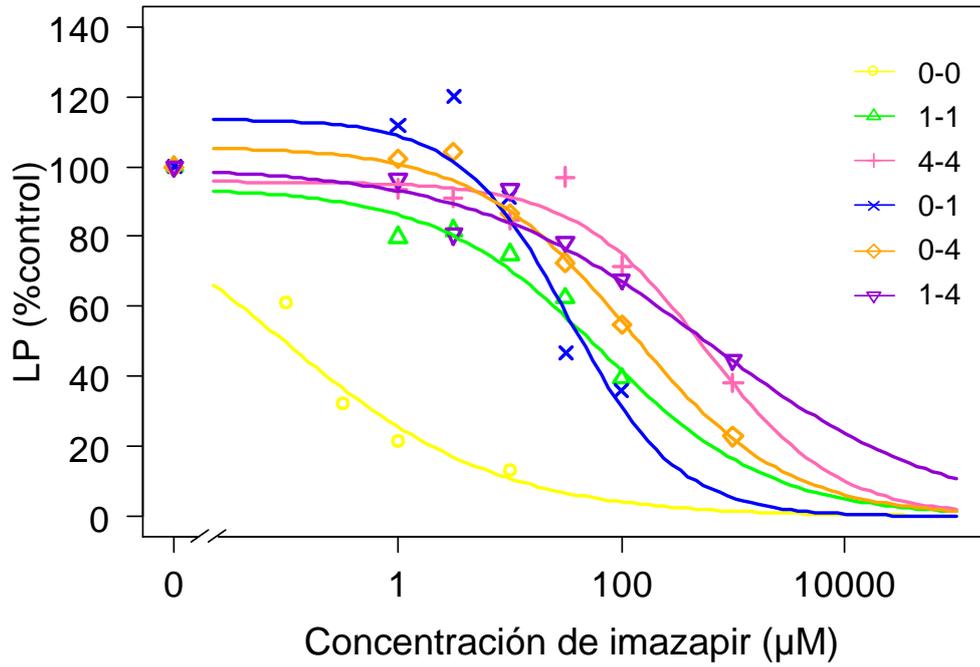


Figura 10. Sistema radical de plántulas de siete días obtenidas en el ensayo de germinación. **(A)** Las imágenes corresponden a los genotipos *ahas1/ahas1* (0-0), *Ahas1-1/Ahas1-1* (1-1) y *Ahas1-4/Ahas1-4* (4-4), tratados con solución nutritiva suplementada con el herbicida imazapir (10 μ M). **(B)** Las imágenes corresponden a los genotipos *ahas1/Ahas1-1* (0-1), *ahas1/Ahas1-4* (0-4) y *Ahas1-1/Ahas1-4* (1-4), tratados con solución nutritiva suplementada con el herbicida imazapir (10 μ M).

(A)



(B)

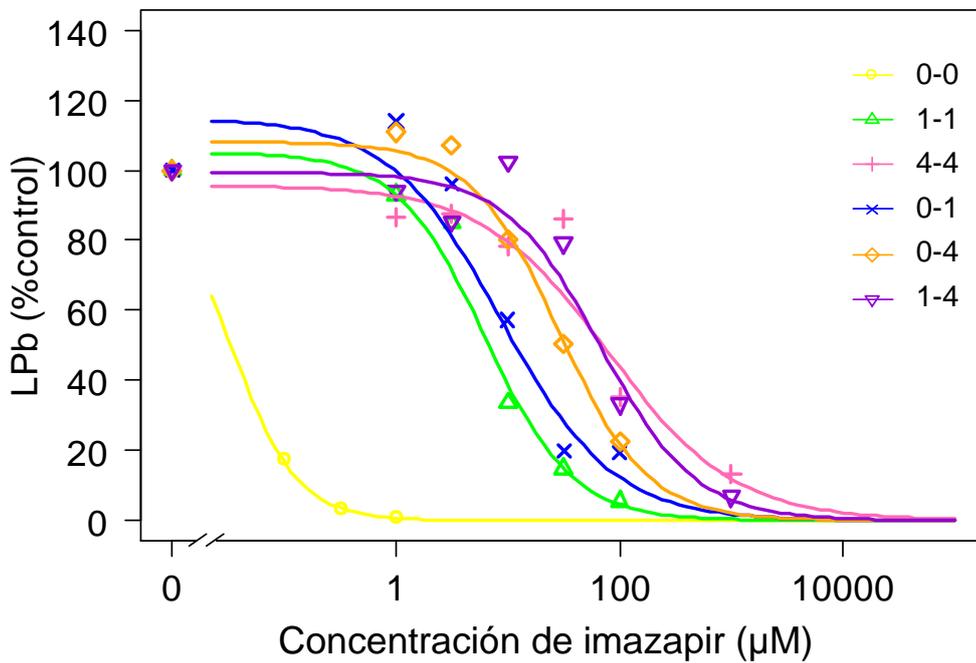


Figura 11. Efecto del herbicida imazapir en plántulas de siete días sobre variables de crecimiento radical expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis isóneas evaluadas. **(A)** Longitud de raíz principal (LP). **(B)** Longitud de la raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb).

(C)

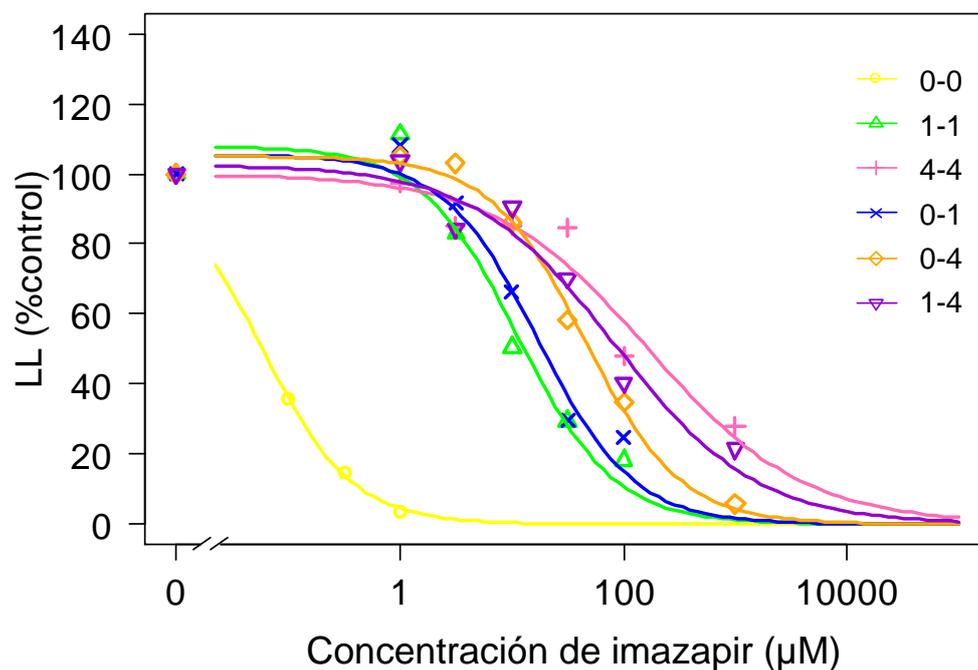


Figura 11. (Continuación) Efecto del herbicida imazapir en plántulas de siete días sobre variables de crecimiento radical expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis isolíneas evaluadas. **(C)** Longitud de la raíz lateral más larga (LL).

Tabla 4. Valores de GR_{50} (μM) de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb) y longitud de la raíz lateral más larga (LL), obtenidos a partir de plántulas de siete días tratadas con diferentes concentraciones de imazapir.

Genotipo	LP	LPb	LL
0-0	$0,09 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,02$
1-1	$67,79 \pm 33,09$	$6,20 \pm 1,82$	$11,20 \pm 2,27$
4-4	$567,28 \pm 202,18$	$79,80 \pm 33,83$	$166,47 \pm 57,85$
0-1	$33,95 \pm 8,44$	$8,71 \pm 2,94$	$17,13 \pm 3,50$
0-4	$119,93 \pm 46,81$	$28,69 \pm 8,72$	$45,08 \pm 9,18$
1-4	$576,93 \pm 383,73$	$67,41 \pm 19,87$	$83,43 \pm 24,83$

Tabla 5. Valores de probabilidad asociados a la comparación del GR₅₀ de las curvas de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb) y longitud de la raíz lateral más larga (LL), en función de la concentración del herbicida imazapir.

Comparación	LP	LPb	LL
0-0 vs 1-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 4-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 0-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 4-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 0-1	ns	ns	ns
1-1 vs 0-4	ns	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4-4 vs 0-1	<0,05	<0,05	ns
4-4 vs 0-4	ns	ns	ns
4-4 vs 1-4	ns	ns	ns
0-1 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-1 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-4 vs 1-4	<0,0001	<0,05	<0,005

Respecto a las plántulas que germinaron y crecieron en presencia del herbicida metsulfurón metil, se observó una marcada diferencia entre los tres genotipos portadores del alelo *Ahas1-4*, el cual confiere resistencia a dicho herbicida, y los genotipos restantes (0-0, 0-1 y 1-1), los cuales mostraron menor longitud de raíz principal, un número de raíces laterales considerablemente menor y de menor longitud (Fig. 12).

Por medio del análisis estadístico de regresión no lineal, los datos obtenidos a partir de las plántulas anteriormente mencionadas, ajustaron a un modelo log-logístico (Fig. 13). Los valores estimados de GR₅₀ de las variables LP, LPb y LL se presentan en la Tabla 6. Para la variable LP se observaron diferencias entre los valores de GR₅₀, entre los genotipos con mayor grado de resistencia (4-4, 1-4 y 0-4) y los susceptibles (0-0, 0-1 y 1-1), que alcanzan valores hasta 1000 veces mayores a favor de los genotipos resistentes. Las mayores diferencias entre los valores GR₅₀ se observaron para la variable LPb, hasta 2000 veces superiores al comparar los genotipos resistentes con los susceptibles, efecto que se observó visualmente ya que las plántulas presentaban raíces principales con escaso número de raíces laterales.

En la comparación de valores de GR₅₀ (Tabla 7), se observaron diferencias significativas al comparar el genotipo 0-0 con el resto de los genotipos, dentro de las tres variables evaluadas. Lo mismo ocurrió al comparar el genotipo 1-1 con los genotipos resistentes. Dentro de los genotipos resistentes, no se encontraron diferencias significativas para las tres variables evaluadas al comparar entre los genotipos 4-4 vs 0-4 y 4-4 vs 1-4.

(A)



(B)

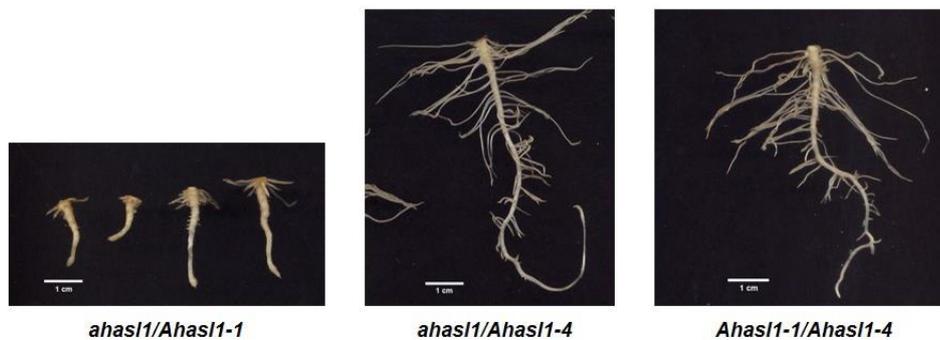
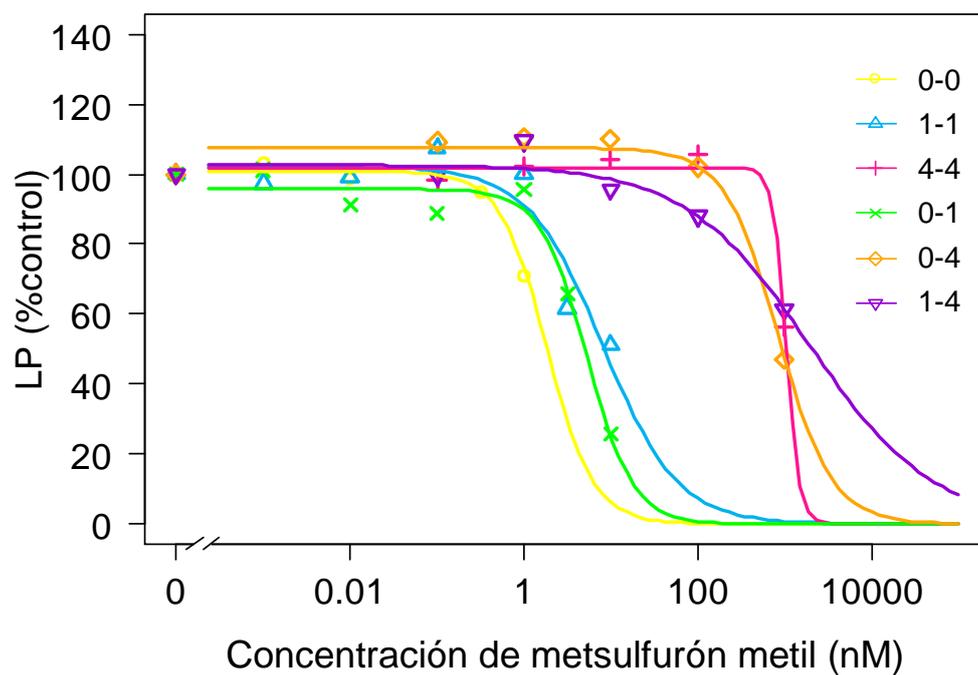


Figura 12. Sistema radical de plántulas de siete días obtenidas en el ensayo de germinación. Las imágenes corresponden a las plántulas tratadas con solución nutritiva suplementada con el herbicida metsulfurón metil (10 nM). **(A)** Sistema radical de plántulas correspondientes a los genotipos *ahas1/ahas1* (0-0), *Ahas1-1/Ahas1-1* (1-1) y *Ahas1-4/Ahas1-4* (4-4). **(B)** Sistema radical de plántulas correspondientes a los genotipos *ahas1/Ahas1-1* (0-1), *ahas1/Ahas1-4* (0-4) y *Ahas1-1/Ahas1-4* (1-4).

(A)



(B)

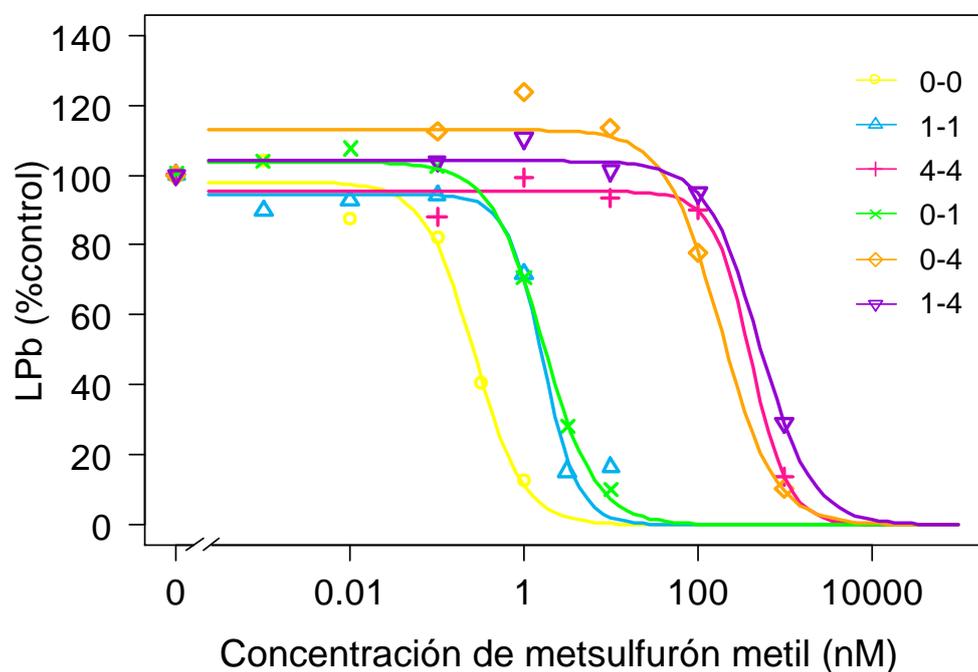


Figura 13. Efecto del herbicida metsulfurón metil en plántulas de siete días sobre variables de crecimiento radical expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis isolíneas evaluadas. **(A)** Longitud de raíz principal (LP). **(B)** Longitud de la raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb).

(C)

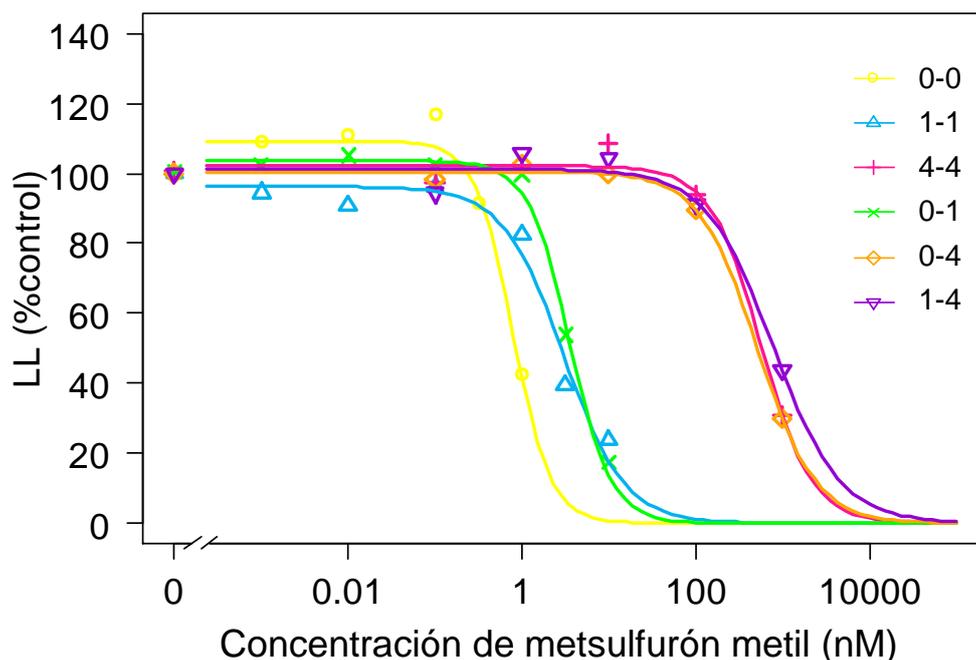


Figura 13. (Continuación) Efecto del herbicida metsulfurón metil en plántulas de siete días sobre variables de crecimiento radical expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis isóneas evaluadas. **(C)** Longitud de la raíz lateral más larga (LL).

Tabla 6. Valores de GR₅₀ (nM) de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb) y longitud de la raíz lateral más larga (LL), obtenidos a partir de plántulas de siete días tratadas con diferentes concentraciones de metsulfurón metil.

Genotipo	LP	LPb	LL
0-0	1,83 ± 1,02	0,27 ± 0,05	0,79 ± 0,12
1-1	8,06 ± 2,37	1,65 ± 0,28	3,03 ± 0,67
4-4	1041,3 ± 448,73	408,16 ± 193,19	566,11 ± 185,94
0-1	5,31 ± 1,08	1,66 ± 0,32	3,56 ± 0,58
0-4	848,95 ± 197,38	181,04 ± 48,1	512,17 ± 159,80
1-4	1909,7 ± 1257	512,57 ± 157,39	766,69 ± 231,36

Tabla 7. Valores de probabilidad asociados a la comparación del GR₅₀ de las curvas de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb) y longitud de la raíz lateral más larga (LL), en función de la concentración del herbicida metsulfurón metil.

Comparación	LP	LPb	LL
0-0 vs 1-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 4-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 0-1	<0,005	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 4-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 0-1	ns	ns	ns
1-1 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4-4 vs 0-1	<0,05	ns	<0,01
4-4 vs 0-4	ns	ns	ns
4-4 vs 1-4	ns	ns	ns
0-1 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-1 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-4 vs 1-4	ns	<0,0001	ns

Ensayo de germinación en multimacetas durante 14 días

A nivel del sistema radical se observaron resultados que se correlacionan con los obtenidos en el ensayo de germinación de siete días para las tres variables del sistema radical evaluadas (LP, LPb y LL). En los ensayos de 14 días también se analizaron tres variables de crecimiento aéreo de las plántulas: área foliar total (AF), longitud promedio del primer par de hojas (LF) y tonalidad de color promedio del primer par de hojas (Hue).

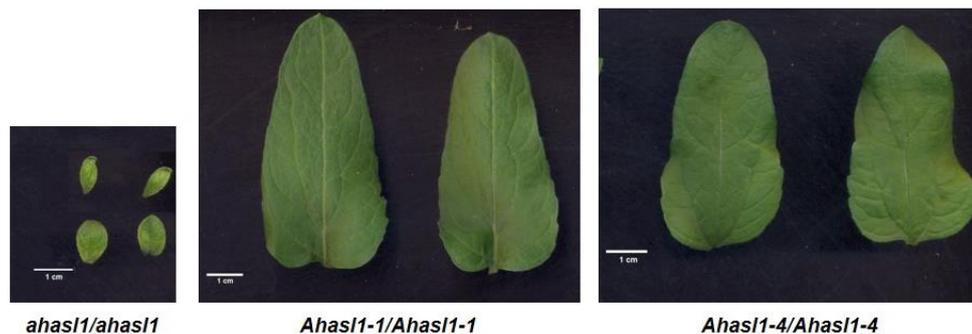
En el ensayo realizado en presencia del herbicida imazapir, a medida que la concentración de herbicida aumentaba se observó un aumento gradual de clorosis de las hojas y menor crecimiento de las mismas, excepto para el genotipo 0-4 en el cuál se observó un alto grado de clorosis a partir de la menor concentración de herbicida con la cual fue tratado (1µM) (Fig. 14). Ninguno de los genotipos evaluados mostró crecimiento de hojas en presencia de las concentraciones más altas de herbicida aplicadas a cada uno de ellos.

Realizando el análisis de regresión no lineal, los datos obtenidos ajustaron a un modelo log-logístico (Fig. 15) para todas las variables excepto para Hue ($p < 0,05$). Para esta última variable se llevaron a cabo análisis de la variancia y pruebas de comparación de medias (Fig. 16). Respecto a los valores de GR₅₀ (Tabla 8), los genotipos 4-4 y 1-4 presentaron los valores más altos para las cinco variables. Analizando los valores de GR₅₀ de las variables aéreas AF y LF, el genotipo 4-4 mostró un valor 300 veces superior al genotipo susceptible 0-0 y más de

dos veces superior con respecto al genotipo 1-1. Para el genotipo 0-4 se observó una respuesta diferencial entre el crecimiento del sistema radical y de la parte aérea de las plántulas. Para las variables LP, LPb y LL, los valores de GR₅₀ fueron hasta tres veces superiores respecto al genotipo 1-1, contrariamente a lo observado en las variables aéreas, donde los valores de GR₅₀ del genotipo 0-4 fueron aproximadamente cuatro veces inferiores al genotipo 1-1.

Al comparar los valores de GR₅₀ (Tabla 9) del genotipo 0-0 versus los demás genotipos y entre los genotipos 1-1 y 4-4, se encontraron diferencias significativas para las cinco variables. Entre los genotipos con mayor grado de resistencia (1-4 y 4-4) no se encontraron diferencias significativas entre los valores de GR₅₀ para las cinco variables. A su vez, se observó que para las variables radicales LP y LPb los valores de GR₅₀ de los genotipos 0-4 y 4-4 no difirieron significativamente, contrariamente a lo que ocurrió para las variables de crecimiento aéreo.

(A)

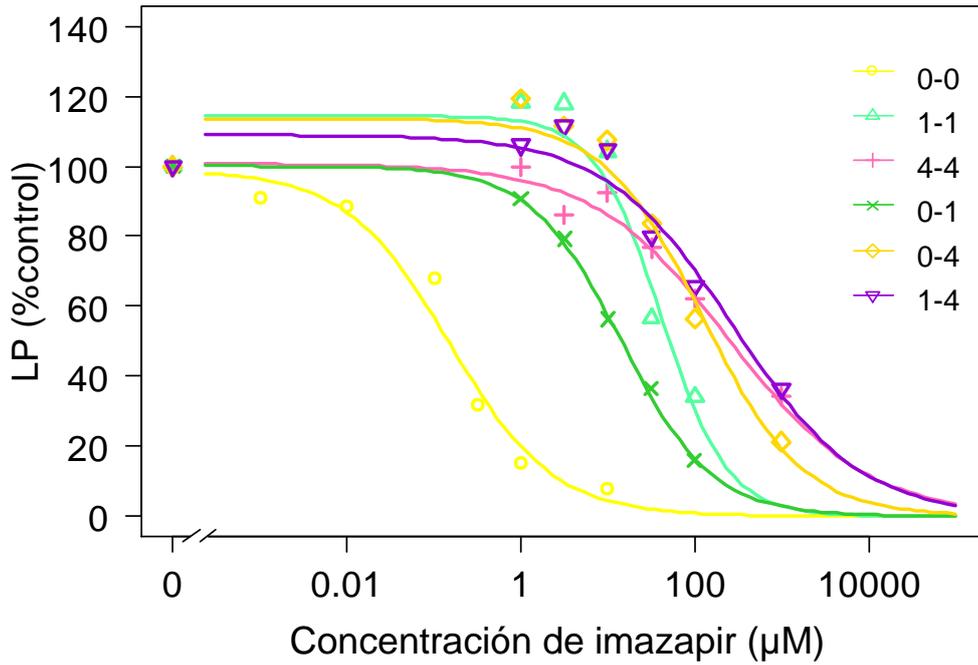


(B)



Figura 14. Primer par de hojas expandidas de plántulas de 14 días obtenidas en el ensayo de germinación. Las imágenes corresponden a las plántulas tratadas con solución nutritiva suplementada con el herbicida imazapir (1 μ M). **(A)** Primer par de hojas de plántulas de girasol correspondientes a los genotipos *ahas1/ahas1* (0-0), *Ahas1-1/Ahas1-1* (1-1) y *Ahas1-4/Ahas1-4* (4-4). **(B)** Primer par de hojas de plántulas de girasol correspondientes a los genotipos *ahas1/Ahas1-1* (0-1), *ahas1/Ahas1-4* (0-4) y *Ahas1-1/Ahas1-4* (1-4).

(A)



(B)

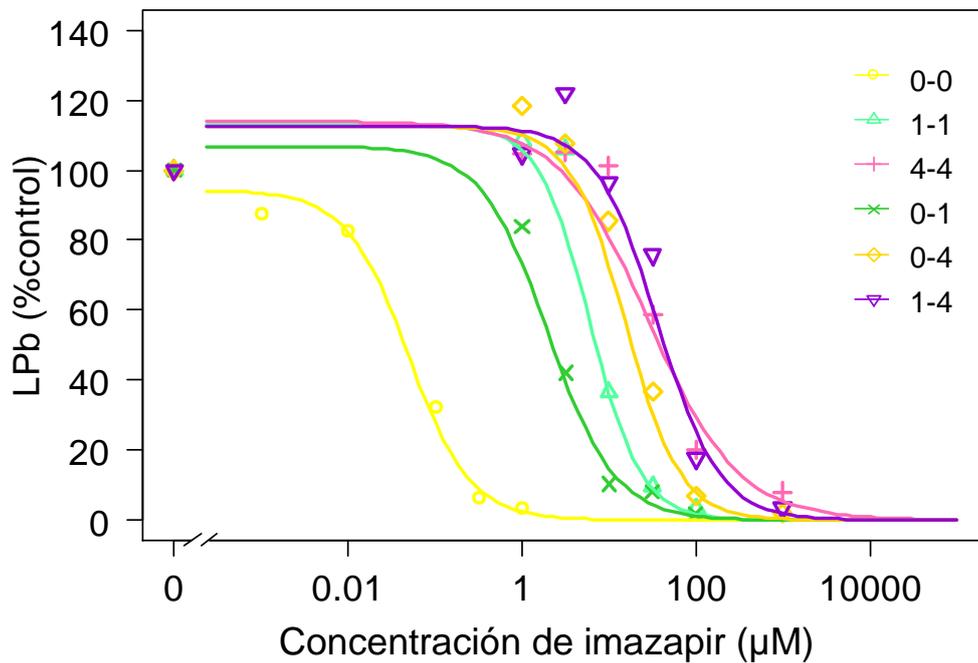
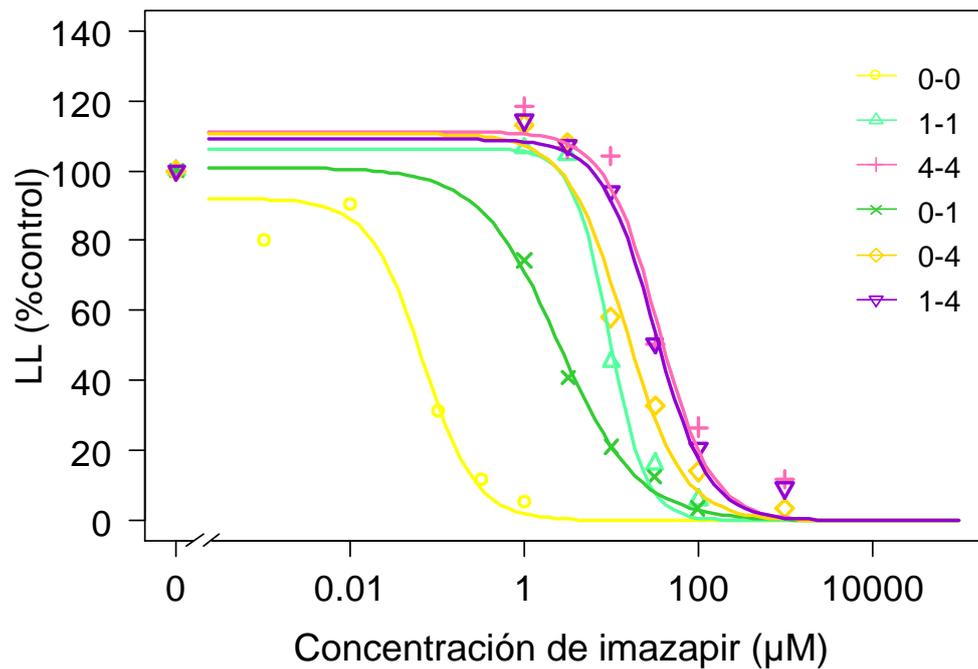


Figura 15. Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 14 días sobre variables de crecimiento radical y aéreo, expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis aislíneas evaluadas. **(A)** Longitud de raíz principal (LP). **(B)** Longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb).

(C)



(D)

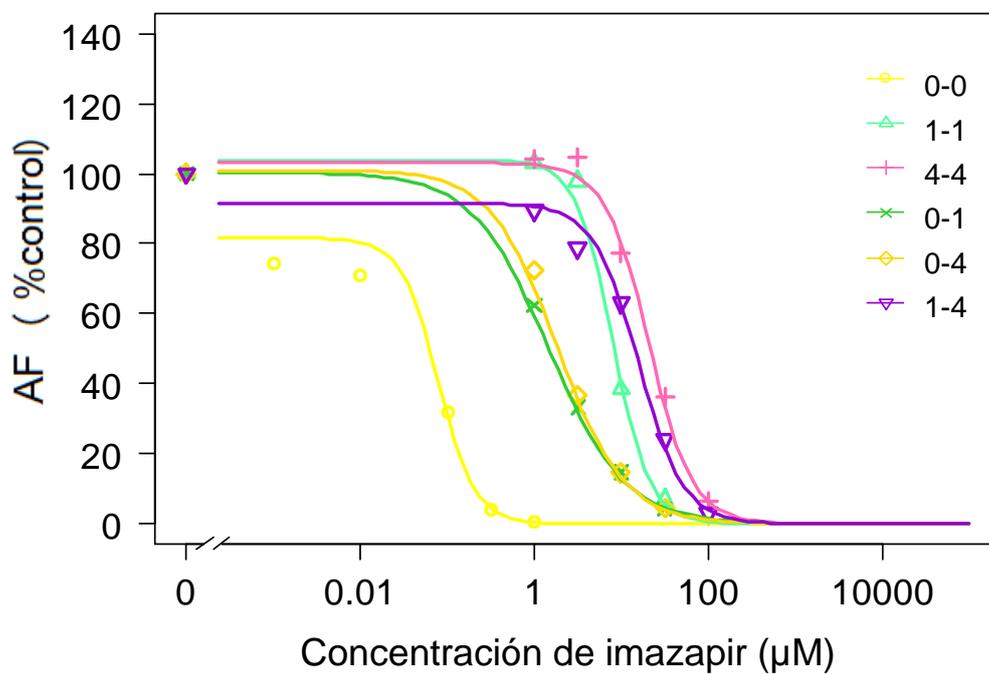


Figura 15. (Continuación) Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 14 días sobre variables de crecimiento radical y aéreo, expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis isolíneas evaluadas. **(C)** Longitud de la raíz lateral más larga (LL). **(D)** Área foliar total (AF).

(E)

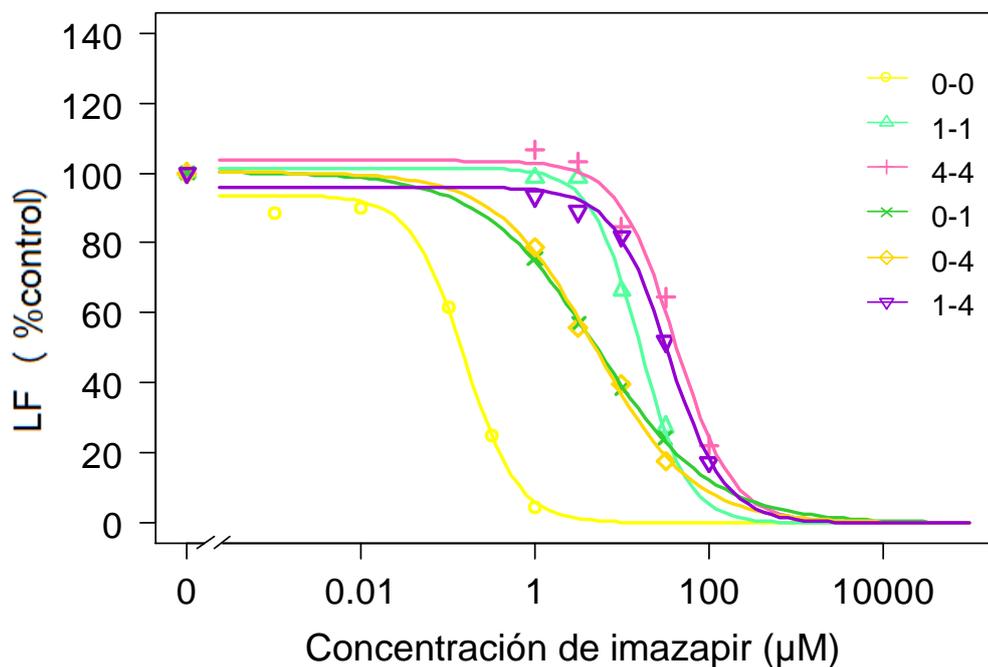


Figura 15. (Continuación) Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 14 días sobre variables de crecimiento radical y aéreo, expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis isolíneas evaluadas. **(E)** Longitud promedio de primer par de hojas (LF).

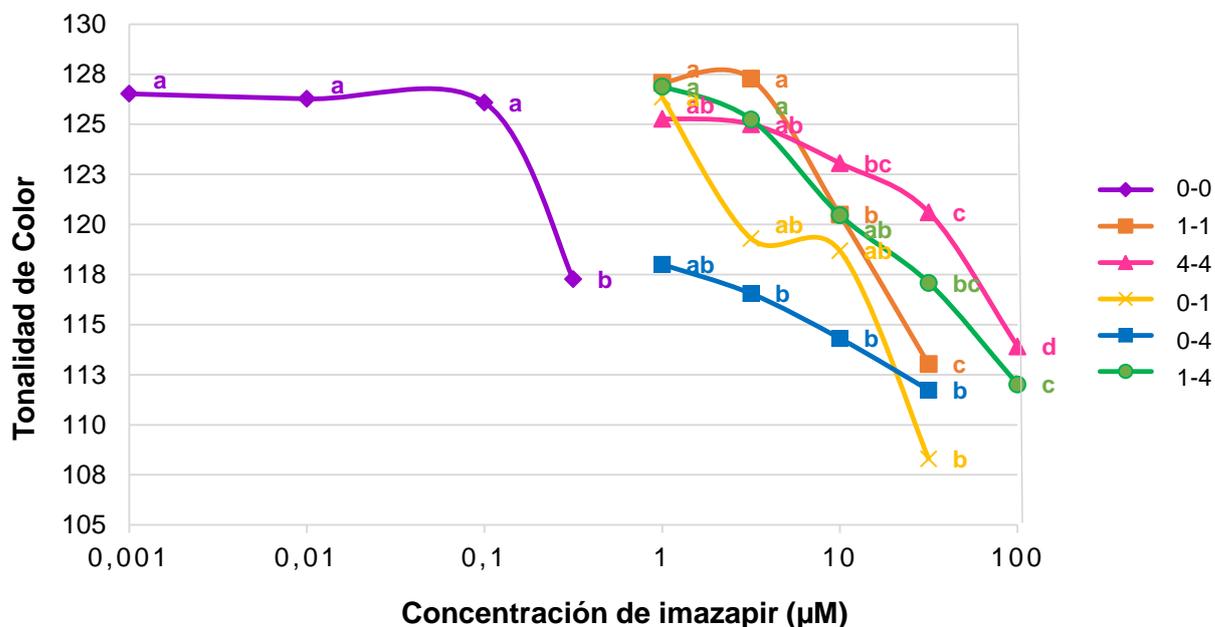


Figura 16. Efecto del herbicida imazapir sobre la variable tonalidad de color promedio del primer par de hojas (Hue) en plántulas de 14 días. Para cada genotipo letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios según la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$)

Tabla 8. Valores de GR₅₀ (µM) de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb), longitud de la raíz lateral más larga (LL), área foliar total (AF) y longitud promedio de primer par de hojas (LF), obtenidos a partir de plántulas de 14 días tratadas con diferentes concentraciones de imazapir.

Genotipo	LP	LPb	LL	AF	LF
0-0	0,15 ± 0,05	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,16 ± 0,03
1-1	41,29 ± 7,73	6,07 ± 1,70	9,49 ± 1,42	8,02 ± 1,28	16,08 ± 2,32
4-4	251,04 ± 110,60	28,69 ± 12,69	34,69 ± 6,40	20,76 ± 4,14	41,18 ± 6,41
0-1	14,32 ± 4,47	1,98 ± 0,76	2,50 ± 0,74	1,46 ± 0,48	5,07 ± 1,46
0-4	124,47 ± 35,51	15,44 ± 4,55	14,45 ± 2,94	1,85 ± 0,53	4,90 ± 1,26
1-4	274,83 ± 106,01	36,33 ± 11,10	31,66 ± 5,89	15,87 ± 3,74	34,72 ± 5,78

Tabla 9. Valores de probabilidad asociados a la comparación del GR₅₀ de las curvas de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb), longitud de la raíz lateral más larga (LL), área foliar total (AF) y longitud promedio de primer par de hojas (LF), en función de la concentración del herbicida imazapir en el ensayo en multimacetas de 14 días.

Comparación	LP	LPb	LL	AF	LF
0-0 vs 1-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 4-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 0-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 4-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 0-1	ns	ns	<0,05	<0,05	<0,05
1-1 vs 0-4	<0,0001	<0,0005	<0,05	<0,05	<0,05
1-1 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,001	<0,0001
4-4 vs 0-1	ns	ns	<0,01	<0,05	<0,01
4-4 vs 0-4	ns	ns	<0,05	<0,05	<0,005
4-4 vs 1-4	ns	ns	ns	ns	ns
0-1 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns	ns
0-1 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-4 vs 1-4	<0,05	<0,005	<0,0001	<0,0001	<0,0001

En cuanto a las plántulas que crecieron en presencia del herbicida metsulfurón metil, se observó un comportamiento diferente al que presentaron las plántulas que crecieron en presencia de imazapir. A nivel de crecimiento aéreo con el herbicida metsulfurón metil los genotipos lograron expandir al menos un par de hojas en presencia de las concentraciones más altas de herbicida, pero con menor crecimiento de las hojas en dichas concentraciones. En cuanto al grado de clorosis, las plántulas de los genotipos 4-4, 1-1, 0-0 y 0-1 no presentaron amarillamiento de hojas en ninguna de las concentraciones de herbicidas aplicadas. En los genotipos 0-4 y 1-4 se observó presencia de clorosis gradual en las hojas de las plántulas que crecieron en presencia de las concentraciones más altas de herbicida (Fig. 17 y Fig. 18).

Por medio del análisis de regresión no lineal, los datos ajustaron al modelo log-logístico (Fig. 19), excepto los de la variable Hue. Al igual que los ensayos presentados anteriormente, se obtuvieron los valores de GR_{50} para las cinco variables restantes (Tabla 10). Los mismos evidencian la diferencia entre los genotipos de menor grado de resistencia (0-0, 0-1 y 1-1) y los genotipos con al menos un alelo *Ahas1-4* (0-4, 1-4 y 4-4). Dentro de las variables aéreas, el genotipo 4-4 obtuvo el mayor valor de GR_{50} , cinco veces superior al valor obtenido por los genotipos 0-4 y 1-4 y 100 veces mayor al del genotipo 1-1 para la variable AF. Para la variable LF el valor de GR_{50} del genotipo 4-4 fue más de tres veces superior a los genotipos 0-4 y 1-4, cerca de 200 veces superior al genotipo 1-1 y 1000 veces superior al genotipo 0-0. La comparación de los valores de GR_{50} de los distintos genotipos para las cinco variables se presenta en la Tabla 11. En la misma se observan diferencias significativas en todos los casos excepto para las comparaciones 1-1 vs 0-1, 4-4 vs 0-4 y 4-4 vs 1-4.

Para la variable Hue, se llevaron a cabo análisis de la variancia y pruebas de comparación de medias. En la Figura 20 se puede observar que para los genotipos 0-0, 0-1, 4-4 y 0-4 no hay diferencias significativas entre los valores medios para las concentraciones de herbicida evaluadas.

(A)



(B)

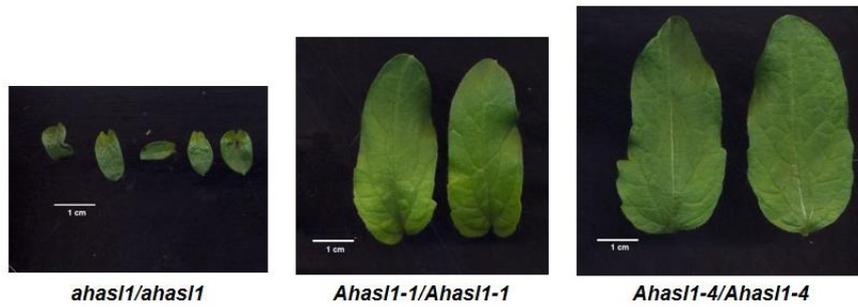


(C)



Figura 17. Plántulas de girasol obtenidas en el ensayo en multimacetas durante 14 días en presencia del herbicida metsulfurón metil. En cada imagen se ordenaron las plántulas que crecieron bajo la mayor a la menor concentración de herbicida. **(A)** Genotipo *Ahas1-4 / Ahas1-4* (4-4). **(B)** Genotipo *Ahas1-1 / Ahas1-4* (1-4). **(C)** Genotipo *Ahas1-1 / Ahas1-1* (1-1).

(A)



(B)

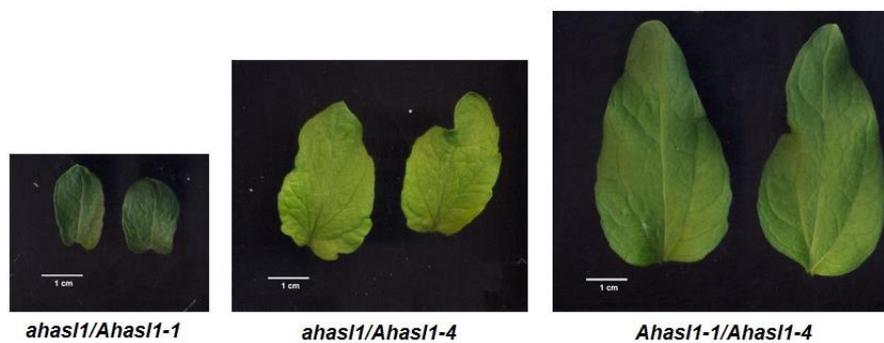
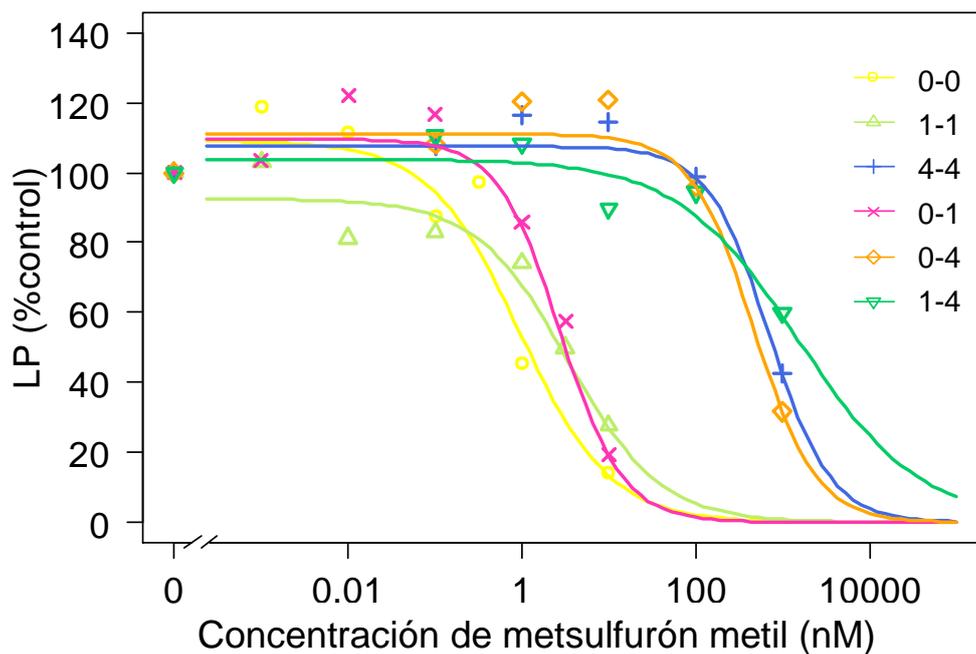


Figura 18. Primer par de hojas expandidas de plántulas de 14 días obtenidas en el ensayo de germinación. Las imágenes corresponden a las plántulas tratadas con solución nutritiva suplementada con el herbicida metsulfurón metil (10 nM). **(A)** Primer par de hojas de plántulas correspondientes a los genotipos *ahas1/ahas1* (0-0), *Ahas1-1/Ahas1-1* (1-1) y *Ahas1-4/Ahas1-4* (4-4). **(B)** Primer par de hojas de plántulas correspondientes a los genotipos *ahas1/Ahas1-1* (0-1), *ahas1/Ahas1-4* (0-4) y *Ahas1-1/Ahas1-4* (1-4).

(A)



(B)

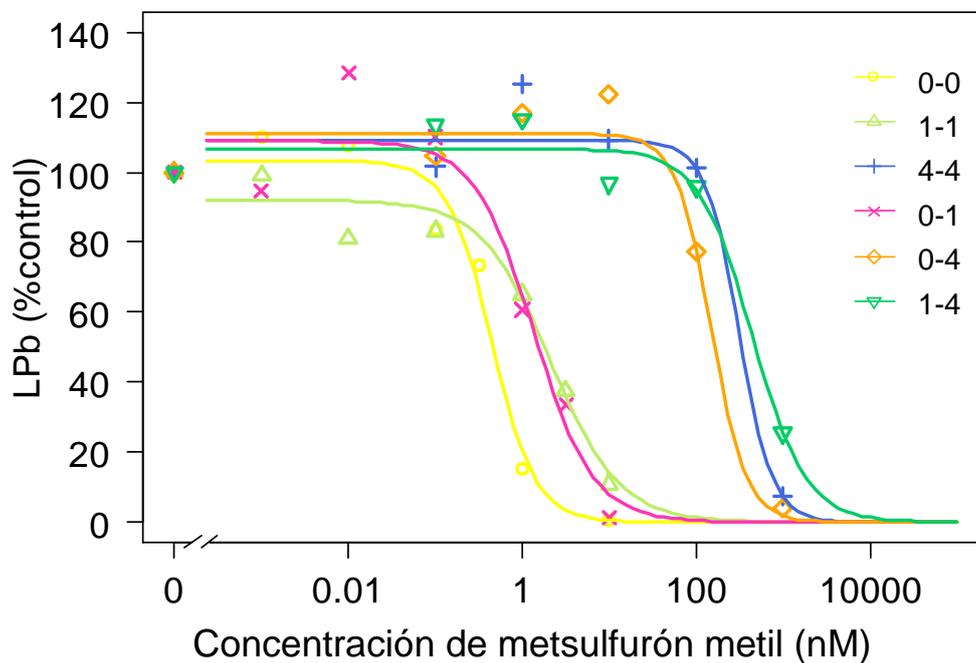
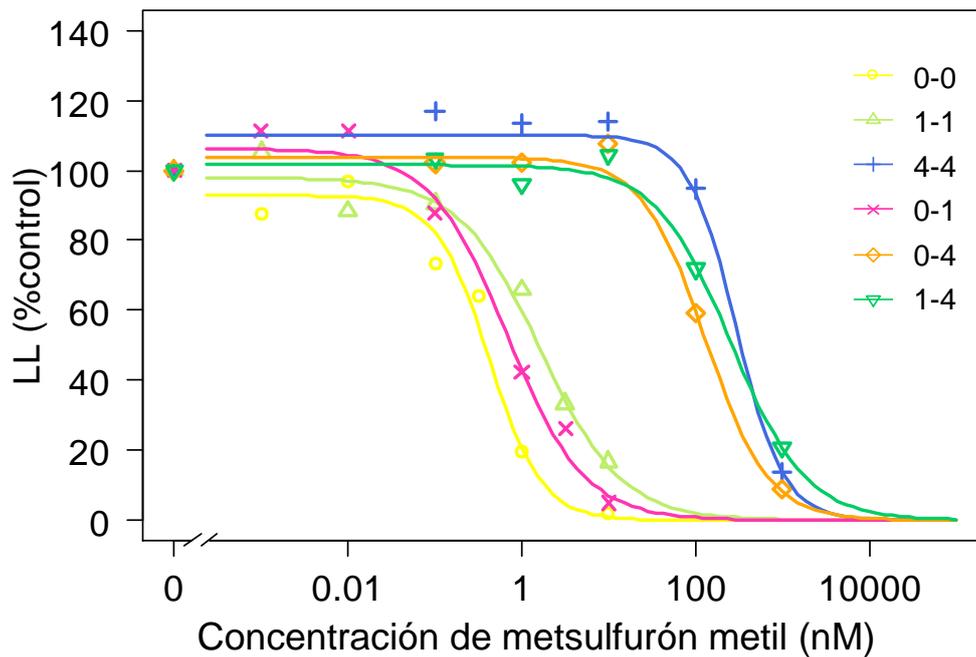


Figura 19. Efecto del herbicida metsulfurón metil en plántulas de 14 días sobre variables de crecimiento radical y aéreo, expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis isolíneas evaluadas. **(A)** Longitud de raíz principal (LP). **(B)** Longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb).

(C)



(D)

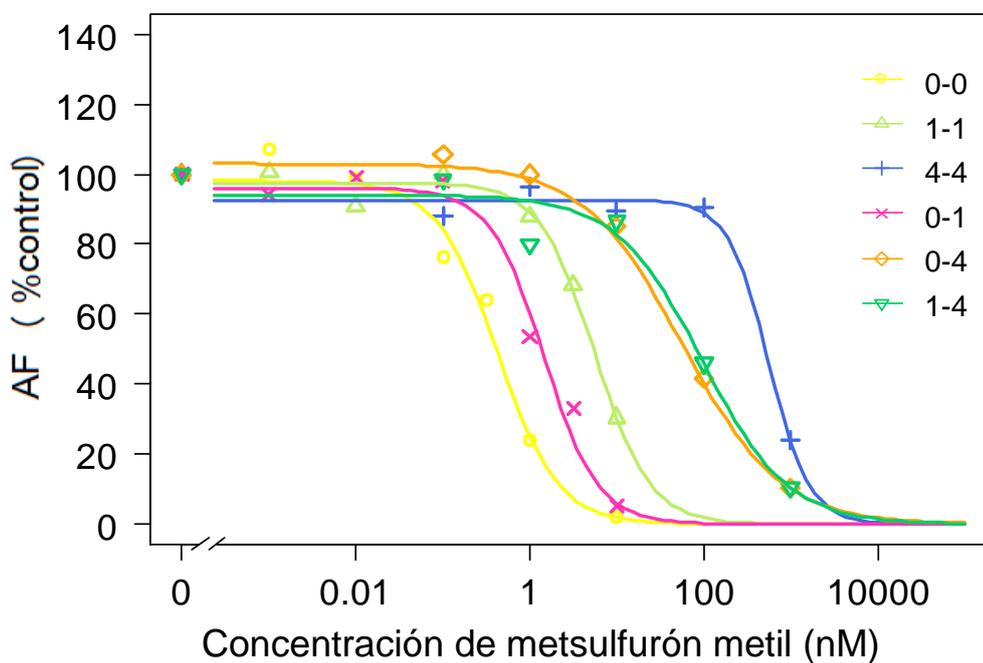


Figura 19. (Continuación) Efecto del herbicida metsulfurón metil en plántulas de 14 días sobre variables de crecimiento radical y aéreo, expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis isolíneas evaluadas. **(C)** Longitud de la raíz lateral más larga (LL). **(D)** Área foliar total (AF).

(E)

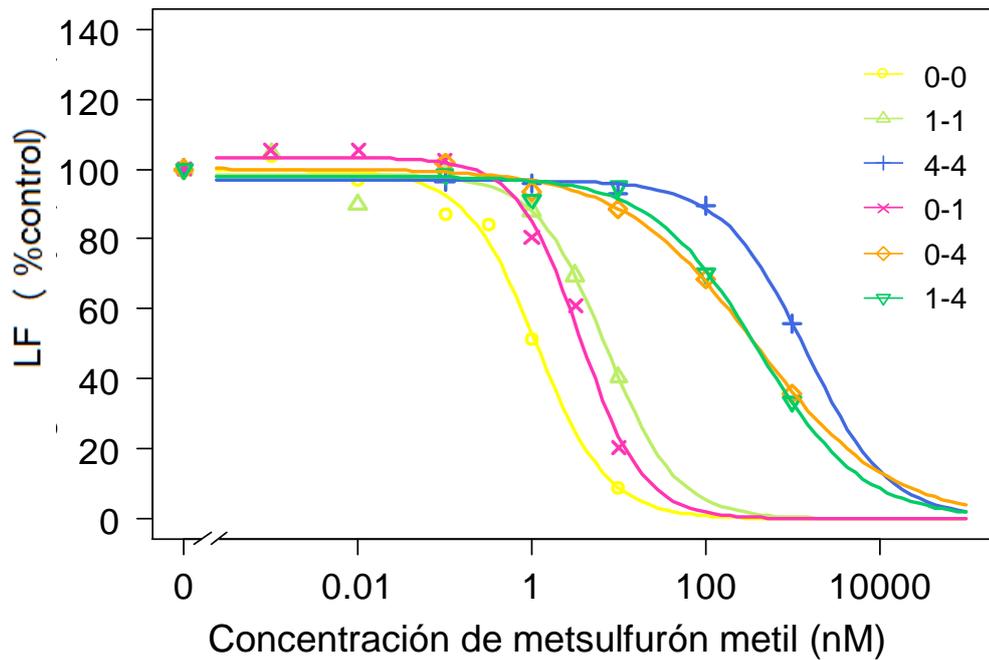


Figura 19. (Continuación) Efecto del herbicida metsulfurón metil en plántulas de 14 días sobre variables de crecimiento radical y aéreo, expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis isolíneas evaluadas. **(E)** Longitud promedio del primer par de hojas (LF).

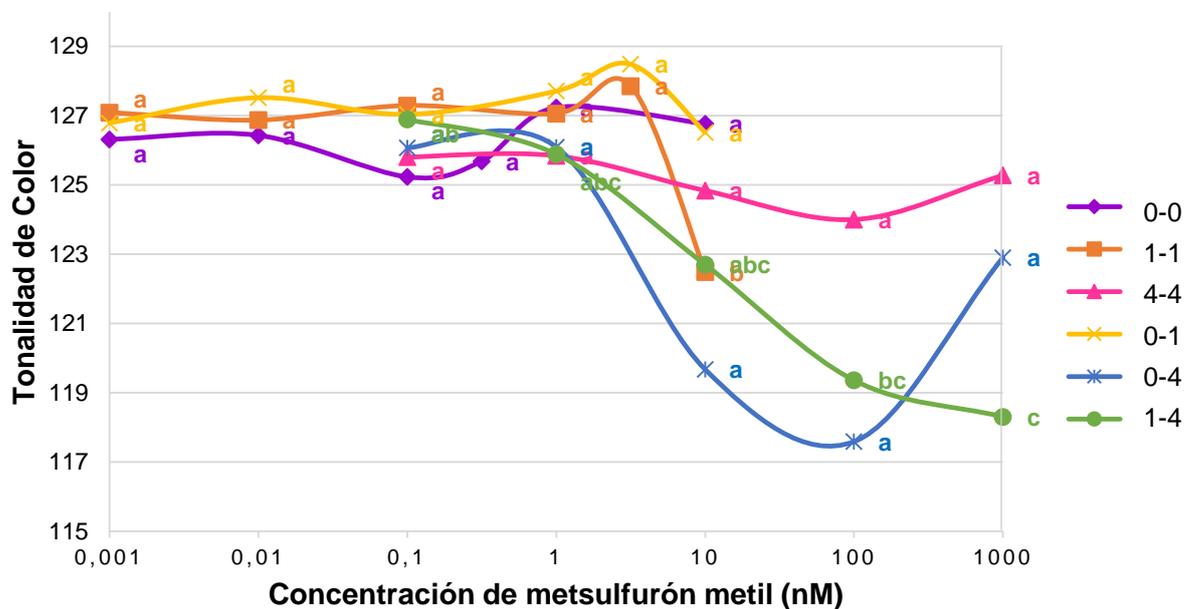


Figura 20. Efecto del herbicida metsulfurón metil sobre la variable Tonalidad de color promedio del primer par de hojas (Hue) en plántulas de 14 días. Para cada genotipo letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios según la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$)

Tabla 10. Valores de GR₅₀ (nM) de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb), longitud de la raíz lateral más larga (LL), área foliar total (AF) y longitud promedio de primer par de hojas (LF), obtenidos a partir de plántulas de 14 días tratadas con diferentes concentraciones de metsulfurón metil.

Genotipo	LP	LPb	LL	AF	LF
0-0	0,94 ± 0,33	0,44 ± 0,13	0,42 ± 0,09	0,42 ± 0,08	1,44 ± 0,29
1-1	3,42 ± 1,30	2,11 ± 0,95	1,62 ± 0,48	5,57 ± 1,05	7,58 ± 1,70
4-4	704,75 ± 233,73	310,22 ± 193,35	293,84 ± 84,73	558,83 ± 260,86	1415,67 ± 536,66
0-1	2,74 ± 0,68	1,35 ± 0,46	0,67 ± 0,22	1,45 ± 0,29	3,71 ± 0,67
0-4	464,94 ± 169,51	148,45 ± 94,48	129,35 ± 33,30	56,51 ± 20,79	375,24 ± 152,30
1-4	1537,1 ± 1117,5	442,09 ± 216,68	256,17 ± 82,05	95,33 ± 32,40	390,83 ± 137,04

Tabla 11. Valores de probabilidad asociados a la comparación del GR₅₀ de las curvas de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb), longitud de la raíz lateral más larga (LL), área foliar total (AF) y longitud promedio de primer par de hojas (LF), en función de la concentración del herbicida metsulfurón metil en el ensayo en multimacetos de 14 días.

Comparación	LP	LPb	LL	AF	LF
0-0 vs 1-1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 4-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 0-1	<0,005	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 4-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 0-1	ns	ns	ns	<0,01	ns
1-1 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4-4 vs 0-1	<0,05	ns	<0,05	<0,05	<0,05
4-4 vs 0-4	ns	ns	ns	ns	ns
4-4 vs 1-4	ns	ns	ns	ns	ns
0-1 vs 0-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-1 vs 1-4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
0-4 vs 1-4	<0,01	<0,05	<0,05	ns	ns

Estimación de correlaciones entre variables de crecimiento radical de los ensayos de germinación de siete y 14 días de duración.

Al realizar la estimación de las correlaciones entre las variables de crecimiento radical en los ensayos en presencia del herbicida imazapir se observó una elevada correlación positiva y significativa (Tabla 12). En la correlación entre las mismas variables de ambos ensayos, se obtuvo un valor de 0,675 para la variable longitud de raíz principal (LP7 y LP14), 0,812 entre LPb7 y LPb14 y 0,846 entre LL7 y LL14. En los ensayos con el herbicida metsulfurón metil, los valores de correlación estimados entre las mismas variables de ambos ensayos fueron positivos y significativos, sin embargo, los valores fueron menores a los obtenidos en los ensayos con el herbicida imazapir: 0,442 entre las variables LP7 y LP14, 0,653 entre LPb7 y LPb14 y 0,562 entre LL7 y LL14.

Tabla 12. Valores de correlación y probabilidad asociada entre las variables de crecimiento radical evaluadas a siete y 14 días: longitud de raíz principal (LP7, LP14), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb7, LPb14), longitud de la raíz lateral más larga (LL7 y LL14). La media matriz superior corresponde a los ensayos en presencia del herbicida imazapir y la media matriz inferior corresponde a los ensayos en presencia del herbicida metsulfurón metil.

	LP14	LPb14	LL14	LP7	LPb7	LL7
LP14		0,894 <0,0001	0,887 <0,0001	0,675 <0,0001	0,801 <0,0001	0,813 <0,0001
LPb14	0,924 <0,0001		0,957 <0,0001	0,686 <0,0001	0,812 <0,0001	0,831 <0,0001
LL14	0,730 <0,0001	0,772 <0,0001		0,684 <0,0001	0,806 <0,0001	0,846 <0,0001
LP7	0,442 <0,0001	0,463 <0,0001	0,507 <0,0001		0,832 <0,0001	0,793 <0,0001
LPb7	0,543 <0,0001	0,653 <0,0001	0,650 <0,0001	0,684 <0,0001		0,940 <0,0001
LL7	0,528 <0,0001	0,561 <0,0001	0,562 <0,0001	0,676 <0,0001	0,683 <0,0001	

Cuantificación de actividad AHAS

Los datos obtenidos a partir del ensayo de actividad AHAS en condiciones *in vitro* se describieron por el modelo log-logístico (Fig. 21). En la Tabla 13 se muestran los valores de I_{50} obtenidos a partir de la cuantificación de la actividad de AHAS. En el ensayo en presencia del herbicida imazapir el genotipo 4-4 obtuvo un valor más de cinco veces superior al resto de los genotipos. Del mismo modo en el ensayo con el herbicida metsulfurón metil, el genotipo 4-4 mostró el mayor I_{50} , aproximadamente 16 veces superior a los genotipos susceptibles a dicho herbicida (0-0, 0-1 y 1-1) y más de cuatro veces superior a los genotipos heterocigotas que portan al menos uno de los alelos *Ahas1-4*.

Se realizó la comparación de los valores de I_{50} entre los seis genotipos en los dos ensayos (Tabla 14). Se encontraron diferencias significativas entre las comparaciones de I_{50} dentro del ensayo realizado con el herbicida imazapir excepto al comparar los genotipos 1-1 vs 0-1, 1-1 vs 0-4 y 0-1 vs 1-4. En la comparación de los valores de I_{50} de los genotipos obtenidos en el ensayo con el herbicida metsulfurón metil se encontraron diferencias significativas excepto en dos de las comparaciones (1-1 vs 0-1 y 0-4 vs 1-4).

(A)

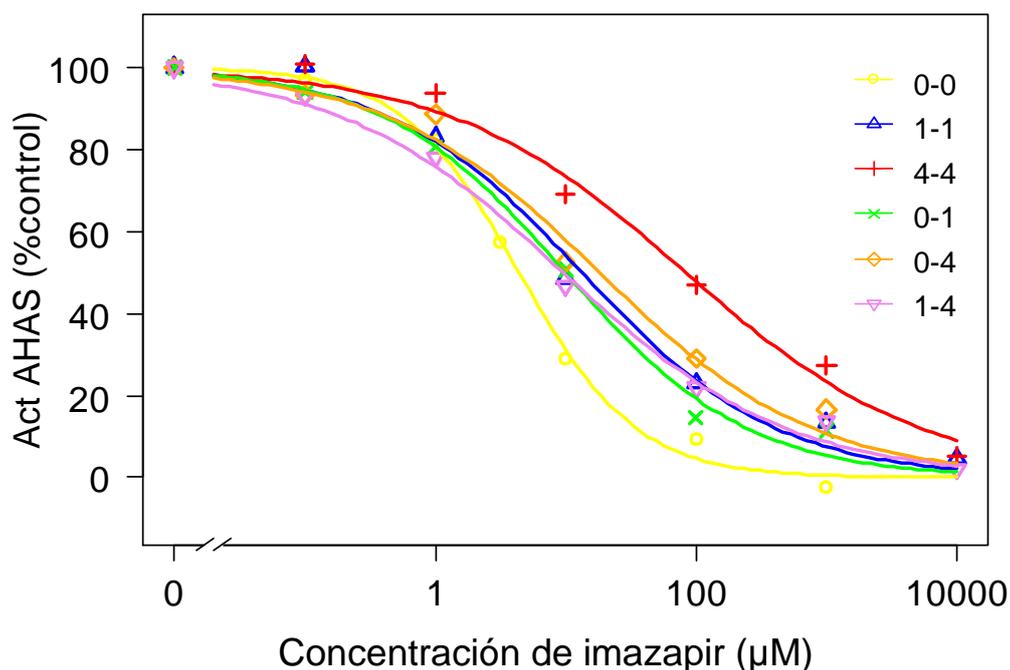


Figura 21. Efecto de las distintas concentraciones de herbicida sobre la actividad enzimática de AHAS, expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis aislóneas evaluadas. **(A)** Actividad enzimática de AHAS en presencia de imazapir.

(B)

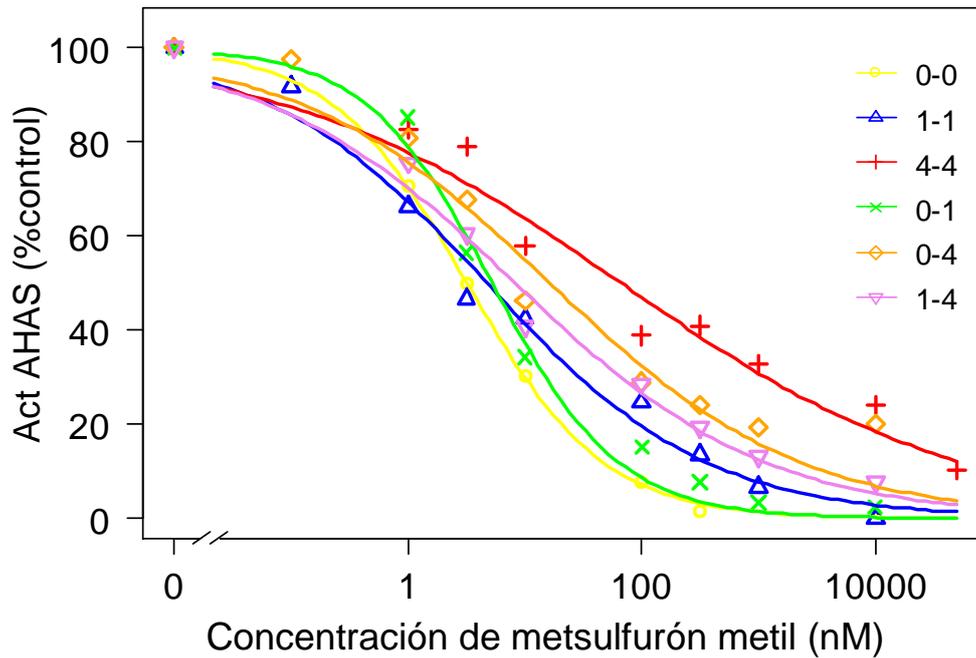


Figura 21. (Continuación) Efecto de las distintas concentraciones de herbicida sobre la actividad enzimática de AHAS, expresadas como porcentaje respecto al control, en las seis aislóneas evaluadas.

(B) Actividad enzimática de AHAS en presencia de metsulfurón metil.

Tabla 13. Valores de I_{50} obtenidos a partir de los ensayos de cuantificación de actividad AHAS con diferentes concentraciones de los herbicidas imazapir (IMI) y metsulfurón metil (SU).

Genotipo	IMI (μM)	SU (nM)
0-0	$4,39 \pm 0,49$	$3,19 \pm 0,47$
1-1	$13,30 \pm 2,37$	$4,71 \pm 0,89$
4-4	$82,91 \pm 13,50$	$66,04 \pm 17,05$
0-1	$9,88 \pm 1,50$	$5,22 \pm 0,22$
0-4	$18,18 \pm 2,95$	$16,29 \pm 3,32$
1-4	$9,53 \pm 1,38$	$8,18 \pm 1,76$

Tabla 14. Valores de probabilidad asociados a la comparación del I₅₀ de las curvas de la variable actividad enzimática de AHAS, en función de la concentración de los herbicidas imazapir (IMI) y metsulfurón metil (SU).

Comparación	IMI	SU
0-0 vs 1-1	<0,005	<0,05
0-0 vs 4-4	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 0-1	<0,0001	<0,005
0-0 vs 0-4	<0,0001	<0,0001
0-0 vs 1-4	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 4-4	<0,0001	<0,0001
1-1 vs 0-1	ns	ns
1-1 vs 0-4	ns	<0,0001
1-1 vs 1-4	<0,0001	<0,05
4-4 vs 0-1	<0,0001	<0,005
4-4 vs 0-4	<0,0001	<0,05
4-4 vs 1-4	<0,0001	<0,01
0-1 vs 0-4	<0,0005	<0,0001
0-1 vs 1-4	ns	<0,05
0-4 vs 1-4	<0,05	ns

Estimación de las relaciones de dominancia entre los alelos *Ahas1-1*, *Ahas1-4* y *ahas1*

Se realizó la estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4* para todas las variables evaluadas en cada ensayo. Para algunas concentraciones de herbicida no se pudo estimar el nivel de dominancia debido a que el alelo resistente no confería una ventaja en cuanto a la resistencia respecto al alelo susceptible (relación R/S inferior a dos).

Para el ensayo de germinación de siete días en presencia del herbicida imazapir se observó que las relaciones de dominancia variaron en función de la concentración de herbicida (Fig. 22). La relación entre los alelos *Ahas1-1* y *ahas1* varió desde sobredominancia del alelo *Ahas1-1* en las concentraciones más bajas de herbicida hacia recesividad en presencia de las concentraciones más altas de herbicida para la variable LP. Esta misma tendencia se observó en la relación entre los alelos *Ahas1-4* y *ahas1*. Una relación de dominancia diferente se observó entre *Ahas1-4* y *Ahas1-1*. La misma varió desde semidominancia del alelo *Ahas1-4* a sobredominancia a medida que se aumentó la concentración de herbicida. Para las variables LPb y LL las relaciones de dominancia entre alelos mostraron un comportamiento diferente al observado para la variable LP, pero similar entre sí. La relación entre los alelos *Ahas1-4* y *ahas1* y entre *Ahas1-4* y *Ahas1-1* varió desde sobredominancia hacia recesividad a medida que aumentó la concentración de herbicida. Entre los alelos *Ahas1-1* y *ahas1* la relación fue de dominancia a sobredominancia de *Ahas1-1* a medida que aumentó la concentración de herbicida.

(A)

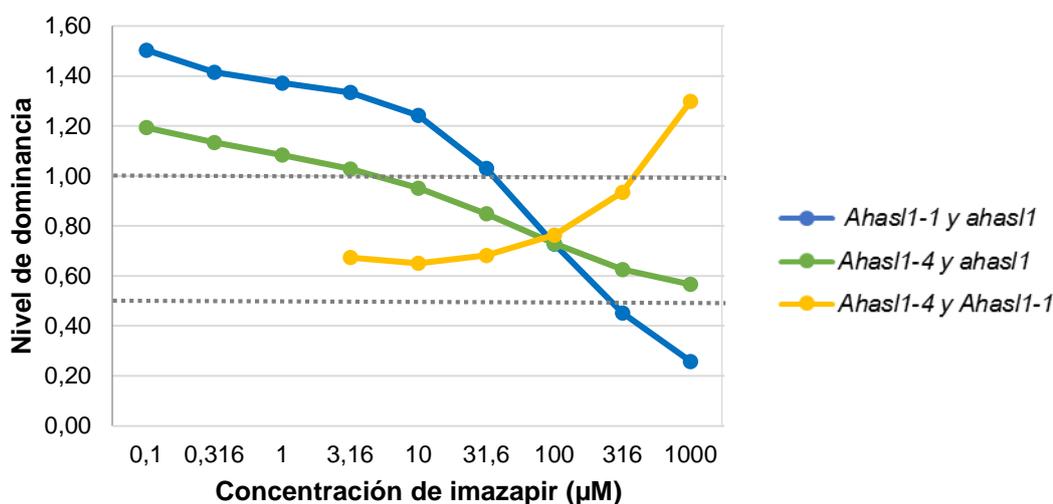
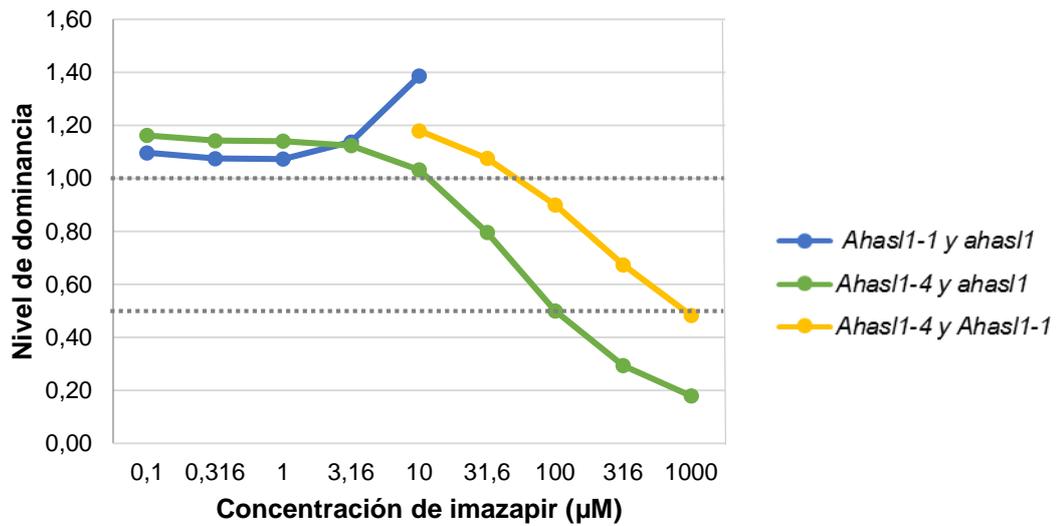


Figura 22. Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo de germinación durante siete días en presencia del herbicida imazapir. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(A)** Longitud de raíz principal (LP).

(B)



(C)

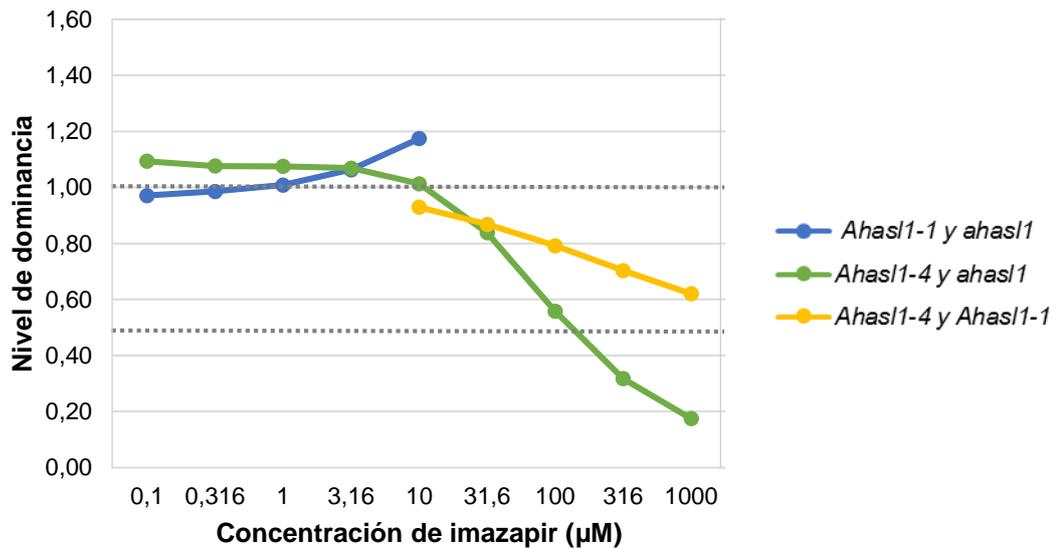


Figura 22. (Continuación) Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo de germinación durante siete días en presencia del herbicida imazapir. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(B)** Longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb). **(C)** Longitud de la raíz lateral más larga (LL).

En el ensayo de germinación de siete días en presencia del herbicida metsulfurón metil no se calculó la relación de dominancia entre los alelos *ahas1* y *Ahas1-1* debido a que ninguno de ellos es resistente a dicho herbicida. En la Figura 23 se presentan las relaciones de dominancia entre los alelos *Ahas1-4* y *ahas1* y entre los alelos *Ahas1-4* y *Ahas1-1*. Para las tres variables evaluadas se observa una tendencia similar: la relación entre *Ahas1-4* y *ahas1* es de dominancia a favor del alelo “resistente” en presencia de concentraciones menores de herbicida y de semidominancia en presencia de las concentraciones más altas. Entre los alelos *Ahas1-4* y *Ahas1-1* se observa una relación de dominancia a favor del *Ahas1-4*.

(A)

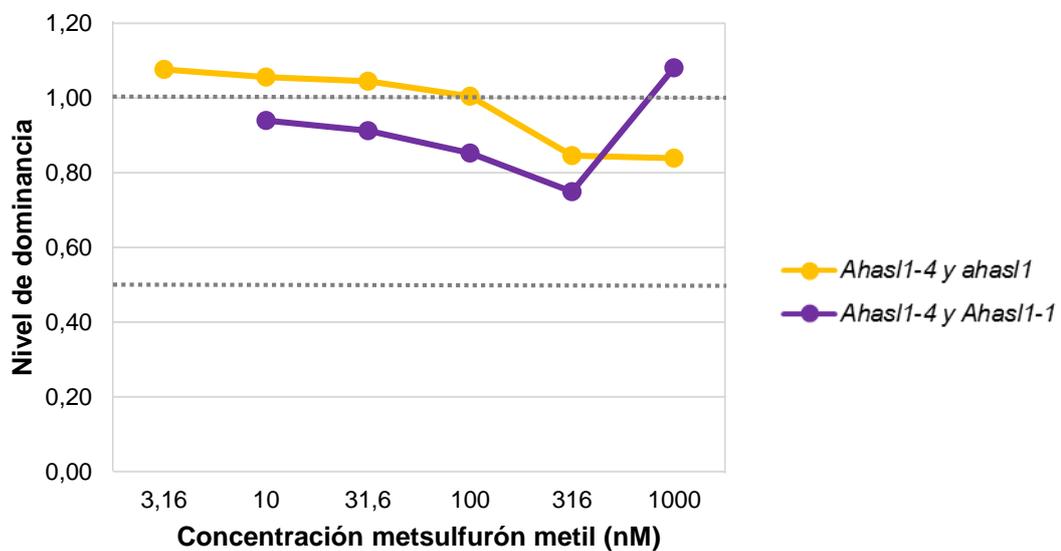
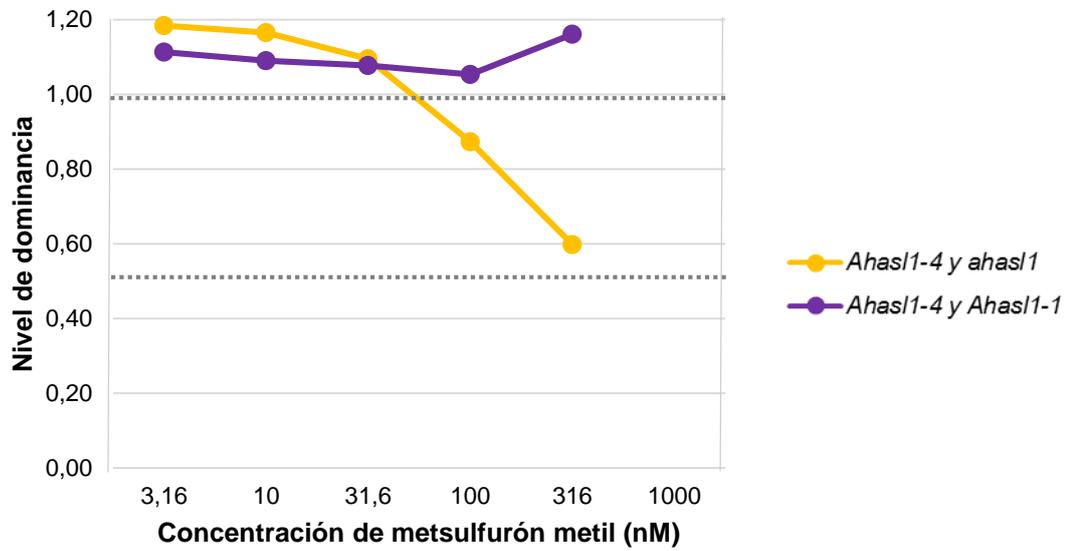


Figura 23. Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo de germinación durante siete días en presencia del herbicida metsulfurón metil. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(A)** Longitud de raíz principal (LP).

(B)



(C)

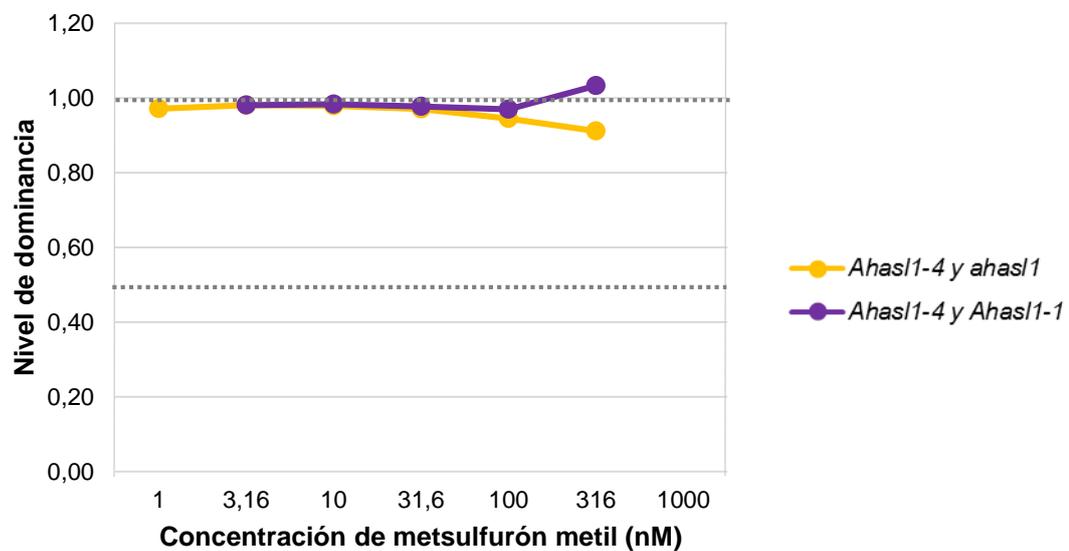


Figura 23. (Continuación) Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo de germinación durante siete días en presencia del herbicida metsulfurón metil. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(B)** Longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb). **(C)** Longitud de la raíz lateral más larga (LL).

Para el ensayo de germinación de 14 días en presencia del herbicida imazapir la estimación de los niveles de dominancia entre los tres alelos presentes en las aislóneas arrojó resultados diferentes (Fig. 24). Se observaron tendencias similares a las del ensayo de germinación durante siete días en la relación de dominancia entre los alelos *Ahas1-4* y *ahas1* para las variables de crecimiento radical. Sin embargo, la relación entre los alelos *Ahas1-1* y *ahas1* varió entre semidominancia y semirecesividad a medida que aumentaron las concentraciones de herbicida aplicadas. Para los alelos *Ahas1-4* y *Ahas1-1* la relación de dominancia efectiva varió desde sobredominancia a dominancia a favor del alelo *Ahas1-4* en la variable LP, de sobredominancia a semirecesividad del alelo *Ahas1-4* en la variable LPb y de semidominancia de *Ahas1-4* sin variación a medida que aumento la concentración de herbicida en la variable LL.

Se realizó la estimación de los niveles de dominancia para las variables aéreas AF y LF. Para las variantes alélicas *Ahas1-1* y *ahas1* y para *Ahas1-4* y *ahas1* la relación varió desde semidominancia, en presencia de las menores concentraciones de herbicida a semirecesividad con las concentraciones más altas. Para los alelos *Ahas1-4* y *Ahas1-1* la relación fue de semidominancia del alelo *Ahas1-4*, sin variaciones a través de las distintas concentraciones de herbicida.

(A)

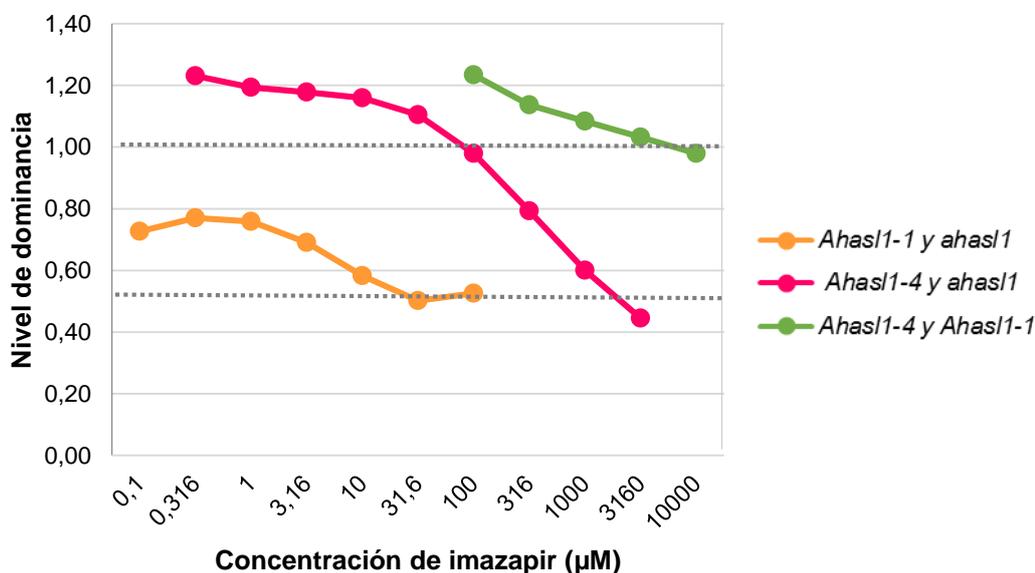
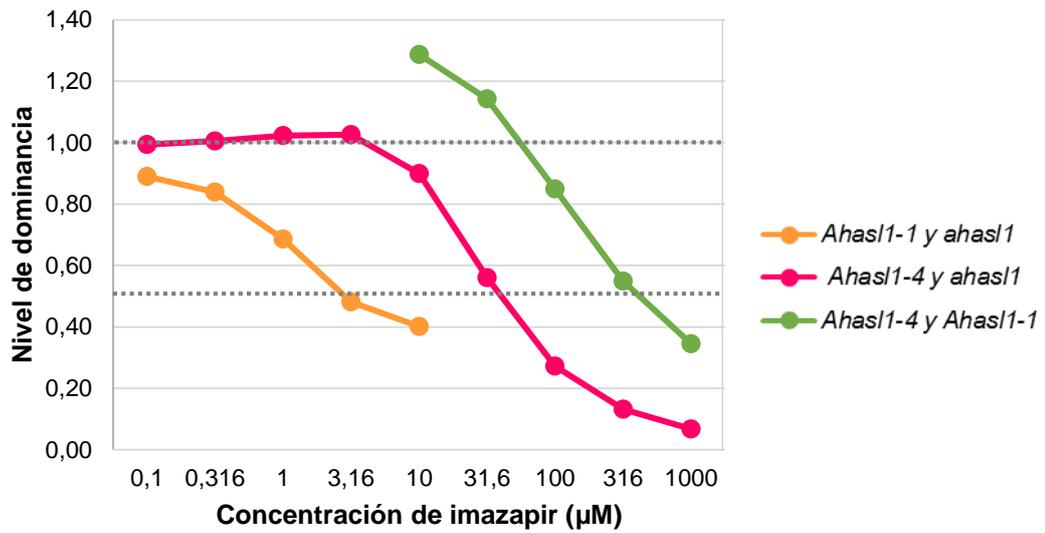


Figura 24. Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo de germinación durante 14 días en presencia del herbicida imazapir. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1.

(A) Longitud de raíz principal (LP).

(B)



(C)

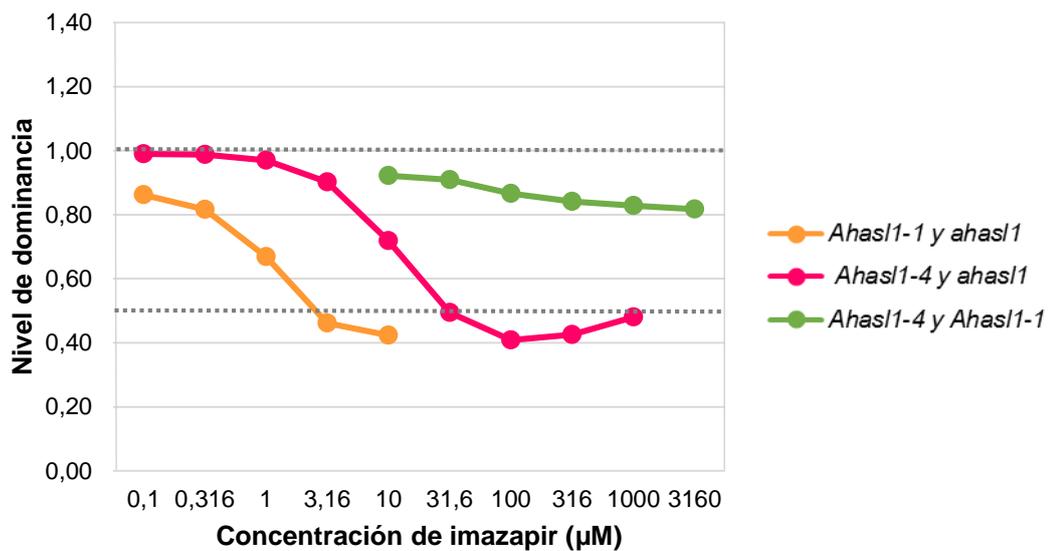
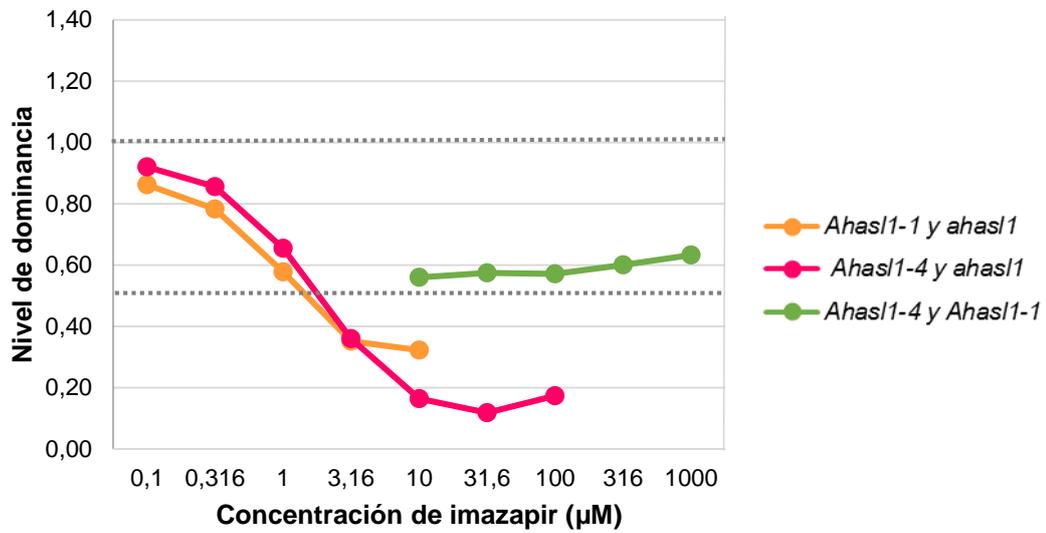


Figura 24. (Continuación) Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo de germinación durante 14 días en presencia del herbicida imazapir. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(B)** Longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb). **(C)** Longitud de la raíz lateral más larga (LL).

(D)



(E)

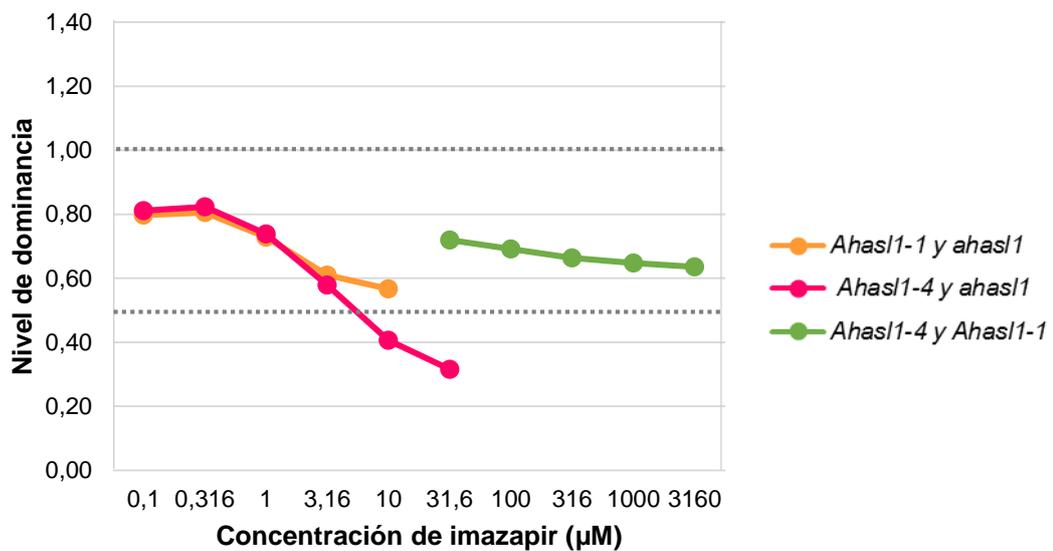


Figura 24. (Continuación) Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo de germinación durante 14 días en presencia del herbicida imazapir. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(D)** Área foliar total (AF). **(E)** Longitud promedio del primer par de hojas (LF).

Al analizar las relaciones de dominancia en el ensayo de germinación de 14 días en presencia del herbicida metsulfurón metil (Fig. 25), para las variables radicales se observó la misma tendencia que se obtuvo en el ensayo de germinación de siete días. En el caso de la variable LP se observó semidominancia del alelo *Ahas1-4* sobre el alelo *Ahas1-1* y dominancia a semidominancia del *Ahas1-4* sobre el alelo *ahas1* a medida que aumentó la concentración de herbicida. Para la variable LPb, las relaciones entre los alelos variaron de dominancia a recesividad entre *Ahas1-4* y *ahas1* y de dominancia a sobredominancia de *Ahas1-4* sobre *Ahas1-1*. Dentro de la variable LL se observó semidominancia a codominancia de *Ahas1-4* sobre *ahas1* y semidominancia de *Ahas1-4* sobre *Ahas1-1* sin variaciones a medida que aumentó la concentración de herbicida.

En ambas variables de crecimiento aéreo se observó una relación de dominancia en las concentraciones de herbicidas más bajas a codominancia del alelo *Ahas1-4* sobre los alelos *ahas1* y *Ahas1-1* en las concentraciones más altas.

(A)

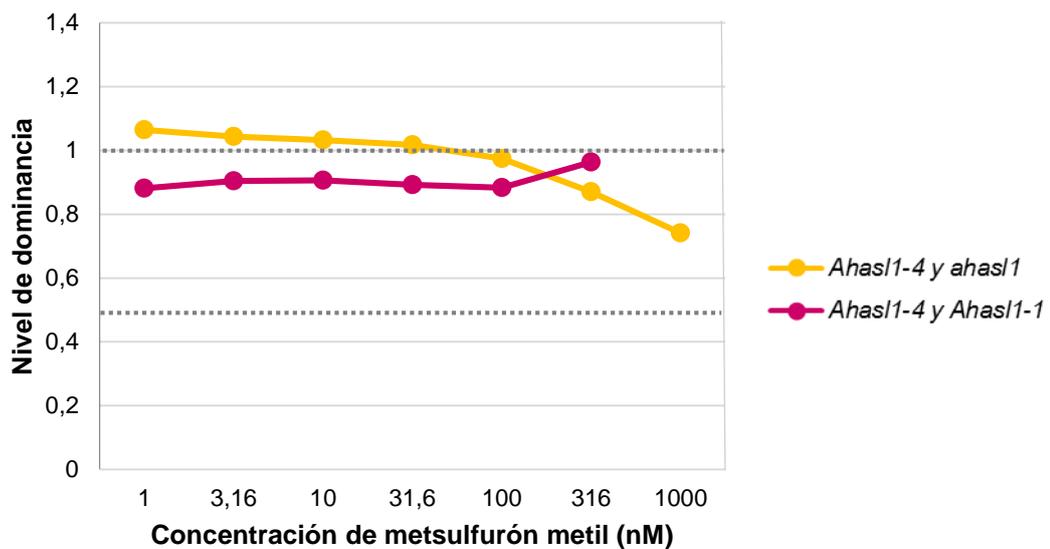
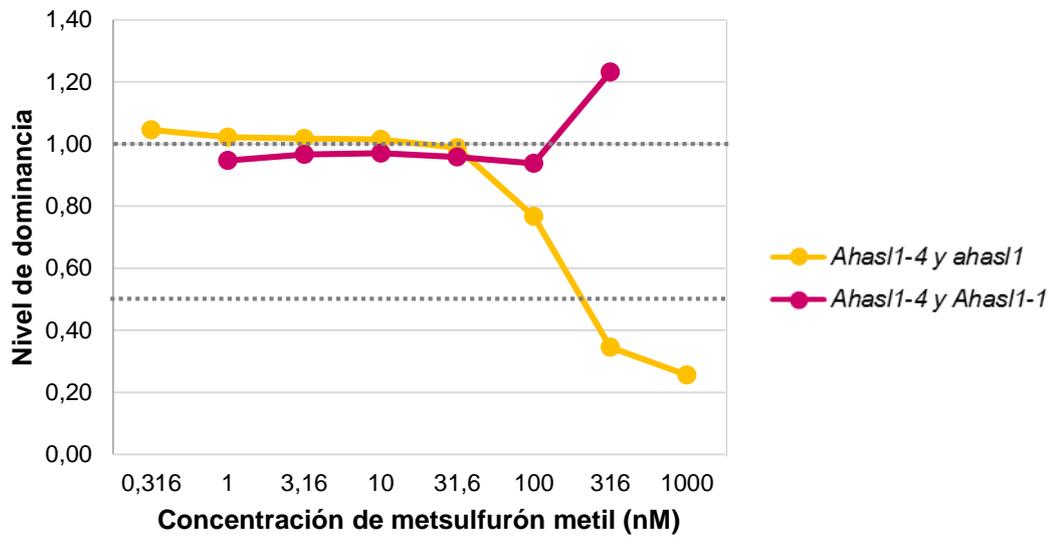


Figura 25. Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo de germinación durante 14 días en presencia del herbicida metsulfurón metil. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(A)** Longitud de raíz principal (LP).

(B)



(C)

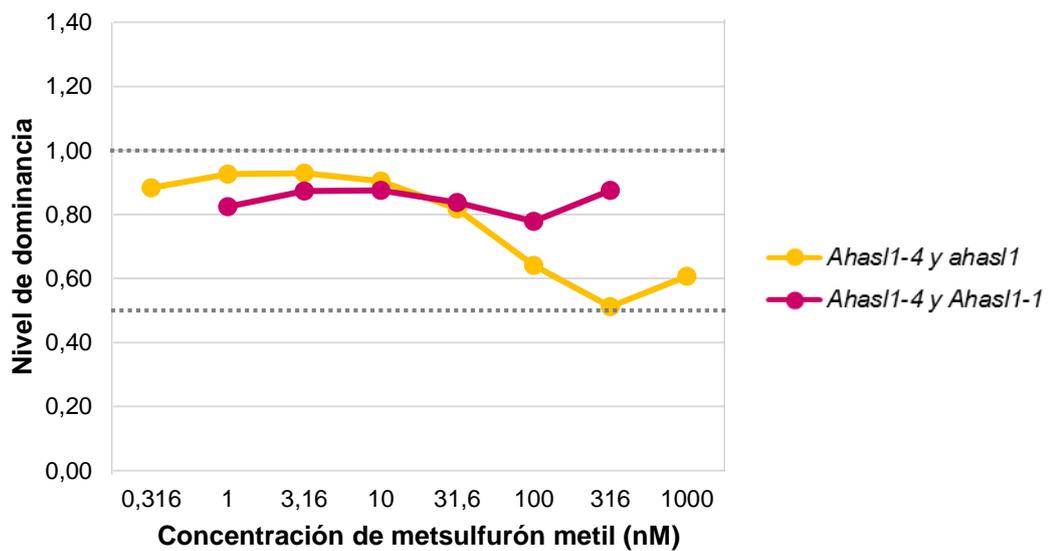
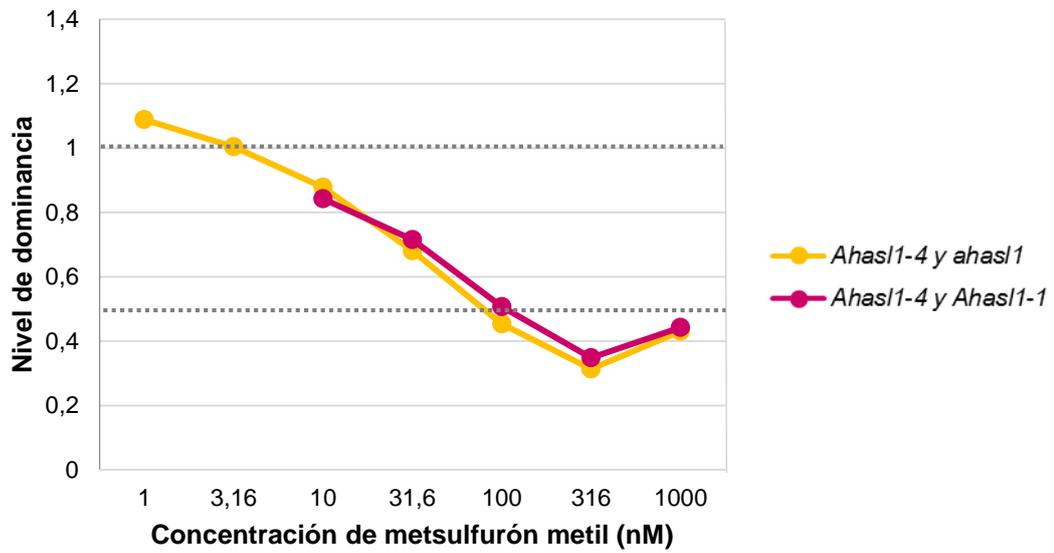


Figura 25. Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo de germinación durante 14 días en presencia del herbicida metsulfurón metil. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(B)** Longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5mm (LPb). **(C)** Longitud de la raíz lateral más larga (LL).

(D)



(E)

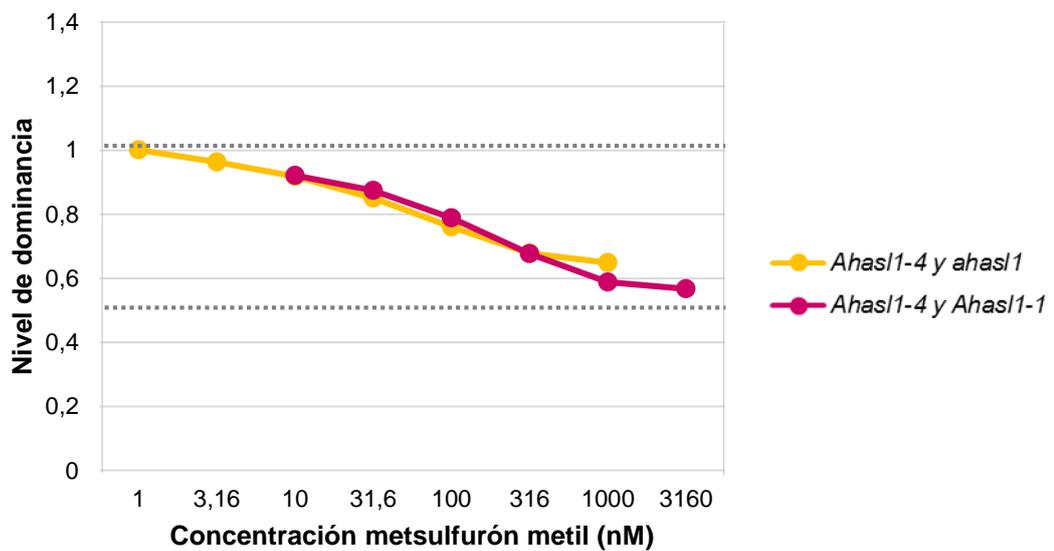


Figura 25. (Continuación) Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para el ensayo durante germinación de 14 días en presencia del herbicida metsulfurón metil. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(D)** Área foliar total (AF). **(E)** Longitud promedio del primer par de hojas (LF).

En el ensayo de cuantificación de actividad enzimática AHAS (Fig. 26), a medida que aumentó la concentración de imazapir, se observó una relación de semidominancia del alelo *Ahas1-1* sobre el alelo *ahas1*, de semidominancia a semirecesividad del alelo *Ahas1-4* sobre el alelo *ahas1* y, contrariamente a lo observado en los ensayos germinativos, la relación fue de recesividad del *Ahas1-4* sobre el alelo *Ahas1-1*.

Similares tendencias se observaron en el ensayo de cuantificación de actividad enzimática AHAS en presencia del herbicida metsulfurón metil: semidominancia a semirecesividad del alelo *Ahas1-4* sobre el alelo *ahas1* y de semirecesividad del alelo *Ahas1-4* en relación con el alelo *Ahas1-1*.

(A)

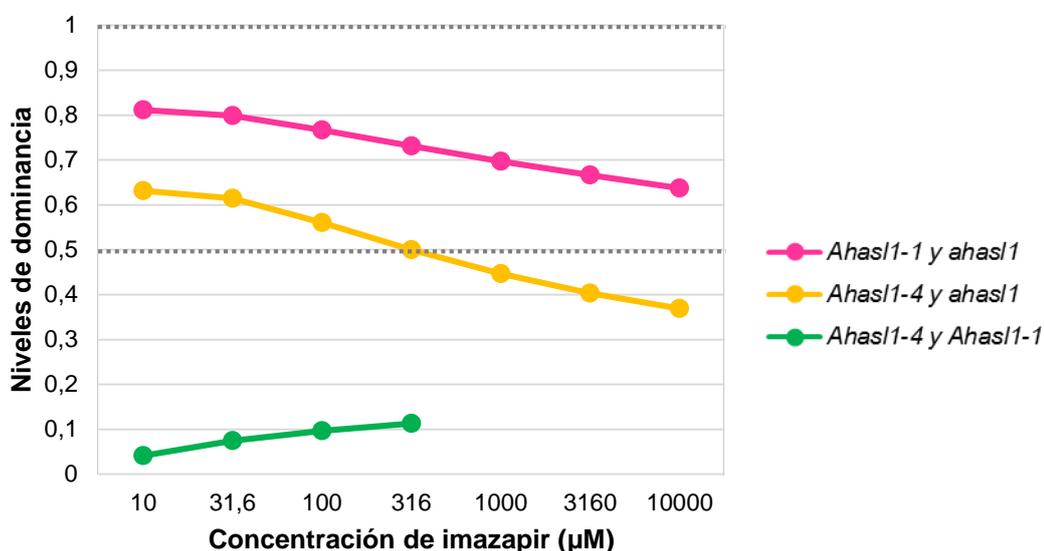


Figura 26. Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para los ensayos de cuantificación enzimática AHAS. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(A)** Ensayo de cuantificación enzimática AHAS en presencia del herbicida imazapir.

(B)

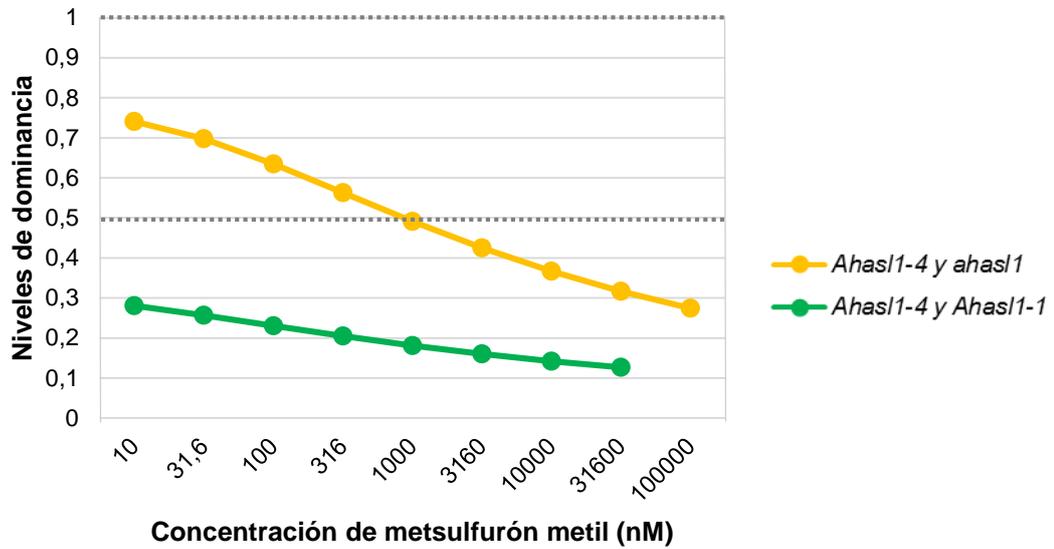


Figura 26. (Continuación) Estimación de la dominancia efectiva entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-4*, para los ensayos de cuantificación enzimática AHAS. La línea de puntos inferior representa nivel de dominancia = 0,5 y la línea de puntos superior representa nivel de dominancia = 1. **(B)** Ensayo de cuantificación enzimática AHAS en presencia del herbicida metsulfurón metil.

DISCUSIÓN

La competencia del cultivo de girasol con las malezas es uno de los factores reductores del rendimiento del mismo. La introducción de nuevas tecnologías en los sistemas de producción ha generado un cambio en la población y distribución de malezas (Gries, 2003). El sistema de siembra directa comenzó a difundirse rápidamente en Argentina a principios de la década de 1990, cubriendo una superficie de 28 millones de hectáreas en el país en la campaña 2010/11. En el cultivo de girasol, este sistema de siembra se emplea en un 70% de la superficie cultivada (AAPRESID, 2012). El sistema de siembra directa contribuyó a disminuir la erosión y la pérdida de agua de la tierra por evaporación y combinado con fertilizantes y herbicidas eficaces y accesibles, brindaron una solución integral a la implantación de los cultivos y al control de las malezas (Satorre, 2005). El desafío a resolver dentro de estos sistemas de manejo de cultivos es el control de malezas de hoja ancha en cultivos con este tipo de hojas como el girasol y la soja. Los cultivos con resistencia a herbicidas constituyen una opción interesante para los productores debido a que podrían utilizar herbicidas de bajo costo que controlen un amplio espectro de malezas (Shaner, 2000). Dentro del cultivo de girasol existen tres tecnologías para el control de malezas disponibles en el mercado. En la tecnología Clearfield® los híbridos poseen el alelo de resistencia *Ahas1-1* y un gen modificador, que otorga resistencia a herbicidas de la familia IMI, en tanto que la tecnología ExpressSun® utiliza el alelo *Ahas1-2* que confiere resistencia a herbicidas de la familia SU, y la tecnología ClearfieldPlus® utiliza el alelo *Ahas1-3* que confiere una elevada resistencia a IMI y no requiere la presencia del gen modificador para que la resistencia sea completa (Sala *et al.*, 2012b). En Argentina sólo se encuentran disponibles comercialmente las tecnologías Clearfield® y ClearfieldPlus®.

Recientemente Sala y Bulos (2012) informaron un nuevo alelo denominado *Ahas1-4* que confiere resistencia a distintas familias químicas de inhibidores de AHAS. Estos autores realizaron la caracterización molecular del alelo *Ahas1-4* y la primera evaluación a nivel de planta entera. Por medio de un índice de toxicidad determinaron que la línea RW-B presenta un patrón de resistencia cruzada a IMI, SU, TP y POB. Además, obtuvieron valores de GR₅₀ para la variable peso seco (en porcentaje respecto al control no tratado) en un ensayo dosis-respuesta, con los herbicidas imazapir y metsulfurón metil, utilizando las líneas de girasol RW-B que porta el alelo *Ahas1-4*, HA425 que porta el alelo *Ahas1-1* y el gen modificador, SuBL con el alelo *Ahas1-2*, y la línea susceptible B770. En presencia del herbicida imazapir, estos autores encontraron que la línea portadora del alelo *Ahas1-4* mostró un valor de peso seco siete veces superior a la línea portadora del alelo *Ahas1-1* y 900 veces superior a la línea susceptible. Estas diferencias son similares a las obtenidas en el presente trabajo de tesis al

comparar los genotipos *Ahas1-4/Ahas1-4* (4-4) y *Ahas1-1/Ahas1-1* (1-1), dado que las mismas variaron entre tres y 15 veces dependiendo de la variable evaluada y las diferencias entre los valores de GR₅₀ de los genotipos *Ahas1-4/Ahas1-4* (4-4) y *ahas1/ahas1* (0-0) variaron entre 20 y 6000 veces. Para el herbicida metsulfurón metil, Sala y Bulos (2012) informaron que la línea RW-B mostró un valor de GR₅₀ 85 veces superior a la línea susceptible B770. Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, al comparar los GR₅₀ de las variables evaluadas entre los genotipos 4-4 y 0-0, se observaron mayores diferencias a favor del genotipo 4-4, las mismas variaron entre 22 y 1500 veces. A su vez, Sala y Bulos (2012) observaron que en presencia de elevadas dosis de herbicida imazapir (320 g i.a. ha⁻¹) las plantas de la línea HA425 desarrollaron clorosis y menor crecimiento de hojas, en contraste con las plantas de la línea RW-B las cuales no mostraron síntomas de clorosis 14 días después de la aplicación del tratamiento. En el ensayo de germinación de 14 días en presencia de imazapir se obtuvieron resultados similares, las plántulas del genotipo 1-1 que crecieron con una concentración de herbicida de 10 µM presentaron clorosis en sus hojas, con una concentración de 31,6 µM el grado de clorosis fue mayor, además se observó necrosis y menor crecimiento de las hojas y las plántulas que crecieron con 100 µM de imazapir no desarrollaron hojas. Las plántulas del genotipo 4-4 mostraron los primeros síntomas de clorosis en presencia de 31,6 µM de imazapir y con una concentración de 100 µM se observó desarrollo de hojas con poco crecimiento, clorosis y necrosis. En este ensayo, ninguno de los genotipos desarrolló hojas cuando crecieron con las mayores concentraciones del herbicida y se observó clorosis gradual en las hojas a medida que aumentó la concentración de herbicida. Un comportamiento diferencial se observó en el caso del genotipo 0-4, mientras a nivel radical obtuvo un valor de GR₅₀ intermedio entre los valores de los homocigotas 0-0 y 4-4, para las variables aéreas mostró un nivel de resistencia muy inferior, sobre todo en la variable tonalidad de color, donde se observó un alto grado de clorosis de las hojas en todas las concentraciones de herbicida aplicadas. Breccia *et al.* (2011) informaron resultados similares al evaluar la resistencia de seis genotipos de girasol que portaban los alelos *Ahas1-1* y el gen modificador en presencia del herbicida imazapir en plántulas en estadio V2. Al incrementar la concentración de herbicida observaron menor crecimiento foliar y la posibilidad de discriminar visualmente entre los genotipos susceptible, resistente intermedio y resistente según el grado de clorosis de sus hojas.

En el presente trabajo, por medio de las metodologías de evaluación en etapas tempranas de crecimiento de plántulas de girasol, se logró caracterizar la resistencia del alelo *Ahas1-4* a los herbicidas imazapir y metsulfurón metil. A través de los ensayos de germinación durante siete días los genotipos que crecieron en presencia de las distintas concentraciones de herbicidas

mostraron reducción del crecimiento radical, observando mayor disminución en las variables LP y LPb, en especial en el genotipo susceptible. La inhibición del crecimiento de raíces en presencia de herbicida permitió discriminar visualmente al genotipo susceptible. Resultados similares obtuvieron los autores Gil *et al.* (2012) al evaluar la resistencia de genotipos de girasol que portaban los alelos *Ahas1-1* y *Ahas1-3*, confirmando que las variables radicales evaluadas son un criterio útil para diferenciar entre plántulas de girasol portadoras de diferentes alelos de resistencia a inhibidores de AHAS. Los resultados obtenidos en el ensayo de germinación durante 14 días complementaron a los obtenidos en el ensayo de germinación a siete días, aportando información valiosa al evaluar el crecimiento aéreo de las plántulas. La utilización del software *Tomato Analyzer* permitió realizar la medición del área foliar, de la longitud de las hojas y la cuantificación de la tonalidad del color de las mismas. Ochogavía *et al.* (2014) utilizaron este software para cuantificar la clorosis de las hojas en materiales Imisun que portan el alelo de resistencia *Ahas1-1* y compararon los resultados con el contenido de clorofila en las hojas en presencia de concentraciones crecientes del herbicida imazapir, encontrando que existe una correlación significativamente positiva entre la reducción de color y la reducción de clorofila a medida que aumenta la concentración de herbicida en la cual crecen las plántulas.

Comparando los valores de GR₅₀ en el ensayo durante 14 días con el herbicida imazapir no se observaron diferencias entre los genotipos con mayor grado de resistencia (1-4 y 4-4). Sin embargo en presencia del herbicida metsulfurón metil, a nivel radical el genotipo 1-4 mostró mayores valores de GR₅₀, mientras que para las variables foliares ocurrió lo inverso, el genotipo 4-4 demostró un comportamiento superior y el genotipo 1-4 se comportó de forma similar al 0-4. Los resultados obtenidos, teniendo en cuenta las variables de crecimiento aéreo, área foliar total (AF) y longitud promedio del primer par de hojas (LF), se correlacionan con los obtenidos al cuantificar la actividad de la enzima AHAS. En presencia de ambos herbicidas el genotipo 4-4 obtuvo los mayores valores de GR₅₀ e I₅₀, superiores a los genotipos heterocigotas que portan el alelo *Ahas1-4*. Además, al comparar los valores de I₅₀ para ambos herbicidas, se observaron diferencias significativas en las comparaciones 4-4 vs 1-4 y 4-4 vs 0-4. Experimentos similares realizaron los autores Endo *et al.* (2007) en arroz (*Oryza sativa*) para confirmar la adquisición de la resistencia al herbicida bispiribac de la familia química pirimidiniltio (u oxi) benzoatos (POB) conferida por la introducción por transgénesis de dos mutaciones (Trp548Leu y Ser627Iso) en el gen *Ahas*. Al tratar las plantas de una generación segregante en un estadio de cinco hojas con el herbicida (1 kg i.a. ha⁻¹), los genotipos homocigotas para el locus *Ahas* modificado y los heterocigotas exhibieron resistencia y crecieron normalmente, mientras que las plantas del genotipo susceptible o *wild type*

presentaron necrosis en todas sus hojas. En el análisis de la actividad de AHAS, el extracto enzimático de las plantas homocigotas para el locus *Ahas* modificado mostró alta actividad, incluso con dosis altas de herbicida (100 μ M), logrando una resistencia superior al extracto obtenido a partir de las plantas heterocigotas. Los resultados obtenidos por estos autores al evaluar la actividad enzimática concuerdan con los obtenidos en este trabajo. Tomando como modelo la estructura cuaternaria de la subunidad catalítica de AHAS de *Arabidopsis* en complejo con herbicidas inhibidores, el tetrámero de AHAS está compuesto por cuatro subunidades idénticas (Mc Court *et al.*, 2006). Endo *et al.* (2007) sugieren que las plantas heterocigóticas para el gen *Ahas* producirían tetrámeros compuestos por una mezcla de subunidades “resistentes” y subunidades “sensibles” al herbicida y estos tetrámeros en presencia del herbicida mostrarían menor actividad enzimática. Análogamente, podría concluirse que en los genotipos heterocigóticos para el alelo *Ahas1-4* los tetrámeros de las subunidades catalíticas de AHAS estarían formados por subunidades de *ahas1* y *Ahas1-4*, en el genotipo 0-4, y *Ahas1-1* y *Ahas1-4* en el genotipo 1-4. La posible formación de estos tetrámeros podría explicar las relaciones de dominancia tendientes a la recesividad observadas a nivel enzimático para estos alelos.

Diversos autores han realizado análisis sobre los diferentes bioensayos difundidos para la evaluación de resistencia a herbicidas. Los ensayos mayormente utilizados son en macetas con aplicación de herbicidas en pre o pos emergencia en un estadio de crecimiento determinado, generalmente entre dos y cuatro hojas, debido a que son los que más se asemejan a las condiciones de crecimiento a campo (Beckie *et al.*, 2000; Burgos, 2015). Sin embargo, estos experimentos consumen tiempo, espacio y son poco prácticos cuando se requiere evaluar un gran número de individuos. Los ensayos de detección rápida de resistencia a herbicida, como los ensayos de germinación durante siete y 14 días son útiles para la discriminar entre genotipos con distintos grados de resistencia. Burgos (2015) destaca la importancia de comparar los resultados de estos ensayos con los que se obtienen a partir de macetas o a campo. Si por medio de estos ensayos alternativos se logra el mismo diagnóstico que en un ensayo en macetas, son una opción superior para evaluar un gran número de individuos en un corto período. Dentro de los ensayos de germinación que se realizaron en este trabajo de tesis, se logró discriminar por su grado de resistencia entre los genotipos evaluados. Sin embargo los valores de GR₅₀ de las variables radicales en el ensayo durante 14 días fueron inferiores a los del ensayo de siete días debido a que las plántulas crecieron durante un período mayor en presencia de los herbicidas. Este ensayo aporta una caracterización más completa ya que evalúa el área foliar de las plántulas y la misma se puede correlacionar con los ensayos de actividad enzimática. Como desventaja respecto al ensayo

de germinación durante siete días, se debe realizar un análisis digital más extenso por el gran número de imágenes de raíces y hojas. A su vez, en la estimación de los valores de correlación entre las variables de crecimiento radical de ambos ensayos de germinación en presencia del herbicida imazapir se observó una alta correlación y significativa entre las variables LP7 y LP14, LPb7 y LPb14 y entre LL7 y LL14. En los ensayos de germinación con el herbicida metsulfurón metil los valores de correlación entre las mismas variables fueron positivos pero inferiores a los observados en las correlaciones con el herbicida imazapir, sin embargo también fueron significativos. Por ello, los ensayos de siete y 14 días podrían utilizarse para discriminar entre genotipos portadores de alelos que confieren resistencia a inhibidores de AHAS, siendo más convenientes económica y operativamente los ensayos durante siete días. El alelo *Ahas1-4* en girasol es el primer caso donde la sustitución Trp574Leu en cultivos fue detectada a partir de la prospección de recursos genéticos silvestres (Sala y Bulos, 2012). McCourt *et al.* (2006) informaron que el residuo Trp574 es importante porque define la forma del canal del sitio activo y sirve para el anclaje de los herbicidas a la enzima, por lo tanto la sustitución por Trp574Leu no solo cambia la forma del canal sino que también provoca la pérdida de muchas de las interacciones de Van der Waals que se dan entre las moléculas de herbicida y la enzima. Esta sustitución de aminoácidos ha sido informada en numerosos casos de especies malezas. En Chile, se han detectado biotipos de *Sorghum halepense* con resistencia debido al uso recurrente del herbicida nicosulfuron (SU). Luego de realizar una evaluación a través de ensayos dosis-respuesta de planta entera, actividad enzimática *in vitro* y una posterior secuenciación del gen *Ahas*, se observó que la mutación identificada en los biotipos resistentes ocasiona la sustitución Trp574Leu en la enzima AHAS (Hernández *et al.*, 2015). Beckie *et al.* (2012) evaluaron individuos obtenidos a partir de una población de *Polygonum convolvulus*, encontrada en la provincia de Alberta en Canadá. Realizando un primer ensayo exploratorio con los herbicidas tifensulfurón/tibenuron (SU) y florasulam (TP) en plantas en un estadio de dos a cuatro hojas, observaron plantas muertas o casi muertas (HS) y plantas con poco a ningún daño (HR). Por medio de ensayos dosis-respuesta en macetas determinaron los valores de GR₅₀ de la población HR y de la población HS. Con el herbicida florasulam el GR₅₀ del genotipo HR fue 20 veces superior al de HS y 10 veces superior con los herbicidas tifensulfurón/tibenuron. La secuenciación del gen *Ahas* reveló que la mutación Trp574Leu se encontraba en todos los individuos evaluados de la población HR, por ello los autores concluyen que dicha mutación es la que otorga un alto grado de resistencia a herbicidas de dos familias químicas que inhiben la enzima AHAS. Es importante resaltar que en las poblaciones de malezas el desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo en respuesta a la presión de selección ejercida por el uso repetido de herbicidas con el mismo

sitio de acción. Dado que para este grupo de herbicidas se han detectado numerosos biotipos de malezas resistentes en un total de 158 especies (Heap, 2016) es importante remarcar que deben llevarse a cabo rotaciones de herbicidas con otros modos de acción para mantener la sustentabilidad de esta tecnología.

Resulta interesante analizar los resultados obtenidos por Lamego *et al.* (2009) al evaluar biotipos de *Bidens subalternans* resistentes (R) y susceptibles (S) a inhibidores de AHAS encontradas en sistemas de producción de soja no transgénica en Brasil. Estos autores realizaron ensayos dosis-respuesta en macetas aplicando distintas dosis de los herbicidas clorimuron (SU), clorasulam (TP), imazetapir (IMI) o Piritiobac (POB) a un estadio de dos a cuatro hojas. El biotipo R presentaba la mutación Trp574Leu en el gen *Ahas* y mostró valores de GR₅₀ muy superiores al biotipo S: 361, 637, 386 y 6343 veces superior con los tratamientos de clorimuron, imazetapir, clorasulam y piritiobac, respectivamente. El ensayo de actividad enzimática se realizó en condiciones *in vivo*, a partir de hojas tratadas con distintas concentraciones de los cuatro herbicidas mencionados, donde el biotipo R fue 17, 166, 434 y 516 veces más resistente en presencia de los herbicidas clorimuron, imazetapir, clorasulam y piritiobac respectivamente, cuando se compararon con el biotipo S. En el presente trabajo de tesis, al igual que en el trabajo mencionado, se observó una marcada diferencia entre los valores de GR₅₀ de los ensayos de germinación y el I₅₀ del ensayo de actividad enzimática. Como lo mencionan Lamego *et al.* (2009), la diferencia entre los GR₅₀ e I₅₀ podría deberse a que los ensayos enzimáticos no son directos, ya que el resultado obtenido es un dosaje de acetoína. Además en estos ensayos el extracto enzimático es incubado durante una hora en contacto con el herbicida, mientras que en los ensayos de germinación los efectos observados son en presencia de herbicida durante siete o 14 días. En segundo lugar, GR₅₀ e I₅₀ se obtienen por un modelo matemático, en este caso el log-logístico, por ello son una estimación y no un valor real.

Respecto al método de cuantificación de la actividad enzimática de la enzima AHAS, en este trabajo se utilizó un protocolo que mide la actividad en condiciones *in vitro* que permite una caracterización rápida de los niveles de resistencia a nivel enzimático. Vega *et al.* (2012) utilizaron un protocolo de actividad AHAS *in vivo* para evaluar genotipos que portaban el alelo *Ahas1-1* y el valor de I₅₀ que obtuvo el genotipo resistente en presencia del herbicida imazapir fue 20 veces superior respecto al genotipo susceptible. Al comparar los valores de I₅₀ de los genotipos 1-1 y 0-0 obtenidos a través del ensayo en condiciones *in vitro* en presencia del herbicida imazapir, el genotipo 1-1 fue tres veces más resistente (<0,005). La metodología *in vitro* no sólo es una herramienta útil para la evaluación de genotipos sino que también reduce el tiempo requerido en el laboratorio. Bozic *et al.* (2012) utilizaron esta metodología para

evaluar híbridos de girasol que portaban el alelo *Ahas1-1* (resistentes a IMI) y el alelo *Ahas1-2* (resistentes a SU), informando diferencias muy superiores de I_{50} respecto a híbridos susceptibles de 3000 y 2600 veces respectivamente.

Sala *et al.* (2008a) evaluaron un genotipo de girasol que portaba el alelo *Ahas1-3* y un genotipo susceptible, con distintos fondos genéticos, en presencia del herbicida imazamox y obtuvieron una diferencia de I_{50} dos veces y media superior para el genotipo que portaba el alelo *Ahas1-3*. Esta diferencia es similar a las observadas al comparar los valores de I_{50} en el ensayo de actividad enzimática en presencia del herbicida imazapir.

En estudios anteriores (Roux *et al.*, 2005; Sala *et al.*, 2012c) se demostró que una única concentración de herbicida no es apropiada para estimar los niveles de dominancia, debido a que en presencia de una baja concentración de herbicida se observará menor crecimiento en genotipos homocigotas susceptibles y los genotipos heterocigotas y homocigotas resistentes tendrían un crecimiento normal, por lo que el alelo resistente sería dominante. Si la concentración fuese mayor tanto el homocigota susceptible como el heterocigota tendrían menor crecimiento y el homocigota resistente lo haría normalmente, en este caso la resistencia sería recesiva. Sala *et al.* (2012c) evaluaron las relaciones de dominancia entre los alelos *ahas1*, *Ahas1-1* y *Ahas1-3*. En el presente trabajo se observó una tendencia similar a la descrita por estos autores. Tomando los alelos de a pares, tanto para resistencia a imazapir como a metsulfurón metil, el nivel de dominancia varió desde sobredominancia a recesividad dentro de cada variable evaluada y concentración de herbicida aplicada.

Es importante estimar el nivel de dominancia entre los alelos de la serie *Ahas1* dentro de un programa de mejoramiento para determinar la constitución genotípica de los híbridos de girasol. Si el alelo *Ahas1-4* es dominante sobre los alelos *Ahas1-1* y *ahas1*, tanto en presencia de herbicidas pertenecientes a la familia de las imidazolinonas como las sulfonilureas, no sería necesario introgresarlo a todos los parentales utilizados para la producción de híbridos, ya que los genotipos heterocigóticos para *Ahas* expresarían un fenotipo resistente. En los ensayos en presencia del herbicida imazapir, teniendo en cuenta los alelos *Ahas1-4* y *Ahas1-1*, los genotipos 1-4 y 4-4 tuvieron valores similares de GR_{50} para las variables LP, LPb, LL, AF y LF en ambos ensayos de germinación y los niveles de dominancia, por ejemplo para la variable LP, variaron entre sobredominancia y dominancia del alelo *Ahas1-4* según la concentración de herbicida. Sin embargo, al evaluar la actividad enzimática de AHAS el valor de I_{50} del genotipo 1-4 fue nueve veces inferior al genotipo 4-4 y se observó una relación de recesividad a semirecesividad del alelo *Ahas1-4*. En presencia del herbicida metsulfurón metil, el genotipo 1-4 obtuvo valores de GR_{50} superiores al 4-4 para las tres variables radicales y respecto al nivel de dominancia se observó que varía de

semidominancia a dominancia *Ahas1-4* para la variable LP. A diferencia de lo observado con el herbicida imazapir en la caracterización de la parte aérea de las plántulas, el valor de GR₅₀ para el genotipo 1-4 fue seis veces menor que el obtenido por el genotipo 4-4 para la variable AF, cuatro veces menor para la variable LF y ocho veces inferior en actividad enzimática (I₅₀). Los niveles de dominancia para la variable AF fueron de codominancia en la concentración 10 nM y semirecesividad en 100 nM. Además, en las plántulas del genotipo 1-4 que crecieron con concentración a partir de 10 nM se observó clorosis por la inhibición causada por el herbicida.

Un análisis similar se puede realizar tomando a los alelos *Ahas1-4* y *ahas1*. En ambos ensayos de germinación, en presencia de cada uno de los herbicidas se encontró que el genotipo 4-4 obtuvo valores de GR₅₀ dos veces superiores a los logrados por el genotipo 0-4 para las variables LP, LPb y LL, 10 veces superiores para la variable AF y un valor de I₅₀ cuatro veces mayor. En la parte aérea de las plántulas del genotipo 0-4 se observaron los síntomas de la inhibición provocada por el herbicida a partir de la menor concentración: 1 μM de imazapir y 1 nM de metsulfurón metil, las hojas presentaban un alto grado de clorosis, un crecimiento menor respecto a otros genotipos que portaban en alelo *Ahas1-4*, que se reflejó en los valores de GR₅₀. Además para las variables AF y LF se observó una relación de semirecesividad del alelo *Ahas1-4* con las concentraciones de herbicida a partir de 10 μM de imazapir y 100 nM de metsulfurón metil. Las reducciones del nivel de dominancia a medida que se incrementa la concentración de herbicida han sido revisadas por Bourguet y Raymond (1998). Estos autores sostienen que dicha tendencia a la recesividad se debería a que a altas dosis en los heterocigotas no sólo se inhiben las enzimas sensibles a herbicida sino que también a una parte de las insensibles. A su vez argumentan que dado que generalmente las enzimas mutantes insensibles a herbicida presentan una reducción en la actividad comparado con la de la enzima sensible este hecho reforzaría la tendencia observada hacia la recesividad.

Los menores valores promedio de los genotipos portadores del alelo *Ahas1-4* al estado homocigota observados para la variable área foliar en ausencia de herbicida sugieren que este alelo presentaría un efecto pleiotrópico sobre el desarrollo de la biomasa aérea. Sería pertinente evaluar si dicho efecto se manifiesta en estadios más avanzados del desarrollo y verificar que su presencia en los fondos genéticos a los que sea introgresado no perjudique la producción a nivel del cultivo. Desde una perspectiva práctica la utilidad de los alelos que confieren resistencia para el mejoramiento vegetal estaría determinada por el balance entre el beneficio de dicho gen de resistencia y el costo de aptitud asociado al mismo.

El efecto pleiotrópico de genes que confieren resistencia a herbicidas en cultivos ha sido revisado por Darmency (2013). Este autor menciona dos casos de impactos negativos sobre cultivos con resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS: reducción del rendimiento (-5% a -11%) en arroz Clearfield ® asociado a la sustitución ALS Gly654 y una menor calidad de fibras en algodón resistente a imazamox portador de la sustitución ALS Ser653. Yu y Powles (2014) en su revisión de estudios similares en especies maleza indican que un costo de aptitud asociado a la sustitución Trp574Leu ha sido verificado para la especie *Amaranthus powellii* mientras que en especies como *Kochia scoparia*, *Raphanus raphanistrum* y *Lolium rigidum* no se observó reducción de crecimiento de las plantas.

Este nuevo alelo ofrece la posibilidad de desarrollar una tecnología superior a las desarrolladas anteriormente debido a que los productores tendrían la posibilidad de utilizar los distintos herbicidas inhibidores de AHAS que se utilizan específicamente para aplicar sobre los girasoles Clearfield ®, ExpresSun ® y ClearfieldPlus ® (Sala *et al.*, 2012c). Además, permitiría introducir este cultivo en rotaciones sin sufrir los daños que ocasiona la residualidad de dichos herbicidas. Howatt y Endres (2006) evaluaron el comportamiento de girasoles resistentes a IMI y a SU que crecieron con residuos de los herbicidas imazetapir, metsulfurón metil o flucarbazone en experimentos en invernáculo. Los girasoles resistentes a IMI presentaron 60 y 66% de daño cuatro semanas después de haber emergido en presencia de residuos de metsulfurón metil y flucarbazone, respectivamente. Sin embargo, en presencia de imazetapir, no se observó diferencia respecto a girasoles que crecieron en suelo sin residuos de herbicida. La residualidad de los tres herbicidas mencionados no causó ningún daño significativo en los girasoles resistentes a SU respecto a los girasoles que no recibieron tratamiento alguno. Por ello, el desarrollo de cultivares híbridos de girasol que porten el alelo *Ahas1-4* tendría alta probabilidad de evitar los efectos producidos por la residualidad de los herbicidas inhibidores de AHAS.

CONCLUSIONES

- El alelo *Ahas1-4* confiere resistencia al herbicida metsulfurón metil y resistencia superior a la conferida por el alelo *Ahas1-1* al herbicida imazapir.
- Las variables longitud de raíz principal y longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm constituyen criterios útiles de selección para identificar individuos portadores de alelos de resistencia en los bioensayos de germinación durante siete días.
- La relación de dominancia entre dos alelos puede variar dependiendo del tipo de herbicida presente, de la concentración de herbicida, de la variable evaluada y del estadio de la planta al momento de evaluación.

BIBLIOGRAFÍA

- AAPRESID (2012). Evolución de la superficie en Siembra Directa en Argentina Campañas 1977/78 a 2010/11. <http://www.aapresid.org.ar/superficie>
- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J. y Ram, S.J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11 (7): 36-42.
- Al-Khatib, K., Baumgartner, J.R., Peterson, D.E. y Currie, R.S. (1998). Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Science* 46: 403-407.
- Beckie, H., Heap, I., Smeda, R. y Hall, L. (2000). Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology* 14: 428-445.
- Beckie, H., Warwick, S. y Sauder, C. (2012). Acetolactate synthase (ALS) inhibitor-resistant wild buckwheat (*Polygonum convolvulus*) in Alberta. *Weed Technology* 26: 156-160.
- Blamey, F. P. C., Zollinger, R. K., y Schneiter, A. A. (1997). Sunflower production and culture. *Sunflower technology and production*: 595-670.
- Bourguet, D., Genissel, A., y Raymond, M. (2000). Insecticide resistance and dominance levels. *Journal of economic entomology* 93 (6): 1588-1595.
- Bourguet y Raymond (1998). The molecular basis of dominance relationships: the case of some recent adaptive genes. *Journal of Evolutionary Biology* 11(1): 103-122.
- Box, G. y Cox, D. (1964). An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 26 (2): 211-252.
- Bozic, D., Saric, M., Malidza, G. y Vrbnicanin, S. (2012). Resistance of sunflower hybrids to imazamox and tribenuron-methyl. *Crop protection* 39: 1-10.
- Breccia, G., Vega, T., Nestares, G., Mayor, M.L., Zorzoli, R. y Picardi, L. (2009). Immature embryo culture for early screening of imidazolinone resistance in sunflower. *International Journal of Plant Breeding* 3: 37-40.
- Breccia, G., Vega, T., Nestares, G., Mayor, M.L., Zorzoli, R. y Picardi, L. (2011). Rapid test for detection of imidazolinone resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding* 130: 109-113.
- Bruniard, J.M. y Miller, J.F. (2001). Inheritance of imidazolinone-herbicide resistance in sunflower. *Helia* 24: 11-16.
- Burgos, N. (2015). Whole-plant and seed bioassays for resistance confirmation. *Weed Science Special Issue*: 152-165.
- Darmency, H. (2013). Pleiotropic effects of herbicide-resistance genes on crop yield: a review. *Pest management science* 69: 897-904.
- De Mendiburu, F. (2014). *Agricolae: Statistical procedures for agricultural research. R package version 1*: 1-6.
- Duggleby, R. G., Pang, S. S., Yu, H. y Guddat, L. W. (2003). Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. *European Journal of Biochemistry*, 270(13): 2895-2904.
- Duggleby, R. G., McCourt, J. A. y Guddat, L. W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3): 309-324.

- Endo, M., Osakabe, K., Ono, K., Handa, H., Shimizu, T. y Toki, S. (2007). Molecular breeding of a novel herbicide-tolerant rice by gene targeting. *The Plant Journal* 52: 157–166.
- Gil, M., Breccia, G., Vega, T., Bulos M., Sala, C.A. y Nestares, G. (2012). Soil-less bioassay for the identification of plants carrying different imidazolinone-tolerant alleles in sunflower. *Proceedings 18th International Sunflower Conference*, Mar del Plata y Balcarce, Argentina
- Gries, M. (2003). Taller ASAGIR sobre Malezas en el Cultivo de Girasol. Segundo Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires, Argentina.
- Hawley, R.M. (2005). The Acetohydroxyacid Synthase Gene Family: its Role in Herbicide Resistant Sunflowers. Tesis para optar al título de Master of Science in Genetics, Oregon State University.
- Heap, I. (2016). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [http://: www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)
- Hernández, M. J., León, R., Fischer, A.J., Gebauer, M., Galdames, R. y Figueroa, R. (2015). Target-Site resistance to nicosulfuron in Johnsongrass (*Sorghum halepense*) from chilean corn fields. *Weed Science* 63: 631–640.
- Howatt, K. y Endres, G. (2006). Herbicide-resistant sunflower (*Helianthus annuus*) response to soil residues of ALS-inhibiting herbicides. *Weed Technology* 20: 67–73.
- Kolkman, J. M., Slabaugh, M. B., Bruniard, J. M., Berry, S., Bushman, B. S., Olungu, C., Maes N., Abratti G., Zambelli A., Miller J.F., Leon A. y Knapp, S. J. (2004). Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 109(6): 1147-1159.
- Lamego, F., Charlson, D., Delatorre, C., Burgos, N. and Vidal, R. (2009). Molecular basis of resistance to ALS-Inhibitor herbicides in Greater Beggarticks. *Weed Science* 57: 474–481.
- Lange, A. (2012). Girasol en Siembra Directa: Dificultades y Soluciones. *Proceedings 18th International Sunflower Conference*, Mar del Plata y Balcarce, Argentina, pp. 130 - 135.
- Lobet, G., Pagés, L. y Draye, X. (2011). A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant physiology* 157(1): 29-39.
- McCourt, J.A., Pang, S.S., King-Scott, J., Guddat, L.W. y Duggleby, R.G. (2006). Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *PNAS* 103 (3): 569–573.
- Miller, J.F. y Zollinger, R. (2004). Utilization of cross-resistance to create herbicide-resistant sunflower hybrids. *Proceedings Sunflower Research Workshop*. Fargo, ND, USA, pp: 123-130.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497.
- National Sunflower Association, Sunflower Statistics: World Supply y Disappearance. <http://www.sunflowernsa.com/stats/world-supply/>
- Ochogavía, A.C., Gil, M., Picardi, L. y Nestares, G. (2014). Precision phenotyping of imidazolinone-induced chlorosis in sunflower. *Breeding Science* 64: 416–421.
- R Development Core Team (2012). R: A Language and Environment for Stastical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (<http://www.R-project.org/>).
- Ritz, C. y Streibig, J. C. (2005). Bioassay analysis using R. *Journal of Statistical Software*, 12(5): 1-22.

- Rodríguez, G. R., Moysenko, J. B., Robbins, M. D., Morejón, N. H., Francis, D. M. y van der Knaap, E. (2010). Tomato Analyzer: a useful software application to collect accurate and detailed morphological and colorimetric data from two-dimensional objects. *Journal of visualized experiments: JoVE* (37).
- Roux, F., Matějček, A., Gasquez, J. y Reboud, X. (2005). Dominance variation across six herbicides of the *Arabidopsis thaliana* *csr1-1* and *csr1-2* resistance alleles. *Pest management science* 61: 1089-1095.
- Sala, C. A., Bulos, M., Echarte, M., Whitt, S. R. y Ascenzi, R. (2008a). Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 105-112.
- Sala, C.A., Bulos, M., Echarte, M. (2008b). Genetic Analysis of an Induced Mutation Conferring Imidazolinone Resistance in Sunflower. *Crop Science* 48: 1817-1822.
- Sala, C. A., Bulos, M., Altieri, E. y Ramos, M. L. (2012a). Sunflower: improving crop productivity and abiotic stress tolerance. In: *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*, N. Tuteja, S. Singh Gill, A. F. Tiburcio, R. Tuteja (Eds.) Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. pp: 1203-1249.
- Sala, C.A., Bulos, M., Altieri, E. y Ramos, M.L. (2012b). Genetics and Breeding of Herbicide Tolerance in Sunflower. *Helia* 35: 57-70.
- Sala, C.A., Bulos, M., Altieri, E. y Weston, B., (2012c). Response to imazapyr and dominance relationships of two imidazolinone-tolerant alleles at the *Ahas1* locus of sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 385–396
- Sala, C.A., Bulos, M. y Weston, B. (2012d). Relative tolerance, stability, and reliability of two herbicide tolerance traits in sunflower. *Proceedings 18th International Sunflower Conference*, Mar del Plata y Balcarce, Argentina.
- Sala, C.A. y Bulos, M. (2012). Inheritance and molecular characterization of broad range tolerance to herbicides targeting acetohydroxyacid synthase in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 355-364.
- Satorre, E. (2005). Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy*, 15(87), 24-31.
- Schneider, A.A. y Miller, J.F. (1981). Description of Sunflower Growth Stages. *Crop Science* 21: 901-903.
- Seefeldt, S., Jensen, J.E. y Fuerst, E.P. (1995). Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9(2): 218-227
- Shaner, D. L. (1991). Physiological effects of the imidazolinone herbicides. *The imidazolinone herbicides*. CRC Press, Inc, pp: 129-137.
- Shaner, D. L. (2000). The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on resistance management. *Pest Management Science* 56: 320–326.
- Singh, B.K. y Shaner, D.L. (1995). Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: from test tube to field. *Plant Cell* 7: 935-944.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. (1969). *Biometry*, pp: 1-776.

- Tan, S., Evans, R., Dahmer, M., Singh, B. y Shaner, D. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 61: 246–257.
- Tan, S., Evans, R. y Singh, B.K. (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 30: 195-204.
- Tuesca, D. y Nisensohn, L. (2004). Inhibidores de la síntesis de aminoácidos. En: *Herbicidas*, Vitta, J. (Ed.) Rosario, UNR Editora. pp: 51-55.
- Vega, T., Breccia, G., Nestares, G., Mayor, M. L., Zorzoli, R. y Picardi, L. (2009). Soil-less bioassays for early screening for resistance to imazapyr in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Pest Management Science* 65: 991–995.
- Vega, T., Breccia, G., Gil, M., Zorzoli, R. Picardi, L. y Nestares, G. (2012). Acetohydroxyacid synthase (AHAS) in vivo assay for screening imidazolinone-resistance in sunflower (*Helianthus annuus L.*) *Plant Physiology and Biochemistry* 61: 103-107
- Westerfeld, W.W. (1945). A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.* 161: 495-502.
- White, A.D., Graham, M.A. y Owen, M.D.K. (2003). Isolation of acetolactate synthase homologs in common sunflower. *Weed Science* 51: 845-853.
- Yu, Q., Zhang, X.Q., Hashem, A., Walsh, M.J. y Powles, S.B. (2003). ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Science* 51: 831–838.
- Yu, Q., Han, H., Vila-Aiub, M. M. y Powles, S. B. (2010). AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *Journal of experimental botany*, 61(14), 3925-3934.
- Yu, Q. y Powles, S. B. (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Management Science* 70: 1340–1350.

ANEXO

Valores absolutos (cm) de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb) y longitud de la raíz lateral más larga (LL), obtenidos a partir del tratamiento control en plántulas de siete días del ensayo realizado con el herbicida imazapir.

Genotipo	LP	LPb	LL
0-0	6,81 ± 1,33	2,62 ± 0,31	3,00 ± 0,78
1-1	7,51 ± 1,09	3,25 ± 0,39	3,54 ± 0,18
4-4	8,96 ± 0,80	3,52 ± 0,39	3,73 ± 0,04
0-1	7,30 ± 0,70	2,83 ± 0,99	3,27 ± 0,67
0-4	8,33 ± 0,66	3,07 ± 0,67	3,55 ± 0,09
1-4	7,94 ± 0,78	3,32 ± 1,15	3,75 ± 0,61

Valores absolutos (cm) de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb) y longitud de la raíz lateral más larga (LL), obtenidos a partir del tratamiento control en plántulas de siete días del ensayo realizado con el herbicida metsulfurón metil.

Genotipo	LP	LPb	LL
0-0	8,41 ± 1,04	3,56 ± 0,99	3,20 ± 0,63
1-1	8,02 ± 0,47	3,70 ± 0,79	4,23 ± 0,32
4-4	7,72 ± 0,40	3,17 ± 0,61	3,38 ± 0,61
0-1	9,40 ± 0,42	3,79 ± 0,19	4,18 ± 0,41
0-4	8,20 ± 0,88	3,37 ± 0,14	3,82 ± 0,18
1-4	8,22 ± 0,57	3,64 ± 0,24	3,77 ± 0,56

Valores absolutos (cm) de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb) y longitud de la raíz lateral más larga (LL), área foliar total (AF) y longitud promedio de primer par de hojas (LF), obtenidos a partir del tratamiento control en plántulas de 14 días del ensayo realizado con el herbicida imazapir.

Genotipo	LP	LPb	LL	AF	LF
0-0	13,40 ± 0,68	9,68 ± 0,27	7,44 ± 0,15	32,71 ± 2,14	5,02 ± 0,30
1-1	10,38 ± 2,24	7,61 ± 2,04	7,83 ± 1,62	32,45 ± 3,98	6,17 ± 0,60
4-4	10,66 ± 1,73	6,48 ± 0,80	5,76 ± 0,65	17,49 ± 2,07	4,12 ± 0,23
0-1	12,92 ± 0,91	9,50 ± 1,13	8,54 ± 0,72	46,30 ± 4,49	6,65 ± 0,12
0-4	9,34 ± 1,57	6,50 ± 1,47	6,57 ± 2,13	23,59 ± 6,38	4,85 ± 0,69
1-4	11,34 ± 1,58	7,06 ± 1,15	7,18 ± 0,28	31,19 ± 3,41	5,12 ± 0,34

Valores absolutos (cm) de las variables longitud de raíz principal (LP), longitud de raíz principal con raíces laterales mayores a 5 mm (LPb) y longitud de la raíz lateral más larga (LL), área foliar total (AF) y longitud promedio de primer par de hojas (LF), obtenidos a partir del tratamiento control en plántulas de 14 días del ensayo realizado con el herbicida metsulfurón metil.

Genotipo	LP	LPb	LL	AF	LF
0-0	10,28 ± 1,47	7,39 ± 0,50	7,25 ± 0,86	25,45 ± 9,44	4,55 ± 0,64
1-1	14,49 ± 2,89	9,71 ± 1,52	9,24 ± 1,39	35,65 ± 2,32	6,52 ± 0,21
4-4	9,96 ± 2,19	6,61 ± 1,65	5,76 ± 1,38	20,23 ± 2,66	4,61 ± 0,28
0-1	12,63 ± 1,11	9,02 ± 1,07	8,53 ± 1,65	46,50 ± 9,45	6,13 ± 0,63
0-4	9,69 ± 1,61	6,68 ± 0,78	6,40 ± 0,57	23,87 ± 2,56	4,69 ± 0,20
1-4	11,82 ± 2,31	7,69 ± 1,15	7,80 ± 1,25	31,08 ± 4,05	5,32 ± 0,25

Valores absolutos (absorbancia) de los tratamientos control obtenidos a partir de los ensayos de cuantificación de actividad AHAS con los herbicidas imazapir (IMI) y metsulfurón metil (SU).

Genotipo	IMI	SU
0-0	1,59 ± 0,17	2,61 ± 0,27
1-1	1,15 ± 0,43	0,90 ± 0,32
4-4	1,57 ± 0,11	1,40 ± 0,38
0-1	1,57 ± 0,21	2,15 ± 0,41
0-4	1,59 ± 0,45	1,60 ± 0,44
1-4	1,46 ± 0,34	1,62 ± 0,75