



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

*IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A  
HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ENZIMA ACETOHIDROXIÁCIDO SINTASA EN  
GIRASOL*

**LIC. MERCEDES GIL**

Tesis para optar al título de  
**DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS**

Director: DRA. LILIANA A. PICARDI

CO-Directores: ING. AGR. (MSc) GRACIELA M. NESTARES

DRA. SILVINA FELITTI

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A HERBICIDAS  
INHIBIDORES DE LA ENZIMA ACETOHIDROXIÁCIDO SINTASA EN GIRASOL**

Mercedes Gil

Licenciada en Biotecnología (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario)

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, 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 Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre 2012 y 2016, bajo la dirección de la Dra. Liliana A. Picardi y la co-dirección de la Ing. Agr. (Msc) Graciela M. Nestares y la Dra. Silvina Felitti.

Nombre y firma del Doctorando

Nombre y firma del Director

Nombre y firma del Co - Director

Defendida: .....de 2017

## AGRADECIMIENTOS

A Graciela. Por aguantarme hace tantos años siendo mucho más que una directora. Porque cuando miro el camino recorrido me doy cuenta de la suerte que tuve de encontrarme con ella y porque es la responsable de que nuestro grupo sea sencillamente el más feliz.

A Lili y Silvi, por su paciencia y sus importantes aportes para llevar a cabo este trabajo.

A los miembros de la Cátedra de Genética, que nos forman en la multidisciplina y la responsabilidad, pero más aún, nos apoyan con un cariño inmenso.

A mis Gulis...Mati, por estar hace 12 años a mi lado como amigo, novio, esposo y ahora como papá de mi bebé. Por ser todo para mí. Y a Vicente, nuestro porotito, que llegó para enseñarnos los que es el amor más puro.

A mis papás Chiqui y Guille, por mostrarme siempre el camino de la libertad. Porque me acompañan en cada decisión y me siguen mimando como cuando era chica.

A mi hermano Mati y mi cuñada Vani, por ser mis referentes. Y a mi sobrino Mateo por alegrarnos la vida desde que llegó.

A mis amigas de Venado, por toda una vida juntas. Por tanto.

Al Grupete, por tantos años de anécdotas y aguante. Por ser un pilar fundamental durante todas las etapas de estudio.

Al *sunflower team*, por mostrarme que el trabajo en equipo es lo más valioso y a los chicos de la salita de becarios. Todos juntos hacen que el día a día sea maravilloso y que Agrarias sea un lugar entrañable.

A Sandrine, Alexandra, Ludivine y Stephanie de l' *Unité de Recherche en Génomique Végétale* (URGV, INRA) en Évry, París. Por haberme recibido con tanto amor durante mi estadía de trabajo, por la dedicación y la paciencia, y sobretodo por la alegría diaria que me hizo sentir siempre entre amigas. Je vous adore les filles!!!

A Nicolás Langlade del *Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organisms* (LIPM, INRA) en Toulouse, por su amistosa invitación a conocer sus laboratorios y campos experimentales y por su enorme colaboración para con este trabajo.

Al CONICET por haber financiado mi carrera de posgrado y a los responsables del programa de becas BEC.AR por haberme permitido realizar una formación en el exterior, experiencia que jamás olvidaré.

**A MIS GULIS**

## PRESENTACIONES A CONGRESOS

### COMUNICACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS INTERNACIONALES

1- Gil, M.; Vega, T.; Felitti, S.; Picardi, L.; Balzergue, S. y Nestares, G. "RNA-seq characterization of non-target-site mechanisms in imidazolinone resistant sunflower (*Helianthus annuus* L.)". 7th International Weed Science Congress (IWSC). Clarion Congress Hotel Prague. Praga, República Checa. 19-25 de Junio de 2016.

2- Gil, M.; Vega, T.; Breccia, G.; Mansilla, C.; Picardi, L. y Nestares, G. "Image analysis for the determination of herbicide resistance mechanism in sunflower". 4to. Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional (4CAB2C) y 4ta. Conferencia Internacional de la Sociedad Iberoamericana de Bioinformática (SolBio). CIFASIS-CONICET (Campus CCT Rosario). Rosario, Argentina. 29-31 de Octubre de 2013.

### COMUNICACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS NACIONALES

1- Gil, M.; Ochogavía, A.; Felitti, S.; Picardi, L. y Nestares, G. "Caracterización de transcritos asociados a mecanismos de resistencia a imidazolinonas no relacionados al sitio de acción en girasol". XXXI Reunión Argentina De Fisiología Vegetal: *Enfrentando el cambio climático haciendo sostenible la productividad agro-forestal*. Corrientes, Argentina. 13-16 de noviembre de 2016.

2- Martin, G.; Gil, M.; Vega, T. y Nestares, G. "Efecto de un inhibidor de citocromos P450 sobre la resistencia al herbicida imazetapir en girasol". XVII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2016. Facultad De Ciencias Veterinarias. IV Jornada Latinoamericana II Jornadas De Ciencia y Tecnología 2016. Facultad De Ciencias Agrarias. I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias 2016. Universidad Nacional De Rosario. Casilda / Zavalla, Argentina. 22-23 de septiembre de 2016.

3- Gil, M.; Vega, T.; Breccia, G.; Mansilla, C.; Picardi, L. y Nestares, G. "Efecto de la inhibición de citocromos P450 sobre la resistencia a imidazolinonas en girasol". XV Congreso-XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Facultad de Ciencias Agrarias (UNR). Zavalla, Argentina. 28 y 29 de noviembre de 2013.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	i
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN GENERAL	2
HIPÓTESIS GENERAL	11
OBJETIVO GENERAL	11
CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE CITOCROMOS P450 SOBRE LA RESISTENCIA A IMIDAZOLINONAS EN GIRASOL	
INTRODUCCIÓN	13
HIPÓTESIS ESPECÍFICA	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	50
CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON EL HERBICIDA IMAZETAPIR EN GIRASOL	
INTRODUCCIÓN	52
HIPÓTESIS ESPECÍFICA	61
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	62
RESULTADOS	101
DISCUSIÓN	134
CONCLUSIONES	141
CONCLUSIONES GENERALES	144
PERSPECTIVAS	145
BIBLIOGRAFÍA	148
ANEXO	160

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

### A

A: adenina

$A_{260; 230; 280}$ : medidas de absorbancia a longitud de onda 230, 260 o 280 nm

ABCs: transportadores ABC

ABT: 1-aminobenzotriazol

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

AFT: área total foliar total

AgNO<sub>3</sub>: nitrato de plata

*ahas*: gen de la acetohidroxiácido sintasa

AHAS: acetohidroxiácido sintasa

Ala: alanina

ALS: acetolactato sintasa

ANOVA: análisis de la variancia

Arg: arginina

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: nucleasa de ARN

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosomal

Asp: aspartato

ATP: adenosina trifosfato

### C

C: citosina

cDNA-AFLP: *cDNA amplified fragment length polymorphism*, polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados de cDNA

cm: centímetros

Cys: cisteína

°C: grados Celsius

### D

dNTPs: desoxirribonucleótidos

dT: desoxitimidina

dUTP: desoxiuridina trifosfato

## **E**

E: eficiencia de PCR

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EST: *expressed sequence tag*, etiqueta de secuencia expresada

## **F**

FAD: flavina adenina dinucleótido

## **G**

G: guanina

g: fuerza centrífuga

Glu: glutatión

Gly: glicina

GSTs: glutatión S-transferasas

GTs: glicosiltransferasas

## **H**

HEPES: ácido N-2-hidroxi-etilpiperazin-N'-2-etanosulfónico

*hue*: índice de coloración de las hojas

hs: horas

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

## **I**

IMI: imidazolinonas

## **K**

kDa: kilodaltons

## **L**

LFT: longitud foliar total

LH: longitud de hipocótilo

LL: longitud de raíz lateral más larga

LP: longitud de raíz principal

## **M**

M: molar

mg: miligramos

Mg<sup>2+</sup>: catión magnesio divalente

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio

min: minutos

miRNAs: micro ARNs

ml: mililitros

mM: milimolar

MS: solución nutritiva Murashige y Skoog (1962)

## **N**

NaCO<sub>3</sub>: carbonato de sodio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaOH: hidróxido de sodio

ng: nanogramos

nm: nanómetros

## **P**

p: probabilidad

pb: pares de bases

PBO: piperonil butóxido

PCR: *polimerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

Phe: fenilalanina

PSA: persulfato de amonio

PSF: peso seco foliar

PVPP: polivinilpolipirrolidona

P450s: P450 monooxigenasas

## **R**

R: línea endocriada de girasol HA 425 con resistencia a IMI

RT-qPCR: *reverse transcription quantitative PCR*, PCR cuantitativa seguida de transcripción reversa

RNA-Seq: secuenciación del ARN

rpm: revoluciones por minuto

## **S**

S: línea de girasol HA 89 susceptible a IMI

seg: segundos

Ser: serina

STEX: tampón Tris-HCl-EDTA-Tritón X-100

## **T**

T: timina

TAE: tampón Tris-acetato-EDTA

TBE: tampón Tris-borato-EDTA

TE: tampón Tris-HCl-EDTA

TEMED: N, N, N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina

Thr: treonina

TPP: tiamín difosfato

## **U**

U: unidades de enzima

μl: microlitros

μM: micromolar

## **V**

V: voltio

Val: valina

valor E: probabilidad del alineamiento de secuencias

V2: estadio vegetativo con dos hojas verdaderas de acuerdo a la escala fenológica de  
Schneiter y Miller (1981).

v/v: volumen en volumen

## RESUMEN

En el año 1998 se encontró en Kansas, Estados Unidos, una población de girasol maleza (*Helianthus annuus* L.) resistente a herbicidas imidazolinonas (IMI) y esta fuente de resistencia denominada Imisun pudo ser incorporada al girasol cultivado mediante cruzamientos convencionales. Se ha demostrado a través de una aproximación de la genética clásica que esta resistencia está controlada por dos loci: un locus principal con acción semidominante (*Imr1*) que se corresponde con una mutación en el codón 205 del locus que codifica para la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) y un segundo locus (*Imr2*) de efecto modificador, cuya identidad se desconoce pero que podría corresponder a determinantes génicos adicionales involucrados en el metabolismo del herbicida. La detoxificación de xenobióticos usualmente se asocia a familias de enzimas tales como glutatión S-transferasas (GSTs), glicosiltransferasas y citocromo P450 monooxigenasas (P450s).

La hipótesis del presente trabajo es que existen genes asociados a la presencia del locus *Imr2* que están involucrados en la eficiencia de metabolismo y detoxificación del herbicida imazetapir en la fuente de resistencia Imisun de la especie girasol. El objetivo general fue Identificar y caracterizar mecanismos de resistencia al herbicida imazetapir en la fuente de resistencia Imisun de la especie girasol y los objetivos específicos fueron los siguientes:

1- Evaluar el efecto del inhibidor de citocromos P450 piperonil butóxido (PBO) sobre la resistencia al herbicida imazetapir en plantas completas de girasol.

2- Evaluar el efecto del inhibidor de citocromos P450 1-aminobenzotriazol (ABT) sobre la resistencia al herbicida imazetapir en plantas completas de girasol.

3- Caracterizar el transcriptoma de dos genotipos de girasol resistente y susceptible a imidazolinonas, respectivamente y su respuesta al tratamiento con imazetapir mediante la técnica cDNA-AFLP.

3.1-Determinar la concentración de herbicida imazetapir óptima para el estudio del transcriptoma.

3.2- Determinar los tiempos de colecta post tratamiento con herbicida adecuados para el estudio del transcriptoma.

3.3- Evaluar los niveles de inhibición de la actividad AHAS *in vitro* durante los tiempos de colecta.

4- Analizar las diferencias en los niveles de expresión génica para el genotipo resistente en respuesta al tratamiento con imazetapir mediante la técnica TruSeq Stranded RNA-Seq.

Para los ensayos de reversión de la resistencia en plantas completas se utilizaron dos líneas endocriadas de girasol resistente (R) y susceptible (S) a IMI, el herbicida imazetapir y los inhibidores de P450s PBO y ABT. Las variables evaluadas sobre plantas de 15 días fueron: área total foliar total (AFT), longitud de raíz principal (LP), longitud de la raíz lateral más larga (LL), longitud de hipocótilo (LH) y índice de coloración de las hojas *hue*, mediante programas de análisis de imágenes digitales. Los contrastes ortogonales detectaron diferencias significativas en algunos tratamientos para el inhibidor PBO en las variables AFT y LL en el genotipo R y los valores del índice de reducción atribuida al PBO fueron de 26 %, 23 %, respectivamente. En el caso del inhibidor ABT se encontró efecto significativo del mismo para las variables LP y LL en el genotipo R y los valores del índice de reducción atribuida al inhibidor fueron de 13 % y 11 %, respectivamente. Estos resultados sugieren que en la fuente de resistencia *Imisun* existiría un mecanismo de detoxificación mediado por isoformas de P450s particularmente inhibidas por ABT y PBO.

Para el análisis de estudio del transcriptoma se utilizaron las dos líneas endocriadas de girasol R y S y el herbicida imazetapir. La concentración óptima de trabajo de imazetapir fue 1  $\mu\text{M}$  y los tiempos de colecta adecuados para el análisis del transcriptoma fueron 12, 18 y 24 hs. Se confirmó la inhibición de AHAS en los tiempos de colecta elegidos, se eligió la combinación óptima de enzimas de restricción *CviAII* y *MseI* mediante un análisis *in silico* y se realizó el ensayo de cDNA-AFLP. Se aislaron, re-amplificaron y secuenciaron 49 fragmentos diferencialmente expresados cuyas potenciales categorías funcionales se asignaron mediante búsquedas BLAST contra bases de datos NCBI y contra el transcriptoma ensamblado *de novo* HaT13I. Dieciocho secuencias aisladas en diferentes tiempos de colecta, tratamientos y genotipo estarían relacionadas a procesos de detoxificación y estrés hídrico.

El análisis TruSeq Stranded RNA-Seq se realizó sobre plantas R control y tratadas con imazetapir 1  $\mu\text{M}$  y para el mapeo se utilizó como referencia el transcriptoma HaT13I. Se realizó una búsqueda específica de familias de genes relacionados con procesos de detoxificación de xenobióticos. Ninguno mostró expresión diferencial.

Los resultados de este trabajo de tesis sugieren que el metabolismo de herbicidas en la fuente de resistencia estudiada es de expresión constitutiva, puede ser detectado en el genotipo susceptible y la resistencia aparece como resultado de un aumento de dicho metabolismo en un momento determinado del tratamiento con IMI. Estos mecanismos de resistencia no relacionados al sitio de acción podrían contribuir a la resistencia a imidazolinonas en girasol y estar relacionados al locus *Imr2*.

## ABSTRACT

### Identification and characterization of imidazolinone resistance mechanisms in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Imidazolinone (IMI) resistance genes have been introgressed from a sunflower wild population collected in Kansas to elite inbred lines. A digenic model has been proposed as the genetic basis of the inheritance of IMI resistance. This model assumes that both parents must express two resistance genes to achieve complete resistance in the hybrids: the major semidominant locus *Imr1*, an allelic variant of the *ahas1* locus that codes for the acetohydroxyacid synthase catalytic subunit and the modifier locus *Imr2*, whose effect remains unknown and it could be related to non-target-site resistance such as xenobiotic metabolism.

The objective of this study was to identify and characterize IMI resistance mechanisms in sunflower. Specific objectives were:

1- Evaluate the growth response to imazetapyr in combination with P450s inhibitor piperonyl butoxide (PBO) in sunflower plantlets.

2- Evaluate the growth response to imazetapyr in combination with P450s inhibitor 1-aminobenzotriazole (ABT) in sunflower plantlets.

3- Characterize sunflower gene expression in response to imazetapyr using cDNA-AFLP.

3.1- Determine the optimal herbicide concentration known as *discriminating dose*.

3.2- Determine optimal herbicide treatment length.

3.3- Determine acetohydroxyacid synthase *in vitro* activity to assess enzyme inhibition levels.

4- Characterize resistant sunflower gene expression in response to imazetapyr using TruSeq Stranded RNA-Seq.

Two sunflower inbred lines were used in this study: HA 425 and HA 89, classified as resistant (*Imr1Imr1Imr2Imr2*) and susceptible (*imr1imr1imr2imr2*), respectively.

An important number of xenobiotic metabolism related genes were found in cDNA-AFLP and RNA-Seq transcriptomic analysis: cytochromes P450, ABC transporters, glycosyltransferases, UDPglucuronosyl/glucosyltransferases and glutathione S-transferases. This results combined with increased phytotoxicity of imazetapyr in the resistant line when P450s inhibitors were present, agree with suggestions previously made that non-target-site resistance mechanisms may contribute to herbicide resistance in sunflower. Moreover, these mechanisms could be related to the modifier locus *Imr2*. This study allowed to detect

constitutively expressed detoxification genes potentially related to imidazolinone resistance in sunflower and encourage further experimentation on the molecular and biochemical levels to assess the role of P450s in endowing herbicide resistance.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las malezas han sido el principal factor biótico en la pérdida de rendimiento de los cultivos desde el inicio de la agricultura y su control en los sistemas de cultivo modernos es vital para cubrir las demandas mundiales de alimento (Délye et al., 2013). Los herbicidas son actualmente la herramienta más poderosa y efectiva para el control de las malezas, cumplen un rol fundamental en los sistemas de producción y en este sentido, la necesidad de entender los mecanismos de acción de los herbicidas utilizados cotidianamente y de desarrollar otros, nuevos y más eficientes, es constante (Sabbatini et al., 2004).

Los herbicidas pueden agruparse en familias según sus sitios y modos de acción. Estas familias incluyen por ejemplo a los inhibidores de la enzima acetil-CoA carboxilasa que afectan la síntesis de lípidos, inhibidores del fotosistema II, inhibidores de la síntesis de pigmentos carotenoides, de la síntesis de celulosa, entre otros. Sin embargo, la mayoría de los herbicidas actualmente comercializados actúan bloqueando la biosíntesis de ciertos aminoácidos, tales como aquellos de cadena ramificada, en plantas (Tan et al., 2006). Dado que estas vías biosintéticas no se encuentran en animales, los inhibidores de las enzimas que participan exclusivamente en dichos procesos resultan apropiados para su uso como herbicidas (Sabbatini et al., 2004; Duggleby et al., 2008).

Una de las primeras respuestas de la planta frente a la aplicación de herbicidas que inhiben la biosíntesis de aminoácidos es el cese de la síntesis de proteínas. En consecuencia, se detienen los eventos mitóticos entre las fases G<sub>2</sub> y M retrasando el crecimiento vegetativo del vástago y de la raíz y afectando la reproducción (Rost y Reynolds, 1985). Además, disminuye el transporte y metabolismo de fotosintatos y comienzan a acumularse azúcares neutros en las hojas y raíces (Zabalza et al., 2004), se impide la incorporación de timina al ADN (ácido desoxirribonucleico) y simultáneamente se desarrolla clorosis, necrosis y deformación de las hojas (Singh y Shaner, 1995; Whitcomb, 1999; Sabbatini et al., 2004). La muerte de la planta se produce luego de varias semanas (Whitcomb, 1999; Tuesca y Nisensohn, 2001).

La enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS, EC 2.2.1.6) es la primera enzima que comparten las tres vías de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina en procariotas, algas, levaduras, hongos y plantas superiores. Dado que no se encuentra presente en los animales, estos deben incorporar aminoácidos de cadena

ramificada desde la dieta (Lancien et al., 2007; Duggleby et al., 2008). Específicamente, las dos reacciones en las que participa esta enzima involucran:

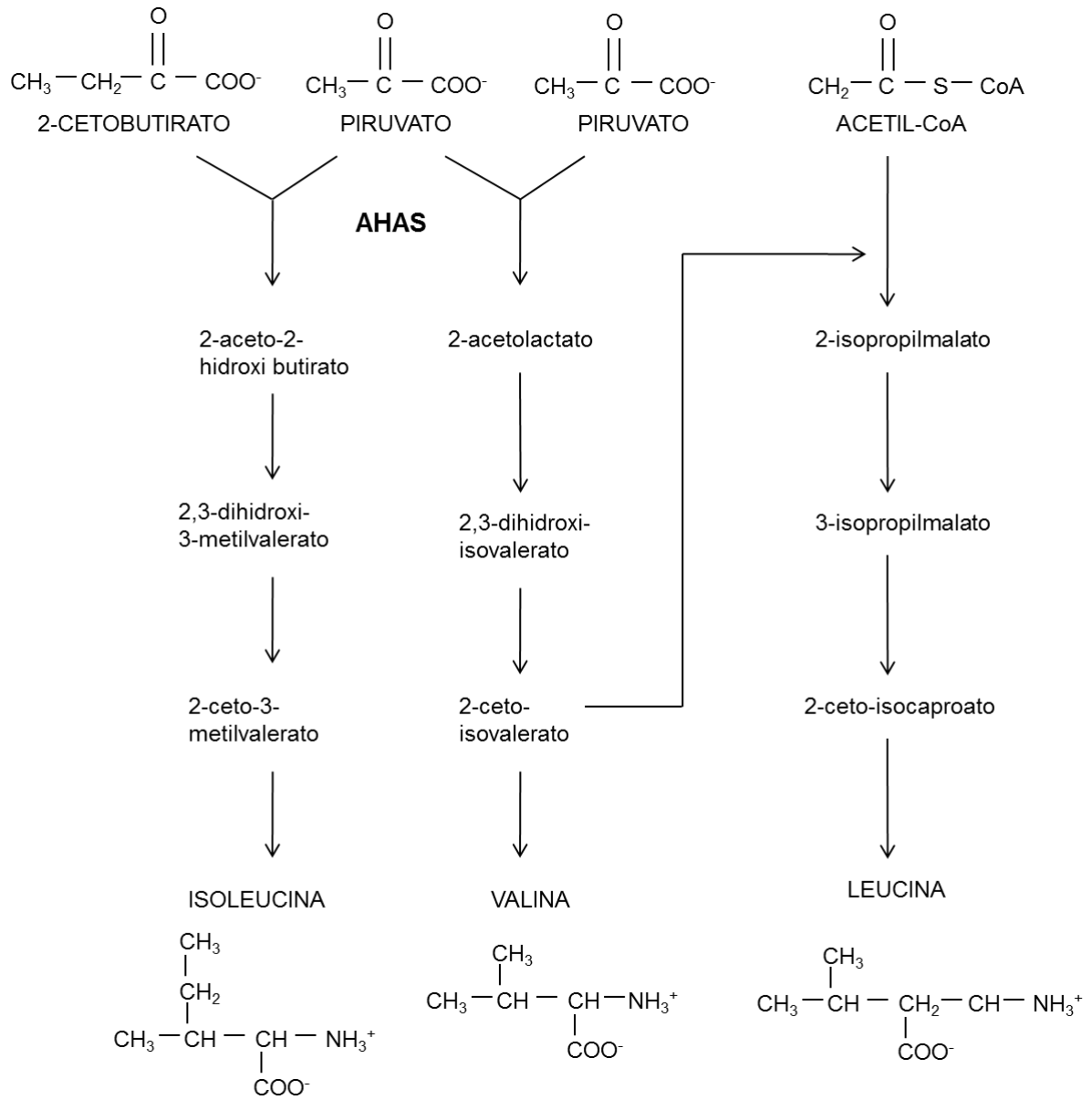
i) descarboxilación de una molécula de piruvato y su posterior condensación con otra molécula de piruvato para originar dióxido de carbono y 2-acetolactato (motivo por el cual inicialmente la enzima fue denominada acetolactato sintasa, ALS) y

ii) descarboxilación de una molécula de piruvato, condensación de la misma con una molécula de 2-cetobutirato y liberación de dióxido de carbono y de 2-aceto-2-hidroxitbutirato.

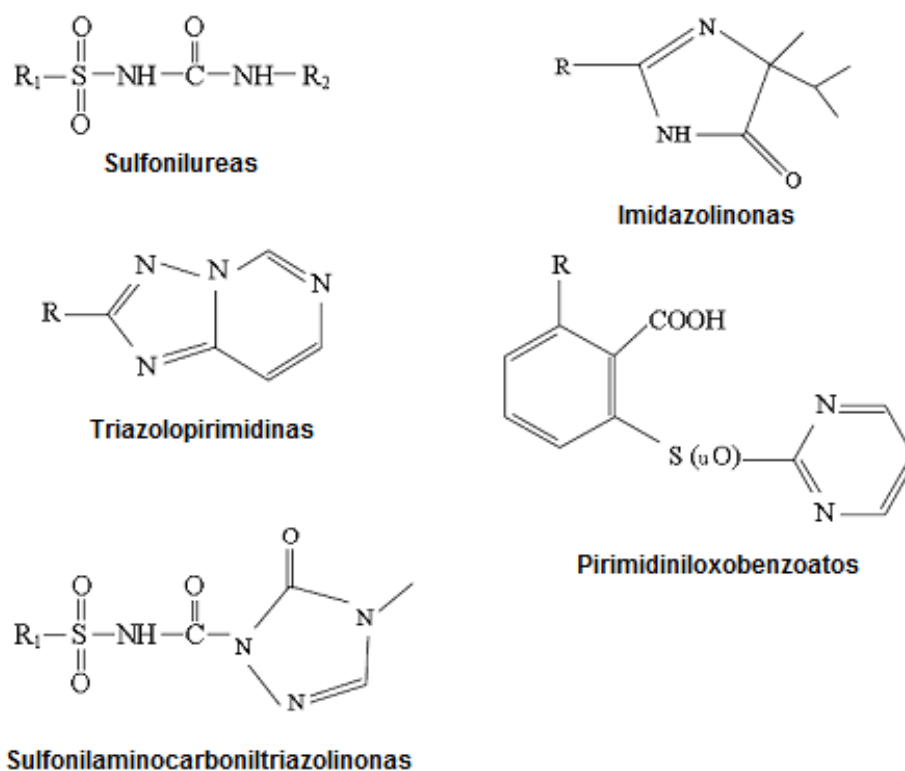
De la primera reacción antes citada se bifurcan dos vías de síntesis de los aminoácidos valina y leucina y la segunda reacción forma parte de la vía de síntesis del aminoácido isoleucina (Chipman et al., 1998; Duggleby et al., 2008) (Figura 1).

La enzima AHAS es una flavoproteína conformada por al menos dos subunidades catalíticas y dos subunidades regulatorias. Para su eficiente actividad catalítica requiere de los cofactores tiamín difosfato (TPP), flavina adenina dinucleótido (FAD) y un catión divalente, generalmente magnesio ( $Mg^{2+}$ ). Su mecanismo de regulación más importante se basa en una inhibición por producto: en plantas superiores, cualquiera de los tres aminoácidos ramificados puede unirse a una de las subunidades regulatorias e inhibir la actividad enzimática por un cambio conformacional (Duggleby et al., 2008). La actividad AHAS se desarrolla en el cloroplasto de los vegetales y si bien la biosíntesis de aminoácidos ramificados se lleva a cabo en toda la planta, ocurre una mayor expresión de AHAS en los tejidos más jóvenes y en tejidos meristemáticos (Singh y Shaner, 1995; Lancien et al., 2007). Cabe mencionar que esta enzima se encuentra en bajas cantidades por célula (Durner et al., 1991).

La inhibición de la actividad AHAS es una estrategia eficiente para la eliminación de malezas en los campos cultivados así como para el desarrollo de antifúngicos y antimicrobianos (McCourt y Duggleby, 2006). Actualmente existen en el mercado cinco familias de herbicidas químicamente no relacionadas cuya actividad biológica está directamente relacionada con la enzima AHAS: imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas, pirimidiniloxobenzoatos y sulfonilaminocarboniltriaolinonas (McCourt y Duggleby, 2006; Duggleby et al., 2008) (Figura 2). La aplicación de isoleucina, leucina y valina exógenos revierte los efectos de estos herbicidas lo que indica que la enzima AHAS es el único blanco de estos compuestos (Ray, 1984). Este hecho fue recientemente corroborado a través de estudios de transcriptómica (Manabe et al., 2007).



**Figura 1.** Vías de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada en plantas superiores. La enzima AHAS participa en las dos primeras reacciones paralelas. Adaptado de Duggleby y Pang (2000).



**Figura 2.** Estructuras moleculares básicas de las cinco familias químicas correspondientes al grupo de herbicidas inhibidores de AHAS. R, R1 y R2 son grupos químicos adicionales a la estructura básica. Tomado de Tan et al. (2006) y Zhou et al. (2007).

Los herbicidas de la familia de las imidazolinonas (IMI) fueron desarrollados al inicio de los años '80 y, junto con las sulfonilureas, fueron los primeros inhibidores de AHAS en salir al mercado (McCourt y Duggleby, 2006). Poseen un anillo imidazol que está involucrado en la fuerte unión del herbicida a su blanco y un segundo anillo que varía según el tipo de IMI y que puede ser un anillo quinolina, benceno ó un anillo piridino. Las diferencias en los niveles de inhibición de AHAS de las distintas IMI sugieren que esta segunda estructura cíclica también participa en la inhibición de la enzima. Por otra parte, se observó una leve diferencia en los niveles de inhibición de AHAS entre aquellas imidazolinonas que poseían como segundo anillo un grupo piridino pero los diferentes grupos funcionales en la posición cinco del anillo piridino mostraron estar relacionados con ciertas características de las imidazolinonas como por ejemplo con metabolismos detoxificadores diferenciales en las plantas (Tan et al., 2005).

Los herbicidas inhibidores de AHAS son ampliamente utilizados en la actualidad y son los principales componentes de los programas de manejo de malezas en muchos cultivos. Permiten el control de un amplio espectro de malezas, son efectivos a bajas dosis de aplicación dada su alta potencia biológica (se suelen utilizar en dosis de gramos por hectárea para alcanzar los efectos de otras familias de herbicidas que son utilizadas en rangos de kilogramos por hectárea) (Zhou et al., 2007), son selectivos para una gran variedad de cultivos y presentan un perfil ambiental favorable. Además se catalogan como herbicidas seguros y efectivos, con baja toxicidad en mamíferos debido a la ausencia del blanco AHAS en el reino animal (Tan et al., 2005).

La resistencia a herbicidas se refiere a la capacidad heredable de una planta para sobrevivir y reproducirse luego de la exposición a una concentración de herbicida normalmente letal para los individuos de esa especie. En una planta la resistencia puede ocurrir naturalmente o ser inducida mediante técnicas de ingeniería genética, selección de variantes somaclonales o mutagénesis. La tolerancia a herbicidas, en cambio, se define como la capacidad intrínseca de una especie para sobrevivir y reproducirse luego del tratamiento con herbicida sin necesidad de una selección o manipulación genética previa (WSSA, 1998).

El uso continuo de herbicidas inhibidores de AHAS y la falta de alternancia con otros herbicidas de distinto modo y sitio de acción ha ocasionado que, al presente, las malezas resistentes a estos herbicidas representen un importante grupo con 252 especies informadas (Baucom, 2016; Heap, 2017). La base para la resistencia surge de:

i) Disminución en los niveles de absorción y/o translocación del herbicida en la planta (Shaner y Singh, 1997).

ii) Aumento en el metabolismo detoxificador de la planta que puede involucrar fenómenos como dealquilación, hidroxilación o conjugación de grupos sobre el herbicida, inactivándolo y/o logrando la compartimentalización del compuesto en pocas horas (hs) luego de la aplicación (Shaner y Singh, 1997).

iii) Modificación del sitio de unión del herbicida en la enzima debido a una mutación puntual en el gen *ahas* (Pang et al., 2004). La frecuencia de alelos *ahas* resistentes a herbicida en la naturaleza es alta (Yuan et al., 2007). En la actualidad, se identificaron 17 aminoácidos en *Arabidopsis thaliana* que al ser modificados desencadenan resistencia específica ó que derivan en una resistencia cruzada a dos ó más de estas familias de herbicidas (Duggleby et al., 2008). Varias mutaciones diferentes del gen *ahas* han podido ser identificadas en diferentes cultivos resistentes incluyendo maíz, caña de azúcar, canola, soja, tabaco, trigo y algodón (Thyssen et al., 2014).

Según informes de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) la producción de alimento debe aumentar entre un 70 a 100 % para el 2050 para lograr paliar el potencial crecimiento de la población y los cambios en la dieta<sup>a</sup>. Esto se ve exacerbado por los continuos cambios climáticos, la competencia entre cultivos y malezas por tierra y agua y las continuas disminuciones en los rendimientos actuales. Para combatir estos desafíos deben desarrollarse cultivos que combinen altos rendimientos con resistencias a estreses bióticos y abióticos. Uno de los potenciales cultivos para lograr esta meta es el girasol.

El cultivo de girasol (*Helianthus annuus* L.) es de gran importancia económica a nivel mundial, ocupando el puesto 12 en el ranking de áreas cultivadas<sup>b</sup> y alcanzando una producción anual promedio de aproximadamente 47 millones de toneladas (*National Sunflower Association*, 2016/2017). En Argentina, uno de los principales productores de girasol a nivel mundial, se siembra girasol en diversas áreas abarcando diferentes ambientes edafoclimáticos. Hoy en día nuestro país cuenta con una superficie cultivada de 1.450.000 hectáreas y una producción anual que alcanza las 3,5 millones de toneladas<sup>c</sup>. El girasol cultivado es una especie con capacidad de adaptación a ambientes extremos y posibilidad de hibridación con especies silvestres emparentadas cuyos alelos de interés agronómico pueden utilizarse en planes de mejoramiento. Además de ser un cultivo sumamente importante para el desarrollo de alimentos en países emergentes y fuente de aceites vegetales beneficiosos para la salud, el girasol se convirtió en uno de los modelos para estudios ecológicos y evolutivos más importantes en la actualidad (Rieseberg, 2016).

En los últimos años se han destinado grandes esfuerzos al desarrollo de cultivares de girasol resistentes a herbicidas y en particular, la resistencia a imidazolinonas ha sido un área de investigación activa. En 1996 fue identificada una población de girasol maleza resistente a imidazolinonas (ANN-PUR) en Kansas, Estados Unidos, en un campo cultivado con soja y tratado con el herbicida imazetapir durante siete años consecutivos (Al-Khatib et al., 1998; Bruniard y Miller, 2001). Esta fuente de resistencia denominada Imisun pudo ser incorporada al girasol cultivado mediante cruzamientos convencionales (Miller y Al-Khatib, 2002) y en la actualidad existen líneas públicas americanas liberadas por el USDA-ARS (*United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service*) resistentes a los herbicidas

---

<sup>a</sup> [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)

<sup>b</sup> <http://faostat3.fao.org/home/E>

<sup>c</sup> <https://www.sunflowernsa.com/stats/world-supply/>

imazamox e imazetapir y disponibles para su uso en la obtención de híbridos, líneas parentales, o germoplasma resistente. Varias compañías semilleras introdujeron la resistencia a imidazolinonas en sus propias líneas de girasol y distintas variedades fueron comercializadas por primera vez en Estados Unidos, Argentina y Turquía en el 2003 bajo el nombre comercial de Girasol Clearfield® (Tan et al., 2005). Estas variedades resistentes permiten minimizar los potenciales daños ofreciendo una opción eficaz de tratamiento de malezas, a la vez que aumentan la flexibilidad en la rotación de cultivos (Bruniard, 2001; Sala et al., 2012). El éxito comercial de los cultivos Clearfield® se debe al hecho de que no están sujetos a las regulaciones aplicadas a organismos genéticamente modificados (OGM) en la mayoría de los países (Tan et al., 2005).

Bruniard y Miller (2001) demostraron a través de una aproximación de la genética clásica que el modelo de la herencia de la resistencia a imidazolinonas en girasol involucra tres clases fenotípicas distintas en las poblaciones  $F_2$ : fenotipo resistente (R), intermedio (I) y susceptible (S) en proporciones 3:9:4, respectivamente (Tabla 1). A su vez, en el cruzamiento prueba fueron identificadas cuatro clases fenotípicas: intermedio plus (I+), intermedio menos (I-), susceptible plus (S+) y susceptible menos (S-). Esto permitió establecer que la resistencia a imidazolinonas en girasol está controlada por dos loci de codificación nuclear: un locus principal con acción semidominante (*Imr1*) y un segundo locus (*Imr2*) de efecto modificador sobre el primero. En la siguiente tabla se detallan las clases genotípicas y fenotípicas y su correspondiente proporción observadas en la generación  $F_2$  obtenida a partir del cruzamiento entre una línea resistente (*Imr1, Imr1, Imr2, Imr2*) y una línea susceptible (*imr1, imr1, imr2, imr2*):

**Tabla 1.** Clases y proporciones genotípicas y fenotípicas en las poblaciones  $F_2$  derivadas del cruzamiento entre líneas parentales resistente y susceptible a imidazolinonas, respectivamente. Adaptado de Bruniard y Miller (2001).

Genotipo (proporción)	Fenotipo (proporción)
<i>Imr1, Imr1, Imr2, Imr2</i> (1) <i>Imr1, Imr1, Imr2, imr2</i> (2)	Resistente (3)
<i>Imr1, imr1, Imr2, Imr2</i> (2) <i>Imr1, imr1, Imr2, imr2</i> (4) <i>Imr1, Imr1, imr2, imr2</i> (1) <i>Imr1, imr1, imr2, imr2</i> (2)	Intermedio (9)
<i>imr1, imr1, Imr2, Imr2</i> (1) <i>imr1, imr1, Imr2, imr2</i> (2) <i>imr1, imr1, imr2, imr2</i> (1)	Susceptible (4)

El máximo nivel de resistencia se observa únicamente cuando *Imr1* se encuentra en estado homocigota y cuando está presente al menos un alelo *Imr2*. Estudios posteriores de Kolkman et al. (2004) permitieron identificar, clonar y secuenciar tres genes parálogos de la subunidad catalítica de AHAS (AHAS1, AHAS2 Y AHAS3) a partir de biotipos de girasol resistentes y susceptibles a imazetapir y demostraron que el gen *Imr1* se corresponde con una mutación en el codón 205 (numeración correspondiente a la secuencia de aminoácidos de *A. thaliana*) en el gen de AHAS1 que provoca la sustitución de alanina (GCG) por valina (GTG). El residuo Ala205 hace contacto hidrofóbico con el herbicida, el cual se une al canal de acceso al sustrato y bloquea la entrada al sitio activo del sustrato de la enzima (Pang et al., 2003). La mutación Ala205Val de AHAS1 cosegrega con la resistencia a IMI en girasol y confiere niveles de resistencia moderada a IMI (Bruniard y Miller, 2001; Kolkman et al., 2004).

En la actualidad se desconoce el mecanismo de resistencia que está relacionado con el segundo locus *Imr2*. Estudios de Al-Khatib et al. (1998) señalaron que los niveles de absorción y translocación de imazetapir marcado con  $^{14}\text{C}$  es similar entre biotipos resistentes y susceptibles de girasol, resultados consistentes con informes previos que muestran que dichos procesos no son responsables de la resistencia a inhibidores de AHAS en malezas (Saari et al., 1990). Se postula que *Imr2* podría corresponderse con determinantes génicos adicionales involucrados en el metabolismo del herbicida.

Investigaciones realizadas durante las últimas décadas han revelado que las plantas superiores presentan un sistema amplio y versátil de enzimas que metabolizan herbicidas y otros xenobióticos a productos no-fitotóxicos (Kreuz et al., 1996). Este sistema les confiere una resistencia que se clasifica como no relacionada al sitio de acción específico del xenobiótico (mecanismos NTSR, *non-target site resistance*). A diferencia de la resistencia relacionada al sitio de acción (mecanismos TSR, *target site resistance*) de herencia monogénica, que involucra mutaciones puntuales en los genes que codifican para las enzimas blanco y cuyos mecanismos moleculares son relativamente simples de estudiar, los mecanismos NTSR son en general de herencia poligénica y pueden incluir procesos de oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación, entre otras (Yuan et al., 2007). La vía de metabolismo depende de la naturaleza química del xenobiótico, del organismo y de las condiciones ambientales y generalmente ocasiona resistencia cruzada a múltiples herbicidas (Van Eerd et al., 2003) con lo cual su estudio constituye un verdadero desafío.

Millones de toneladas de herbicidas se aplican anualmente en el mundo. Sin embargo se estima que menos del 5 % de estos productos alcanzan sus enzimas blanco mientras que el resto se deposita en suelo y se mueve hacia la atmósfera y el agua (Van Eerd et al., 2003).

Una comprensión exhaustiva de los mecanismos de metabolismo de pesticidas en plantas es necesario para el desarrollo de nuevos herbicidas, para su uso eficiente y seguro, así como para desarrollar estrategias de biorremediación de suelos y aguas contaminadas.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS GENERAL**

Existen genes asociados a la presencia del locus *Imr2* que están involucrados en la eficiencia de metabolismo y detoxificación del herbicida imazetapir en la fuente de resistencia Imisun de la especie girasol.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar y caracterizar mecanismos de resistencia al herbicida imazetapir en la fuente de resistencia Imisun de la especie girasol.

# **CAPÍTULO 1**

**ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE CITOCROMOS P450 SOBRE LA  
RESISTENCIA A IMIDAZOLINONAS EN GIRASOL**

## INTRODUCCIÓN

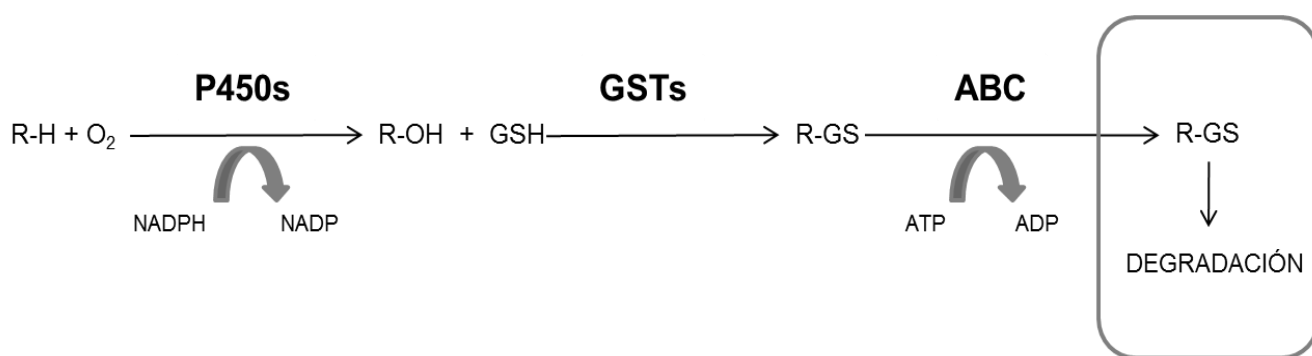
Los mecanismos de resistencia a herbicida pueden clasificarse en dos grandes grupos: i) con modificación en el sitio de acción (TSR, *target-site resistance*) y ii) sin modificación en el sitio de acción (NTSR, *non-target-site resistance*). En el primer caso, el herbicida alcanza su sitio de acción en una dosis letal pero el organismo en cuestión sobrevive. Estos mecanismos pueden estar dados por mutaciones en el gen que codifica para la proteína blanco del herbicida o por una sobreexpresión de la misma (amplificación génica o cambio en el promotor del gen) (Devine y Shukla, 2000; Powles y Yu, 2010). El segundo grupo involucra mecanismos que minimizan la cantidad de herbicida activo que alcanza el sitio de acción, como pueden ser modificaciones en la absorción, transporte y metabolismo del herbicida (De Prado y Franco, 2004; Powles y Yu, 2010).

En la mayoría de los casos reportados, la resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS se debe a mutaciones puntuales en el gen *ahas* que resulta en una enzima menos sensible (Tranel y Wright, 2002). Se han informado más de 100 combinaciones únicas de malezas y mutaciones en el gen *ahas* que confieren resistencia (Heap, 2017). Otra forma mediante la cual las plantas sortean la inhibición de AHAS es un aumento en el metabolismo que detoxifica rápidamente el herbicida y este proceso es el que generalmente permite a los cultivos ser resistentes a estos inhibidores. Comparado con los mecanismos TSR, la resistencia metabólica a inhibidores de AHAS ha sido reportada para muy pocas especies que incluyen *Lolium rigidum*, *Alopecurus myosuroides*, *Bromus rigidum*, *Avena fatua*, *Echinochloa phyllopogon* y *Sinapis arvensis* (Yu y Powles, 2014b). Los niveles de resistencia mediada por metabolismo del herbicida generalmente son bajos, en el rango de 10X de supervivencia comparado con el genotipo susceptible, mientras que los niveles de resistencia TSR a inhibidores AHAS son generalmente de 100X o más (Tranel y Wright, 2002; Yu y Powles, 2014b; Guo et al., 2015).

La detoxificación que provoca la neutralización del herbicida es en efecto el aspecto más estudiado de los mecanismos NTSR (Délye, 2012; Duhoux et al., 2015). En la actualidad se han caracterizado las principales familias de enzimas metabolizadoras de herbicidas para varias especies aunque hasta el momento sólo algunos genes fueron identificados (Kreuz et al., 1996; Van Eerd et al., 2003; Yuan et al., 2007; Délye, 2012).

Las plantas superiores están equipadas de un sistema amplio y versátil de enzimas que las protegen de la acción fitotóxica de los herbicidas y otros xenobióticos (Van Eerd et al.,

2003; Sandermann, 2004; Kvesitadze et al., 2006). El proceso de detoxificación llevado a cabo por las plantas consta generalmente de un esquema de cuatro fases (Figura 1.1). En la primera fase o Fase I las moléculas del xenobiótico son activadas a través de procesos de oxidación, reducción o hidrólisis para generar un compuesto más soluble y menos tóxico. La reacción más común de esta primera fase es una oxidación y generalmente es llevada a cabo por enzimas citocromos P450 monooxigenasas (Werck-Reichhart et al., 2000; Yun et al., 2001).



**Figura 1.1.** Fases del metabolismo de xenobióticos en plantas superiores. Se indican las principales familias de enzimas asociadas a la detoxificación de herbicidas y las etapas en las que participan. La segunda etapa puede involucrar la conjugación de un azúcar al herbicida mediante enzimas del tipo glicosiltransferasas. P450s: citocromo P450 monooxigenasas; GSH: glutatión; GSTs: glutatión S-transferasas; ABC: transportadores ABC. Adaptados de Yuan et al. (2007) y Délye (2012).

Los citocromos P450 monooxigenasas (P450s) son hemoproteínas presentes en animales, plantas, bacterias y hongos, codificadas por una superfamilia de genes designados CYP. La simbología CYP se completa con un número para las distintas familias (más de 40 % de identidad en la secuencia de aminoácidos), una letra para las subfamilias (más de 55 %

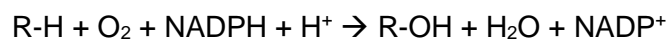
de identidad) y finalmente un número para el gen en cuestión (ejemplo CYP4U2) (Feyereisen, 1999; Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

En plantas superiores, los P450s conforman una de las superfamilias de proteínas enzimáticas más grande y probablemente la mayoría de las especies vegetales codifican varios centenares de estas enzimas: al menos 246 genes de P450s fueron identificados en el genoma de *A. thaliana* (Kreuz et al., 1996; Werck-Reichhart et al., 2000; Didierjean et al., 2002). Se cree que esta gran evolución de la familia de P450s ocurrió vía duplicación y conversión génica, como resultado de la necesidad de plantas sésiles de adaptarse a ambientes hostiles y de protegerse de patógenos y predadores (Coleman et al., 1997).

Los mecanismos de regulación y expresión de P450s no han sido caracterizados en profundidad debido a la baja concentración celular de estas proteínas. En condiciones normales se presentan constitutivamente en el organismo y su expresión se ve incrementada frente a la exposición a estrés fisiológico o químico (Van Eerd et al., 2003).

No hay una distribución específica de los P450s ya que como sus funciones son tan diversas pueden desarrollarse en todo tipo de tejidos y etapas del desarrollo del organismo. Sus funciones biológicas incluyen desde la síntesis de macromoléculas estructurales como lignina, cutina ó suberina hasta la síntesis y el catabolismo de todo tipo de hormonas, la síntesis de pigmentos y de compuestos de defensa y el metabolismo de xenobióticos (Werck-Reichhart et al., 2000). También son los encargados de producir un gran número de metabolitos secundarios incluyendo reguladores de crecimiento, isoprenoides y alcaloides (Van Eerd et al., 2003).

Los P450s catalizan reacciones extremadamente diversas sobre una gran variedad de sustratos pero en general estas se basan en una monooxigenación, con la formación de una molécula de agua y un producto oxigenado de acuerdo a la siguiente ecuación:



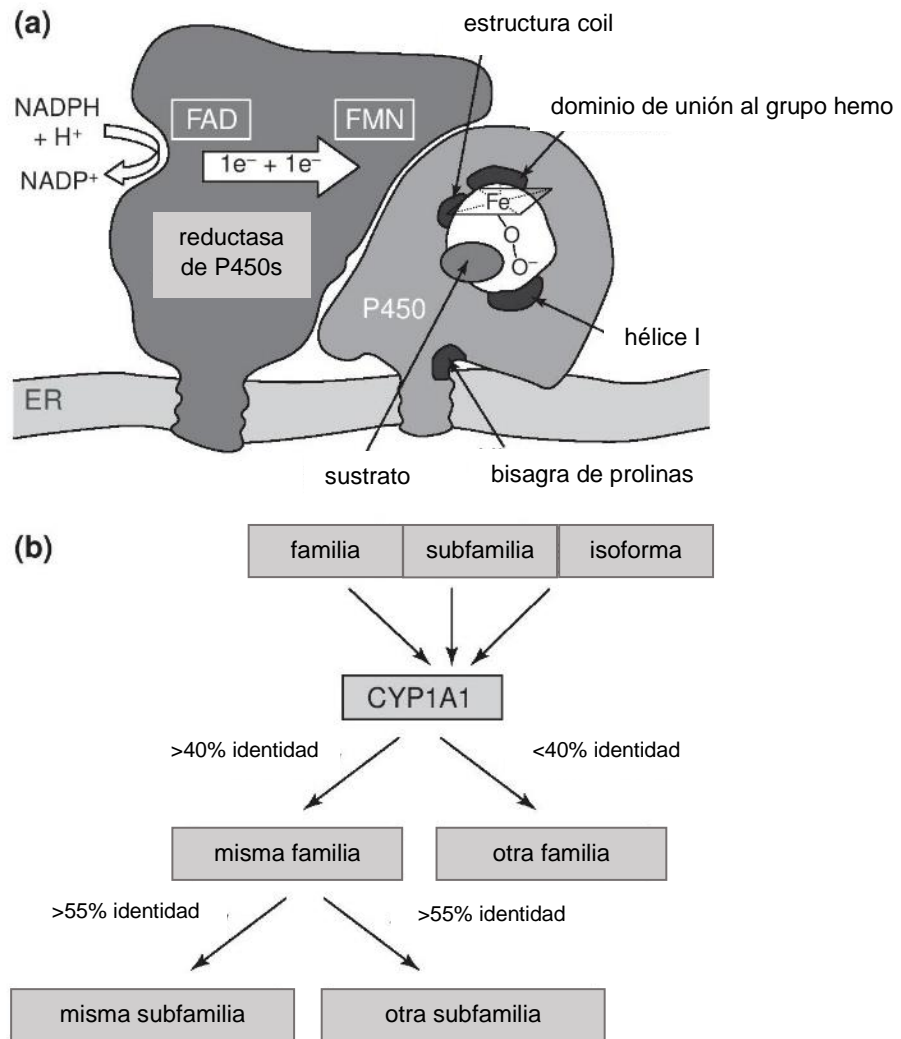
De esta manera se clasifican como monooxigenasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Saari et al., 1994) y pueden dividirse en cuatro clases dependiendo de cómo llegan los electrones del NADPH al sitio catalítico. Los de clase I requieren tanto una reductasa que contiene flavina adenina dinucleótido (FAD) y una redoxina hierro-azufre. Los de clase II requieren únicamente una reductasa que contiene FAD y flavina mononucleótido (FMN). Los de clase III son enzimas que no requieren una fuente dadora de

electrones mientras que los de clase IV reciben electrones directamente del NADPH (Werck-Reichhart et al., 2000). La mayoría de los P450s caracterizados corresponden a la clase II. Los electrones del NADPH son transferidos uno a uno al P450 vía flavoproteínas FAD y FMN que actúan como reductasas. Tanto los P450s como sus reductasas están unidas vía extremo N-terminal a la superficie del retículo endoplasmático.

Los P450s tienen masas moleculares que van de 45 a 62 kDa y en general tienen una identidad aminoacídica menor al 20 %. Sin embargo, existe una alta conservación de su topografía general, su estructura tridimensional y algunos residuos linderos al grupo hemo: el motivo Phe-x-x-Gly-x-Arg-x-Cys-x-Gly cerca del extremo C-terminal es la secuencia más conservada entre los P450s y contiene la cisteína que sirve como ligando para el ion hierro; el motivo Ala/Gly-Gly-x-Asp-/Glu-Thr-Thr/Ser localizado 150 residuos arriba del C-terminal corresponde a la zona de unión del oxígeno en la hélice I. Estas secuencias conservadas y su ubicación se consideran particularidades específicas de los P450s (Werck-Reichhart et al., 2000; Van Eerd et al., 2003) (Figura 1.2).

La participación de citocromos P450 en el metabolismo de las principales clases de herbicidas y la resistencia mediada por esta vía fue demostrada en numerosos trabajos para otras especies vegetales en su mayoría especies maleza (Didierjean et al., 2002; Siminszky, 2006). Dichos eventos involucran hidroxilación, O- dealquilación, N- dealquilación y/o de-esterificación de la molécula del inhibidor (Saari et al., 1994). Según la clase de P450, estos pueden poseer selectividad para sus sustratos ó pueden presentar redundancia y derivar en una resistencia a múltiples clases de herbicidas químicamente no relacionadas entre sí (Robineau et al., 1998).

Los mecanismos por los cuales las plantas adquieren metabolismos incrementados mediados por P450s que provocan un aumento en la resistencia a herbicidas no están aún determinados pero podrían involucrar una regulación alterada de una vía de respuesta al estrés en la cual uno ó más P450s son inducidos. Así sucede para los insectos donde una sobreexpresión constitutiva de P450s es el único mecanismo de resistencia a insecticidas hasta ahora descrito (Feyereisen, 1999). Otras posibles causas de metabolismos incrementados mediados por P450s podrían ser mutaciones puntuales y/o duplicación de genes P450s, como se observó en humanos para P450s metabolizadores de importantes drogas clínicas (Lundqvist et al., 1999). A su vez, un análisis de la organización genómica de *A. thaliana* y de arroz revela que una gran proporción de las isoformas de P450s proviene de eventos de duplicación génica (Siminszky, 2006).



**Figura 1.2.** Estructura y nomenclatura de P450s de plantas superiores. (a) P450s y reductasa de P450s ancladas al retículo endoplasmático (ER) vía extremo N-terminal. Los dominios altamente conservados en la mayoría de los P450s se muestran en negro. Adaptado de Werck-Reichhart et al. (2000).

Una forma de evaluar la participación de P450s en la detoxificación de herbicidas es identificar y cuantificar los residuos derivados del metabolismo del xenobiótico en cuestión formados *in vivo*: productos aril- o alquil-hidroxiados, y N-, S- u O-dealquilados y sus conjugados glucosídicos. Por ejemplo, se llevaron a cabo estudios en sorgo resistente a inhibidores de AHAS con herbicidas marcados con  $^{14}\text{C}$  y el análisis de sus residuos derivados

permitió determinar que el metabolismo es un mecanismo que podría explicar la resistencia (Abit y Al-Khatib, 2013). Otra forma de estudiar la contribución de P450s es su expresión heteróloga. La detoxificación de inhibidores de AHAS mediada por P450s ha sido ampliamente estudiada en *A. thaliana* mediante la expresión heteróloga de genes de origen animal o bien mediante transformación con genes caracterizados previamente en otras especies vegetales (Werck-Reichhart et al., 2000; Didierjean et al., 2002; Inui y Ohkawa, 2005). Algunos genes de P450s han sido utilizados para generar cultivos resistentes a herbicidas, entre ellos la sobreexpresión del gen de levadura CYP51A1 en tabaco provocó resistencia a herbicidas de la familia de los triazoles (Graseum et al., 1995). Está demostrado que un único gen de P450 en plantas transgénicas puede conferir resistencia a más de 13 herbicidas diferentes (Schuler y Werck-Reichhart, 2003; Hirose et al., 2005). La mayor parte de los estudios en especies cultivadas se han llevado a cabo en monocotiledóneas mientras que la información disponible en especies dicotiledóneas es escasa (Siminszky, 2006; Minton et al., 2008; Powles y Yu, 2010; Riechers et al., 2010). Un gen citocromo P450 de arroz, CYP81A6, fue clonado y mostró resistencia a sulfonilureas (Pan et al., 2006) y en el género *Helianthus* existen algunos antecedentes: en *Helianthus tuberosus* se ha identificado una isoforma de P450 (gen CYP76B1) con la que se ha transformado tabaco y *A. thaliana* logrando incrementar la capacidad de metabolizar sulfonilureas (Robineau et al., 1998; Didierjean et al., 2002) mientras que en girasol cultivado se ha identificado una línea con resistencia natural a múltiples herbicidas mediada por isoformas de P450s revertidas por malatión (Kaspar et al., 2011). Por otro lado, se ha patentado una fuente alternativa de resistencia a imidazolinonas mediada por citocromo P450s obtenida a partir de un programa de mutagénesis y selección (León, et al., 2012). Sin embargo, clonar genes de P450s presenta importantes limitaciones debido a que los recursos genéticos de muchas de estas especies de interés son limitados y la familia de citocromos P450 contiene cientos de miles de genes potencialmente relacionados a la resistencia (Délye, 2012). El genoma del algodón *Gossypium raimondii* contiene 347 genes de P450s anotados y cualquier base de datos de proteínas P450 vegetales y animales puede tener alrededor de 11 mil anotaciones (Thyssen et al., 2014).

De esta manera, la aproximación más eficiente para evaluar la participación de P450s en la resistencia a herbicidas puede obtenerse *in vivo* utilizando inductores (etanol, fenobarbital, aminopirina, ácido clofíbrico, etc) o inhibidores de P450s (Werck-Reichhart et al., 2000). Los principales inhibidores utilizados para caracterizar la resistencia mediada por P450s *in vivo* son compuestos químicos como el 1-aminobenzotriazol (ABT) y el piperonil butóxido (PBO), reguladores de crecimiento como tetcyclasis e insecticidas organofosforados como malatión y terbufos (Preston et al., 1996; Fischer et al., 2000; Werck-Reichhart et al.,

2000; Letouzé y Gasquez, 2003; Beckie et al., 2012; Pan et al., 2012). Estos compuestos son selectivos para determinadas isoformas de P450s con lo cual permiten diferenciar el subgrupo particular de esta gran familia de enzimas monooxigenasas involucrada en la resistencia.

Además de sus funciones generales y conservadas en todas las especies, la mayoría de P450s están involucrados en el metabolismo secundario que difiere de planta a planta al igual que el número y la especificidad de sus sustratos. Esta es la razón principal de su selectividad a herbicidas químicamente no relacionadas entre si (Werck-Reichhart et al., 2000) y de su potencialidad como herramientas versátiles para la remediación de suelos y aguas contaminados (Siminszky, 2006). Una caracterización profunda de la identidad y la regulación de genes de P450s posibilitaría la modificación del cultivo en estudio y el incremento de su resistencia a herbicidas (Van Eerd et al., 2003).

El locus *Imr1* de la fuente de resistencia Imisun se corresponde con la modificación en el sitio de acción del herbicida en la enzima AHAS. La mutación implicada no confiere resistencia completa a imidazolinonas y la presencia de *Imr2*, cuya identidad es aún desconocida, es necesaria para alcanzar el máximo nivel de resistencia en este modelo genético. En el presente capítulo se abordará el estudio de patrones de inhibición de citocromos P450 para elucidar la participación de isoformas involucradas en el metabolismo de imazetapir en el cultivo girasol.

## **HIPÓTESIS ESPECÍFICA**

En la fuente de resistencia Imisun existe un mecanismo de detoxificación del herbicida imazetapir mediado por isoformas de P450s particularmente inhibidas por: a) piperonil butóxido (PBO) y b) 1-aminobenzotriazol (ABT).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Evaluar el efecto del inhibidor de citocromos P450 piperonil butóxido (PBO) sobre la resistencia al herbicida imazetapir en plantas completas de girasol.
- 2- Evaluar el efecto del inhibidor de citocromos P450 1-aminobenzotriazol (ABT) sobre la resistencia al herbicida imazetapir en plantas completas de girasol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A LOS INHIBIDORES PIPERONIL BUTÓXIDO (PBO) Y 1-AMINOBENZOTRIAZOL (ABT)

#### MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron dos líneas endocriadas desarrolladas por el USDA-ARS (*United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service*) Estados Unidos, cedidas gentilmente por los Drs. Jerry Miller y José María Bruniard. Estas líneas difieren entre sí a nivel del primer y segundo locus que determinan la resistencia a imidazolinonas para la fuente de Kansas. En la Tabla 1.1 se detallan genotipo y fenotipo de estos materiales utilizando la nomenclatura de Bruniard y Miller (2001):

**Tabla 1.1.** Líneas endocriadas casi isogénicas (NILs, *near isogenic lines*) HA 425 y HA 89. Se indica el genotipo para la resistencia a imidazolinonas y el fenotipo observado a campo según lo descrito por Bruniard y Miller (2001). La resistencia de la línea HA 425 proviene de la fuente de Kansas ANN-PUR desde un cruzamiento HA 89\*3 / ANN-PUR (Al-Khatib et al., 1998; Miller y Al-Khatib, 2002).

Material vegetal	Genotipo	Fenotipo
HA 425	<i>Imr1Imr1Imr2Imr2</i>	Resistente
HA 89	<i>imr1imr1imr2imr2</i>	Susceptible

#### HERBICIDA

Como inhibidor de AHAS se utilizó el herbicida de la familia de las imidazolinonas imazetapir cuyo ingrediente activo es el ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il nicotínico).

## **INHIBIDORES DE P450s**

Los inhibidores de citocromos P450 utilizados fueron piperonil butóxido (PBO) y 1-aminobenzotriazol (ABT). Se realizaron ensayos en plantas completas para el ajuste de sus concentraciones y se seleccionó la mayor concentración que no causó efectos fitotóxicos sobre la planta: PBO 50  $\mu\text{M}$  y ABT 70  $\mu\text{M}$  (Gil, 2011).

## **CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS**

Se obtuvieron plantas de los dos genotipos por germinación de las cipcelas en multimacetas utilizando perlita como soporte inerte. Los riegos se realizaron por capilaridad y se incubó en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo ( $25 \pm 2$  °C y 16/8 hs luz/oscuridad). Las plantas crecieron hasta el estadio V2 (dos hojas verdaderas) cumplidos 15 días de incubación.

## **TRATAMIENTOS**

Se realizaron dos ensayos independientes para distintas concentraciones de herbicida para el inhibidor PBO:

### **Ensayo 1:**

- i) control
- ii) imazetapir 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$
- iii) PBO 50  $\mu\text{M}$
- iv) PBO 50  $\mu\text{M}$  + imazetapir 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$

### **Ensayo 2:**

- i) control
- ii) imazetapir 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$
- iii) PBO 50  $\mu\text{M}$
- iv) PBO 50  $\mu\text{M}$  + imazetapir 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$

Para el inhibidor ABT los tratamientos fueron:

- i) control
- ii) imazetapir 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$
- iii) ABT 70  $\mu\text{M}$
- iv) ABT 70  $\mu\text{M}$  + imazetapir 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$

La solución control de riego consistió en una formulación nutritiva sobre la base salina MS (Murashige y Skoog, 1962) al 25 %. Para formular las soluciones del resto de los tratamientos se agregó herbicida y/o inhibidor según corresponda.

### **SECUENCIA DE RIEGOS**

Días 0 a 6: solución control MS para todos los tratamientos.

Día 7: solución control MS para tratamientos i y ii; solución de inhibidor para tratamientos iii y iv.

Días 8 a 15: riegos con las soluciones detalladas para cada tratamiento de ensayos 1 y 2.

Para todos aquellos tratamientos que contenían inhibidor (iii y iv) el riego del día siete con solución de inhibidor se realizó para propiciar la absorción del mismo sin interferencia de herbicida.

### **DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

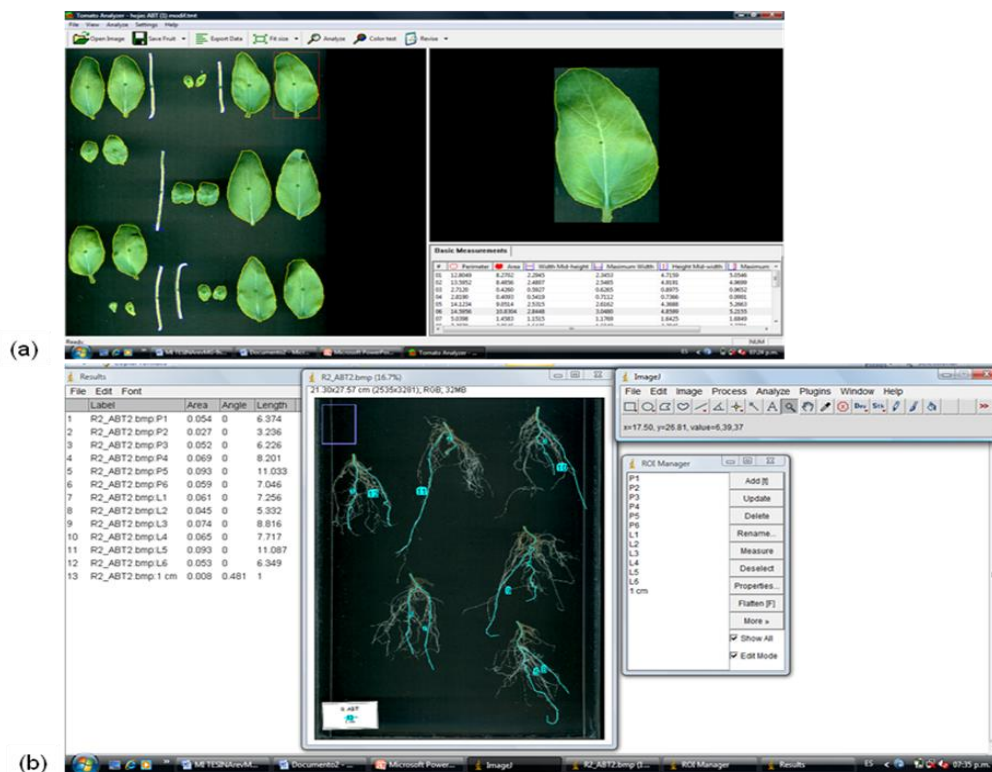
El diseño experimental fue en bloques completamente aleatorizados con tres repeticiones para cada combinación de genotipo y tratamiento. La unidad experimental consistió en diez plantas. Las variables a evaluar sobre plantas de 15 días fueron:

- área total foliar total (AFT)
- longitud de raíz principal (LP)
- longitud de la raíz lateral más larga (LL)
- longitud de hipocótilo (LH)
- índice de coloración de las hojas (*hue*)

Las plantas fueron disectadas en parte aérea (hojas e hipocótilos) y radical y se generaron imágenes digitales utilizando un escáner de mesa a una resolución de 300 dpi.

Estas imágenes fueron procesadas mediante los programas *Tomato Analyzer* (Rodríguez et al., 2010) para efectuar las mediciones de las variables AFT, LH y *hue* (Figura 1.3 a) e *Image J* en el caso de las variables LP y LL (Figura 1.3 b).

El índice de coloración de las hojas *hue* corresponde a un parámetro de nivel de clorosis cuantificado mediante el análisis *Tomato Analyzer Color Test* (TACT) de la herramienta bioinformática *Tomato Analyzer*®. Un índice de coloración de las hojas *hue* de 90° corresponde al color amarillo mientras que 180° representa el color verde azulado.



**Figura 1.3.** Imágenes procesadas y medición de las variables: (a) AFT, LH y *hue* mediante el programa *Tomato Analyzer*; (b) LP y LL con el programa *Image J*. AFT, área foliar total; *hue*, índice de coloración de las hojas; LH, longitud de hipocótilo; LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga.

El número total de plantas escaneadas para cada uno de los tres ensayos fue de 480 plantas.

Los datos se expresaron como promedio de las diez plantas. Para cada ensayo se efectuaron pruebas de normalidad y homogeneidad de variancia y se realizaron análisis de la variancia (ANOVA) por genotipo. El modelo de ANOVA es el siguiente:

$$y_{kij} = \mu + \beta_k + \tau_i + \gamma_j + (\tau\gamma)_{ij} + \varepsilon_{kij}$$

donde:

$y_{kij}$ : valor observado para la variable  $y$  en la  $i$ -ésima concentración de herbicida imazetapir, en la  $j$ -ésima concentración de inhibidor de P450s, en la  $k$ -ésima repetición

$\mu$ : media general

$\beta_k$ : efecto de  $k$ -ésimo bloque

$\tau_i$ : efecto de la  $i$ -ésima concentración de herbicida imazetapir

$\gamma_j$ : efecto de la  $j$ -ésima concentración de inhibidor de P450s

$(\tau\gamma)_{ij}$ : interacción entre el herbicida imazetapir y el inhibidor de P450s

$\varepsilon_{kij}$ : error experimental

variando:

$k$ : 1 –  $r$

$i$ : 1 –  $a$

$j$ : 1 –  $b$

Se consideraron efectos fijos de herbicida e inhibidor de citocromo P450s y la tabla de ANOVA es la siguiente:

Fuente de variación	g.l.	C.M.	E (C.M.)
Bloque	(r - 1)		
Herbicida IMI	(a - 1)	CM <sub>4</sub>	$\sigma^2 + rb\Sigma\tau_i^2 / (a-1)$
Inhibidor de P450s	(b - 1)	CM <sub>3</sub>	$\sigma^2 + ra\Sigma\gamma_j^2 / (b-1)$
IMI * inhibidor de P450s	(a - 1)(b - 1)	CM <sub>2</sub>	$\sigma^2 + r\Sigma\Sigma(\tau\gamma)_{ij}^2 / (a-1)(b-1)$
Error	(r - 1)(ab - 1)	CM <sub>1</sub>	$\sigma^2$
Total	(rab) - 1		

En todos los casos el cuadrado medio error (CM<sub>1</sub>) fue utilizado como denominador en las pruebas de F de significación de los cuadrados medios.

El efecto de los inhibidores de P450s se evaluó a través de contrastes ortogonales para cada concentración de herbicida en ambos genotipos. Como herramienta informática de análisis se utilizó el programa estadístico R (R Development Core Team, 2010).

Por otra parte se calculó un índice que determina el porcentaje de reducción en los valores de las variables de crecimiento estudiadas que puede ser atribuido al inhibidor de P450s (Beckie et al., 2012; Breccia et al., 2017). El mismo se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{ÍNDICE} = \frac{IMI - (IMI + \text{inhibidor})}{IMI} \times 100$$

donde:

IMI: valor que toma la variable para el tratamiento con herbicida.

IMI + inhibidor: valor que toma la variable para el tratamiento con herbicida e inhibidor.

## RESULTADOS

### EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL INHIBIDOR PIPERONIL BUTÓXIDO (PBO)

#### Ensayo 1: concentraciones de imazetapir 1, 10 y 100 $\mu\text{M}$

Los análisis de variancia de los datos obtenidos detectaron efecto significativo del tratamiento con imazetapir ( $p < 0,05$ ) en ambos genotipos para todas las variables excepto para la variable LP. No se encontró efecto significativo del inhibidor PBO para las variables LL, AFT, *hue* y LP. No se observó interacción significativa entre el efecto del inhibidor PBO y del imazetapir para ninguna de las variables en ambos genotipos ( $p > 0,05$ ) (Tablas 1.2, 1.3, y Tablas a.1 - a.10 de la sección Anexo).

La línea susceptible HA 89 se vio altamente afectada luego de la aplicación del herbicida imazetapir. El aspecto de las mismas una vez cumplidos los 15 días de incubación se muestra en la Figura 1.4.



**Figura 1.4.** Plántulas de 15 días del genotipo susceptible HA 89 bajo tratamiento (a) control e (b) IMI 10  $\mu\text{M}$ . Las plantas bajo tratamiento IMI 10  $\mu\text{M}$  mostraron una marcada disminución en el crecimiento de tejidos foliar y radicular y altos índices de clorosis y necrosis respecto del control.

**Tabla 1.2.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la línea HA 425 de genotipo resistente (R) considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Los valores de la variable área foliar total (AFT) fueron transformados con la función raíz cuadrada (sqrt). *hue*, índice de coloración de las hojas; LH, longitud de hipocótilo; LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga.

Genotipo R	<i>hue</i>	LH	AFT	LP	LL
PBO	ns	ns	ns	ns	ns
IMI	$p < 1e^{-8}$	$p < 0,001$	$p < 1e^{-7}$	ns	$p < 0,05$
PBO*IMI	ns	ns	ns	ns	ns

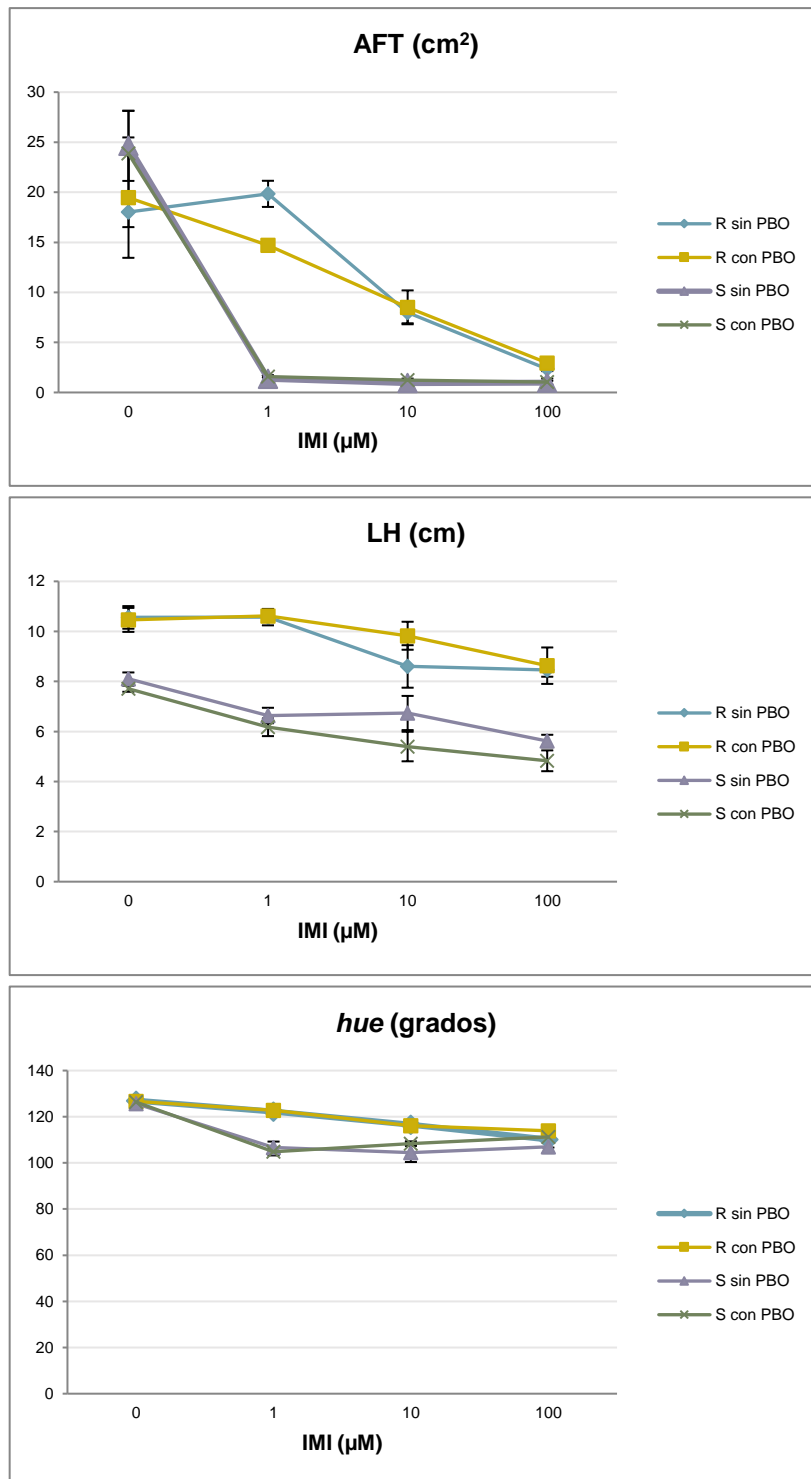
ns: no significativo ( $p > 0,05$ )

**Tabla 1.3.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la línea HA 89 de genotipo resistente (S) considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). *hue*, índice de coloración de las hojas; LH, longitud de hipocótilo; AFT, área foliar total; LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga.

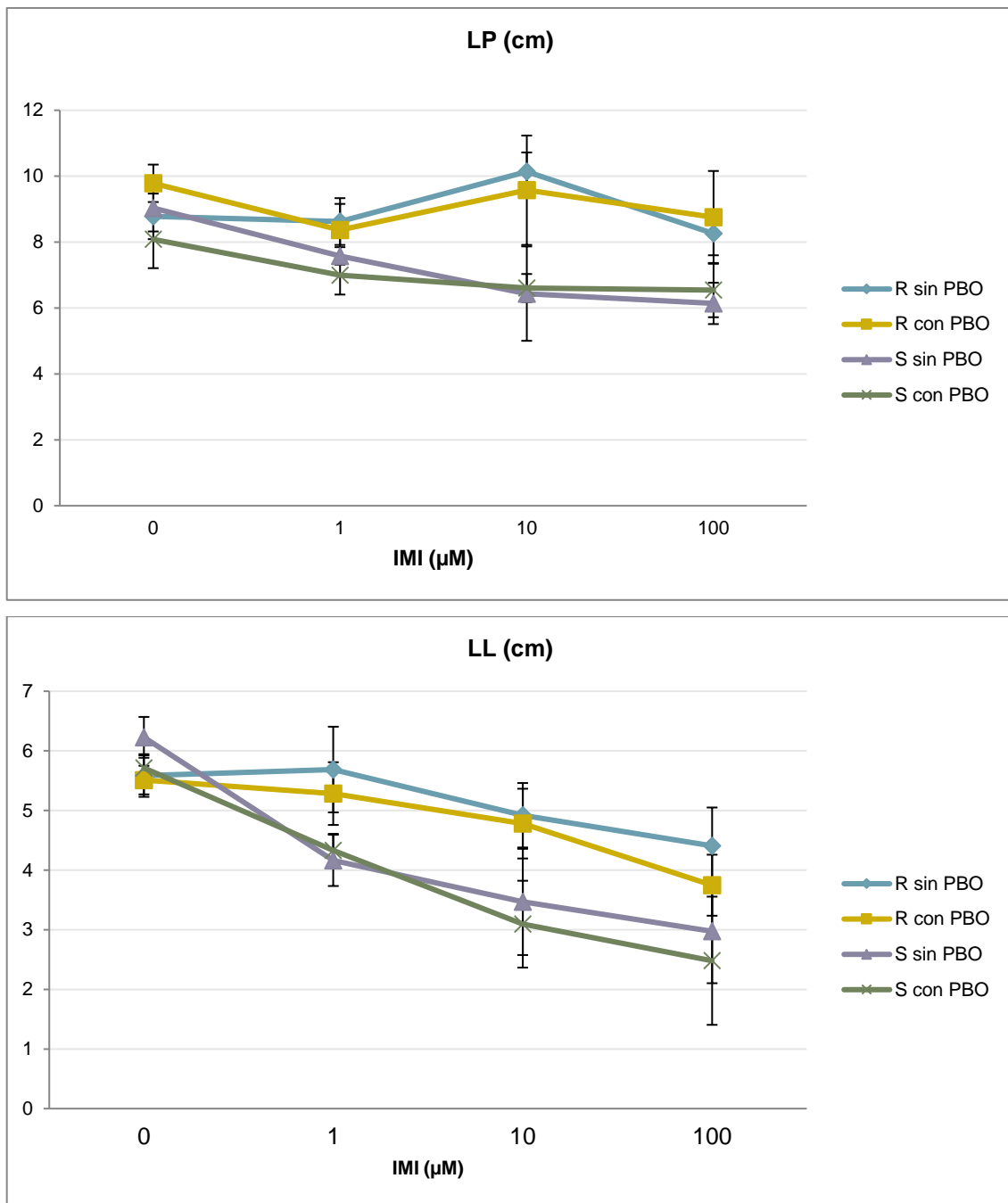
Genotipo S	<i>hue</i>	LH	AFT	LP	LL
PBO	ns	$p < 0,05$	ns	ns	ns
IMI	$p < 1e^{-6}$	$p < 0,001$	$p < 1e^{-10}$	ns	$p < 0,001$
PBO*IMI	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0,05$ )

En las Figuras 1.5 y 1.6 se muestran las gráficas estimadas que representan los valores promedio de las variables AFT, LH y *hue* y LP y LL, respectivamente en función de la concentración de herbicida.



**Figura 1.5.** Efecto del tratamiento combinado de imazetapir y PBO sobre las variables evaluadas en las líneas HA 425 (R) y HA 89 (S). AFT, área foliar total; LH, longitud de hipocótilo; *hue*, índice de coloración de las hojas. Las barras verticales representan los errores estándar de los promedios.



**Figura 1.6.** Efecto del tratamiento combinado de imazetapir y PBO sobre las variables evaluadas en las líneas HA 425 (R) y HA 89 (S). LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga. Las barras verticales representan los errores estándar de los promedios.

En la Tabla 1.4 se muestran los valores medios para todas las variables evaluadas en la línea HA 425 resistente a imazetapir y sus correspondientes errores estándar. También se muestran los valores de probabilidad (*p-value*) del análisis de contrastes ortogonales y el valor del índice de reducción para cada concentración de herbicida.

**Tabla 1.4.** Efecto del inhibidor de P450s (PBO) sobre las variables AFT, área foliar total (cm<sup>2</sup>); LH, longitud de hipocótilo (cm); *hue*, índice de coloración de las hojas (grados); LP, longitud de raíz principal (cm) y LL, longitud de raíz lateral más larga (cm) en la línea HA 425 resistente a imazetapir.

Variable	Imazetapir (μM)	Imazetapir medias ± error estándar	Imazetapir + PBO medias ± error estándar	<i>p-value</i> <sup>a</sup>	Índice de reducción (%) <sup>b</sup>
<b>AFT</b>	1	19,84 ± 1,30	14,69 ± 0,36	0,0145	25,94
	10	7,97 ± 1,06	8,50 ± 1,69	ns	--
	100	2,34 ± 0,20	2,94 ± 0,43	ns	--
<b>LH</b>	1	10,57 ± 0,32	10,62 ± 0,14	ns	--
	10	8,60 ± 0,84	9,82 ± 0,55	ns	--
	100	8,46 ± 0,27	8,63 ± 0,72	ns	--
<b><i>hue</i></b>	1	122,23 ± 0,60	122,77 ± 0,82	ns	--
	10	116,51 ± 1,39	116,10 ± 1,35	ns	--
	100	110,12 ± 1,18	113,90 ± 0,95	ns	--
<b>LP</b>	1	8,62 ± 0,71	8,36 ± 0,79	ns	--
	10	10,13 ± 0,58	9,57 ± 1,65	ns	--
	100	8,26 ± 0,66	8,75 ± 1,40	ns	--
<b>LL</b>	1	5,68 ± 0,71	5,28 ± 0,52	ns	--
	10	4,92 ± 0,54	4,78 ± 0,58	ns	--
	100	4,40 ± 0,64	3,74 ± 0,51	ns	--

<sup>a</sup> valores de probabilidad del análisis de contrastes ortogonales; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

<sup>b</sup> índice que determina el porcentaje de reducción en los valores de la variable que puede ser atribuido al inhibidor de P450s.

El valor del índice para los tratamientos 1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  + PBO de la variable AFT en el genotipo R resultó ser 25,94 %, lo que indica que el PBO es responsable de una disminución en los valores de AFT de aproximadamente un 26 %.

Los valores de probabilidad del análisis de contrastes ortogonales para la línea HA 89 susceptible a imazetapir resultaron no significativos para todas las variables (Tabla a.11 de la sección Anexo).

## EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL INHIBIDOR PIPERONIL BUTÓXIDO (PBO)

**Ensayo 2:** concentraciones de imazetapir 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M

Los análisis de variancia (ANOVA) detectaron efecto significativo del tratamiento con imazetapir ( $p < 0,05$ ) en ambos genotipos para todas las variables. No se encontró efecto significativo para el inhibidor PBO en las variables LL, AFT, *hue* y LP.

En el caso de la variable LL para el genotipo resistente se observó una interacción significativa entre el efecto del inhibidor PBO y del imazetapir ( $p < 0,05$ ) (Tablas 1.5, 1.6 y Tablas a.12 - a.21 de la sección Anexo).

La línea susceptible HA 89 fue altamente afectada por el tratamiento con el herbicida.

**Tabla 1.5.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la línea HA 425 de genotipo resistente (R) considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). *hue*, índice de coloración de las hojas; LH, longitud de hipocótilo; AFT, área foliar total; LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga.

Genotipo R	<i>hue</i>	LH	AFT	LP	LL
PBO	ns	ns	ns	ns	ns
IMI	$p < 1e^{-8}$	$p < 0,001$	$p < 1e^{-6}$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
PBO*IMI	ns	ns	ns	ns	$p < 0,05$

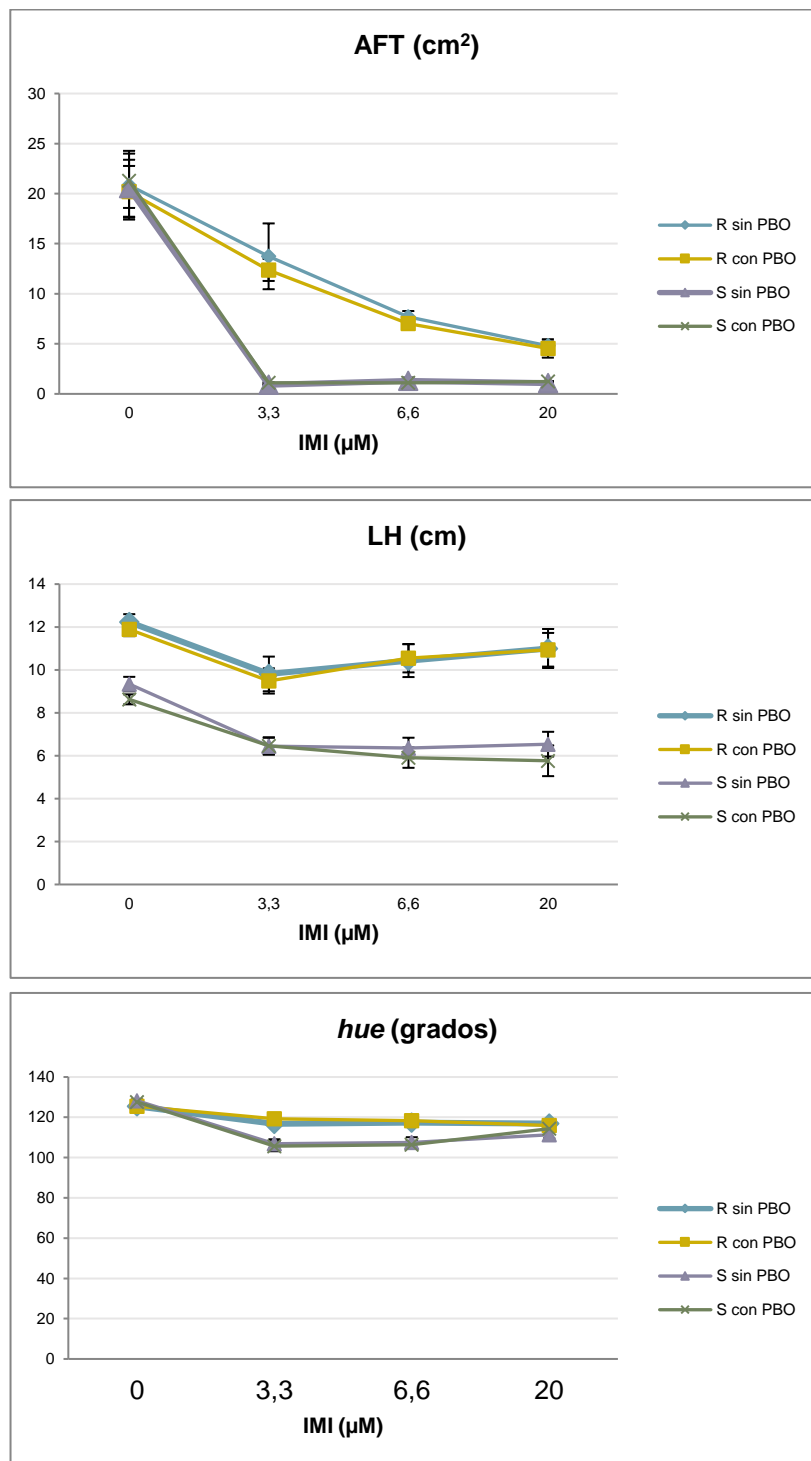
ns: no significativo ( $p > 0,05$ )

**Tabla 1.6.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la línea HA 89 de genotipo susceptible (S) considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). La variable área foliar total (AFT) fue transformada mediante la función logaritmo natural (log). *hue*, índice de coloración de las hojas; LH, longitud de hipocótilo; LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga.

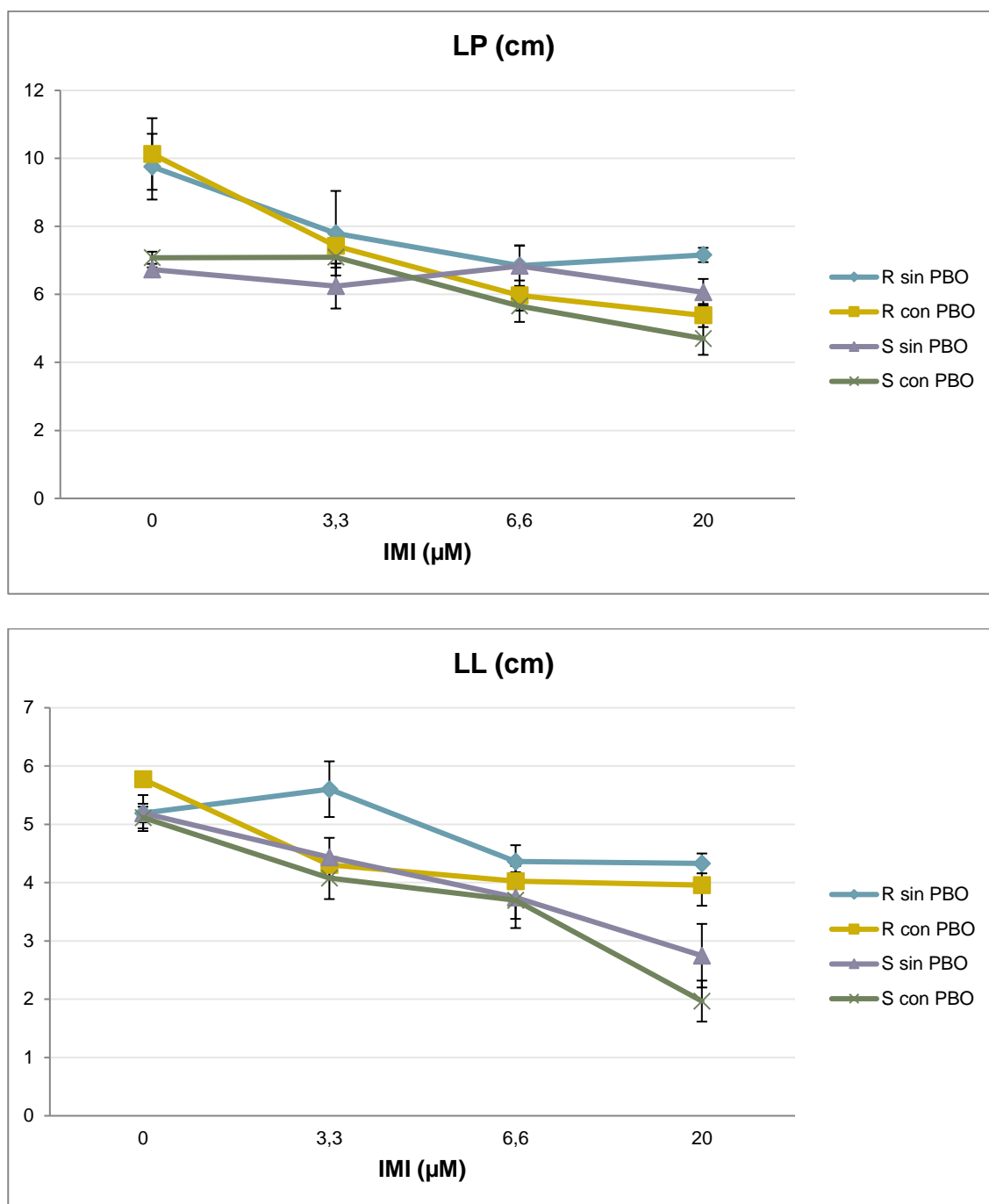
<b>Genotipo S</b>	<i>hue</i>	LH	AFT	LP	LL
PBO	ns	p < 0,05	ns	ns	ns
IMI	p < 1e <sup>-9</sup>	p < 1e <sup>-6</sup>	p < 1e <sup>-10</sup>	p < 0,05	p < 1e <sup>-4</sup>
PBO*IMI	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0,05$ )

En las Figuras 1.7 y 1.8 se muestran las gráficas estimadas que representan los valores promedio de las variables AFT, LH y *hue* y LP y LL respectivamente, en función de la concentración de herbicida.



**Figura 1.7.** Efecto del tratamiento combinado de imazetapir y PBO sobre las variables evaluadas en las líneas HA 425 (R) y HA 89 (S). AFT, área foliar total; LH, longitud de hipocótilo; *hue*, índice de coloración de las hojas. Las barras verticales representan los errores estándar de los promedios.



**Figura 1.8.** Efecto del tratamiento combinado de imazetapir y PBO sobre las variables evaluadas en las líneas HA 425 (R) y HA 89 (S). LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga. Las barras verticales representan los errores estándar de los promedios.

En la Tabla 1.7 se muestran los valores medios para todas las variables evaluadas en la línea HA 425 resistente a imazetapir y sus correspondientes errores estándar. También se muestran los valores de probabilidad (*p-value*) del análisis de contrastes ortogonales y el valor del índice de reducción para cada concentración de herbicida.

**Tabla 1.7.** Efecto del inhibidor de P450s (PBO) sobre las variables AFT, área foliar total (cm<sup>2</sup>); LH, longitud de hipocótilo (cm); *hue*, índice de coloración de las hojas (grados); LP, longitud de raíz principal (cm) y LL, longitud de raíz lateral más larga (cm) en la línea HA 425 resistente a imazetapir.

Variable	Imazetapir (µM)	Imazetapir medias ± error estándar	Imazetapir + PBO medias ± error estándar	<i>p-value</i> <sup>a</sup>	Índice de reducción (%) <sup>b</sup>
<b>AFT</b>	3,3	13,74 ± 3,28	12,37 ± 1,09	ns	--
	6,6	7,70 ± 0,57	7,02 ± 0,14	ns	--
	20	4,80 ± 0,43	4,54 ± 0,92	ns	--
<b>LH</b>	3,3	9,81 ± 0,80	9,48 ± 0,58	ns	--
	6,6	10,43 ± 0,76	10,54 ± 0,66	ns	--
	20	11 ± 0,90	10,94 ± 0,78	ns	--
<b><i>hue</i></b>	3,3	116,75 ± 0,59	119,20 ± 1,45	ns	--
	6,6	117,37 ± 0,95	118,23 ± 1,33	ns	--
	20	116,93 ± 0,84	115,92 ± 0,70	ns	--
<b>LP</b>	3,3	7,80 ± 1,24	7,42 ± 0,34	ns	--
	6,6	6,84 ± 0,59	5,96 ± 0,44	ns	--
	20	7,16 ± 0,21	5,38 ± 0,34	ns	--
<b>LL</b>	3,3	5,60 ± 0,47	4,30 ± 0,12	0,0051	23,14
	6,6	4,36 ± 0,27	4,02 ± 0,26	ns	--
	20	4,33 ± 0,17	3,95 ± 0,35	ns	--

<sup>a</sup> valores de probabilidad del análisis de contrastes ortogonales; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

<sup>b</sup> índice que determina el porcentaje de reducción en los valores de la variable que puede ser atribuido al inhibidor de P450s.

El valor del índice para la variable LL en el genotipo R con los tratamientos 3,3  $\mu\text{M}$  y 3,3  $\mu\text{M}$  + PBO es 23,14 %, lo que indica que el PBO es responsable de una disminución en los valores de LL de aproximadamente un 23 %.

Estos resultados sugieren que en la fuente de resistencia Imisun existiría un mecanismo de detoxificación mediado por isoformas de P450s particularmente inhibidas por PBO.

Los valores de probabilidad del análisis de contrastes ortogonales para la línea HA 89 susceptible a imazetapir resultaron no significativos para todas las variables (Tabla a.22 de la sección Anexo).

## EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL INHIBIDOR 1-AMINOBENZOTRIAZOL (ABT)

Los análisis de la variancia (ANOVA) mostraron efecto significativo del tratamiento con herbicida para todas las variables en ambos genotipos ( $p < 0,05$ ). En el genotipo resistente (R) se encontró un efecto significativo de ABT para las variables LP y LL. La interacción entre el efecto del inhibidor ABT y el herbicida resultó no significativa en todos los casos (Tablas 1.8, 1.9 y Tablas a.23 - a.32 de la sección Anexo).

En las Figuras 1.9 y 1.10 se muestran las gráficas estimadas que representan los valores promedio de las variables AFT, LH y *hue* y LP y LL respectivamente, en función de la concentración de herbicida.

**Tabla 1.8.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la línea HA 425 de genotipo resistente (R) considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). *hue*, índice de coloración de las hojas; LH, longitud de hipocótilo; AFT, área foliar total; LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga.

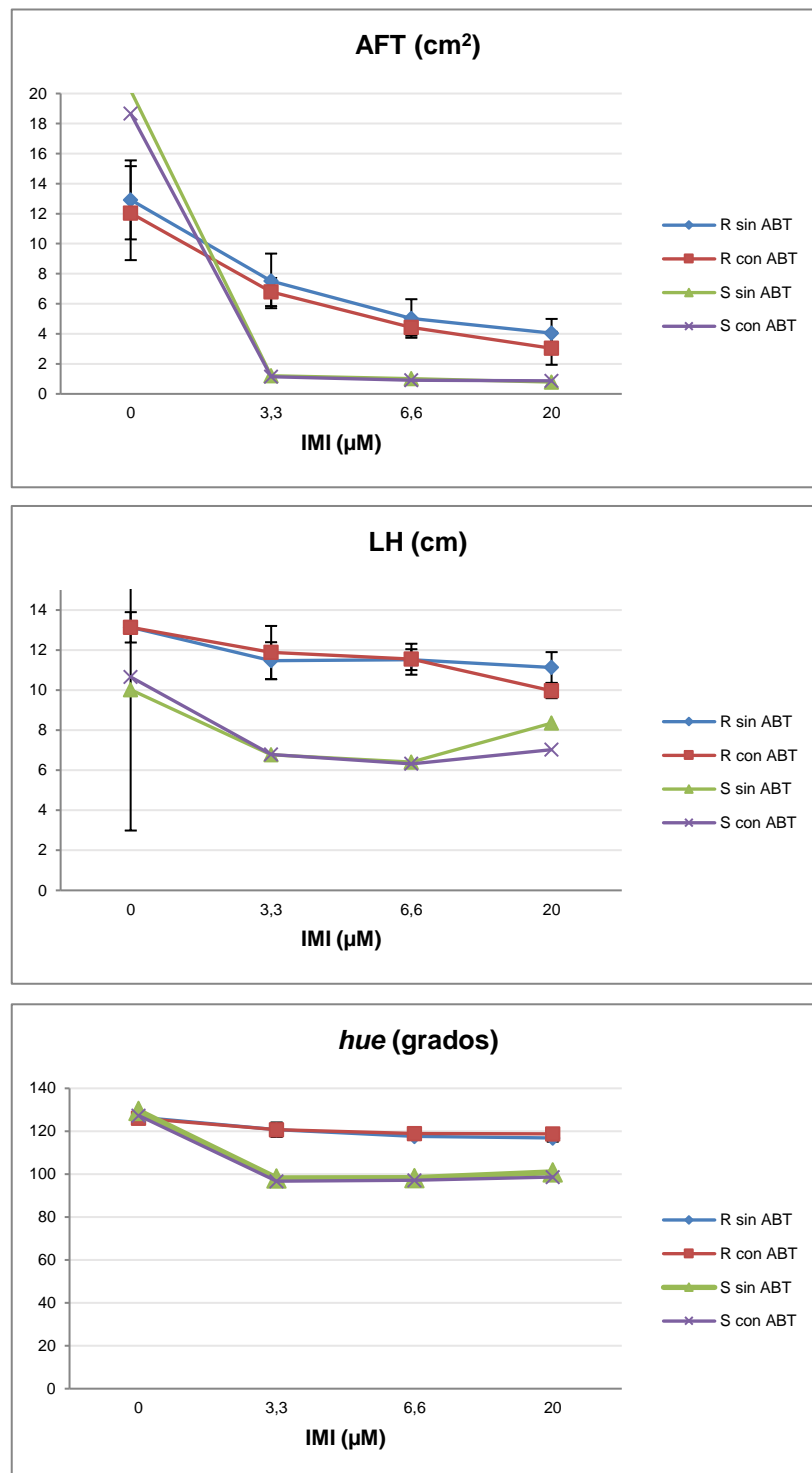
Genotipo R	<i>hue</i>	LH	AFT	LP	LL
ABT	ns	ns	ns	$p < 0,03$	$p < 0,03$
IMI	$p < 1e^{-5}$	$p < 1e^{-4}$	$p < 1e^{-6}$	$p < 0,04$	$p < 1e^{-6}$
ABT*IMI	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0,05$ )

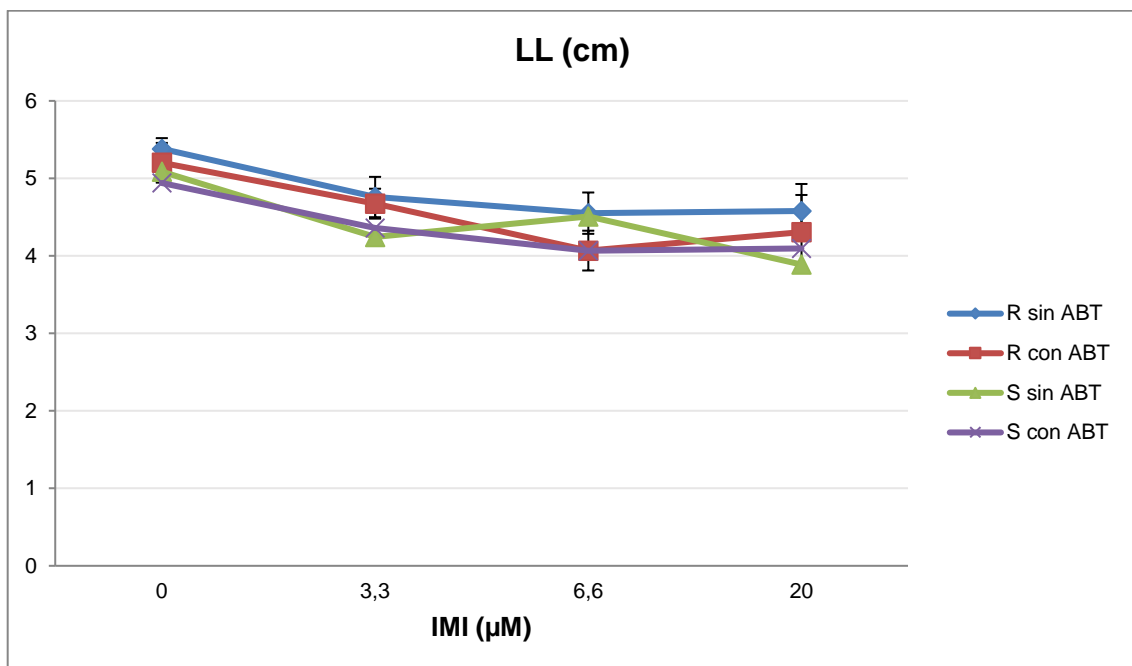
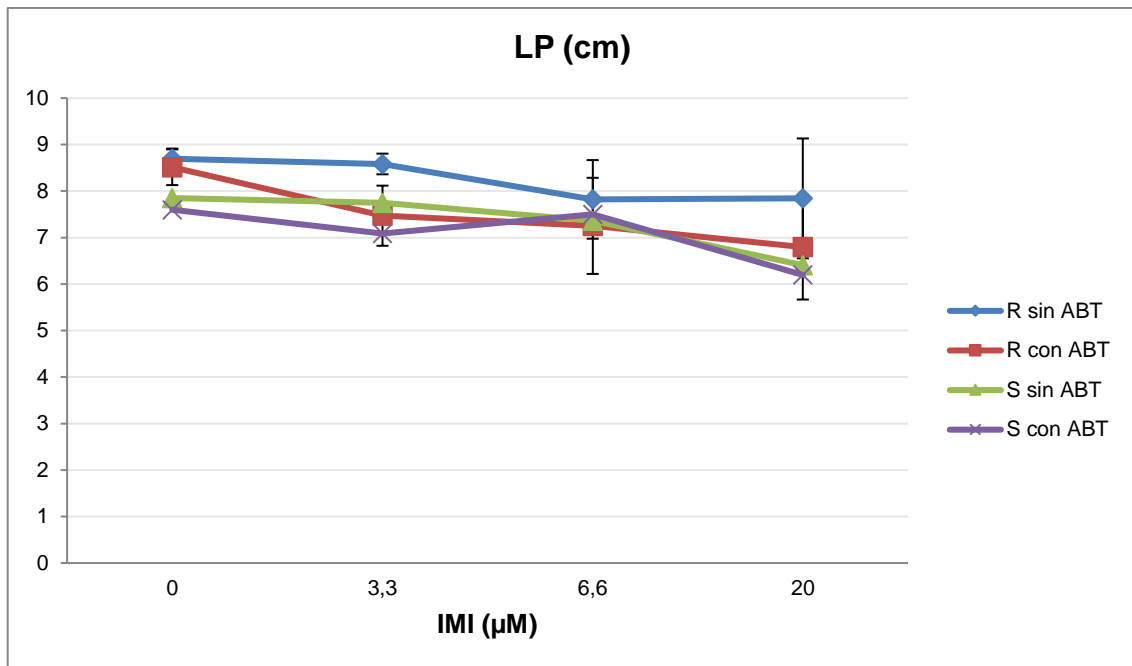
**Tabla 1.9.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la línea HA 89 de genotipo resistente (S) considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). *hue*, índice de coloración de las hojas; LH, longitud de hipocótilo; AFT, área foliar total; LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga.

Genotipo S	<i>hue</i>	LH	AFT	LP	LL
ABT	ns	ns	ns	ns	ns
IMI	$p < 1e^{-10}$	$p < 1e^{-9}$	$p < 1e^{-8}$	$p < 0,005$	$p < 0,05$
ABT*IMI	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0,05$ )



**Figura 1.9.** Efecto del tratamiento combinado de imazetapir y ABT sobre las variables evaluadas en las líneas HA 425 (R) y HA 89 (S). AFT, área foliar total; LH, longitud de hipocótilo; *hue*, índice de coloración de las hojas. Las barras verticales representan los errores estándar de los promedios.



**Figura 1.10.** Efecto del tratamiento combinado de imazetapir y ABT sobre las variables evaluadas en las líneas HA 425 (R) y HA 89 (S). LP, longitud de raíz principal; LL, longitud de raíz lateral más larga. Las barras verticales representan los errores estándar de los promedios.

En la Tabla 1.10 se muestran los valores medios para todas las variables evaluadas en la línea HA 425 resistente a imazetapir y sus correspondientes errores estándar. También se muestran los valores de probabilidad (*p-value*) del análisis de contrastes ortogonales y el valor del índice de reducción para cada concentración de herbicida.

**Tabla 1.10.** Efecto del inhibidor de P450s (ABT) sobre las variables AFT, área foliar total (cm<sup>2</sup>); LH, longitud de hipocótilo (cm); *hue*, índice de coloración de las hojas (grados); LP, longitud de raíz principal (cm) y LL, longitud de raíz lateral más larga (cm) en la línea HA 425 resistente a imazetapir.

Variable	Imazetapir (μM)	Imazetapir medias ± error estándar	Imazetapir + ABT medias ± error estándar	<i>p-value</i> <sup>a</sup>	Índice de reducción (%) <sup>b</sup>
<b>AFT</b>	3,3	7,52 ± 1,81	6,78 ± 0,93	ns	--
	6,6	5,02 ± 1,28	4,42 ± 0,55	ns	--
	20	4,04 ± 0,94	3,03 ± 1,09	ns	--
<b>LH</b>	3,3	11,47 ± 0,92	11,87 ± 1,32	ns	--
	6,6	11,52 ± 0,52	11,54 ± 0,77	ns	--
	20	11,13 ± 0,76	9,97 ± 0,37	ns	--
<b><i>hue</i></b>	3,3	120,77 ± 3,18	120,68 ± 3,32	ns	--
	6,6	117,59 ± 1,11	118,92 ± 2,02	ns	--
	20	116,86 ± 1,74	118,78 ± 2,64	ns	--
<b>LP</b>	3,3	8,58 ± 0,22	7,47 ± 0,64	ns	--
	6,6	7,82 ± 0,84	7,25 ± 1,03	ns	--
	20	7,84 ± 1,28	6,79 ± 1,12	0,0239	13,35
<b>LL</b>	3,3	4,75 ± 0,26	4,67 ± 0,19	ns	--
	6,6	4,55 ± 0,26	4,06 ± 0,25	0,0346	10,61
	20	4,58 ± 0,34	4,30 ± 0,47	ns	--

<sup>a</sup> valores de probabilidad del análisis de contrastes ortogonales; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

<sup>b</sup> índice que determina el porcentaje de reducción en los valores de la variable que puede ser atribuido al inhibidor de P450s.

El valor de índice de reducción atribuido a la presencia del ABT en el genotipo R para la variable LP en el tratamiento 20  $\mu\text{M}$  fue de 13,35 %. Para la variable LL en el tratamiento 6,6  $\mu\text{M}$  el valor fue de 10,61 %.

Estos resultados sugieren que en la fuente de resistencia Imisun existiría un mecanismo de detoxificación mediado por isoformas de P450s particularmente inhibidas por ABT.

Los valores de probabilidad del análisis de contrastes ortogonales para la línea HA 89 susceptible a imazetapir resultaron no significativos para todas las variables (Tabla a.33 de la sección Anexo).

## DISCUSIÓN

Los estudios con plantas completas son una aproximación *in vivo* que permite demostrar la participación de los citocromos P450s en el metabolismo de herbicidas. El estudio de los mecanismos de resistencia no relacionados al sitio de acción (NTSR) mediante observaciones de los efectos combinados del herbicida de interés y otras moléculas (inhibidores o activadores de herbicidas, enzimas metabolizadoras, inhibidores de enzimas de detoxificación, entre otros) es la única aproximación disponible para identificar casos de resistencia debidos a mecanismos nuevos, desconocidos y complejos que no pueden ser evaluados con ensayos bioquímicos o moleculares rutinarios. Por otra parte, cabe destacar que los ensayos en plantas enteras como los realizados en el presente trabajo poseen amplias ventajas: i) reflejan los niveles de fitotoxicidad reales del herbicida por lo que se pueden analizar los efectos de los mecanismos de resistencia relacionados al sitio de acción ii) permiten estudiar los mecanismos de resistencia secundarios e identificar enzimas con selectividad a múltiples herbicidas capaces de combatir malezas de difícil control (Letouzé y Gasquez, 2003; Beckie et al., 2012; Yang et al., 2016).

La participación de P450s en los mecanismos NTSR fue demostrada mediante estudios de inhibición *in vivo* utilizando los inhibidores PBO y ABT para otros cultivos como arroz, trigo, maíz y soja (Kwon y Penner, 1995; Hinz et al., 1997; Singh et al., 1998; Deng y Hatzios, 2003) y en malezas como *E. phyllopogon*, *L. rigidum*, *A. myosuroides* y *S. arvensis* L. (Burnet et al., 1993; Menendez y de Prado, 1996; Fischer et al., 2000; Veldhuis et al., 2000). Se han realizado pocos estudios en el género *Helianthus* con este tipo de aproximación metodológica; entre ellos se puede mencionar la identificación de una línea de girasol cultivado con resistencia natural a múltiples herbicidas mediada por isoformas de P450s revertidas por malatión (Kaspar et al., 2011).

Los estudios de herencia llevados a cabo por Bruniard y Miller (2001) utilizando como material vegetal la fuente de resistencia Imisun a partir del cruzamiento HA 425/HA 89 postularon la presencia de un locus modificador (*Imr2*) como condición para que la resistencia agronómica sea completa. En el presente trabajo se evaluaron estos materiales y los resultados obtenidos constituyen la primera aproximación para validar la hipótesis de que en la fuente de resistencia descubierta en Kansas existiría un mecanismo de detoxificación mediado por isoformas de P450s particularmente inhibidas por piperonil butóxido (PBO) y 1-aminobenzotriazol (ABT).

La línea HA 425 mostró una reducción significativa en las variables LL y LP como resultado del tratamiento combinado de los inhibidores PBO y ABT y el herbicida imazetapir. La variable área foliar total (AFT) se vio afectada únicamente por el tratamiento combinado PBO-IMI. Las isoformas de P450s involucradas tendrían un comportamiento tejido-específico: aquellas isoformas particularmente inhibidas por PBO se expresarían tanto en raíz como en tejido foliar (índices de reducción de las variables LL y AFT de 23 % y 26 %, respectivamente) mientras que aquellas inhibidas por ABT se expresarían en raíz (índices de reducción de las variables LL y LP de 11 % y 13 %, respectivamente). Esto concuerda con el hecho de que las isoformas de P450s poseen diferente especificidad por los distintos inhibidores y distintas isozimas se expresan en distintos tejidos (Siminszky, 2006). Así fue descrito para una línea de girasol cuya resistencia a múltiples herbicidas pudo ser revertida por malatión y donde la fitotoxicidad sólo se vio incrementada únicamente en tejido foliar y no en tejido radicular (Kaspar et al., 2011).

Tanto el inhibidor PBO como el ABT provocaron una reducción en los valores de las variables radicales LL y LP. Esto es consistente con lo descrito por Vega et al. (2009) y Breccia et al. (2011) quienes encontraron que la susceptibilidad a imidazolinonas en plántulas germinadas en presencia de herbicida se manifiesta principalmente a través de la reducción del crecimiento del sistema radicular y que estos caracteres son parámetros útiles para la selección de genotipos de girasol que difieren en sus niveles de resistencia a IMI. Estudios previos del presente grupo de trabajo utilizando el herbicida imazapir y los inhibidores ABT y PBO sobre la fuente de resistencia de Kansas también demostraron una reducción en los valores de LL, LP y AFT siendo índices de reducción estimados superiores a los encontrados para imazetapir (29 % a 37 %) (Breccia et al., 2017). Estas diferencias de magnitud podrían deberse a un metabolismo diferencial de los dos tipos de herbicida. Las imidazolinonas poseen una estructura general común y cada una de ellas presenta una estructura de anillo particular: el imazapir contiene un anillo piridina mientras que el imazetapir contiene un anillo piridina sustituido por un residuo alquilo. Se demostró que debido a este sustituyente alquilo en el anillo piridina, la degradación de imazetapir en plantas se lleva a cabo principalmente por la oxidación del alquilo seguido de la conjugación de glucosa. En cambio el metabolismo de imazapir se desencadena por el cierre del anillo carboxilo y el átomo de nitrógeno del anillo piridino. Estas diferencias hacen que el imazetapir sea altamente selectivo y efectivo en el control de malezas a bajas dosis y que por otra parte se necesiten dosis superiores de imazapir para ejercer este mismo control (Lee, et al., 1991).

Los avances en análisis de imágenes aportan mejoras a los bioensayos tal como mejoras en la rapidez, precisión y calidad del fenotipado, haciendo posible la evaluación de síntomas de plantas enfermas (R4P Network, 2016). Mientras que el carácter color de hoja es usualmente evaluado mediante escalas visuales que no poseen una rigurosidad cuantitativa, el análisis digital de imágenes puede considerarse una herramienta confiable para un fenotipado preciso. En general la evaluación de la clorosis se lleva a cabo utilizando escalas visuales cualitativas altamente dependientes del operador, mientras que el análisis con el programa *Tomato Analyzer* provee una cuantificación objetiva de los niveles y de la uniformidad del color (Ochogavía et al. 2014). Una reducción en los valores del índice de coloración de las hojas *hue* en función del incremento de las concentraciones de herbicida se asocia a la presencia de síntomas foliares tales como clorosis y necrosis. La aparición de estos síntomas fue observada tanto para el genotipo resistente como para el susceptible, aunque el daño en este último fue significativamente mayor a menores concentraciones de imazetapir. Se demostró que el índice de coloración de las hojas *hue* es un parámetro muy útil para discriminar genotipos resistentes de susceptibles en etapas tempranas del tratamiento con herbicida. Ambos programas utilizados en este trabajo, *Image J* y *Tomato Analyzer*, proveen evaluaciones objetivas de caracteres morfológicos y de variación de color de órganos vegetales.

Los estudios de herencia de la fuente de resistencia de Kansas postularon la presencia de un locus modificador *Imr2* (Bruniard y Miller, 2001). El aumento de la fitotoxicidad del herbicida luego del tratamiento con inhibidores de P450s en la línea resistente HA 425 y el hecho de que los inhibidores no mostraron efecto sobre ninguna de las variables para el genotipo susceptible sugieren que un mecanismo de detoxificación mediado por P450s estaría asociado al locus *Imr2*. El metabolismo de herbicidas es generalmente un mecanismo de resistencia que también se encuentra en los genotipos susceptibles en menor magnitud y/o se desencadena más tarde. Tal es el caso de los estudios en sorgo de metabolitos derivados del herbicida inhibidor de AHAS rimsulfuron que mostraron que el metabolismo es más rápido en el genotipo resistente, lo que podría explicar la rápida recuperación de las plantas de sorgo de los daños ocasionados por el herbicida observados en el campo (Abit y Al-Khatib, 2013).

La herencia de la resistencia basada en el metabolismo de herbicida mediado por P450s fue caracterizada para varias especies en función de su origen monogénico o poligénico. Para el caso de *L. rigidum* fueron demostrados ambos tipos de herencia: algunas poblaciones poseen genes únicos de P450s cada uno responsable de la resistencia a un

grupo de herbicidas (Preston, 2003) y otras que presentan resistencia conferida por un modelo de dos genes aditivos como se demostró para los herbicidas no relacionados clorsulfurón, inhibidor de AHAS y diclofop-metil (Busi et al., 2010; Han et al., 2014). Por su parte, para la especie *A. myosuroides* se identificaron poblaciones con resistencia al herbicida fenoxaprop-P-etil mediada por un único P450 y revertida por malatión (Letouzé y Gasquez, 2001) así como también se encontraron poblaciones con múltiples genes aditivos (Petit et al., 2010).

A partir del descubrimiento en 1998 en Kansas de la fuente de resistencia Imisun se destinaron esfuerzos y recursos para el desarrollo de híbridos resistentes a imidazolinonas. Cabe destacar que esta es la primera fuente de resistencia a herbicidas que se utilizó en los planes de mejoramiento del cultivo de girasol.

En el año 2002 se liberaron las primeras líneas públicas americanas de girasol resistente a imidazolinonas desarrolladas por el Departamento de Agricultura de los EEUU (USDA-ARS, *United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service*) y en el año 2003 se comercializaron por primera vez en Argentina, Estados Unidos y Turquía híbridos resistentes a imidazolinonas bajo el nombre de tecnología Clearfield® (Tan et al., 2005). La incorporación de este carácter representó el mayor avance para el control de malezas y consecuentemente para el incremento de la producción (Zollinger, 2004) ya que se estima que la competencia de malezas causa pérdidas de un 20 % a 70 % en el rendimiento de este cultivo (Blamey y Zollinger, 1997). Sin embargo la naturaleza digénica de la herencia de la resistencia Imisun constituyó una dificultad para el proceso de conversión de líneas progenitoras de híbridos por retrocruza, abriendo paso a nuevas fuentes de resistencia generadas por mutagénesis y que confieren mayor insensibilidad de la enzima AHAS a las imidazolinonas sin requerir la presencia de un mecanismo NTSR en el fondo genético de las líneas progenitoras de híbridos. Este es el caso del alelo de resistencia Ala 122 lanzado al mercado en el año 2010 como tecnología Clearfield Plus® (Sala et al., 2008a; Sala et al., 2008b; Bulos et al., 2013).

La fuente de resistencia Imisun es el primer ejemplo de un carácter comercial de resistencia a herbicidas conferido por dos mecanismos independientes (Tan et al., 2005). Cuando coexisten mecanismos TSR y NTSR se pueden obtener diferentes niveles de resistencia entre genotipos con el mismo alelo *ahas* y esto se debe al efecto del fondo genético (*background*) subyacente en el mecanismo NTSR. Es decir que la presencia de diferentes genes modificadores puede dar lugar a variaciones en la resistencia observada a nivel fenotípico. Las mayores respuestas diferenciales al tratamiento con IMI responden a la presencia de genes únicos o principales; sin embargo existen efectos cuantitativos adicionales

atribuidos a genes modificadores (Snape et al., 1991; Bruniard, 2001). De hecho, además del estudio de herencia de la resistencia en la fuente Imisun realizado a partir del cruzamiento HA 425/HA 89, se analizaron otras cinco poblaciones F2 de diversos orígenes para confirmar el modelo propuesto de herencia digénica de gen principal y gen modificador (Bruniard, 2001). Para todos los casos se verificó la segregación esperada 3:9:4 excepto para una única población en la cual se presume la segregación de más de dos loci y se postula la presencia de más de un gen modificador en el *background* de las poblaciones de diversos orígenes. La modificación puntual en el gen *ahas* no confiere el 100 % de la resistencia en los girasoles Imisun razón por la cual el *background* debe completar la resistencia (Doley, 2001). Lo mismo se observó para dos poblaciones de *A. myosuroides* resistentes vía mecanismos NTSR a la mayoría de los herbicidas más efectivos para control en el cultivo de trigo (fenoxaprop, clodinafop, pinoxaden, iodosulfuron+mesosulfuron y piroxsulam) y al herbicida para control de malezas de hoja ancha quizalofop. El estudio de segregación mostró que múltiples fenotipos resistentes eran provocados por múltiples genes vinculados a mecanismos NTSR (Délye et al., 2011). Más aún, los mecanismos NTSR desarrollados por la acumulación de diferentes genes fue más frecuente que la selección por genes simples (Petit et al., 2010) y la principal causa de esta acumulación de genes es el cruzamiento natural de la especie. Los mecanismos NTSR evolucionarían mediante una acumulación de diferentes mecanismos en una misma planta e involucra protectores directos de la acción del herbicida, así como reguladores de dichos protectores (Délye, 2012).

Contrario a los mecanismos TSR que confieren resistencia específica a aquellos herbicidas relacionados a la proteína en cuestión, los mecanismos NTSR pueden conferir una resistencia impredecible (Petit et al., 2010). Los mecanismos NTSR constituyen el componente principal de la resistencia a determinados herbicidas en algunas poblaciones de malezas como *Avena fatua*, *A. myosuroides*, *Vulpia bromoides* (Letouzé y Gasquez, 2003; Yu et al., 2004; Beckie et al., 2012) y cultivos como arroz, trigo y maíz (Hinz et al., 1997; Singh et al., 1998; Deng y Hatzios, 2003) mientras que para otras es un mecanismo que complementa a los mecanismos TSR (Fischer et al., 2000; Koeppe et al., 2000; Yang et al., 2016). El locus *Imr2* estaría relacionado a un mecanismo secundario que refuerza los niveles de resistencia generados por la mutación en el codón 205 en el gen *Imr1* y su aporte se ve reflejado en los índices de reducción encontrados para los ensayos de inhibición de P450s en planta completa en el presente trabajo.

Actualmente se desconoce si la resistencia mediada por P450s se debe a un cambio en la especificidad por el sustrato por parte de las monooxigenasas (mutación génica), a un

cambio en la regulación génica o a una duplicación génica (Schuler y Werck-Reichhart, 2003). Así, el metabolismo incrementado podría estar relacionado a una sobreexpresión de ciertos genes P450s como fue observado para *Echinochloa phyllopogon* (Iwakami et al., 2014). Considerando el enorme número y diversidad de genes de P450s en las diferentes especies de plantas, estas enzimas se convierten en una potencial fuente para la ingeniería de la resistencia a pesticidas mediante transformación y para su uso en bioseguridad utilizando, por ejemplo, bacterias del suelo. Otras aplicaciones incluyen marcadores positivos para la transformación de plantas y biorremediación de suelos y aguas (Werck-Reichhart et al., 2000).

## CONCLUSIONES

- Los ensayos realizados con plantas completas sugieren que en la fuente de resistencia *Imisun* existiría un mecanismo de detoxificación mediado por isoformas de P450s particularmente inhibidas por piperonil butóxido (PBO) y 1-aminobenzotriazol (ABT).
- Las isoformas de P450s involucradas en los mecanismos de resistencia no relacionados al sitio de acción (NTSR) estudiados tendrían un comportamiento tejido-específico: aquellas isoformas particularmente inhibidas por PBO se expresan tanto en raíz como en tejido foliar mientras que aquellas inhibidas por ABT se expresan en raíz.
- Los índices de reducción estimados de las variables longitud de raíz lateral más larga (LL) y área foliar total (AFT) para el inhibidor PBO fueron de 23 % y 26 % respectivamente mientras que para el inhibidor ABT los índices de reducción de las variables LL y LP fueron de 11 % y 13 % respectivamente. Esto sugiere que las isoformas de P450s estudiadas poseen diferente especificidad por los distintos inhibidores.
- El aumento de la fitotoxicidad del herbicida luego del tratamiento con inhibidores de P450s únicamente para la línea resistente HA 425 y la ausencia de efecto de dichos inhibidores sobre el genotipo susceptible sugieren que un mecanismo de detoxificación mediado por P450s estaría asociado al locus *Imr2*.

# **CAPÍTULO 2**

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO  
CON EL HERBICIDA IMAZETAPIR EN GIRASOL**

## INTRODUCCIÓN

La incorporación de la resistencia a imidazolinonas en el girasol representa el mayor avance para el control de malezas y consecuentemente para el incremento de la producción de este cultivo. A partir de la caracterización genética de la fuente de resistencia descubierta en Kansas se sabe que la mutación del sitio de unión a herbicidas de la enzima AHAS (*Imr1*) no es el único determinante genético que explica la resistencia y que existe un segundo locus (*Imr2*) que contribuye a la misma (Bruniard y Miller, 2001; Kolkman et al., 2004). Si bien se ha realizado la caracterización bioquímica y molecular del locus *Imr1* (Vega et al., 2009; Vega et al., 2012; Breccia et al., 2013) hasta el momento no se habían destinado esfuerzos para elucidar cuál es el rol de *Imr2* aunque se postula que estaría vinculado a la detoxificación del herbicida.

En el Capítulo 1 se llevaron a cabo análisis de inhibición *in vivo* de citocromo P450s para determinar los niveles de fitotoxicidad en planta entera y evaluar la participación de estas enzimas en la resistencia a IMI en girasol. Estos ensayos resultaron en una primera aproximación a la identidad del locus *Imr2*. Sin embargo, es importante destacar que la participación de P450s en el metabolismo de las IMI no significa necesariamente que estas sean las únicas proteínas involucradas en la resistencia.

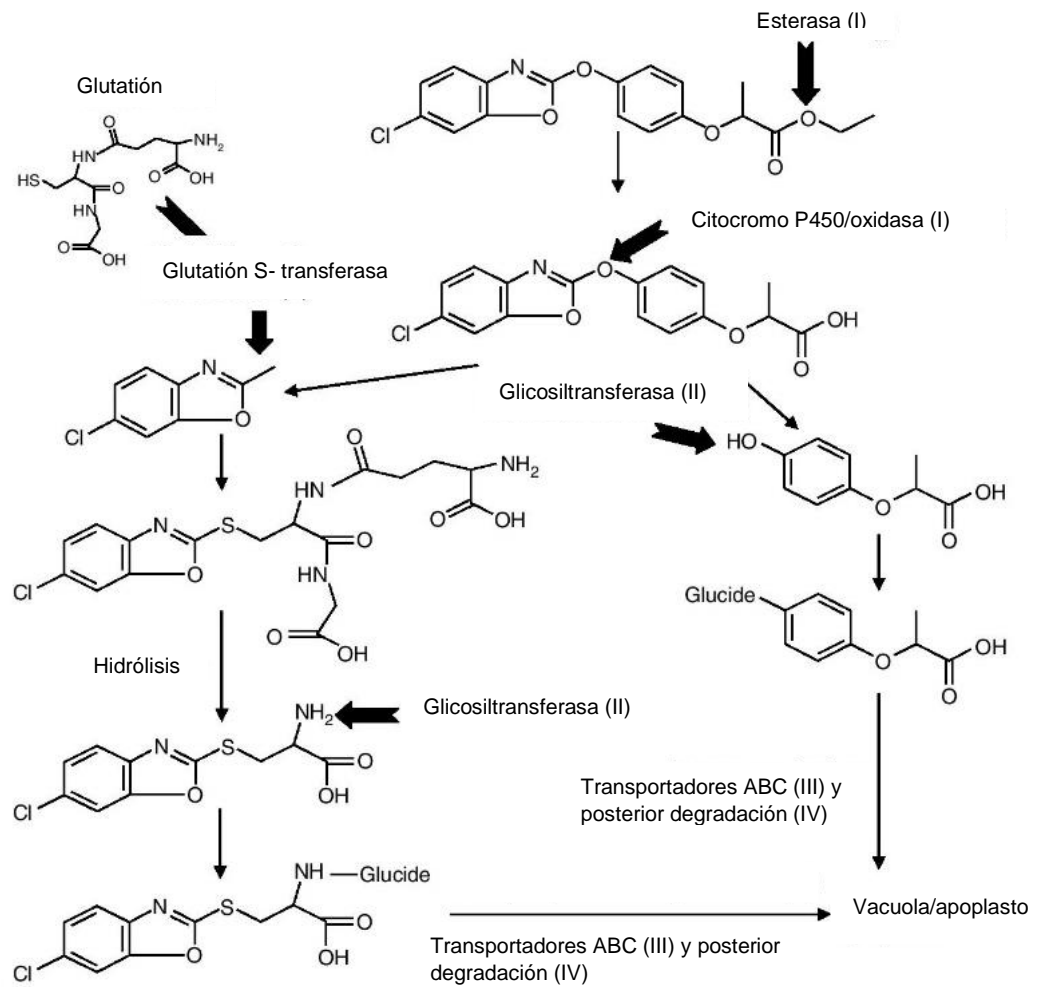
A pesar de que pueden existir mecanismos NTSR de control monogénico (Mithila et al., 2012) es probable que la mayoría sean de control poligénico (Busi et al., 2010; Petit et al., 2010) y que parte de los efectores de esta resistencia sean de expresión constitutiva y parte sean inducidos, inclusive pudiendo variar según el herbicida utilizado y el genotipo de la planta. Los mecanismos NTSR constitutivos se asocian a metabolismos secundarios basales con mayores niveles de expresión en plantas resistentes, mientras que los mecanismos inducidos están involucrados en la respuesta de la planta al estrés causado por la aplicación del herbicida que desencadena vías de respuesta. Como consecuencia, los mecanismos NTSR no se componen solo de enzimas metabolizadoras de herbicida sino también de reguladores (Yuan et al., 2007; Cummins et al., 2009; Délye, 2012; Délye et al., 2013) .

El daño que ocasiona el herbicida sobre la planta comienza de tres a ocho horas luego de la aplicación del xenobiótico. Para ser eficientes y proporcionar altos niveles de resistencia, los mecanismos NTSR deben desencadenarse antes de que el daño sea irreversible y debe persistir por un período suficiente para permitirle a la planta resistente recuperarse del contacto con el herbicida. Son parte de la respuesta a estrés de la planta e involucran procesos dinámicos que se desarrollan en el tiempo (Délye, 2012).

Los mecanismos NTSR pueden involucrar una disminución en la absorción del herbicida, disminución en la eficiencia de translocación y/o aumento en el metabolismo y detoxificación del xenobiótico (Délye, 2012). Una reducción en la penetración del herbicida fue reportado en girasol resistente a inhibidores de AHAS (White et al., 2002). Sin embargo, debido a que las formulaciones comerciales están diseñadas para optimizar la absorción del herbicida, este mecanismo generalmente no confiere altos niveles de resistencia. Por otra parte, la reducción en la translocación ha sido ampliamente estudiada y es el principal mecanismo de resistencia a herbicidas como el glifosato y el paraquat (Preston et al., 1996; Powles y Yu, 2010). Finalmente, existe evidencia bioquímica sustancial que prueba la participación en mecanismos NTSR de enzimas que degradan herbicidas, aunque sólo algunos genes fueron identificados hasta el momento (Yuan et al., 2007).

Para responder a cambios constantes del medio ambiente las plantas han desarrollado un sistema sofisticado de detoxificación de químicos tóxicos. En general, el proceso de detoxificación consta de un esquema de cuatro fases (Figura 2.1). En la primera fase o Fase I las moléculas del xenobiótico son activadas de manera de que ciertos grupos funcionales sean expuestos a las enzimas de la Fase II. Las propiedades del compuesto original se transforman a través de oxidación, reducción o hidrólisis para generar un compuesto más soluble y menos tóxico. La reacción más común de esta primera fase es una oxidación y generalmente es llevada a cabo por citocromos P450 monooxigenasas (P450s) (Werck-Reichhart et al., 2000; Yun et al., 2001). La participación de P450s en la resistencia al herbicida clorotoluron en *A. myosuroides* fue identificada mediante aplicación exógena de inhibidores de P450s y analizando los metabolitos acumulados luego del tratamiento con el herbicida (Kemp et al., 1990). Por otra parte, uno de los primeros genes de P450s identificados fue clonado de *H. tuberosus* y se determinó su vinculación con el metabolismo de una variedad de xenobióticos y herbicidas de la familia de las fenilureas (Robineau et al., 1998).

La Fase II usualmente implica la conjugación de una molécula hidrofílica (por ejemplo glutatión ó un azúcar) al xenobiótico activado, preparándolo para su reconocimiento por los transportadores de la Fase III. Estos conjugados poseen poca o ninguna toxicidad y pueden ser almacenados en las organelas. Generalmente las enzimas involucradas en esta fase son glutatión S-transferasas (GSTs) y glicosiltransferasas (GTs). Las GSTs son enzimas multifuncionales que catalizan la conjugación de glutatión a varios sustratos hidrofóbicos y electrofílicos para generar un producto polar. La resistencia mediada por GSTs tiene como blanco a múltiples herbicidas y en algunos casos esta resistencia se debe a un incremento en la expresión de dichos genes mientras que en otros resulta de un aumento en la actividad de



**Figura 2.1.** Variedad de enzimas involucradas en la degradación de herbicidas. En números romanos se indican las etapas del proceso al que corresponde la familia enzimática. Adaptado de Délye (2012).

las enzimas GSTs. Varias GSTs fueron purificadas y caracterizadas en soja, trigo, maíz y otros cultivos (Cummins et al., 1997; Andrews et al., 2005; Edwards y Dixon, 2005). Un ejemplo es un gen de GST de arroz, clonado y expresado con éxito en *Escherichia coli* y cuyo producto tiene actividad sobre herbicidas de la familia de las cloroacetanilidas (Cho y Kong, 2005).

La Fase III se basa en el transporte de la molécula conjugada hacia la vacuola o hacia el espacio extracelular por transportadores activos, generalmente del tipo ABC. Los

transportadores ABC (ABCs) están anclados a membranas y poseen uno o dos sitios de unión a adenosina trifosfato (ATP) para transporte activo. En plantas superiores, los ABCs poseen gran variedad de funciones como excreción de compuestos tóxicos, secuestro de metabolitos secundarios, translocación de ácidos grasos, entre otras. Son una de las familias de genes más diversas en plantas superiores y su diversidad de sustratos es una importante característica en relación a la resistencia a herbicidas. Se demostró que pueden transportar químicos conjugados con glutatión (Martinoia et al., 1993) y conjugados glucosídicos derivados del herbicida primisulfuron (Gaillard et al., 1994). Además se demostró que varios ABCs en *A. thaliana* y otras especies transportan diferentes herbicidas y metabolitos derivados (Liu et al., 2001; Schulz y Kolukisaoglu, 2006).

Finalmente, la Fase IV incluye la degradación del conjugado en la vacuola o en el espacio extracelular (Bartholomew et al., 2002; Klein et al., 2006) y la protección contra los daños colaterales del herbicida como lo son la liberación de especies reactivas del oxígeno. Por ejemplo, en algunas plantas resistentes los mecanismos NTSR involucran el aumento en la expresión de peroxidasas que protegen a las células del daño oxidativo (Duhoux et al., 2015).

Los mecanismos NTSR son el principal tipo de resistencia a glifosato y a herbicidas que inhiben las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACCase) y AHAS en malezas (Yu et al., 2009). Existe gran evidencia de que el aumento coordinado de la expresión de las cuatro familias de genes GSTs, GTs, ABCs y P450s puede conferir resistencia por metabolización de herbicidas en malezas y cultivos (Schäffner et al., 2002; Van Eerd et al., 2003; Manabe et al., 2007; Yuan et al., 2007). Más aún, una acción conjunta entre mecanismos NTSR y TSR promoverían la supervivencia de ejemplares de la maleza *Conyza canadensis* bajo tratamiento con el herbicida glifosato (Dinelli et al., 2006). Por otra parte, se ha demostrado que genes de respuesta a estrés abiótico están implicados en la resistencia a imidazolinonas en *A. thaliana*: una expresión basal superior de todos estos genes colaboraría con el proceso de resistencia a IMI y le garantizaría a la planta sobrevivir a la aplicación del herbicida (Manabe et al., 2007).

Los genes involucrados en mecanismos NTSR pueden ser identificados, sintetizados químicamente y expresados en otros cultivos para beneficiarse de su impacto en dichas plantas transgénicas. Los genes sintéticos también pueden expresarse en *Phichia pastoris* o *Escherichia coli* para producir la proteína correspondiente y realizar estudios bioquímicos (Malik, 2016).

Kolkman et al. (2004) postuló que el locus *Imr2*, también denominado *enhancer*, presente en la línea de girasol HA 425 estudiada en el presente trabajo podría estar relacionado con mecanismos NTSR.

El girasol es una planta anual originaria de América que pertenece a la familia Compositae, una de las más grandes y ecológicamente más diversas entre las familias de plantas con flores. Posee un genoma diploide ( $2n=34$ ) y su caracterización genómica ha sido lenta, en parte debido a que los miembros de la familia Compositae tienen genomas grandes y complejos. El genoma del girasol contiene entre 3,5 y 3,6 billones de bases, 15 % más grande que el genoma humano y comprende un 78 % de secuencias repetitivas siendo uno de los genomas de plantas con mayor porcentaje de estas secuencias, principalmente elementos transponibles (Cavallini et al., 2010; Gill et al., 2014).

Hasta el año 2016 no había sido secuenciado un genoma completo de girasol lo que dificultó la aplicación de aproximaciones moleculares para el mejoramiento del cultivo así como se encontraban limitados los estudios evolutivos en esta especie (Rieseberg, 2016). Finalmente, en la conferencia *Days Exchanges on Sunflower* llevada a cabo en junio de 2016 en Toulouse, Francia se presentó a la comunidad científica la secuencia completa de un genoma de referencia de girasol y este logro es parte del proyecto SUNRISE<sup>a</sup> en colaboración con el Consorcio Internacional del Genoma de Girasol<sup>b</sup>. El proyecto SUNRISE, fundado por la Agencia Nacional de Investigaciones de Francia (*Agence Nationale de la Recherche*, ANR), trabaja por la adaptación del cultivo de girasol a los cambios climáticos actuales desarrollando nuevas variedades con mejores niveles de tolerancia a sequía. Agrupa a 16 colaboradores públicos y privados entre los que se encuentra el *Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organisms*, LIPM (INRA/CNRS) de Toulouse, Francia. La secuencia completa del genoma de girasol ha sido publicada *online* en mayo de 2017 (Badouin et al. 2017).

El genoma de referencia secuenciado corresponde a la línea de girasol XRQ desarrollada por el INRA, Francia. Este logro combinó, entre otras, técnicas de secuenciación WGS (*whole-genome shotgun*) mediante plataformas *Illumina* y 454 con la generación de mapas físicos y genéticos de alta densidad e información de transcriptoma y secuencia para

---

<sup>a</sup> <http://www.sunrise-project.fr>

<sup>b</sup> Consorcio liderado por la *University of British Columbia* en Canada y por *l'Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) en Francia .

diversos microarreglos de genotipos salvajes y cultivados. Sin embargo, el gran salto lo facilitó la utilización de la plataforma de secuenciación de última generación PacBio RS II4, la cual permite obtener *reads* 100 veces más largos que los de secuenciadores previos facilitando el correcto ensamblado de secuencias (Rieseberg, 2016; SUNRISE, 2017).

La obtención de un genoma de referencia es un hito en el mejoramiento del cultivo de girasol que permitirá un avance extraordinario en los programas de mejoramiento para la generación de nuevas variedades, permitiendo nuevas adaptaciones a métodos actuales de producción y acoplándose a las necesidades de producción de alimentos y usos múltiples en la industria.

Cabe destacar que se han realizado pocos estudios que examinen la expresión génica diferencial en respuesta a tratamientos de herbicida en girasol. A su vez, en lo que respecta particularmente a herbicidas inhibidores de AHAS, los estudios a nivel de transcriptoma están restringidos a la especie modelo *A. thaliana* o a *Brassica napus* (Manabe et al., 2007; Das et al., 2010). Los transcritos expresados diferencialmente en presencia o ausencia del herbicida en diferentes tejidos de distintos genotipos de girasol brindarían información acerca de los mecanismos celulares que se inducen bajo estas condiciones. Esto contribuiría a una mayor comprensión no sólo del modo de acción del herbicida sino también de los posibles mecanismos de resistencia implicados y de los efectos secundarios que éstos inducen.

Teniendo en cuenta que la aproximación a la identidad del locus modificador *Imr2* resulta compleja ya que podría estar vinculado a mecanismos NTSR, las tecnologías para el estudio global del transcriptoma y de la expresión diferencial juegan un papel sustancial en su caracterización. Estas técnicas permiten la identificación a gran escala de genes clave y el análisis de mecanismos moleculares relacionados al desarrollo y a respuestas biológicas multigénicas, e incluyen métodos basados en hibridización o en análisis de secuencias. Los primeros involucran la incubación de ADNc marcado fluorescentemente con microarreglos comerciales o diseñados de acuerdo a preferencias personales. Son relativamente económicos pero poseen varias limitaciones: su aplicación se limita a organismos cuyo genoma está completamente secuenciado o que poseen grandes colecciones de secuencias de transcritos disponibles, conocidas y anotadas, poseen altos niveles de interferencia en el análisis debido a la hibridización cruzada y un rango limitado de niveles de detección debido a la saturación de señal. Además, los métodos de normalización para comparar resultados de diferentes experimentos son muy complejos (Vuylsteke et al., 2007; Li et al., 2015). En contraste los métodos basados en análisis de secuencia determinan directamente la secuencia del ADNc. Entre ellos, el método SAGE (secuenciación Sanger de ADNc o librerías

de ESTs), CAGE (*cap analysis of gene expression*) y MPSS (*massively parallel signature sequencing*) son metodologías que pueden proveer niveles precisos de expresión génica aunque son técnicas muy caras y una porción significativa de las lecturas no pueden ser mapeadas específicamente a la referencia y las isoformas no pueden distinguirse (Wang et al., 2009). Otra técnica basada en secuencia atractiva para el análisis de perfiles transcriptómicos es la metodología polimorfismo en la longitud de fragmentos de ADNc amplificados (cDNA-AFLP, *cDNA amplified fragment length polymorphism*).

La técnica cDNA-AFLP permite el descubrimiento de genes sobre la base de la detección de fragmentos y análisis cuantitativos de la expresión génica. Permite el estudio de genes altamente homólogos o miembros de familias génicas debido a que no hay riesgo de hibridación cruzada como en los chips de microarreglos (Vuylsteke et al., 2007). Esta técnica permite aproximarse al conocimiento de la regulación genética de caracteres mediante la correlación entre la expresión del carácter en el organismo en estudio y un perfil de corte de restricción del ADNc del mismo (Stölting et al., 2009). Posee ventajas colectivas, entre ellas: alta reproducibilidad y sensibilidad, capacidad del estudio global del transcrito, robustez y una de sus cualidades más importantes es que no requiere información previa de secuencia del genoma con lo cual es una herramienta especialmente útil para trabajar con organismos no modelo (Stölting et al., 2009; Xiao et al., 2009).

La metodología cDNA-AFLP involucra la extracción del ARN (ácido ribonucleico), la retrotranscripción y la digestión del ADNc con una combinación de dos enzimas de restricción. Posteriormente se realizan amplificaciones selectivas con oligonucleótidos portadores de bases selectivas para reducir el pool de ADNc total amplificado. Los fragmentos de restricción se separan en geles de agarosa o poliacrilamida y los análisis presencia-ausencia y de diferencias de intensidades entre las bandas permiten identificar potenciales genes relacionados al carácter (Vuylsteke et al., 2007; Stölting et al., 2009). Actualmente existen variantes de la técnica cDNA-AFLP incluyendo el método *one gene-one tag* en el cual el número de fragmentos AFLP por transcripto se ve reducido (Vuylsteke et al., 2007) y la sustitución del revelado autoradiográfico de los geles por tinción con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Xiao et al., 2009).

Por otra parte, la herramienta basada en secuencia actualmente más poderosa para identificar genes regulados diferencialmente y brindar datos cualitativos y cuantitativos sin la necesidad de información de secuencias genómicas o transcriptómicas previas es la secuenciación global del ARN o RNA-Seq. Esta técnica se basa en la conversión de una población de ARN (total o poli-A<sup>+</sup>) inicial a una biblioteca de ADNc y la posterior amplificación

y secuenciación de cada molécula mediante secuenciadores de última generación. Se obtienen lecturas cortas denominadas *reads* que tienen entre 30–400 pares de bases (pb) dependiendo de la tecnología utilizada y que alinean contra un genoma o transcriptoma de referencia o se ensamblan *de novo* (Wang et al., 2009).

Las tecnologías de secuenciación de última generación poseen muchas ventajas para la caracterización global de la expresión génica. Entre ellas, la posibilidad de identificar variaciones de secuencia en zonas transcritas y la inexistencia de señal de interferencia debido a que las lecturas pueden ser mapeadas sin ambigüedad a regiones únicas de la referencia. Por otra parte, la técnica RNA-Seq no posee un límite de detección ni cuantificación y sus resultados son altamente reproducibles (Wang et al., 2009). La posibilidad de obtención de lecturas *de novo* permite que esta técnica sea aplicada a especies no modelo debido a que transcriptomas de referencia necesarios para la cuantificación de la expresión génica se pueden obtener inclusive aunque no haya información de secuencia previa (Pan et al., 2016). RNA-Seq tiene el poder de distinguir entre genes parálogos, de detectar transcritos poco abundantes y de permitir una cuantificación reproducible. Además, produce una cobertura completa proveyendo información de secuencia, polimorfismos de secuencia y estructura (Lister et al., 2009).

Entre todas las tecnologías de secuenciación actualmente disponibles en el mercado, la tecnología *Illumina* provee miles de *reads* de alta calidad y ofrece una alta cobertura especialmente útil para ensayos de RNA-Seq que requieren la detección y cuantificación de transcritos poco abundantes (Lister et al., 2009; Gaines et al., 2014).

Existen varias estrategias de RNA-Seq. En cuanto al sentido de lectura de la hebra, podemos distinguir la secuenciación *stranded* (datos hebra-específicos que aportan información acerca de la direccionalidad del transcripto) y *no-stranded* (estrategia clásica donde se secuencia la doble hebra del ADNc y así se pierde información sobre el origen del transcripto). Por otro lado, en función del extremo de ARN que se secuencia, la estrategia *pair-end* consiste en secuenciar ambos extremos (5' y 3') del ARN y permite la evaluación de patrones de *splicing* de exones distales de un transcripto a diferencia de la estrategia *single-end* (Lister et al., 2009).

El enorme número de genes de P450s, GSTs, ABCs y demás familias detoxificadoras en los genomas vegetales hace muy compleja su caracterización individual. Una posibilidad para descifrar el complejo control genético de la respuesta a herbicidas y los mecanismos NTSR es realizar una secuenciación global del transcriptoma. La tecnología RNA-Seq permite

detectar alteraciones en vías celulares y expresiones génicas, afiliaciones entre genes y sus productos y permite aislar genes para aquellos caracteres cuya bioquímica es altamente compleja (Malik, 2016). Se considera la herramienta más promisoría para la identificaciones de controles genéticos de caracteres complejos en plantas (Duhoux et al., 2015). Análisis de RNA-Seq fueron llevados a cabo para estudiar resistencia metabólica al herbicida diclofop en la maleza de interés mundial *L. rigidum* así como para el estudio de resistencia a inhibidores de AHAS en *L. rigidum* y *A. myosuroides*, encontrándose en todos los casos enzimas involucradas de las familias P450s, GSTs y GTs (Gaines et al., 2014; Duhoux et al., 2015; Gardin et al., 2015). Quince genes codificantes de enzimas de las familias antes nombradas, así como ABCs y esterasas, fueron identificados mediante la misma técnica y vinculados a la resistencia a fenoxaprop-P-etil en *Beckmannia syzigachne* (Pan et al., 2016).

Varios factores hacen crucial el entendimiento del mecanismo de resistencia vinculado al locus modificador *Imr2*. Por un lado, considerando la hipótesis de que está relacionado a mecanismos NTSR, este locus conferiría una resistencia cruzada a herbicidas con diferentes modos de acción incluyendo aquellos aún no comercializados. Elucidar sus bases moleculares permitiría evaluar las condiciones para la máxima eficiencia del herbicida en uso y establecer estrategias integradas de manejo de malezas para el cultivo de girasol. A su vez, permitiría desarrollar herramientas de detección y diagnóstico de la resistencia en cruzamientos de interés.

Poco se conoce sobre la resistencia metabólica a nivel genómico y genético y pocos genes relacionados a la detoxificación de herbicidas fueron caracterizados (Yu y Powles, 2014a; Pan et al., 2016). La identificación de genes involucrados en mecanismos NTSR es fundamental para entender la evolución de la resistencia y comprender procesos fisiológicos similares útiles para fitorremediación. La identificación de los genes involucrados en la resistencia a IMI en girasol posibilitaría modificar su expresión en este cultivo aumentando los niveles de resistencia así como también permitiría introgresar mediante ingeniería genética esta fuente de resistencia a otros cultivos de interés.

## HIPÓTESIS ESPECÍFICA

En la fuente de resistencia Imisun existen mecanismos no relacionados al sitio de acción que contribuyen al metabolismo del herbicida imazetapir y que pueden ser caracterizados a través de análisis de perfiles de expresión de cDNA mediante: a) cDNA-AFLP y b) RNA-Seq.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Caracterizar el transcriptoma de dos genotipos de girasol resistente y susceptible a imidazolinonas, respectivamente y su respuesta al tratamiento con imazetapir mediante la técnica cDNA-AFLP.

1.1- Determinar la concentración óptima de herbicida imazetapir para el estudio del transcriptoma.

1.2- Determinar los tiempos de colecta post tratamiento con herbicida adecuados para el estudio del transcriptoma.

1.3- Evaluar los niveles de inhibición de la actividad AHAS *in vitro* durante los tiempos de colecta.

2- Analizar las diferencias en los niveles de expresión génica para el genotipo resistente en respuesta al tratamiento con imazetapir mediante la técnica TruSeq Stranded RNA-Seq.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CARACTERIZACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DE DOS GENOTIPOS DE GIRASOL RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A IMIDAZOLINONAS, RESPECTIVAMENTE EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON IMAZETAPIR MEDIANTE LA TÉCNICA cDNA-AFLP.

#### MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron las líneas endocriadas HA 425 (*Imr1Imr1Imr2Imr2*) y HA 89 (*imr1imr1imr2imr2*) de genotipos resistente y susceptible, respectivamente, cuya descripción y origen se detalló en el Capítulo 1.

#### HERBICIDA

Como inhibidor de AHAS se utilizó el herbicida de la familia de las imidazolinonas imazetapir cuyo ingrediente activo es ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il nicotínico).

#### CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

Se obtuvieron plantas de los dos genotipos por germinación de las cipcetas en multimacetas utilizando perlita como soporte inerte. El riego se realizó por capilaridad con una solución nutritiva formulada sobre la base salina de Murashige y Skoog (1962) al 25 % (solución nutritiva MS) y se incubó en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo ( $25 \pm 2$  °C y 16/8 hs luz/oscuridad).

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE HERBICIDA IMAZETAPIR PARA EL ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA

Se realizó un ensayo de planta entera para determinar la concentración óptima de herbicida para el análisis del transcriptoma. La concentración óptima también llamada *concentración discriminante* (R4P Network, 2016) es aquella en la cual todas las plantas susceptibles mueren mientras que las resistentes al herbicida exhiben un 100 % de supervivencia sin daño visible luego de ocho días de tratamiento.

Se obtuvieron plantas de los genotipos HA 425 y HA 89 mediante el protocolo descrito en la sección “Condiciones de crecimiento de las plantas” y los tratamientos con imazetapir (IMI) realizados en plántulas de ocho días fueron:

I) control (solución nutritiva MS)

II) IMI 0,7  $\mu\text{M}$

III) IMI 1  $\mu\text{M}$

IV) IMI 1,8  $\mu\text{M}$

V) IMI 3,3  $\mu\text{M}$

VI) IMI 6,6  $\mu\text{M}$

**N Total: 720 plantas**

## DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental fue en bloques completamente aleatorizados con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en diez plantas. Las variables evaluadas sobre plantas en estadio V2 (dos hojas verdaderas) cumplidos 15 días de crecimiento fueron:

- área total foliar total (AFT)
- peso seco foliar (PSF)
- longitud foliar total (LFT)
- índice de coloración de las hojas (*hue*)

Se generaron imágenes digitales de las plantas correspondientes a cada tratamiento utilizando un escáner de mesa. Estas imágenes fueron analizadas mediante el programa *Tomato Analyzer*® (Rodríguez et al., 2010) obteniéndose los datos de AFT, LFT y *hue* (Figura 2a). El índice de coloración de las hojas *hue* corresponde a un índice de nivel de clorosis cuantificado mediante el análisis *Tomato Analyzer Color Test* (TACT) de la herramienta

bioinformática *Tomato Analyzer*®. Las hojas escaneadas fueron almacenadas por siete días en estufa a 70 °C para cuantificar el PSF.

Los datos se expresaron como promedio de las diez plantas. Se efectuaron pruebas de normalidad y homogeneidad de variancia y se realizaron análisis de la variancia (ANOVA) por genotipo. El modelo del ANOVA es el siguiente:

$$y_{ki} = \mu + \beta_k + \tau_i + \varepsilon_{ki}$$

donde:

$y_{ki}$ : valor observado para la variable  $y$  en la  $i$ -ésima concentración de herbicida imazetapir, en la  $k$ -ésima repetición

$\mu$ : media general

$\beta_k$ : efecto de  $k$ -ésimo bloque

$\tau_i$ : efecto de la  $i$ -ésima concentración de herbicida imazetapir

$\varepsilon_{ki}$ : error experimental

variando:

$k$ : 1 – r

$i$ : 1 – a

Se consideraron efectos fijos de herbicida y la tabla de ANOVA es la siguiente:

Fuente de variación	g.l.	C.M.	E (C.M.)
Bloque	$(r - 1)$		
Herbicida IMI	$(a - 1)$	$CM_2$	$\sigma^2 + r\sum\tau_i^2 / (a-1)$
Error	$(r - 1)(a - 1)$	$CM_1$	$\sigma^2$
Total	$(ra) - 1$		

El cuadrado medio error ( $CM_1$ ) fue utilizado como denominador en las pruebas de F de significación de los cuadrados medios.

Las comparaciones de medias se efectuaron a través de la prueba de Tukey (Sokal y Rohlf, 1962). Como herramienta informática de análisis se utilizó el programa estadístico R (R Development Core Team, 2010).

### DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE COLECTA POST TRATAMIENTO CON HERBICIDA ADECUADOS PARA EL ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA

Para evaluar el crecimiento foliar en el tiempo (inhibición del crecimiento por efectos del herbicida) y determinar la duración del tratamiento con herbicida para el posterior análisis cDNA-AFLP, se obtuvieron plantas mediante el protocolo antes descrito en la sección “Condiciones de crecimiento de las plantas”. Los riegos con IMI 1  $\mu\text{M}$  se realizaron sobre plántulas de ocho días (dos hojas verdaderas). Se evaluó el crecimiento foliar en los siguientes días: 0 (antes del tratamiento con IMI), 1, 2, 3 y 4 luego del tratamiento. El tratamiento continuó hasta el día 10 como medida control del crecimiento. Las variables evaluadas fueron:

- área total foliar total (AFT)
- longitud foliar total (LFT)
- índice de coloración (*hue*)

El diseño experimental fue en bloques completamente aleatorizados con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en diez plantas. El procesamiento de imágenes y análisis de las variables se llevó a cabo como se indica en la sección anterior.

Los datos se expresaron como promedio de las diez plantas. Se efectuaron pruebas de normalidad y homogeneidad de variancia y se realizaron análisis de la variancia (ANOVA) por genotipo. El modelo del ANOVA es el siguiente:

$$y_{ki} = \mu + \beta_k + \tau_i + \varepsilon_{ki}$$

donde:

$y_{ki}$ : valor observado para la variable  $y$  en la  $i$ -ésima concentración de herbicida imazetapir, en la  $k$ -ésima repetición

$\mu$ : media general

$\beta_k$ : efecto de  $k$ -ésimo bloque

$\tau_i$ : efecto del  $i$ -ésimo tiempo de colecta

$\varepsilon_{ki}$ : error experimental

variando:

k: 1 – r

i: 1 – a

Se consideraron efectos fijos de tiempos de colecta y la tabla de ANOVA es la siguiente:

Fuente de variación	g.l.	C.M.	E (C.M.)
Bloque	(r – 1)		
Tiempos de colecta	(a – 1)	CM <sub>2</sub>	$\sigma^2 + r\sum\tau_i^2 / (a-1)$
Error	(r -1)(a – 1)	CM <sub>1</sub>	$\sigma^2$
Total	(ra) - 1		

El cuadrado medio error (CM<sub>1</sub>) fue utilizado como denominador en las pruebas de F de significación de los cuadrados medios.

Las comparaciones de medias se efectuaron a través de la prueba de Tukey (Sokal y Rohlf, 1962). Como herramienta informática de análisis se utilizó el programa estadístico R (R Development Core Team, 2010).

## EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD AHAS *IN VITRO* DURANTE LOS TIEMPOS DE COLECTA

Para evaluar el grado de inhibición de la enzima AHAS en los tiempos de colecta elegidos se realizó un ensayo de actividad *in vitro* el cual permite dosar el producto de la enzima AHAS, acetolactato.

Se obtuvieron plantas mediante el protocolo antes descrito en la sección “Condiciones de crecimiento de las plantas”. Los riegos con IMI 1  $\mu\text{M}$  se realizaron sobre plántulas de ocho días (dos hojas verdaderas) y se colectaron ambas hojas del par luego de 12 hs, 18 hs y 24 hs de tratamiento IMI 1  $\mu\text{M}$ . También se colectaron hojas bajo tratamiento control (solución MS). Para cada tiempo se pesaron las hojas y se congelaron inmediatamente en  $\text{N}_2$  líquido: una hoja del par se guardó a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para posterior extracción del ARN destinado a los ensayos de cDNA-AFLP y RNA-seq; la segunda hoja se utilizó para el presente ensayo de AHAS *in vitro*. Las hojas se procesaron en microtubos de 2 ml con micropilón hasta obtener un polvo fino. El polvo obtenido para cada hoja se homogeneizó en un buffer de extracción/reacción (relación buffer/tejido de 5 ml/g):

50 mM ácido N-2-hidroxi-etilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) pH=7,5

200 mM piruvato de sodio

20 mM cloruro de magnesio,  $\text{MgCl}_2$

2 mM tiamín difosfato, TPP

20  $\mu\text{M}$  flavina adenina dinucleótido, FAD

PVPP (polivinilpolipirrolidona) como secuestrante de fenoles en una relación 6:1

Luego se centrifugó dos veces por 10 min a 12000 rpm a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , se recuperó el sobrenadante y se incubó el extracto crudo a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por 60 min. El extracto se dividió en dos alícuotas de 70  $\mu\text{l}$  cada una. Una de las alícuotas fue utilizada para la decarboxilación del acetolactato a acetoína (tubo de determinación), por lo tanto se le agregaron 20  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 M para lograr el medio ácido necesario para que ocurra la reacción. A la alícuota restante, considerada como control de producción de acetoína endógena, se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de hidróxido de sodio (NaOH) 2,5 M (tubo control). Ambas alícuotas fueron incubadas 15 min a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ .

**DETERMINACIÓN DEL PRODUCTO POR REACCIÓN COLORIMÉTRICA**

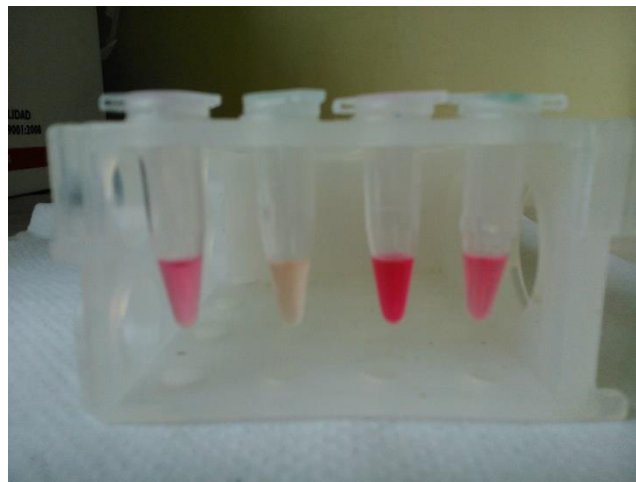
El dosaje de acetoina se realizó por la reacción de Westerfeld (1945). Se agregaron 135  $\mu$ l de una solución de creatina (0,25 % m/v) y  $\alpha$ -naftol (2,5 % m/v) preparado en hidróxido de sodio (NaOH) 2,5 M justo antes de ser utilizados y se incubó a 60 °C 15 min. Se centrifugó por 10 min a 10000 rpm (a temperatura ambiente) y se recuperó el sobrenadante (200  $\mu$ l). Se midió absorbancia a 530 nm (Figura 2.2). Se calculó el valor  $\delta$ Abs:

$$\delta\text{Abs (mg tejido)}^{-1} = \text{Abs}_{530\text{nm (+)}} - \text{Abs}_{530\text{nm (-)}}$$

donde:

$\text{Abs}_{530\text{nm (+)}}$ : valor de absorbancia correspondiente al tubo de determinación.

$\text{Abs}_{530\text{nm (-)}}$ : valor de absorbancia correspondiente al tubo control.



**Figura 2.2.** Reacción colorimétrica para medición de acetoina. De izquierda a derecha: genotipo resistente (tratamiento control MS e IMI 1  $\mu$ M, respectivamente), genotipo susceptible (tratamiento control MS e IMI 1  $\mu$ M, respectivamente).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Se realizaron tres repeticiones para cada combinación de tratamientos (genotipo, tiempo de colecta y tratamiento) y los datos de absorbancia  $\delta\text{Abs}$  (mg tejido)<sup>-1</sup> se expresaron en porcentaje respecto del tratamiento control MS. Se efectuaron pruebas de normalidad y homogeneidad de variancia y las diferencias de medias de tratamientos IMI y control MS se analizaron mediante pruebas *t* de *student* ( $p < 0,05$ ) utilizando como herramienta informática el programa estadístico R (R Development Core Team, 2010).

## cDNA-AFLP

Una vez elegidos la concentración óptima del herbicida, los tiempos de colecta del material vegetal y realizada la evaluación de inhibición de AHAS *in vitro*, se procedió a la elección de la combinación óptima de enzimas de restricción para la caracterización del transcriptoma y se procedió a realizar la metodología de cDNA-AFLP según el protocolo descrito por Vuylsteke et al. (2007) y Xiao et al. (2009).

### ELECCIÓN DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

La técnica cDNA-AFLP tiene como objetivo analizar la mayor cantidad de transcritos posibles en una muestra determinada optimizando la *cobertura*: fracción de secuencias que aparece al menos una vez en forma de fragmento posible de resolver (100 a 1000 pb). Una cobertura insuficiente puede impedir la detección de genes correlacionados con el carácter de interés. La mayor variación en la cobertura se explica por la elección de las enzimas de restricción, siendo este un punto crítico de la técnica (Stölting et al., 2009).

Para elegir la combinación óptima de enzimas de restricción se realizó un análisis de restricción *in silico* utilizando la aplicación libre *AFLPInSilico*<sup>a</sup> (Rombauts et al., 2003). Se evaluaron las zonas de corte de tres combinaciones distintas de enzimas de restricción sobre las etiquetas de secuencias expresadas (ESTs, *expressed sequence tag*) de girasol que se encuentran disponibles en la base de datos NCBI<sup>b</sup> (*National Centre for Biotechnology Information*) y los resultados se compararon con aquellos del estudio de optimización de variables para cDNA-AFLP realizado por Stölting et al. (2009).

---

<sup>a</sup> <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/aflpinsilico/>

<sup>b</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=sunflower>

## ENSAYO cDNA-AFLP

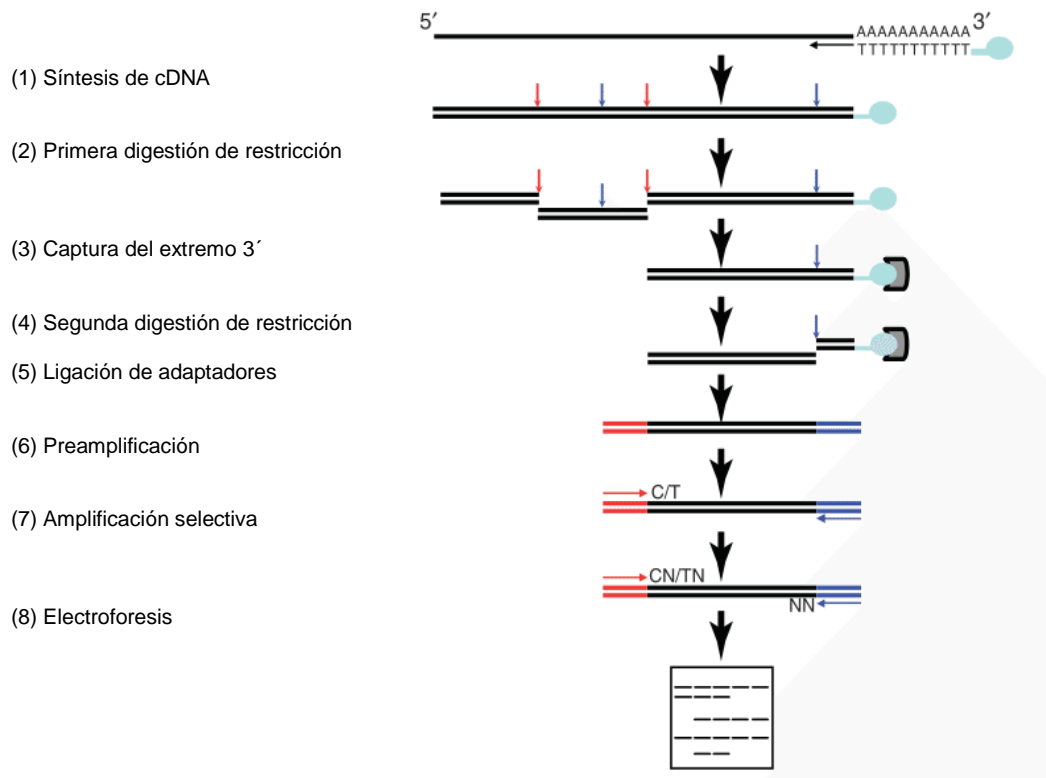
El material vegetal utilizado para la extracción del ARN se obtuvo como se describe en la sección “Evaluación de los niveles de inhibición de la actividad AHAS *in vitro* durante los tiempos de colecta”.

La variante de cDNA-AFLP utilizada fue *one gene - one tag* (Figura 2.3). Esta estrategia se adapta al método de cDNA-AFLP original (*one gene - multiple tag*) reduciendo el número de fragmentos AFLP por gen transcrito a una única secuencia, seleccionando el extremo 3' del fragmento de restricción de cada transcrito previo a la amplificación selectiva. Esta variante ofrece algunas ventajas sobre la original: (i) sólo se genera un fragmento derivado de transcrito (FDT) por transcrito, lo que incrementa la eficiencia de cobertura del transcriptoma que se define como la fracción del transcriptoma cubierto dada una cantidad determinada de recursos y dada una combinación de cebadores usada (ii) disminución en el número total de fragmentos analizados por electroforesis, simplificando el análisis de los resultados (iii) los FDT derivados del fragmento de restricción 3' se ven menos afectados a la variación por una incompleta retrotranscripción de los ARN mensajeros (ARNm), disminuyendo así el número de templados de ADNc necesarios para obtener un análisis reproducible (Vuylsteke et al., 2007).

## EXTRACCIÓN DE ARN

La preparación de ARN total se realizó a partir de tejido foliar utilizando el kit comercial *PureLink RNA Mini Kit* (Life Technologies).

De acuerdo a las instrucciones del proveedor, se disgregó el tejido con micropilón evitando el descongelamiento y se agregaron 600 µl de buffer *Lysis Buffer* (isotiocianato de guanidina) preparado en 2-mercaptoetanol (1 % v/v). Se dispersó completamente el pellet en agitador vórtex y se logró la lisis de las células. Se realizó un spin de centrifuga (3000 g 1 min) y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó a 12000 g (10000 rpm) por 2 min y el sobrenadante (400 µl) se transfirió a un tubo libre de ARNasa (nucleasa de ARN).



**Figura 2.3.** Estrategia *one gene - one tag* derivada de la metodología original de cDNA-AFLP. Adaptado de Vuylsteke et al. (2007).

Se agregaron 400 µl de etanol 70 % v/v, se dispersaron precipitados en agitador vórtex y se transfirieron 700 µl de la muestra al filtro *Spin Cartridge* colocado en un tubo *Collection Tube*. Luego de centrifugar a 12000 g por 15 seg a temperatura ambiente, se descartó el líquido del tubo *Collection Tube* y se reinsertó al filtro *Spin Cartridge*. Se agregaron 700 µl de buffer *Wash Buffer I* al filtro *Spin Cartridge* en tubo *Collection Tube* y se centrifugó a 12000 g por 15 seg a temperatura ambiente. Se descartó el tubo *Collection Tube*.

Se realizó un tratamiento con DNasa en columna. Para ello se agregaron 80 µl de preparación DNasa I (DNasa I 3 U/µl) sobre el filtro *Spin Cartridge* y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 350 µl de buffer *Wash Buffer I* y se centrifugó a 12000 g por 15 seg. Se descartó el líquido y se colocó el mismo tubo *Collection Tube*.

Finalmente, para eluir el ARN se agregaron 500 µl de buffer *Wash Buffer II* en etanol 80 % v/v por el centro del filtro *Spin Cartridge*. Luego de centrifugar a 12000 g por 15 seg a temperatura ambiente y descartar el sobrenadante se centrifugó a 12000 g por 2 min para secar la membrana de sílica embebida con el ARN. Se agregaron 100 µl de agua *RNase Free Water* por el centro del filtro *Spin Cartridge*, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó por 2 min a 13000 g a temperatura ambiente para eluir el ARN de la membrana hacia el tubo *Recovery Tube*. El ARN se almacenó a -80 °C.

### CUANTIFICACIÓN Y CHEQUEO DE INTEGRIDAD DEL ARN

La cuantificación de la concentración del ARN se realizó por espectrofotometría (ng/µl) y se calcularon las proporciones:  $A_{260}/A_{280}$  (indicador de contaminación proteica) y  $A_{260}/A_{230}$  (indicador de contaminación fenólica y/o de guanidina).

Los chequeos de integridad del ARN se realizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % teñido con *SYBR®Safe* (Invitrogen) y posterior análisis en transiluminador de mesa (Invitrogen Safe Image 2.0).

### RETROTRANSCRIPCIÓN

El ARN de concentración inicial 0,1 µg/µl se utilizó como molde en reacciones de retrotranscripción con oligos dT<sub>25</sub> biotinilados y enzimas transcriptasa reversa *Superscript II* (Invitrogen) y *ADN polimerasa I* (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. Como primer paso se incubó a 65 °C por 5 min la siguiente mezcla:

ARN (0,1 µg/µl)	11 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
oligo(dT) biotinilados (100 µM)	1 µl

La mezcla se mantuvo en hielo. A continuación se incubó 2 min a 42 °C con:

<i>First Strand Buffer</i> 5X	5 µl
ditiotreitól (DTT, 0,1M)	2 µl

Se agregó 1 µl de enzima transcriptasa reversa *Superscript II* (50 U/µl) y se incubó 2 hs a 42 °C y luego 15 min a 70 °C.

Posteriormente se agregaron 140 µl de la mix de síntesis de la segunda hebra:

Buffer 10X 2da hebra (buffer de la ligasa)	16 µl
dNTPs (10mM)	3 µl
ribonucleasaH (2 U/ul)	0,8 µl
DNA pol I (10 U/ul)	3,5 µl
H <sub>2</sub> O miliQ estéril	116,7 µl

Se incubó 1 hs a 12 °C y luego 1 hs a 22 °C. El ADN copia (ADNc) sintetizado fue conservado a -20 °C.

#### **PURIFICACIÓN DEL ADNc**

La purificación de ADNc se realizó utilizando el kit *Nucleospin Extract II* (Macherey Nagel). De acuerdo a las instrucciones del proveedor, se mezclaron 320 µl de buffer *NT* con 160 µl de la mezcla de la reacción de la segunda hebra. Se cargó la muestra en una columna *NucleoSpin Extract II* y se centrifugó por 1 min a 11,000 g. Se desechó el filtrado y se añadieron 600 µl de buffer *Wash Buffer NT3* en etanol 80 % v/v. Se centrifugó por 2 min a 11,000 g para remover buffer *NT3* y se dejaron abiertos los tubos unos segundos para eliminar trazas de etanol. Se añadieron 30 µl de buffer *NE* de elución y se incubó a temperatura ambiente por 1 min. Se centrifugó por 1 min a 11,000 g.

#### **PRIMERA DIGESTIÓN CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN**

Se incubó la primera enzima de restricción *CviA II* (10 U/µl) con el ADNc por 2 hs a 25 °C mezclando suavemente en termociclador. Se añadieron 40 µl de esferas magnéticas *Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles* (Promega) previamente lavadas y resuspendidas a cada muestra de ADNc digerida y se incubó a temperatura ambiente por 30 min en agitación suave. En soporte magnético *MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand* (Promega) se eliminó el sobrenadante con pipeta (Figura 2.4) y se

resuspendieron las esferas en 100  $\mu$ l de buffer 1X STEX. Se repitió este paso cuatro veces y se resuspendieron las esferas en 30  $\mu$ l de buffer TE (10:01).



**Figura 2.4.** Incubación sobre soporte magnético de esferas magnéticas, ADNc y primera enzima de restricción.

#### **SEGUNDA DIGESTIÓN CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN**

Se incubó la segunda enzima de restricción *Mse* I (10 U/ $\mu$ l) con las esferas previamente resuspendidas por 2 hs a 37 °C con agitación suave. En soporte magnético, se transfirió el sobrenadante compuesto de fragmentos de templados liberados a un tubo limpio.

#### **LIGACIÓN DE ADAPTADORES**

Se purificaron los fragmentos digeridos y se los ligó a los adaptadores correspondientes mediante *T4 DNA ligasa* (Promega). Se incubó durante toda la noche a 4 °C. En la Tabla 2.1 se indican las secuencias de los adaptadores correspondientes a las dos enzimas de restricción.

**Tabla 2.1.** Secuencias de los adaptadores correspondientes a las enzimas de restricción *CviA II* y *Mse I* utilizadas en el ensayo cDNA-AFLP expresadas en sentido 5´- 3´del ADN.

Enzima de restricción	Adaptador	Secuencia 5´- 3´
<i>CviA II</i>	> <i>CviAII</i> _Forward	CTCGTAGACTGCGTACC
	> <i>CviAII</i> _Reverse	ATGGTACGCAGTCTAC
<i>Mse I</i>	> <i>MseI</i> _Forward	GACGATGAGTCCTGAG
	> <i>MseI</i> _Reverse	TACTCAGGACTCAT

#### PRE-AMPLIFICACIÓN

La pre-amplificación por PCR se realizó con cebadores específicos y *DNA polimerasa GoTaq* (Promega). En la Tabla 2.2 se indican las secuencias de los cebadores correspondientes a las dos enzimas de restricción.

**Tabla 2.2.** Secuencias de los cebadores correspondientes a las enzimas de restricción *CviA II* y *Mse I* utilizadas para el paso de pre-amplificación en el ensayo cDNA-AFLP expresadas en sentido 5´- 3´ del ADN.

Enzima de restricción	Cebador	Secuencia 5´- 3´
<i>CviA II</i>	> <i>CviAII</i> _preprimer	CTCGTAGACTGCGTACCAT
<i>Mse I</i>	> <i>MseI</i> _preprimer	GACGATGAGTCCTGAGTAA

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl:

> <i>Cvi</i> All_preprimer (10 µM)	0,4 µl
> <i>Mse</i> I_preprimer (10 µM)	0,4 µl
dNTP (10 mM)	0,4 µl
Buffer 5X	4 µl
GoTaq (5 U/ul)	0,2 µl
agua destilada estéril (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> )	13,6 µl
ADNc + adaptadores	1 µl

Las condiciones térmicas de las reacciones de PCR fueron las siguientes:

- paso inicial de desnaturalización: 5 min a 95 °C
- 30 ciclos: 30 seg a 94 °C (desnaturalización)
  - 30 seg a 55 °C (hibridación)
  - 1 min a 72 °C (elongación)
- paso final de elongación: 10 min a 72 °C

### **AMPLIFICACIÓN SELECTIVA**

Se diluyeron las pre-amplificaciones (factor de dilución: 3) y se incubaron con las distintas combinaciones de cebadores selectivos y *DNA polimerasa GoTaq* (Promega) seguida de una amplificación por PCR. En la Tabla 2.3 se indican las secuencias de los cebadores correspondientes a las dos enzimas de restricción

**Tabla 2.3.** Secuencias de los cebadores correspondientes a las enzimas de restricción *CviA II* y *Mse I* utilizadas para el paso de amplificación selectiva en el ensayo cDNA-AFLP expresadas en sentido 5´-3´ del ADN.

Enzima de restricción	Cebador	Secuencia 5´- 3´
<i>CviA II</i>	> <i>CviAII_selprimerA</i>	GACTGCGTACCATGA
	> <i>CviAII_selprimerC</i>	GACTGCGTACCATGC
	> <i>CviAII_selprimerG</i>	GACTGCGTACCATGG
	> <i>CviAII_selprimerT</i>	GACTGCGTACCATGT
<i>Mse I</i>	> <i>Msel_selprimerA</i>	GATGAGTCCTGAGTAAA
	> <i>Msel_selprimerC</i>	GATGAGTCCTGAGTAAC
	> <i>Msel_selprimerG</i>	GATGAGTCCTGAGTAAG
	> <i>Msel_selprimerT</i>	GATGAGTCCTGAGTAAT

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl:

Cebador selectivo 1 (10 µM)	0,2 µl
Cebador selectivo 2 (10 µM)	0,2 µl
dNTP (10 mM)	0,2 µl
Buffer 5X	2 µl
GoTaq (5 U/ul)	0,2 µl
agua destilada estéril (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> )	6,2 µl
dil. pre-amplificación ADNc	1 µl

Las condiciones térmicas de las reacciones de PCR fueron las siguientes:

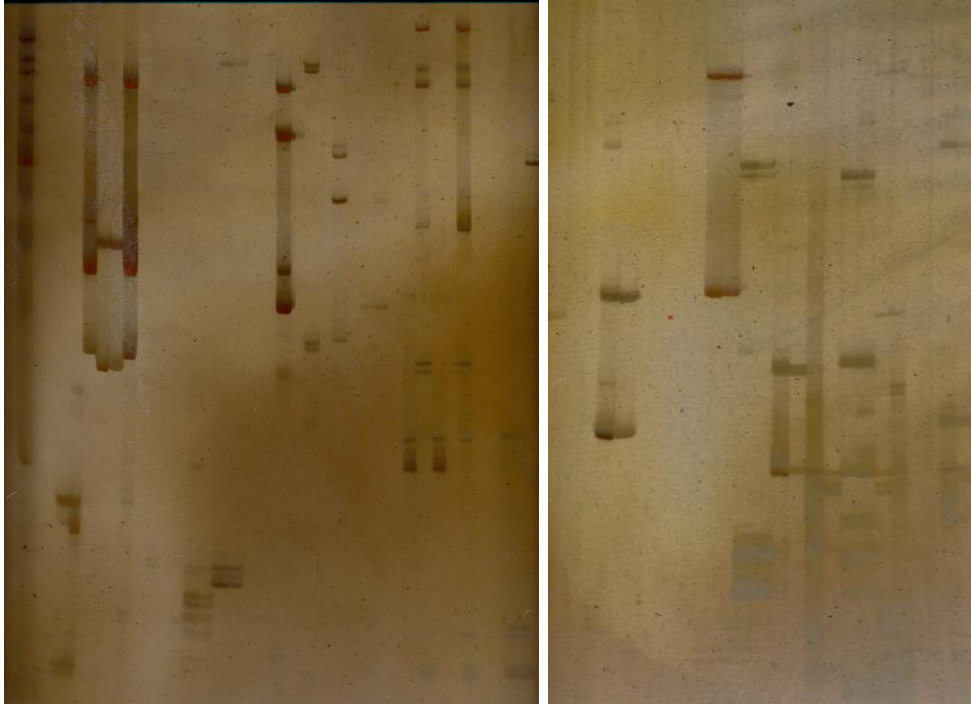
- paso inicial de desnaturalización: 5 min a 95 °C
- 12 ciclos de: 30 seg a 94 °C (desnaturalización)  
30 seg a 65 °C, bajando 0,7 °C cada ciclo (hibridación)  
1 min a 72 °C (elongación)
- 30 ciclos de: 30 seg a 94 °C  
30 seg a 55 °C  
1 min a 72 °C
- paso final de elongación: 10 min a 72 °C

#### **RESOLUCIÓN DE FRAGMENTOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA**

Los fragmentos de amplificación obtenidos se separaron en geles de poliacrilamida 5 % m/v. Luego de la preparación con soluciones *Bind Xilano* y *Repel Xilano* para el vidrio de retención y el vidrio de contención, respectivamente, se procedió a cargar la solución acrilamida/bisacrilamida 5 % m/v en TBE 0,5X conteniendo persulfato de amonio (PSA) 10 % m/v y TEMED. Posteriormente se colocaron los peines.

A las muestras provenientes de las amplificaciones selectivas se les agregó buffer *Loading Buffer* azul y se desnaturalizaron en termociclador (5 min a 94 °C). Una vez el gel en la cuba de corrida, se sembraron 3 µl de cada muestra en paralelo a la siembra de un marcador de peso molecular de 100 pb. La electroforesis se realizó en soluciones de corrida de TBE 0,5X y 1X (1 hs 40 min a 1300 V).

Una vez finalizada la corrida el gel se incubó en solución fijadora (ácido acético glacial 10 % v/v) por 20 min en agitación suave, se realizaron tres lavados con agua destilada y se incubó el gel en solución de tinción (AgNO<sub>3</sub> y formaldehído). Tapado, se mantuvo en agitación por 30 min con luz apagada. Luego de un lavado con agua destilada por 10 seg se sumergió en solución de revelado frío conteniendo carbonato de sodio (NaCO<sub>3</sub>), tiosulfato (10 mg/ml) y formaldehído (37 % v/v) hasta visualizar las bandas. Para cortar la tinción se incubó el gel en solución fijadora y se dejó secar por 24 hs para luego proceder al escaneo (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Geles de poliacrilamida 5 % m/v teñidos con  $\text{AgNO}_3$ .

Aquellos fragmentos que mostraron expresión diferencial se aislaron del gel y se incubaron 4 hs a 37 °C con agitación en buffer de elución acetato de amonio ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) 0,5 M y ácido etilendiamíntetraacético (EDTA) 1 mM. Mediante centrifugación se eliminaron las bandas de poliacrilamida y posteriormente se reamplificaron. Para confirmar la especificidad de la amplificación, los productos de PCR obtenidos fueron enviados para su secuenciación a *Macrogen Inc. Korea*<sup>a</sup>.

Se asignaron potenciales categorías funcionales mediante búsquedas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)<sup>b</sup> contra bases de datos de nucleótidos, ESTs y proteicas en NCBI y se realizaron alineaciones locales contra el transcriptoma ensamblado *de novo* HaT13I.

---

<sup>a</sup> <http://www.macrogen.com/eng/>

<sup>b</sup> [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

## VALIDACIÓN MEDIANTE RTqPCR

Los resultados se validaron mediante la técnica PCR cuantitativa seguida de transcripción reversa (RTqPCR, *reverse transcription quantitative PCR*) para tres genes de interés y un gen de referencia seleccionados del mismo ensayo de cDNA-AFLP. Idealmente un gen de referencia debe expresarse en todas las células del organismo, debe expresar un número constante de copias en el tiempo y en los diferentes tejidos y sus niveles de expresión deben ser similares a aquellos de los genes que se desea validar. El gen de referencia se eligió debido a su estabilidad en la expresión durante el ensayo de cDNA-AFLP.

Se diseñaron cebadores específicos con la herramienta *Primer3* (web v 4.0.0)<sup>a</sup> (Rozen y Skaletsky, 2000). Los parámetros establecidos para el diseño incluyeron una longitud de los cebadores de entre 18 y 23 nucleótidos, un contenido de GC de 30 a 70 % y una temperatura de hibridación (*annealing*) de 57 a 62 °C. Los oligonucleótidos se sintetizaron en *Macrogen Inc. Korea*. Los cebadores diseñados para cada uno de los genes se muestran en la Tabla 2.4.

Las RTqPCR se llevaron a cabo en un termociclador *Rotor-Gene® Q with HRM- High Resolution Melting* (Qiagen) y analizados con el software propio del equipo *Rotor-Gene Q Series Software 1.7* (Build 94, Copyright © 2008 Corbett Life Science).

Las retrotranscripciones se realizaron utilizando el kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega) y las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en presencia de SYBR green (Mezcla Real®, Biodynamics) en un volumen de 15 µl incluyendo los siguientes reactivos:

ADNc (25 a 40 ng/reacción)	2 µl
Cebador directo (10 µM)	1 µl
Cebador reverso (10 µM)	1 µl
Mezcla Real 2X (Biodynamics)	7,5 µl
agua destilada estéril (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> )	3,5 µl

<sup>a</sup> <http://bioinfo.ut.ee/primer3-4.0.0/primer3/>

**Tabla 2.4.** Cebadores específicos para validar mediante RTqPCR cuatro genes de interés y un gen de referencia obtenidos en el ensayo cDNA-AFLP.

Gen a validar	Cebador	Secuencia 5´- 3´
transportador ABC	>75LeftP	CGCCGTGATCTGACTTTAGC
	>75RightP	CCGATGCCTCTAATCATTTCGC
glicosiltransferasas	>62LeftP	CTCTCCAACGAACCTCCTCC
	>62RightP	TATTTTGTTCCTCCGCCCTCT
	>71A_1_20LeftP	CCAATGCTGACTATGCCTGAG
	>71A_1_20RightP	GAGGGAAACTTCGGAGGGAA
gen de referencia	>58LeftP	GGTTGATAAGGAGACGATTGAGT
	>58RightP	ACCATTAAGCTATCAGTACCTCC

Se realizaron dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por cada muestra y se incorporaron controles negativos a los que no se les agregó ADNc. El protocolo de ciclado fue:

- paso inicial de desnaturalización: 2 min a 94 °C
- 40 ciclos: 15 seg a 95 °C (desnaturalización)
  - 30 seg a Tm °C (hibridación)
  - 40 seg a 72 °C (elongación)
- paso final de elongación de 10 min a 72 °C

El valor de Tm en el paso de hibridación se ajustó para cada par de cebadores y varió entre 61° C y 62° C. La curva de fusión del producto de amplificación se construyó al final del ciclado mediante ciclos de 5 seg desde 72 °C a 95 °C aumentando la temperatura 0,2 °C luego del segundo ciclo.

Para la cuantificación relativa de los transcritos se tomaron los valores de ciclo de cuantificación ( $C_q$ , *quantification cycle*) y los valores de eficiencia de reacción ( $E$ ) calculados y denominados *comparative quantitation* por el programa del *Rotor-Gene Q software* (versión 1.7.94).

La expresión normalizada ( $EN$ ) fue calculada para cada gen teniendo en cuenta la eficiencia ( $E$ ) de la reacción y los valores de  $C_q$  tanto para el gen de interés (*goi*) como para el gen de referencia (*ref*), considerando un promedio de eficiencia para cada amplicón (Simon, 2003; Schefe et al., 2006):

$$EN = \frac{(E_{ref})^{C_{qref}}}{(E_{goi})^{C_{qgoi}}}$$

Para la cuantificación relativa de los genes la expresión normalizada se expresó como relativa al valor de  $EN$  más bajo de la corrida. Se realizaron pruebas  $t$  de *student* para el análisis de comparación de las medias de expresión relativa utilizando el programa estadístico R (R Development Core Team, 2010).

## **ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON IMAZETAPIR MEDIANTE LA TÉCNICA TRUSEQ STRANDED RNA-SEQ**

El material vegetal utilizado para la extracción del ARN se obtuvo como se describe en la sección “Evaluación de los niveles de inhibición de la actividad AHAS *in vitro* durante los tiempos de colecta”. Se trabajó con el genotipo HA 425 resistente a IMI, dos réplicas biológicas para cada muestra y los tratamientos fueron:

- i) control (solución nutritiva MS)
- ii) imazetapir 1  $\mu$ M

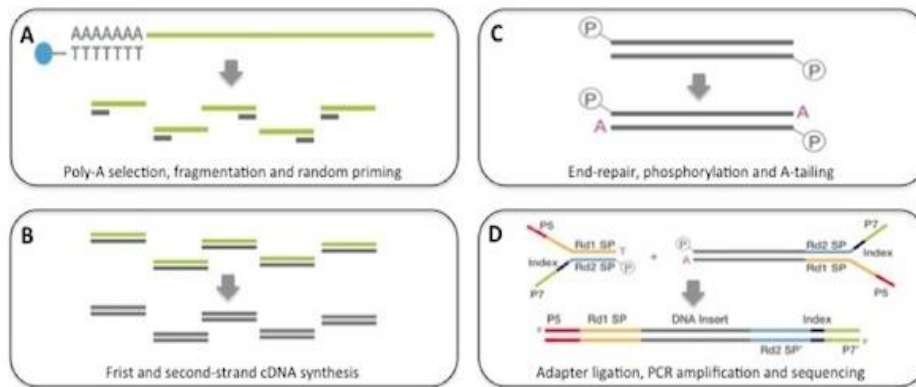
### **INTEGRIDAD Y CONCENTRACIÓN DEL ARN**

Se verificó la integridad y se estimó la concentración de cada muestra de ARN mediante la metodología *Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano* (Agilent Technologies). Una cuantificación más exacta de la concentración se realizó mediante *RiboGreen Fluostar Optima BMG* (BMG Labtech).

### **PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA DE ADNc**

La construcción de la biblioteca de ADNc lista para secuenciar se realizó mediante el kit *TruSeq Stranded mRNA* (Illumina). El tipo de biblioteca construida fue *stranded* (secuenciación única de la hebra codificante del ADNc) y *multiplex* (corrida de cuatro muestras por línea en la celda del secuenciador) (Figura 2.6).

La purificación del ARNm se realizó a partir de 1  $\mu$ g de ARN total con esferas magnéticas *RNA Purification Beads* portadoras de oligos dT. Se incubó por 5 min a 65 °C para desnaturalizar el ARN y eliminar estructuras secundarias y luego se mantuvo a 4 °C. Se incubó sobre mesada a temperatura ambiente durante 5 min y luego otros 5 min sobre soporte magnético.



**Figura 2.6.** Esquema de la construcción de la biblioteca de ADNc mediante el protocolo *TruSeq Stranded mRNA* (Illumina).

Se eliminó delicadamente el sobrenadante sin tocar las esferas y una vez fuera del soporte magnético las mismas se resuspendieron en 200  $\mu$ l de buffer *Bead Washing Buffer*. Se incubó 5 min sobre soporte magnético y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió en 50  $\mu$ l de buffer *Elution Buffer* y luego se incubó 2 min a 80 °C.

Se agregaron 50  $\mu$ l de buffer *Bead Binding Buffer* y se incubó 5 min sobre mesada y otros 5 min sobre soporte magnético. Se eliminó el sobrenadante y las esferas se resuspendieron en 200  $\mu$ l de buffer *Bead Washing Buffer*. Tras otros 5 min sobre soporte magnético y eliminación del sobrenadante, se agregaron 19,5  $\mu$ l de mix *Fragment, Prime, Finish* para fragmentación del ARNm e incubación con hexámeros aleatorios como cebadores. Se incubó 8 min a 94 °C y luego se llevó a 4 °C.

### SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DEL ADNc

Luego de 5 min sobre soporte magnético se tomaron 17  $\mu$ l de sobrenadante y se los incubó con 8  $\mu$ l de mix *SuperScript II + First Strand Synthesis mix ActD* en termociclador:

- 10 min a 25 °C
- 15 min a 42 °C
- 15 min a 70 °C
- mantener a 4°C

Se agregaron 5 µl de buffer *Resuspension Buffer*, 20 µl de *Second Strand Marking Master Mix* que contiene dUTPs y se incubó 1 hs a 16 °C. Luego se incubó a temperatura ambiente por 1 min.

Se agregaron 90 µl de esferas *AMPure XP*, se incubó 15 min sobre mesada y luego 5 min sobre soporte magnético. Se eliminaron 135 µl de sobrenadante y se lavaron las esferas incubando 30 seg con 200 µl de etanol 80 % v/v frío. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y para eliminar las trazas de etanol se incubó 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 17,5 µl de buffer *Resuspension Buffer*, se incubó 2 min sobre mesada y luego 5 min sobre soporte magnético.

### **ADENILACIÓN DEL EXTREMO 3'**

Se agregó un nucleótido adenina (A) a los extremos romos 3' para prevenir la formación de quimeras o fragmentos concatenados durante la reacción de ligación. Para ello, se transfirieron 15 µl de sobrenadante a tubo nuevo y se agregaron 2,5 µl de buffer *Resuspension Buffer* y 12,5 µl de *A-Tailing Mix*. Se incubó en termociclador:

- 30 min a 37 °C
- 5 min a 70 °C
- mantener a 4 °C

### **LIGACIÓN DE LOS ADAPTADORES**

Se agregaron 2,5 µl de buffer *Resuspension Buffer*, 2,5 µl de *Ligation Mix* y 2,5 µl de *RNA Adapter Index* correspondiente a cada muestra. Luego se incubó 10 min a 30 °C y se agregaron 5 µl de *Stop Ligation Buffer*. Se agregaron 42 µl de esferas *AMPure XP*, se incubó 15 min sobre mesada y otros 5 min en soporte magnético. Se eliminaron 79,5 µl de sobrenadante y se lavaron las esferas agregando 200 µl de etanol 80 % v/v frío, incubando 30 seg y eliminando el sobrenadante. Para eliminar las trazas de etanol se incubó 15 min a temperatura ambiente y fuera del soporte magnético se agregaron 52,5 µl de *Resuspension Buffer* y se incubó 2 min a temperatura ambiente. Otra vez en el soporte magnético se incubó 5 min y se transfirieron 50 µl de sobrenadante para incubar 15 min sobre mesada con 50 µl de esferas *AMPure XP* y otros 5 min en soporte magnético. Se eliminaron 95 µl de

sobrenadante y para lavar las esferas se agregaron 200 µl de etanol 80 % v/v frío, incubando 30 seg y eliminando el sobrenadante. Para eliminar las trazas de etanol se incubó 15 min sobre mesada y fuera del soporte magnético se agregaron 22,5 µl de *Resuspension Buffer*. Se incubó 2 min en mesada y 5 min en soporte magnético.

### **AMPLIFICACIÓN POR PCR**

A 20 µl del sobrenadante se agregaron 5 µl de *PCR Primer Cocktail* y 25 µl de *PCR Master Mix* y se incubó en termociclador:

- paso inicial de desnaturalización: 30 seg a 98 °C
- 15 ciclos: 10 seg a 98 °C (desnaturalización)
  - 30 seg a 60 °C (hibridación)
  - 30 seg a 72 °C (elongación)
- etapa final de elongación: 5 min a 72 °C
- mantener a 10 °C

Se agregaron 50 µl de esferas *AMPure XP* y se incubó 15 min sobre mesada y luego 5 min sobre soporte magnético. Se eliminaron 95 µl de sobrenadante y el lavado de las esferas se realizó agregando 200 µl de etanol 80 % v/v frío, incubando 30 seg y eliminando el sobrenadante. Para eliminar las trazas de etanol se incubó 15 min a temperatura ambiente y se agregaron 32,5 µl de *Resuspension Buffer*. Luego de 2 min en mesada, se incubó 5 min sobre soporte magnético. Se transfirieron 30 µl de sobrenadante (biblioteca de ADNc) a un tubo 1,5 ml.

### **VALIDACIÓN DE CALIDAD DE LA BIBLIOTECA**

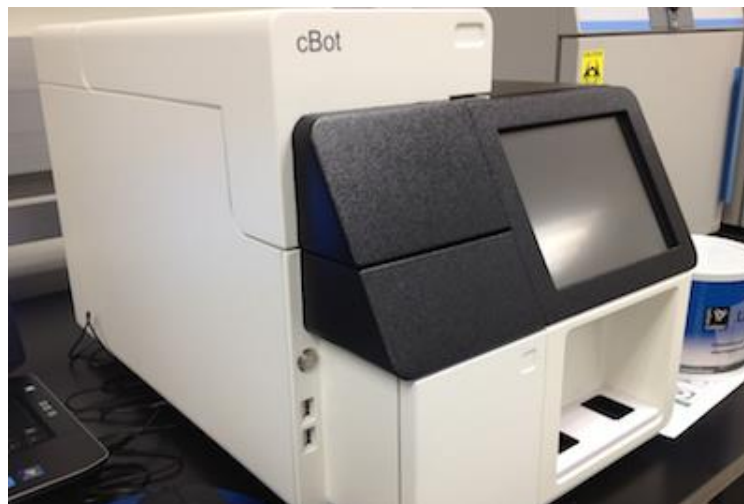
Se realizó la validación de tamaño y rendimiento de la biblioteca por migración en *Agilent Bioanalyzer DNA 1000* (Agilent Technologies) y la cuantificación de concentración mediante *RiboGreen Fluostar Optima BMG* (BMG Labtech) (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Validación de tamaño, rendimiento y concentración de la biblioteca de ADNc mediante *Agilent Bioanalyzer DNA 1000* (Agilent Technologies) y *RiboGreen Fluostar Optima BMG* (BMG Labtech).

## SECUENCIACIÓN

Mediante una amplificación en puente sobre la celda de secuenciación se clonó cada molécula simple de ADN simultáneamente generando los clusters de secuenciación en equipo *cBOT™* (Illumina) (Figura 2.8).

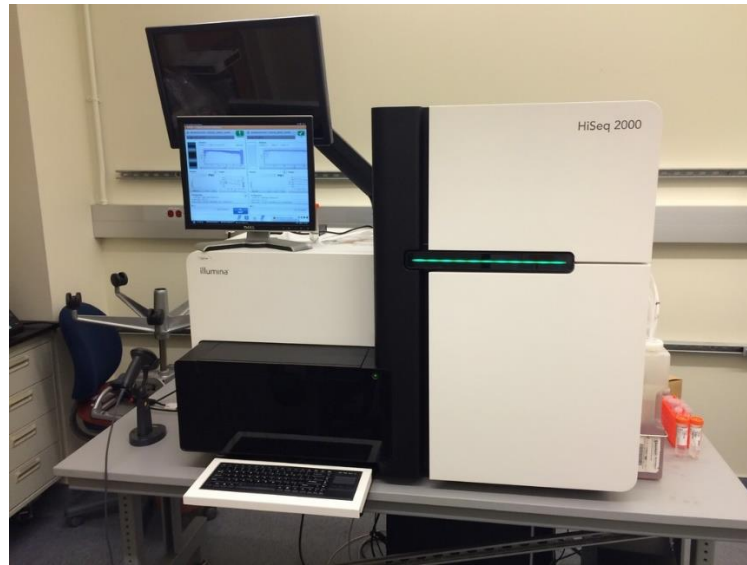


**Figura 2.8.** Generación de los clusters de secuenciación mediante cBOT™ (Illumina)

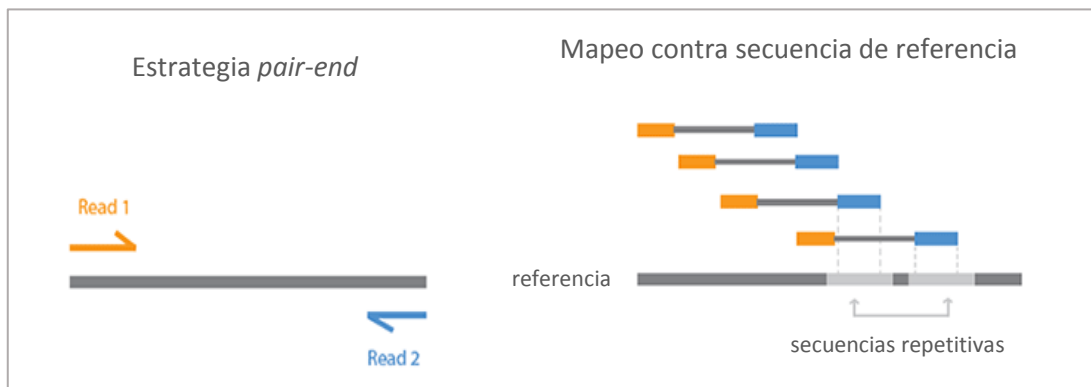
La secuenciación de las cuatro muestras se llevó a cabo en una única línea de un secuenciador de última generación *Illumina HiSeq2000* (Illumina) (Figura 2.9) utilizando adaptadores marcados para las distintas muestras. Se generaron aproximadamente 50 millones de *reads pair-end* (PE) por muestra de tamaño 100 pb. El número de *reads* por muestra, definido como el valor de cobertura del transcriptoma, se predeterminó desde la Plataforma de Transcriptómica y Secuenciación de l' *Unité de Recherche en Génomique Végétale* (URGV) del INRA/CNRS, Francia, donde se llevó a cabo el análisis.

Las condiciones de secuenciación fueron las siguientes:

- *Stranded*: se secuenció únicamente la hebra codificante del ADNc, aumentando la precisión del análisis.
- *Multiplex*: hubo cuatro muestras por línea en la celda del secuenciador eliminando toda variación técnica por posición.
- *Pair-end*: se obtuvo la secuencia de ambos extremos de cada cluster, 5' y 3', aumentando la especificidad del mapeo. En una misma corrida se obtiene doble información de secuencia de cada cluster y debido a que la distancia entre cada par de *read* es conocida, los algoritmos de alineamiento son mucho más específicos a la hora de enfrentar zonas repetitivas del transcriptoma de referencia (Figura 2.10).



**Figura 2.9.** Secuenciador de última generación *Illumina HiSeq2000* (Illumina) de la Plataforma de Transcriptómica y Secuenciación del URGV, INRA/CNRS, Francia.



**Figura 2.10.** Esquema de la secuenciación PE y el mapeo contra la referencia.

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Debido a que para el momento de realización del presente ensayo todavía no había concluido el proyecto SUNRISE de secuenciación del genoma de girasol, para realizar el mapeo de los *reads* se utilizó como referencia el transcriptoma de girasol *non redundant clusters* HaT13I gentilmente facilitado por el *Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organisms* LIPM, INRA/CNRS, Francia. Esta referencia resulta ideal debido a que es un ensamblado *de novo* a partir de secuenciaciones RNA-Seq de la línea de girasol XRQ desarrollada por el INRA, la cual está altamente emparentada con las líneas utilizadas en el presente trabajo de tesis. Para la elaboración del transcriptoma HaT13I se llevaron a cabo secuenciaciones en 13 líneas de un secuenciador *Illumina HiSeq2000* (Illumina) de muestras provenientes de tres tejidos vegetativos (hoja, raíz y tallo) y ocho tejidos florales (bráctea, lígula, ovario, estigma y estilo, antera, corola, semilla y polen) colectados a campo en cinco estadios de desarrollo diferentes. El ensamblado se realizó con las herramientas Velvet/Oasis y se obtuvieron 91860 *contigs* (90266 péptidos):

Transcriptoma <i>de novo</i> HAT13I	
<i>Contigs</i> *	
nº total	91860
longitud media (pb)	820
longitud total (Mb)	75,29
<i>contigs</i> ≥1000 pb	65870 (72 %)
N <sub>50</sub> (pb)**	557

\* *Contig*: superposición de *reads* que mapean en la misma región generando una secuencia consenso.

\*\* N<sub>50</sub> corresponde a la mediana de los tamaños de los *contigs* del transcriptoma ensamblado *de novo*. Dado un conjunto de *contigs*, N<sub>50</sub> se define como la longitud N para la cual 50 % de todas las bases de las secuencias corresponden a una secuencia de longitud L tal que L>N.

Previo al mapeo de las secuencias obtenidas contra el transcriptoma de referencia HaT13I se realizó una limpieza removiendo secuencias ribosomales y cortando las secuencias en presencia de bases no identificadas (Ns).

El mapeo se realizó utilizando la herramienta informática *Bowtie2* (versión 2.2.2) y los parámetros elegidos fueron:

- **MultiHits:** *presentes*, permite el estudio de la redundancia genómica ya que se logran visualizar aquellos *reads* que mapean con el mismo valor esperado (*E-value*, *expect value*) en varias regiones del transcriptoma de referencia. Particularmente útil en caso de organismos que poseen muchos homeólogos, duplicación génica o poliploidía. Sin embargo, la técnica pierde su poder de cuantificación de la expresión.

*ausentes*, permite una cuantificación exacta de la expresión.

- **Local:** se alinea parte del *read* (30 pb) de manera exacta y luego se analizan las bases circundantes para determinar el porcentaje del *read* que mapea con la referencia (porcentaje de bases mapeadas respecto del número total de bases del *read*). Permite mayor flexibilidad que el mapeo *end-end* o mapeo perfecto del *read* y es especialmente útil cuando el transcriptoma de referencia no corresponde al mismo organismo o genotipo de trabajo.

La cuantificación de los *reads* fue realizada utilizando el paquete *Sam2Count* (versión 2.2.2).

## ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

El análisis de calidad de los datos de secuenciación se realizó mediante la herramienta *FastQC* (v0.10.1).

Para la normalización de los datos se utilizó el método *TMM* (*trimmed mean of M-values*). Este método estima niveles relativos de ARN calculando factores escalares entre las muestras utilizando la función *calcNormFactors* del paquete *EdgeR* (v2.4.6) del software estadístico R (v3.1.0) (R Development Core Team, 2010).

El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo utilizando el paquete *EdgeR* (v2.4.6).

## VALIDACIÓN MEDIANTE RTqPCR

Se eligieron 17 *contigs* de interés pertenecientes a familias de genes vinculadas a mecanismos NTSR para validar sus niveles de expresión mediante RTqPCR. Además, se seleccionaron dos *contigs* para utilizar como genes de referencia. Para la elección de los dos genes de referencia se seleccionaron aquellos *contigs* con mayor estabilidad en los niveles de expresión de todas las muestras y que presentaron niveles de expresión cercanos a los de los 17 *contigs* a validar.

Se diseñaron cebadores específicos con la herramienta *Primer3* (web v 4.0.0) (Rozen y Skaletsky, 2000). Los parámetros establecidos para el diseño incluyeron una longitud de los cebadores de entre 18 y 23 nucleótidos, un contenido de GC de 30 a 70 % y una temperatura de hibridación (annealing) de 57 a 62 °C. La especificidad de los cebadores se analizó *in silico* alineando contra el transcriptoma de referencia. Los cebadores diseñados para cada uno de los genes se muestran en la Tabla 2.5.

**Tabla 2.5.** Cebadores específicos para validar mediante RTqPCR 17 genes de interés y 2 genes de referencia obtenidos en el ensayo RNA-Seq.

Gen a validar	Cebador *	Secuencia 5´ - 3´
>HaT13I034693	>HaT13I034693LEFT	TCCCATCATGCATTTACGGC
	>HaT13I034693RIGHT	GTTGTGGTTGTGGGTCTGTC
>HaT13I071699	>HaT13I071699LEFT	GGGTGGACAAACATATGGCT
	>HaT13I071699RIGHT	GTTCAACAAGGGTCTACATGCA
>HaT13I030739	>HaT13I030739LEFT	CTTCTTCACTTGGTTGGGGC
	>HaT13I030739RIGHT	TGCAGGCACCATACTCTTGA
>HaT13I009315	>HaT13I009315LEFT	CCATCCTCCATCCGCAATTG
	>HaT13I009315RIGHT	GAATTCAAGCGGGTCAGTCC
>HaT13I028203	>HaT13I028203LEFT	TGGAGGGGATGTTGGACTTC
	>HaT13I028203RIGHT	GGGTCCAAGGGTTTCAACAC
>HaT13I025514	>HaT13I025514LEFT	CCGAGGTAATAAACGCTGGC
	>HaT13I025514RIGHT	AACCACCCCATGTACACCAA

\* Cebadores LEFT: directo; RIGHT: reverso.

Gen a validar	Cebador *	Secuencia 5' - 3'
>HaT13I030356	>HaT13I030356LEFT	AGGTTTGATTCTCGGGTCGA
	>HaT13I030356RIGHT	CAAGAAAACAGGCAGGGCTT
>HaT13I082919	>HaT13I082919LEFT	TCATGCCTCGAAGTTGTTTTTC
	>HaT13I082919RIGHT	GGAGCGTAATATGGAGCAAAGG
>HaT13I028797	>HaT13I028797LEFT	GGAGGAGATTGCATCAGGGT
	>HaT13I028797RIGHT	CATGCATCACGAAACACCCA
>HaT13I029044	>HaT13I029044LEFT	CGTTTGTCTTGCCGGGTTTA
	>HaT13I029044RIGHT	AAACGGTCCAATGCACCAAA
>HaT13I011927	>HaT13I011927LEFT	GAATCCGTTCTTTCCCGACG
	>HaT13I011927RIGHT	GAGTCGAGTGTCATTGCCAC
>HaT13I035773	>HaT13I035773LEFT	GTCCTGCACTACTCAAGGCT
	>HaT13I035773RIGHT	GACCGCGCCATTCTGTTAAT
>HaT13I011241 RG	>HaT13I011241RGLEFT	GACGACGATCTCTTCAACGC
	>HaT13I011241RGRIGHT	GCCCAACCTTCTTCATCAGC
>HaT13I013640 RG	>HaT13I013640RGLEFT	TGGCGTTCTTTATCCGCTTG
	>HaT13I013640RGRIGHT	GCCTGTTCCGGTGAAGATTC
>HaT13I077451	>HaT13I077451LEFT	GAAGAGGATGAGTCAGGGGA
	>HaT13I077451RIGHT	ATGACCCTTTCCATCAACGC
>HaT13I016848	>HaT13I016848LEFT	CCTCAAGTTAACCGAAGCCG
	>HaT13I016848RIGHT	CCTCTGCATCTTCTCCCAA
>HaT13I015437	>HaT13I015437LEFT	GGATCCTCGGTACTGGGATG
	>HaT13I015437RIGHT	CCTGCACACAACCTTCTTCC
>HaT13I074223	>HaT13I074223LEFT	GGCTGAGGATAGGGGTGTAC
	>HaT13I074223RIGHT	GCAATGCCATAGTGTCCGTT
>HaT13I019076	>HaT13I019076LEFT	CCAATGGACAGCAGCCAAAT
	>HaT13I019076RIGHT	CATGCCGTAGATTGTCCACG

\* Cebadores LEFT: directo; RIGHT: reverso. RG: genes de referencia.

Estos cebadores fueron sintetizados por *Eurofins Genomics*<sup>a</sup>. Los chequeos de especificidad de los oligonucleótidos se realizaron en geles de agarosa y se evaluaron las eficiencias mediante RTqPCR utilizando como molde diluciones de un pool de ADNc provenientes de las cuatro muestras de girasol.

## RTqPCR

### SÍNTESIS DE LA PRIMERA HEBRA DE ADNc

Se trabajó con la enzima transcriptasa reversa *Superscript II* (Invitrogen). A partir de 1 µg de ARN total de cada muestra se preparó un volumen de reacción de 12 µl con:

ARN	csp	1 µg
dNTPs (10 mM)		1 µl
oligo(dT <sub>18</sub> ) (500 µg/µl)		1 µl
agua destilada estéril (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> )	csp	12 µl

Se incubó a 65 °C por 5 min para lograr la desnaturalización del ARN y se llevó inmediatamente a hielo. Se agregó:

5X <i>First Strand Buffer</i>		4 µl
DTT (0,1 M)		2 µl
RNaseOUT (40 µg/µl)		1 µl

Se incubó a 42 °C por 2 min y se agregó 1 µl de enzima transcriptasa reversa *SuperScript II* (200 U/µl, Invitrogen). Se incubó a 42 °C por 50 min y se inactivó la reacción calentando a 70 °C por 15 min.

<sup>a</sup> <http://www.eurofins.com/genomic-services/>

### PCR CUALITATIVA PARA CHEQUEOS DE ESPECIFICIDAD DE CEBADORES

A 1 µl de un pool de los cuatro ADNcs de la etapa anterior se agregó:

buffer de PCR 10X	2,5 µl
cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> , 50 mM)	0,75 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Cebador directo (9 µM)	0,5 µl
Cebador reverso (9 µM)	0,5 µl
<i>Taq DNA polimerasa</i> (5 U/µl)	0,4 µl
agua destilada estéril (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> )	19,6 µl

Se incubó a 94 °C por 2 min para desnaturalizar y se realizó la PCR con los siguientes tiempos y temperaturas:

- Primer paso de desnaturalización: 5 min a 94 °C
- 35 ciclos: 30 seg a 94 °C (desnaturalización)  
30 seg a 60 °C (hibridación)  
2 min 30 seg a 72° C (elongación)
- Etapa final de elongación: 5 min a 72 °C

### CHEQUEOS EN GEL DE AGAROSA 2 %

Se chequearon los productos de PCR en geles de agarosa para evaluar la especificidad de los cebadores. Para ello se mezclaron 2 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE 1X (Tris, acetato y EDTA) en erlenmeyer y se hirvió en microondas hasta obtener una solución translúcida. A la solución tibia se agregó una gota del colorante bromuro de etidio, se homogeneizó totalmente y se volcó la agarosa en la cama ya preparada con los peines. Luego de polimerizar el gel se sembraron 25 µl de productos de PCR en 3 µl de *loading buffer Crystal Red 10X*. También se sembró un marcador de peso molecular de ADN de 100 pb. La corrida se realizó en cuba con TAE 1X a 150 V por 30 min. Una vez finalizada la corrida, el gel se analizó bajo lector de fluorescencia.

### CÁLCULOS DE LA EFICIENCIA DE LOS PARES DE CEBADORES

Se armó un pool de los cuatro ADNcs para evaluar cada par de cebadores en una curva de calibración de ADNc. Se realizaron diluciones del pool: 1/10, 1/30, 1/90 y 1/270.

En placa de 96 pocillos, trabajando con pipetas multicanal y monocanal electrónicas se preparó:

mix de cebadores directo y reverso (1 $\mu$ M)	3 $\mu$ l
master mix <i>SYBR® Premix Ex Taq II</i> (Takara)* + ADNc diluido	5 $\mu$ l

\**SYBR® Premix Ex Taq II* (Takara) contiene *SYBR Green I*, enzimas nucleasa *RNase H* y ADN polimerasa *Takara Ex Taq HS*, mix de dNTPs y magnesio ( $Mg^{2+}$ ).

Se llevó a termociclador para PCR cuantitativa en tiempo real *C100 Touch Thermal Cycler CFX384* (BIORAD) y se realizó el siguiente protocolo:

- etapa inicial de desnaturalización: 1 min a 95 °C
- 40 ciclos: 3 seg a 95 °C (desnaturalización)  
20 seg a 60 °C (anillado, elongación y medición de la fluorescencia)
- curva de fusión: 2 seg a 65 °C  
65 °C a 95 °C (aumentando la temperatura 0,5 °C/ciclo)

Los valores de  $C_q$  se determinaron mediante regresión ( $C_q$  en el punto de máxima pendiente de la curva). Se conservaron aquellos pares de cebadores con eficiencia  $E=100\% \pm 10\%$  y  $R^2 \sim 0,98$ .

Se analizó el comportamiento de los genes de referencia elegidos evaluando el coeficiente de variación promedio ( $\overline{CV}$ ) y el valor de estabilidad ( $\overline{M}$ ) que son parámetros de la aptitud de los mismos para cumplir dicha función (Hellemans et al., 2007).

## PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)

Se realizaron tres réplicas técnicas para cada combinación de par de cebadores-muestra con sus correspondientes curvas de fusión para chequear especificidad de los productos. Se llevó a cabo en termociclador para PCR cuantitativa en tiempo real *C100 Touch Thermal Cycler CFX384* (BIORAD) y se realizó el siguiente protocolo:

- etapa inicial de desnaturalización: 1 min a 95 °C
- 40 ciclos: 3 seg a 95 °C (desnaturalización)  
20 seg a T<sub>m</sub> °C (anillado, elongación y medición de la fluorescencia)
- curva de fusión: 2 seg a 65 °C  
65 °C a 95 °C (aumentando la temperatura 0,5 °C/ciclo)

El valor de T<sub>m</sub> en el paso de hibridación se ajustó para cada par de cebadores y varió entre 57° C y 60° C.

Se tomaron los valores de ciclo de cuantificación (C<sub>q</sub>, *quantification cycle*) y los valores de eficiencia de reacción (E) calculados previamente y se trabajó con el programa *CFX Manager™ Software Security Edition* (BIORAD).

Para la cuantificación relativa de los transcritos, la cantidad relativa (RQ) fue calculada para cada amplicón teniendo en cuenta los valores E y C<sub>q</sub> tanto para el gen de interés (C<sub>q<sub>goi</sub></sub>) como para los genes de referencia (C<sub>q<sub>ref</sub></sub>). Se utilizó como valor calibrador (C<sub>q<sub>cal</sub></sub>) el promedio de los C<sub>q</sub>s de todas las muestras y RQ se calculó con la siguiente ecuación:

$$RQ = E^{C_{qgoi} - C_{qcal}}$$

Se calculó el factor de normalización (NF) como el promedio entre los RQ de los genes de referencia y la cuantificación relativa normalizada (NRQ) se calculó:

$$NRQ = \frac{RQ}{NF}$$

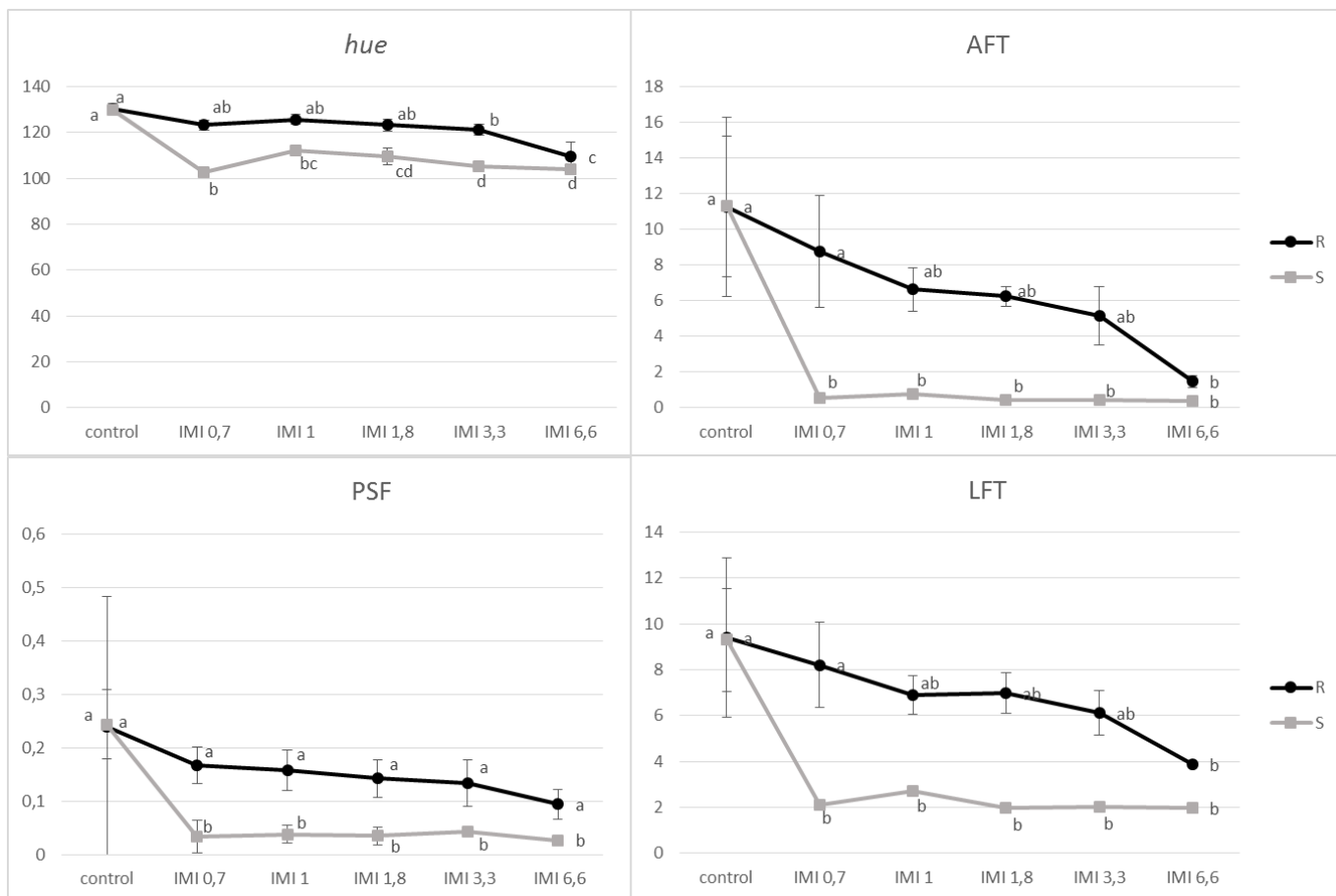
Se realizaron pruebas *t* de *student* ( $p < 0,05$ ) para el análisis de comparación de las medias NRQ utilizando el programa estadístico R (R Development Core Team, 2010).

## RESULTADOS

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE HERBICIDA IMAZETAPIR PARA EL ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA

Se realizó un ensayo de planta entera para determinar la concentración óptima de herbicida para el análisis del transcriptoma. Existe un sólo antecedente en la bibliografía de una puesta a punto similar en *A. thaliana* (Manabe et al., 2007), no habiendo hasta la fecha información similar para girasol. La concentración óptima es aquella en la cual todas las plantas susceptibles mueren mientras que las resistentes al herbicida exhiben un 100 % de supervivencia sin daño visible. En la Figura 2.11 se presentan los valores medios para las variables índice de coloración de las hojas (*hue*), área total foliar total (AFT), peso seco foliar (PSF) y longitud foliar total (LFT) en función de la concentración de imazetapir. Las concentraciones evaluadas fueron 0,7; 1; 1,8; 3,3 y 6,6  $\mu\text{M}$ .

Los resultados muestran que a la concentración 0,7  $\mu\text{M}$  las plantas del genotipo susceptible (S) muestran daños irreversibles, extremos y a los ocho días post tratamiento mueren. En cambio, las plantas del genotipo resistente (R) sobreviven sin efectos visibles. Los daños en el genotipo R comienzan a visualizarse a concentraciones de 3,3  $\mu\text{M}$  para *hue* y de 6,6  $\mu\text{M}$  para AFT y LFT. La variable PSF no registró daño en el genotipo R para ninguna concentración ensayada. De acuerdo a estos resultados, la concentración óptima se encuentra entre 0,7  $\mu\text{M}$  y 3,3  $\mu\text{M}$ . Teniendo en cuenta ensayos previos realizados por el presente grupo de trabajo y de manera de poder correlacionar los datos con resultados anteriores, se determinó como óptima la concentración de imazetapir 1  $\mu\text{M}$ .

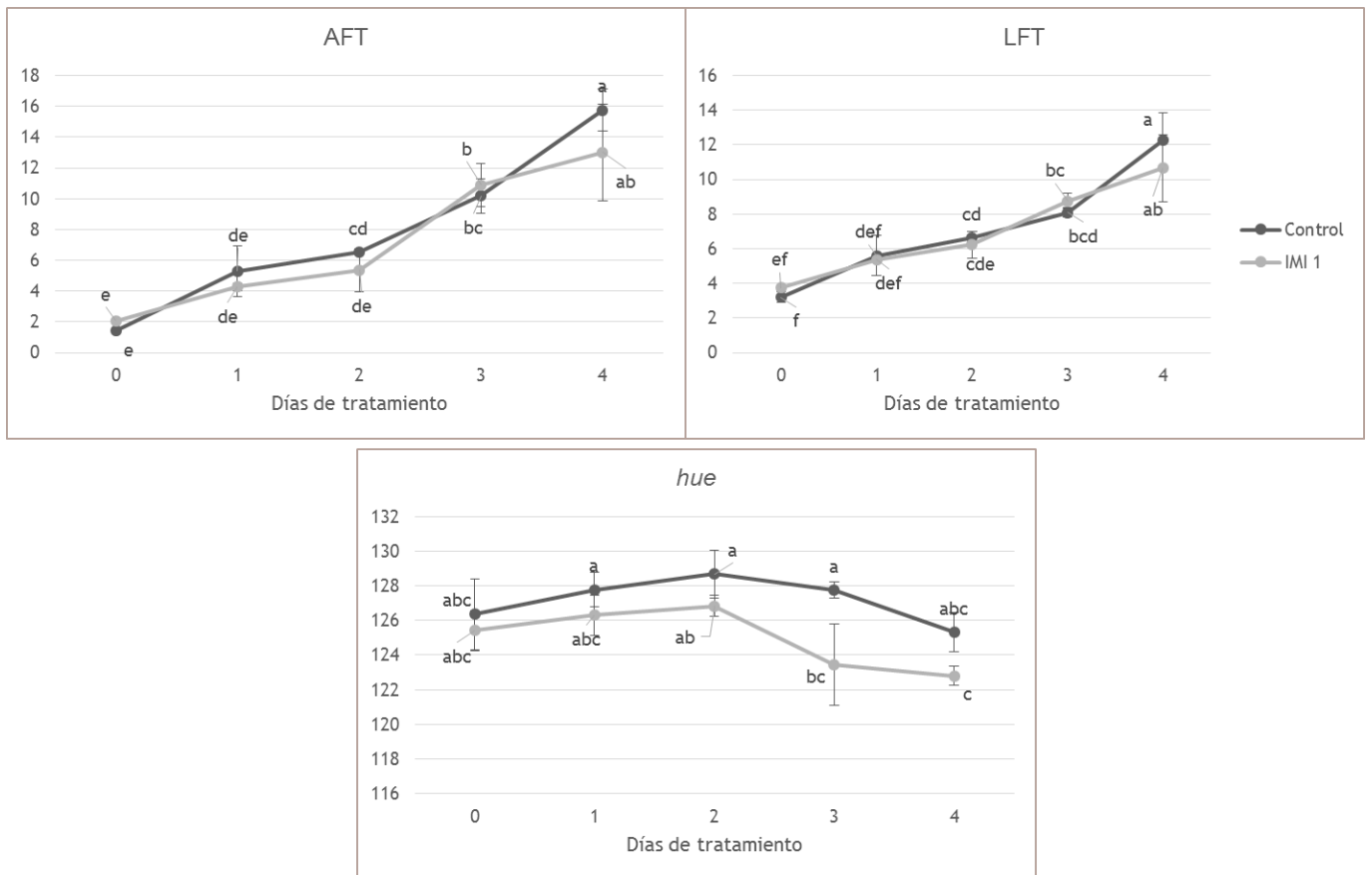


**Figura 2.11.** Valores medios para las variables *hue*, AFT, PSF y LFT de los genotipos HA 425 (R) y HA 89 (S) para las diferentes concentraciones de imazetapir. Letras iguales indican valores similares según la prueba de Tukey al 5 % dentro de cada genotipo. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias. *hue*: índice de coloración de las hojas, AFT: área total foliar total, PSF: peso seco foliar, LFT: longitud foliar total. Las variables fueron evaluadas a ocho días post tratamiento.

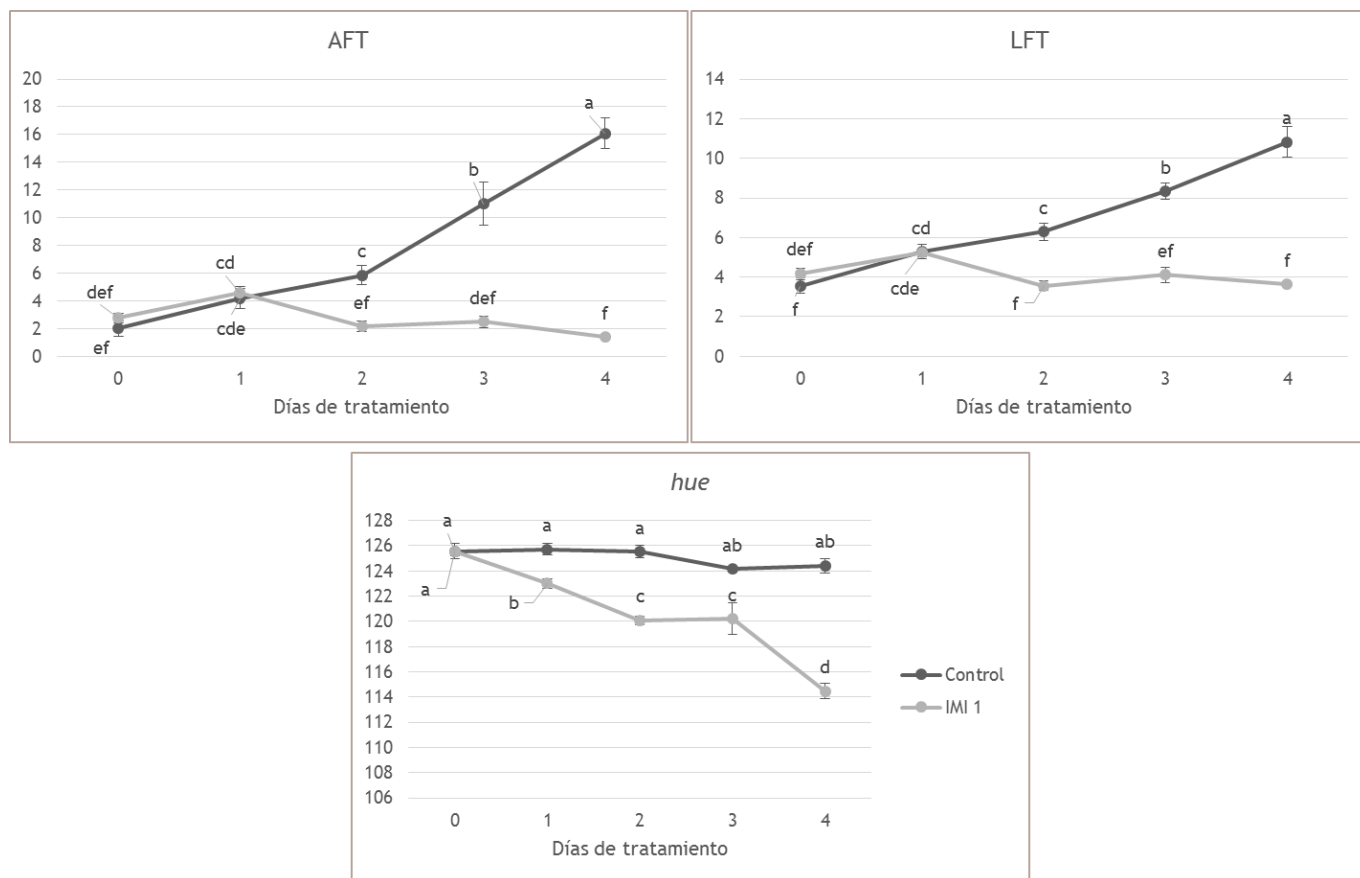
**DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE COLECTA POST TRATAMIENTO CON HERBICIDA ADECUADOS PARA EL ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA**

Una vez determinada la concentración óptima se realizó otro ensayo para establecer el intervalo de tiempo en el cual no se produce división celular significativa en tejido foliar. La importancia de establecer este intervalo para los análisis de expresión génica reside en que durante el mismo no se estarían poniendo de manifiesto genes relacionados con la expansión foliar de modo que se evita la confusión entre los cambios provocados por el herbicida y aquellos relacionados con el crecimiento. La maquinaria involucrada en la división celular y crecimiento es muy compleja y se conoce que es una etapa de altísimos niveles de expresión de una gran variedad de genes, resultando en una complicada interferencia al momento del estudio de nuevos genes con menores niveles de expresión. Por otra parte, se conoce que el herbicida posee efectos negativos sobre la división celular pero no es el mecanismo objeto de estudio en este trabajo y por ello resulta indispensable evitarlo.

Se evaluó el crecimiento foliar (AFT y LFT) y la coloración de las hojas (*hue*) a través de los días 0, 1, 2, 3 y 4 post tratamiento 1µM de imazetapir. En las Figuras 2.12 y 2.13 se presentan los resultados para los genotipos resistente HA 425 (R) y susceptible HA 89 (S) respectivamente.



**Figura 2.12.** Valores medios del genotipo resistente HA 425 (R) para las variables de crecimiento AFT y LFT y para el índice de coloración de las hojas *hue* en función de días post tratamiento. Letras iguales indican valores similares según la prueba de Tukey al 5 %. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias. *hue*: índice de coloración de las hojas, AFT: área total foliar total, LFT: longitud foliar total.



**Figura 2.13.** Valores medios del genotipo susceptible HA 89 (S) para las variables de crecimiento AFT y LFT y para el índice de coloración de las hojas *hue* en los diferentes días post tratamiento. Letras iguales indican valores similares según la prueba de Tukey al 5 %. Las barras verticales representan los errores estándar de las medias. *hue*: índice de coloración de las hojas, AFT: área total foliar total, LFT: longitud foliar total.

Para el genotipo R se observaron diferencias significativas para los parámetros de crecimiento AFT y LFT entre los 2 y 3 días post tratamiento (dpt). Para el genotipo S se evidenció crecimiento foliar en las plantas control entre 1 y 2 dpt mientras que en las tratadas con herbicida el crecimiento se detuvo a partir de 1 dpt. Los síntomas de clorosis evaluados a través del índice de coloración de las hojas *hue* se observaron a partir de 1 dpt en el genotipo S tratado con imazetapir. Por el contrario el genotipo R no mostró síntomas de clorosis en

este período. De acuerdo a lo expuesto el intervalo de tiempo en el cual no se produce crecimiento foliar significativo está dentro de las 24 hs post tratamiento (1dpt).

De acuerdo a estos resultados, se eligieron los siguientes tiempos de colecta post tratamiento:

12 hs → tiempo temprano de colecta.

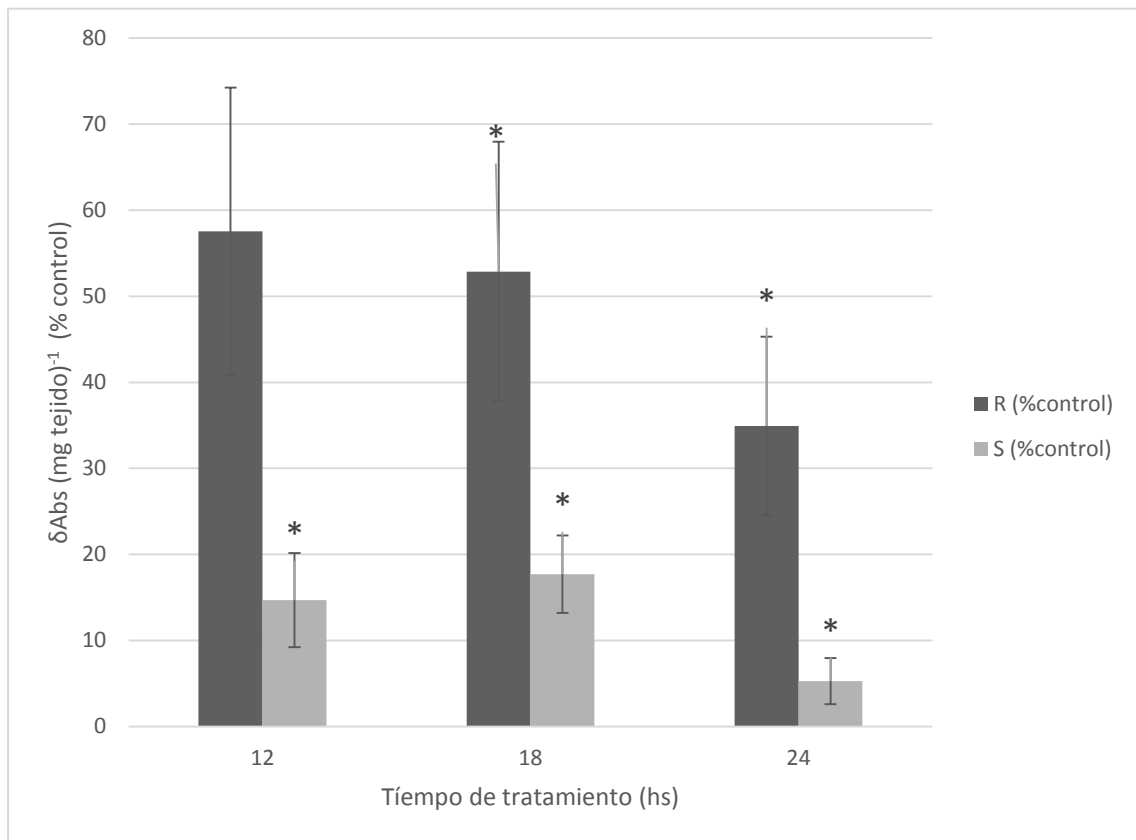
18 hs → tiempo intermedio de colecta.

24 hs → tiempo tardío de colecta.

## EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD AHAS *IN VITRO* DURANTE LOS TIEMPOS DE COLECTA

Para evaluar el grado de inhibición de la enzima AHAS en los tiempos de colecta elegidos se cuantificó su actividad *in vitro* en hojas de plantas de ocho días sometidas a 12, 18 y 24 hs de tratamiento IMI 1  $\mu\text{M}$  y tratamiento control MS. La actividad se cuantificó mediante la reacción colorimétrica para medición de acetoína de Westerfeld (1945). Los valores de absorbancia a 530 nm  $\delta\text{Abs (mg tejido)}^{-1}$  expresados en porcentaje respecto del tratamiento control MS se muestran en la Figura 2.14.

La actividad AHAS en todos los tiempos resultó superior en el genotipo R. Para el genotipo S se encuentran reducciones significativas en los valores de la actividad AHAS en las plantas tratadas con IMI respecto de los controles para todos los tiempos evaluados. Esto sugiere que el herbicida ya se encuentra unido al canal de acceso del sustrato de la enzima (sitio blanco de las IMI). Para el genotipo R no se encontraron diferencias significativas entre plantas tratadas con IMI y sus controles para el tiempo temprano de 12 hs, pero sí para los tiempos intermedio y tardío. Esto concuerda con estudios previos en los cuales se demuestra que la mutación que corresponde al alelo *Imr1* (Ala205Val) es de eficiencia moderada; el herbicida inhibe de todas formas el canal de acceso del sustrato de la enzima y esta inhibición progresa con el tiempo. Esto refuerza la teoría de que la resistencia presente en la fuente de resistencia Imisun de Kansas no se debe exclusivamente a la mutación en el gen *ahas* sino que el locus *Imr2* interviene y la refuerza.



**Figura 2.14.** Actividad AHAS en hojas de los genotipos R y S para 12, 18 y 24 hs de tratamiento IMI 1  $\mu\text{M}$ . Los valores de absorbancia  $\delta\text{Abs}$  ( $\text{mg tejido}^{-1}$ ) se representan en porcentaje respecto del tratamiento control MS. \*: pruebas *t* de *student* significativas ( $p < 0,05$ ) para la comparación de medias IMI 1  $\mu\text{M}$  y control MS.

## cDNA-AFLP

### ELECCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para elegir las enzimas de restricción óptimas se realizó un análisis de restricción *in silico* utilizando la aplicación libre *AFLPInSilico* (Rombauts et al., 2003). Esta aplicación es de uso *online* y permite cargar las secuencias de interés posibilitando la realización de un análisis de restricción con distintas enzimas, de a una y/o combinadas de a dos.

Se eligieron diferentes combinaciones de enzimas de restricción y se realizó el análisis de restricción *in silico* sobre las secuencias de ESTs de girasol disponibles en la base de datos de NCBI (134474 secuencias en Febrero, 2016) (Figura 2.15).

AFLP in SILICO v2

★ if you used this tool please cite our paper:  
 "AFLPInSilico, simulating AFLP fingerprints" (2002/3) Stephane Rombauts, Yves Van de Peer, and Pierre Rouz ♦ Bioinformatics, Bioinformatics. 2003 Apr 12;19(6):776-7. PMID: [12691992](#)

Thank you.  
[Stephane](#)

---

Sequences to submit  allsequences.fasta please only submit fasta formatted sequences as pure simple text files, no word documents or other binary things

Restriction Site 1 <input style="width: 80%;" type="text" value="CATG"/> extended genetic code possible Length of adaptor <input style="width: 40%;" type="text" value="0"/> use 0 for non Selective Nucleotide(s) with Site 1 <input style="width: 40%;" type="text" value="N"/> use N for non type of analysis <input type="radio"/> AFLP <input checked="" type="radio"/> Transcript Profiling, cDNA-AFLP <input type="radio"/> digest using 1 restriction enzyme	Restriction Site 2 <input style="width: 80%;" type="text" value="TTAA"/> extended genetic code possible Selective Nucleotide(s) with Site 2 <input style="width: 40%;" type="text" value="N"/> use N for non
--	---

---

NEW

**HOW-TO :**

- The sequences should be formatted in FASTA format, all the sequences should be stored one after the other in 1 big pure ASCII text file (word documents are binary files, not pure ASCII text!! and won't work, neither are excel sheets etc)
- eg.
- >sequence\_1
- ACGTAGCGATAAGCAGGACTACAACGCACGSAATATCAGCAGCACTCTACAGCAGTA

CAPS LOCK: OFF

**Figura 2.15.** Captura de pantalla de la aplicación libre *AFLPInSilico*.

Para cada combinación de enzimas de restricción se resolvieron fragmentos derivados de transcritos (FDTs) de diferente tamaño (pb), lo que permitió evaluar la eficiencia de cada combinación de enzimas y su nivel de *cobertura* definido como el número de fragmentos

derivados de transcritos de entre 100 y 1000 pb. A mayor *cobertura* del pool de ESTs, se espera un mayor número de FDTs de interés sobre el pool de ADNc propio.

Para realizar el análisis *in silico* y elegir el par óptimo de enzimas de restricción a utilizar en el ensayo de cDNA-AFLP se eligieron tres combinaciones iniciales de dos enzimas de restricción de corte frecuente cada una de acuerdo a lo descrito por Stölting et al. (2009). Las enzimas de restricción utilizadas son la principal causa de variación en la cobertura del pool de secuencias originales y por ello no es recomendable el uso de enzimas de corte poco frecuente que reconocen sitios de seis pares de bases debido a que reducen significativamente el número de FDTs generados en cada reacción de PCR. El uso de enzimas de restricción de corte frecuente (sitios de reconocimiento de cuatro pares de bases) permite obtener una cobertura más profunda del pool de ADNc (Stölting et al., 2009).

A continuación se indican las combinaciones y el número de FDTs de entre 50 y 500 pb correspondiente a cada combinación:

Combinación 1: *Cvi*AI (C<sup>^</sup>ATG) – *Mse*I (T<sup>^</sup>TAA)

Número de TDFs: 34065

Combinación 2: *Cvi*qI (G<sup>^</sup>TAC) - *Taq*I (T<sup>^</sup>CGA)

Número de TDFs: 23950

Combinación 3: *Mae*I (C<sup>^</sup>TAG) - *Hin*pII (G<sup>^</sup>CGC)

Número de TDFs: 11315

En la Figura 2.16 se muestra la salida de la aplicación *AFLPInSilico* para la primera combinación.



Del análisis se desprende que la combinación de enzimas que ofrece la mayor *cobertura* y que por consiguiente resulta más informativa para el ensayo de cDNA-AFLP es la combinación *Cvi*AII–*Mse*I. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Stölting et al. (2009).

### **cDNA-AFLP**

Mediante cDNA-AFLP se aislaron, reamplificaron y secuenciaron 49 fragmentos. Potenciales categorías funcionales se asignaron mediante búsquedas BLAST contra las bases de datos: nucleótidos nr-nt - *plants* 3193, ESTs y proteicas nr - *plants* 3193, presentes en la base de datos NCBI y contra el transcriptoma *de novo* HaT13I.

A continuación se muestran las tablas con las potenciales categorías funcionales de los 49 fragmentos secuenciados y su genotipo de origen (R: resistente, S: susceptible) (Tablas 2.6, 2.7, 2.8 y 2.9).

**Tabla 2.6.** Catorce secuencias potencialmente relacionados a procesos de detoxificación de xenobióticos.

<b>DETOXIFICACIÓN</b>	
Transportadores ABC	
R	S
>18_CviAll_C.ab1288	>3_CviAll_C.ab1
>21_CviAll_C.ab1289	>4_CviAll_C.ab1
>75_CviAll_C.ab1512	>5_CviAll_C.ab1295
	>17A_CviAll_C.ab1
Glicosiltransferasas	
>62_CviAll_C.ab1519	>16A_CviAll_C.ab1
>64_CviAll_C.ab1261	>81_CviAll_C.ab1509
>71a_1_20_CviAll_C.ab1513	
Citocromos P450	
>59_CviAll_C.ab1169	>59_CviAll_G.ab1169
UDP-glucuronosil/UDP-glicosiltransferasa	
>62_2_CviAll_C.ab1375	

**Tabla 2.7.** Cuatro secuencias potencialmente relacionados a procesos de estrés hídrico.

<b>ESTRÉS</b>	
Estrés Hídrico	
R	S
>44_CviAll_T.ab1492	>44_CviAll_T.ab1492
>48_CviAll_T.ab1301	
>49_CviAll_T.ab1306	
>45_CviAll_T.ab1303	

**Tabla 2.8.** Veintitres secuencias potencialmente relacionadas a procesos metabólicos generales.

<b>PROCESOS METABÓLICOS</b>	
Relacionados a Kinasa	
R	S
>30_CviAll_A.ab1504	>16_CviAll_A.ab1508
>31_CviAll_A.ab1492	>78_CviAll_C.ab1448
>61_2_CviAll_G.ab1279	
>73_CviAll_G.ab1505	
>56_CviAll_G.ab1458	
Proteosoma	
	>19_CviAll_A.ab1
>21A_CviAll_A.AB1513	>21A_CviAll_A.ab1513
N-acetiltransferasa	
	>23_CviAll_C.ab1132
Aquaporinas	
>37_CviAll_T.AB1405	
Actividad MID1	
>46_CviAll_T.AB1512	>46_CviAll_T.ab1512
Fotosíntesis	
>47_CviAll_T.AB1305	>47_CviAll_T.ab1305
<i>Protein folding</i>	
>54_CviAll_T.AB1495	
Tricomas	
>57_CviAll_G.AB1355	

**PROCESOS METABÓLICOS**

Proteínas ribosomales	
>58_CviAII_G.AB1232	>58_CviAII_G.ab1232
>61_CviAII_C.AB1141	>61_CviAII_C.ab1141
>66_CviAII_C.AB1507	>66_CviAII_C.ab1507
	>68_CviAII_C.ab1501
Actividad ligasa	
>74_CviAII_G.AB1500	
>71B_1_10_CviAII_C.AB1153	
Relacionado a auxinas	
	>65_CviAII_C.ab1200
Glioxilasa	
>91_CviAII_C.AB1471	>91_CviAII_C.ab1471

**Tabla 2.9.** Ocho secuencias a las cuales no se les pudo asignar una función aparente.

**Sin identificación**

---

>17B\_CviAII\_C.AB1

>19\_2\_CviAII\_C.AB1522

>20\_1\_10\_CviAII\_C.AB1538

>29\_CviAII\_A.AB1496

>36\_CviAII\_A.AB1504

>60\_CviAII\_C.AB1483

>67\_CviAII\_C.AB1217

>72\_CviAII\_C.AB1480

---

Por otra parte, al enfocarse particularmente en las 18 secuencias relacionadas a detoxificación de xenobióticos y estrés y teniendo en cuenta los tiempos de colecta a los que corresponden (Tabla 2.10):

. 12 secuencias corresponden al genotipo R. De estas, cuatro fueron obtenidas en el tiempo de colecta 12 hs y ocho en el tiempo 24 hs.

. Ocho secuencias corresponden al genotipo S. De estas, cuatro se encontraron en el tiempo de colecta 12 hs, una en el tiempo 18 hs y tres en el tiempo 24 hs.

Por otra parte, teniendo en cuenta el tratamiento efectuado:

. De las 12 secuencias correspondientes al genotipo R, cuatro fueron encontradas únicamente en el tratamiento control, cinco en el tratamiento IMI y tres fueron encontradas en ambos tratamientos.

. De las ocho secuencias correspondientes al genotipo S, una fue encontrada únicamente en el tratamiento control, tres en el tratamiento IMI y cuatro fueron encontradas en ambos tratamientos.

**Tabla 2.10.** Número de secuencias encontradas para cada tiempo de colecta y tratamiento.

Genotipo	nº de fragmentos		
	Tiempo de colecta		
	12	18	24
R	4	-	8
S	4	1	3
Tratamiento			
	Control	IMI	ambos
R	4	5	3
S	1	3	4

## VALIDACIÓN MEDIANTE RTqPCR

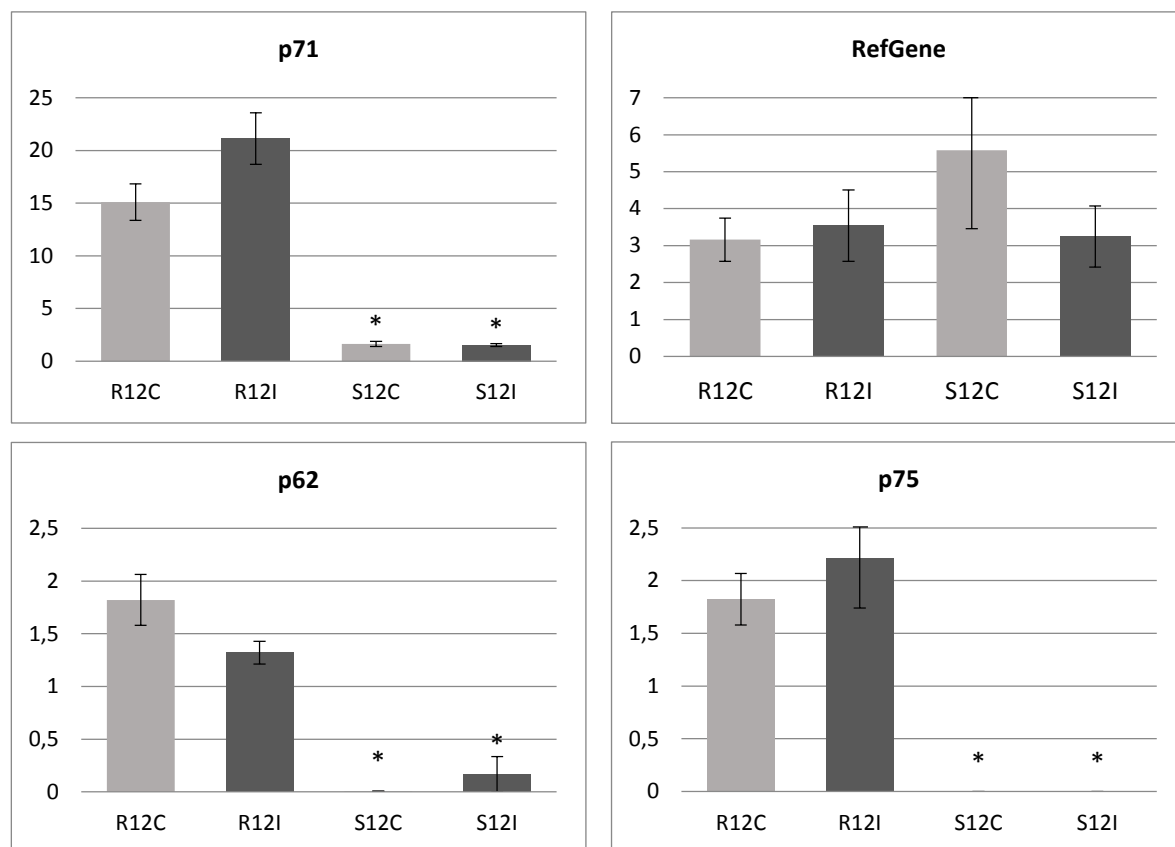
Para la validación de los resultados se realizaron análisis de RTqPCR para tres genes de interés y un gen de referencia identificados durante el análisis de cDNA-AFLP (Tabla 2.11). Los niveles de expresión se evaluaron en los genotipos R y S, tiempo de colecta 12 hs, tratamientos control e IMI. Se trabajó con dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

**Tabla 2.11.** Identidad de los genes elegidos para validar por RTqPCR

Genes validados por RTqPCR	
transportador ABC	>75_CviAII_C.ab1512 (p71)
glicosiltransferasas	>62_CviAII_C.ab1519 (p62)
	>71A_1_20_CviAII_C.ab1513 (p71)
proteína ribosomal (gen de referencia)	>58_CviAII_G.ab1232 (RefGene)

Los datos se analizaron según lo descrito por Simon (2003). Los valores de Cq relativizados se normalizaron respecto del gen de referencia elegido. El Cq se define como el número de ciclos de la RTqPCR donde la emisión de fluorescencia es mayor que el nivel mínimo o umbral de detección.

Se realizaron pruebas *t* de *student* para el análisis de comparación de las medias (Figura 2.17).



**Figura 2.17.** Expresión media relativa y normalizada de los tres genes de interés y el gen de referencia con los respectivos errores estándar de las medias. \*: Pruebas *t* de *student* ( $p < 0,05$ ) respecto de la muestra R12C significativas. Cada barra representa la media de los niveles de expresión de las dos réplicas biológicas y tres técnicas de cada par genotipo-tratamiento.

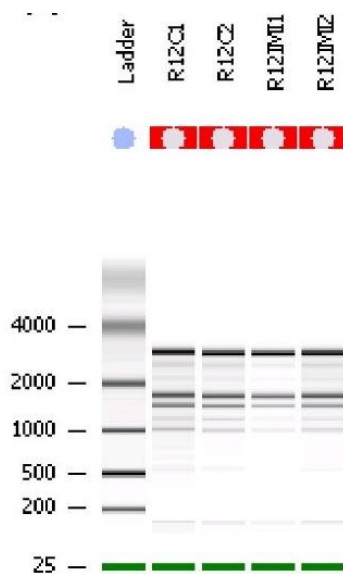
El gen de referencia elegido en el análisis de cDNA-AFLP mostró un comportamiento ideal en los ensayos de RTqPCR, expresándose de manera uniforme en todas las muestras evaluadas. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las medias respecto de la muestra R12C.

Los tres genes elegidos para su validación mostraron una expresión significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en el genotipo R respecto del S para ambos tratamientos (control e IMI). Esto concuerda con los resultados del ensayo de cDNA-AFLP.

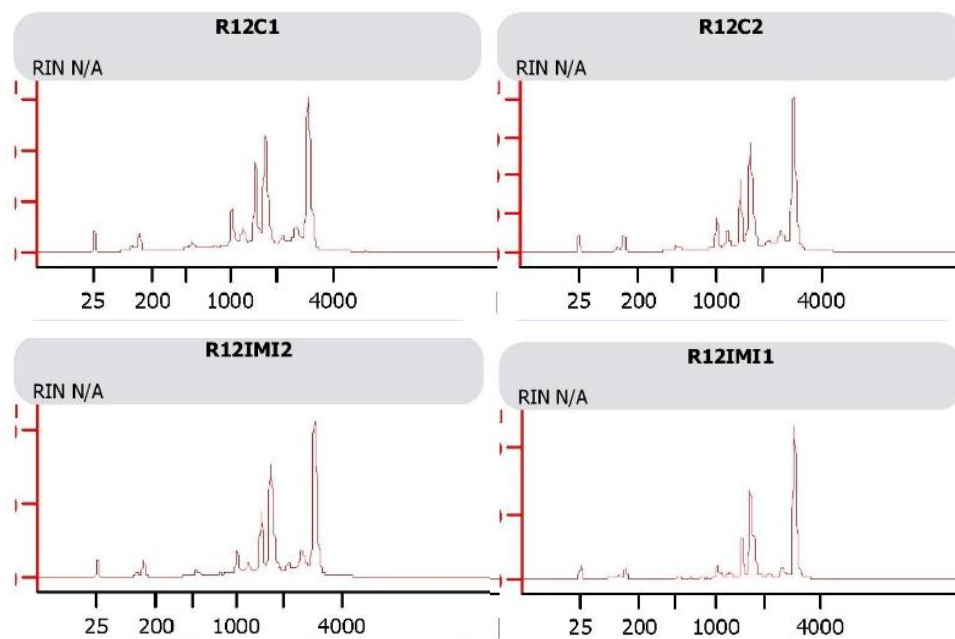
## ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON IMAZETAPIR MEDIANTE LA TÉCNICA TRUSeq STRANDED RNA-SEQ

La extracción del ARN para el análisis de RNA-Seq se llevó a cabo sobre plántulas de ocho días del genotipo resistente HA 425, luego de 12 hs de tratamientos: i) control (solución nutritiva MS), ii) imazetapir 1  $\mu$ M (dos réplicas biológicas para cada tratamiento).

Los análisis de calidad del ARN inicial se realizaron mediante *Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano* (Agilent Technologies) y mostraron una alta integridad de los mismos, fundamental para un correcto ensayo de RNA-Seq (Figuras 2.18 y 2.19):



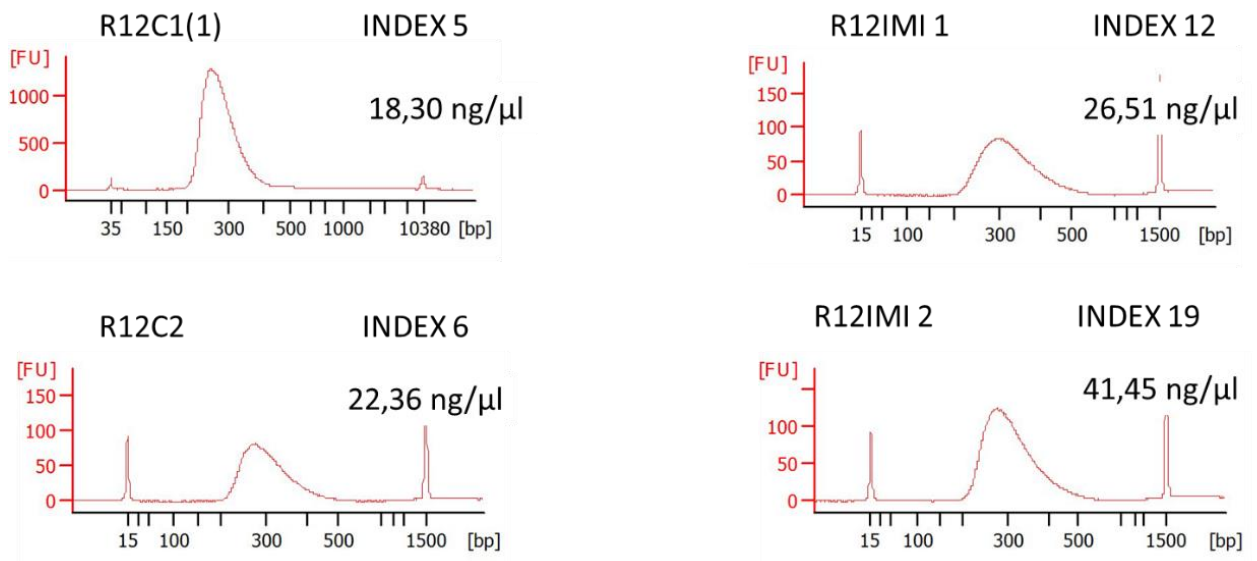
**Figura 2.18.** Integridad del ARN inicial evaluado mediante *Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano* (Agilent Technologies).



**Figura 2.19.** Fluorescencia vs segundos: salida de las cromatografías *Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano* (Agilent Technologies). Los picos del 18s ARN ribosomal (ARNr, pico a 1850 seg) y 28s ARNr (pico a 3000 seg) son de alta intensidad y la proporción 28/18 es aproximadamente dos. Estos son índices de alta integridad y calidad del ARN inicial.

## BIBLIOTECA DE ADNC Y SECUENCIACIÓN

Se llevó a cabo el protocolo *TruSeq Stranded RNA-Seq* (Illumina) para la síntesis de las cuatro bibliotecas de ADNc *stranded* y *multiplex* listas para secuenciar. Se chequeó la pureza y el tamaño de los fragmentos mediante tecnología *2100 Expert DNA 1000 Agilent Bioanalyzer* (Agilent Technologies) y se cuantificaron estrictamente mediante *RiboGreen Fluostar Optima* (BMG). Las bibliotecas resultaron de buena calidad, de concentraciones mayores a 5 ng/μl (valor mínimo esperado) y un tamaño de fragmento aproximado de 260 pb (Figura 2.20).



**Figura 2.20.** Bibliotecas de ADNc de tamaño de fragmento aproximado de 260 pb y concentración promedio 27 ng/μl.

A partir de las bibliotecas se realizó la síntesis de los *clusters* sobre la placa de secuenciación en *cBot Illumina* (Illumina) y posteriormente la secuenciación propiamente dicha en *Illumina HiSeq2000* (Illumina). Se obtuvieron *reads* de 100 pb.

#### ANÁLISIS DE LOS DATOS DE SECUENCIACIÓN

El análisis bioinformático se realizó en el CNS (*Centre National de Séquençage*) de l'*Unité de Recherche en Génomique Végétale* (URGV) de INRA/CNRS, Francia.

Luego de una secuenciación *stranded*, *multiplex* y *pair-end* (PE) para las cuatro muestras, se generaron en total 93G de datos de transcriptoma:

Muestra	Número total de <i>reads</i>
C_1	58951071
C_2	53694537
I_1	42547062
I_2	47904127

C\_1 / 2: tratamiento control, réplicas biológicas 1 y 2  
 I\_1 / 2: tratamiento IMI, réplicas biológicas 1 y 2

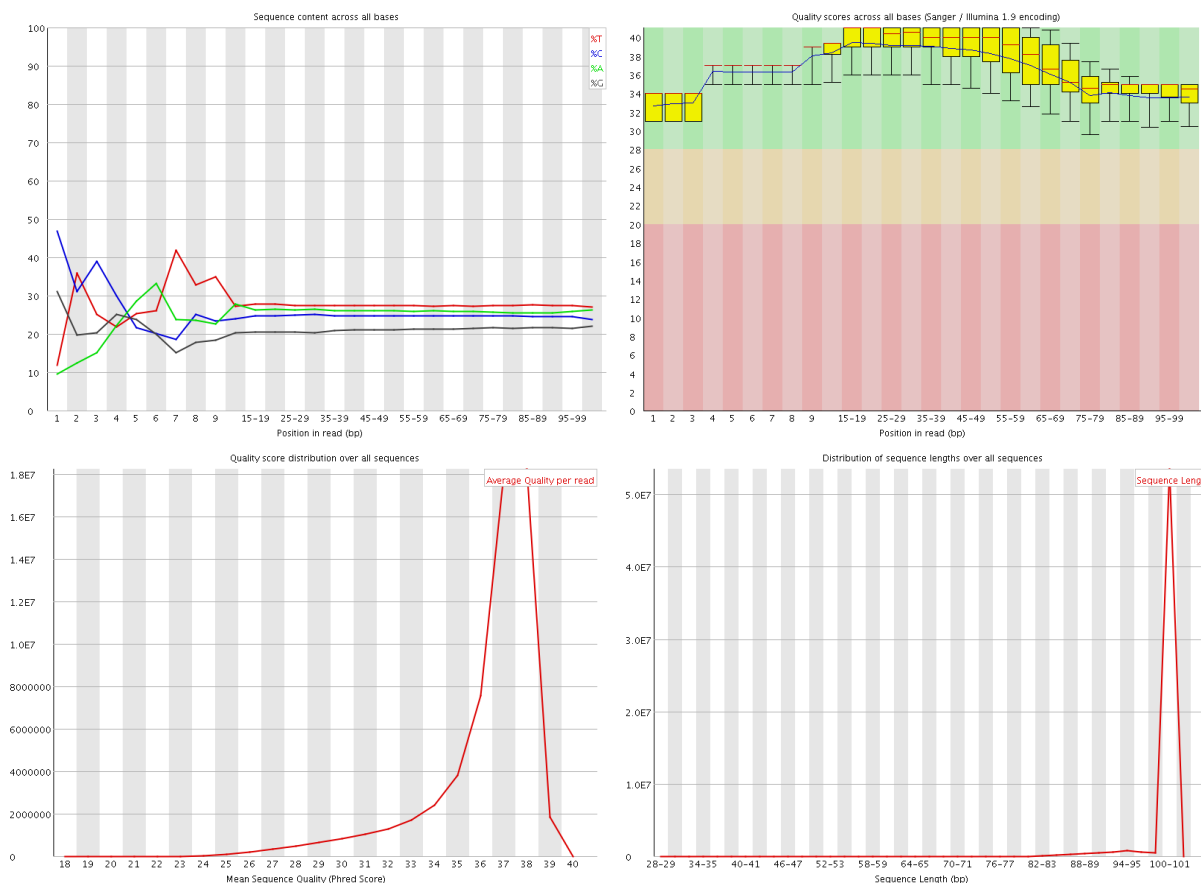
Sobre los datos crudos se realizó la limpieza de las secuencias ribosomales para evitar interferencias en el análisis. La calidad de las cuatro bibliotecas de *reads* se evaluó mediante la herramienta *FastQC* (versión 0.10.1). El valor promedio de contenido GC (% GC) de las bibliotecas de *reads* fue de 45 % mientras que el valor promedio de calidad (Q) fue  $\geq 30$  para más del 97 % de las secuencias, indicando una alta calidad de secuenciación. Todas las muestras superaron los estándares de calidad propuestos por la plataforma de transcriptómica del URGV (Figura 2.21). Los principales parámetros derivados del análisis de calidad *FastQC* para cada muestra son:

a) Contenido de secuencia por base: muestra el porcentaje de cada una de las cuatro bases (T, G, C, A) para cada posición en el *read* de 100 pb.

b) Índice de calidad Q por base: mediante el código *Sanger/Illumina* 1.9 se asigna un valor de índice de calidad de la secuenciación a cada par de bases del *read*. Un valor de Q  $\geq 30$  indica una alta calidad de secuenciación.

c) Distribución de índices de calidad Q por secuencia: asigna un Q promedio por *read* para la muestra.

d) Distribución de longitud de secuencia: para todos los *reads* de la muestra se espera una longitud de secuencia de 100 pb.



**Figura 2.21.** Principales resultados del análisis de calidad *FastQC* para una de las réplicas biológicas del tratamiento control. a) contenido de secuencia por base b) índice de calidad Q por base c) distribución de índices de calidad Q por secuencia d) distribución de longitud de secuencia.

## MAPEO

Luego del análisis de calidad de los datos de secuenciación se realizó el mapeo contra el transcriptoma de referencia *non redundant clusters* HaT13l utilizando la herramienta informática *Bowtie2* (versión 2.2.2) y la cuantificación de los *reads* mediante *Sam2Count* (versión 2.2.2).

Se realizaron dos tipos de mapeo contra el transcriptoma de referencia: *mapeo incluyendo y excluyendo multiHits*. Esto permitió analizar los niveles de redundancia genómica en girasol.

El porcentaje de mapeo total fue similar entre las cuatro muestras para cada estrategia de mapeo y representa una alta compatibilidad con la referencia (la plataforma URGV considera para un ensayo robusto  $\geq 10$  millones de *reads* paired-end mapeados).

Muestra	Nº total de <i>reads</i>	<i>Reads</i> mapeados (sin multiHits)*	<i>Reads</i> mapeados (con multiHits)*
C_1	58951071	42347811 (72 %)	53388969 (91 %)
C_2	53694537	38294556 (71 %)	48837320 (91 %)
I_1	42547062	30238729 (71 %)	38390956 (90 %)
I_2	47904127	34188981 (72 %)	43447018 (91 %)

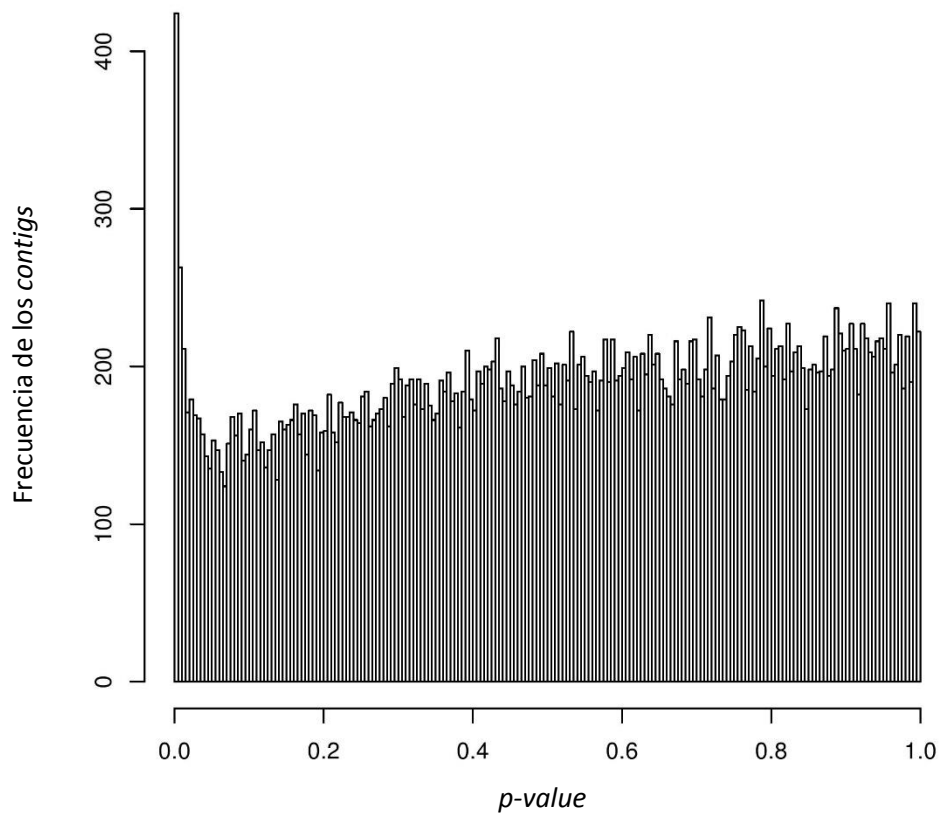
\* pares de *reads* propiamente mapeados contra la hebra correspondiente en la referencia

#### ANÁLISIS DE NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA

Mediante el método TMM del paquete estadístico *EdgeR* se normalizaron los valores de expresión de los *reads* ensamblados en secuencias consenso, denominados *contigs*. Se identificaron los *contigs* no expresados (genes no observados) y se filtraron aquellos con expresión despreciable en tres de las cuatro muestras (genes filtrados). Los *reads* ensamblados y mapeados con y sin multiHits para las cuatro muestras resultaron en:

<i>Contigs</i> expresados	<i>EdgeR</i>	
	Mapeo con MultiHits	Mapeo sin MultiHits
nº total	37849	32251
Longitud media (pb)	1310	1335
Longitud total (Mb)	49,59	43,05
<i>contigs</i> $\geq 1000$ pb	16505 (43,6 %)	18569 (57,6 %)

Luego de la identificación de los *contigs* se realizó el análisis de expresión diferencial. En la Figura 2.22 se muestran las frecuencias de *contigs* en función de valores de probabilidad (*p-value*) del análisis de expresión diferencial.



**Figura 2.22.** Histograma de *p-values*. El pico a valores de  $p < 0,05$  representa la frecuencia de los *contigs* expresados diferencialmente. Una frecuencia aproximadamente constante para  $p > 0,05$  indica una buena modelización en *Edge R*.

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la expresión diferencial de *contigs* (Tablas 2.12 y 2.13):

**Tabla 2.12.** Comparación de los resultados del análisis de expresión *EdgeR* para los dos tipos diferentes de mapeos. N° total: número de *contigs* analizados luego del filtrado de *EdgeR*.  $\log_2FC = \log_2(IMI/C)$ , IMI: nivel de expresión del *contig* en el tratamiento IMI 1 $\mu$ M, C: nivel de expresión del *contig* en el tratamiento control. \*\*ED: Expresados diferencialmente ( $p < 0,05$ ). \*\*\*EDI: Expresados diferencialmente y sobreexpresados en el tratamiento IMI 1 $\mu$ M. \*\*\*\*EDC: expresados diferencialmente y sobreexpresados en el tratamiento control. \*\*\*\*\*SED: sin expresión diferencial entre tratamientos. Los niveles de expresión se ajustaron mediante el método optimizado FDR (Storey y Tibshirani, 2003).

<i>EdgeR</i>		
<i>Contigs</i>	Mapeo	
	con MultiHits	sin MultiHits
n° total	37849	32251
$\log_2FC > 0^*$	19249	16427
$\log_2FC < 0$	18600	15824
ED**	52	46
EDI***	8	8
EDC****	44	38
SED*****	37797	32205

**Tabla 2.13.** Resumen de las identidades de los *contigs* sobreexpresados en el tratamiento IMI 1  $\mu$ M (EDI) y de los *contigs* sobreexpresados en el tratamiento control (EDC).

	Identidad	Descripción	
<i>EdgeR</i>	ATPasas		
	factores de transcripción	tipo B3	
	EDI	proteínas de transferencia de lípidos	
		proteínas de almacenamiento en semilla	
		taumatinas	relacionadas a patogénesis
		síntesis de aminoácidos	biosíntesis de aminoácidos aromáticos
		función catalítica general	liasas, alcohol oxidoreductasas, S-oxidoreductasas, hidrolasas, metiltransferasas, endoglucanasas, kinasas acetiltransferasas, pectinesterasas, de unión a Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup>
	EDC	unión a DNA	factores de transcripción, factores de replicación A
		detoxificación	transportadores ABC, citocromos P450
		respuesta en la defensa	alergeno Bet v I
		sistema de dos componentes	proteínas de dominios CCT
		transportadores	de iones hierro, de oligopéptidos

Se realizó una búsqueda específica de genes de interés relacionados con procesos de detoxificación y metabolismo de xenobióticos sobre los datos de RNA-Seq. En la actualidad la participación en mecanismos NTSR fue establecida para varias familias de genes entre ellas: citocromos P450, glutatión S-transferasas, glicosiltransferasas y transportadores ABC (Manabe et al., 2007; Yuan et al., 2007; Délye, 2012). A modo exploratorio, la búsqueda de estas y otras familias de genes potencialmente involucradas en la detoxificación de IMI en girasol se limitó a un  $|\log_2 F| \geq 0,9$  en ambos análisis (mapeo con y sin multiHits). En el análisis de expresión previo mapeo con multiHits se encontraron 61 *contigs* mientras que en el análisis sin multiHits se encontraron 47 *contigs*. En la Tabla 2.14 se muestra un resumen de los grupos de genes encontrados:

**Tabla 2.14.** *Contigs* relacionados a procesos de detoxificación y metabolismo de xenobióticos. sc: sin clasificación.

<i>Contigs</i>	Familia	Sub-familia
citocromos P450	71	A
		B
	72	A
	74	A
	75	B
	76	C
	77	B
	82	G
	83	B
	85	A
	93	D
	97	C
	704	A
	706	A
707	A	
transportadores ABC	C8	sc
	G	sc
	T1	sc
	T2	sc
glicosiltransferasas	8	sc
UDPglucuronosil/UDP-glucosiltransferasas	sc	sc
glutación S-transferasas	sc	sc

Ninguno de los *contigs* presentó expresión diferencial entre las muestras control y las muestras IMI 1  $\mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ).

### VALIDACIÓN MEDIANTE RTqPCR

Se eligieron 17 *contigs* de interés relacionados a familias de genes con particular relevancia en mecanismos NTSR para validar sus niveles de expresión mediante RTqPCR. Las familias funcionales a las cuales corresponden los 17 *contigs* elegidos se muestran en la siguiente tabla:

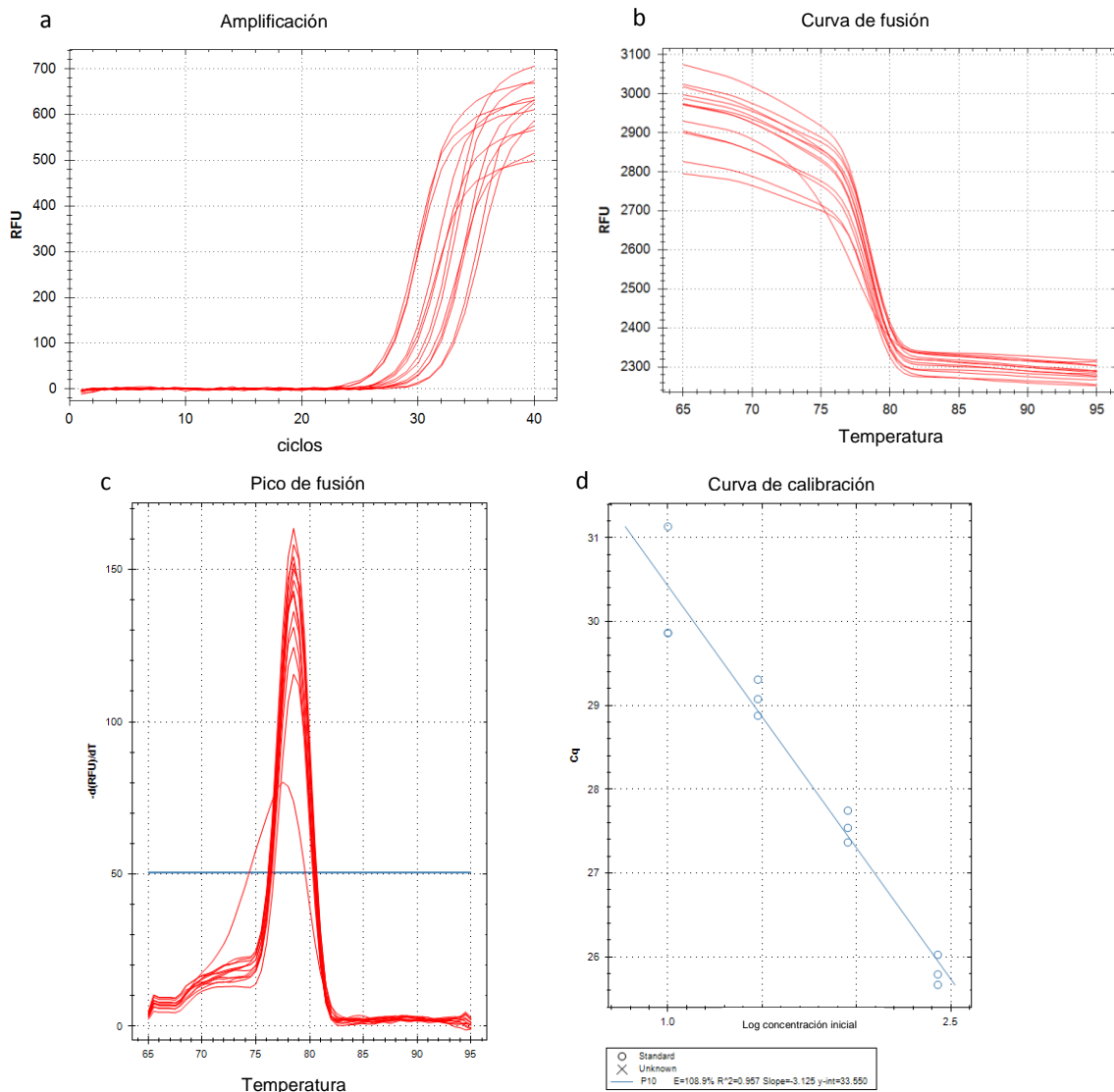
Familia	nº de <i>contigs</i>
citocromos P450	9
transportadores ABC	4
UDP-glucuronosil/UDP-glucosiltransferasas	2
glicosiltransferasas	1
glutación S-transferasas	1

Por otra parte, de los datos de RNA-Seq se seleccionaron aquellos dos *contigs* con mayor estabilidad en los niveles de expresión en las cuatro muestras (tratamientos control, IMI y sus respectivas réplicas biológicas) y que presentaron niveles de expresión cercanos a los de los 17 *contigs* a verificar. Dichos *contigs* se utilizaron como genes de referencia en el ensayo.

Los genes de referencia mostraron un coeficiente de variación promedio ( $\overline{CV}$ ) de 8,14 % y valor de estabilidad promedio ( $\overline{M}$ ) de 0,24. Valores  $\overline{CV}$  y  $\overline{M}$  menores a 25 % y 0,5, respectivamente, son indicadores de genes de referencia de expresión estable en las muestras lo que indica que los genes de referencia elegidos poseen un comportamiento ideal como tales.

Los 17 pares de cebadores elegidos para la validación mostraron una eficiencia de amplificación  $E = 100 \% \pm 10 \%$  y valores de ajuste  $R^2 \sim 0,98$ . En la Figura 2.23 se muestran a

modo ilustrativo los gráficos generados con el programa *CFX Manager™ Software Security Edition* (BIORAD) descriptores de la eficiencia para uno de los pares de cebadores analizados.



**Figura 2.23.** Pruebas de eficiencia de uno de los pares de cebadores diseñados para RTqPCR. La amplificación de cada par de cebadores se analizó sobre cuatro diluciones de un pool de ADNc. a) Curvas de amplificación, b) curvas de fusión, c) picos de fusión, d) curva de calibración para calcular el valor de eficiencia (E) del par de cebadores analizado.

A partir de los valores de Cq relativizados y normalizados por los genes de referencia elegidos se realizaron pruebas de comparación de medias *t* de *student*. Ningún *contig* mostró expresión diferencial en RTqPCR ( $p > 0,05$ ).

#### **PATRONES DE EXPRESIÓN TISULAR**

A través de la herramienta *Genomics/Clusters* de la base de datos HeliaGene<sup>a</sup> se estudiaron los patrones de expresión en tejido de los *contigs* verificados por RTqPCR.

La herramienta *Genomics/Clusters* consiste en una interfaz de visualización de datos de expresión órgano-específica de miARNs (micro ARNs) y mARNs derivada de la secuenciación del transcriptoma de referencia *non redundant clusters* HaT13I del LIPM (INRA/CNRS). Dicho transcriptoma proviene de muestras de tres tejidos vegetativos (hoja, raíz y tallo) y ocho tejidos florales (bráctea, lígula, ovario, estigma y estilo, antera, corola, semilla y polen) colectados a campo en cinco estadios de desarrollo diferentes. La herramienta *Genomics/Clusters* resulta muy útil para la identificación de patrones de expresión tisular.

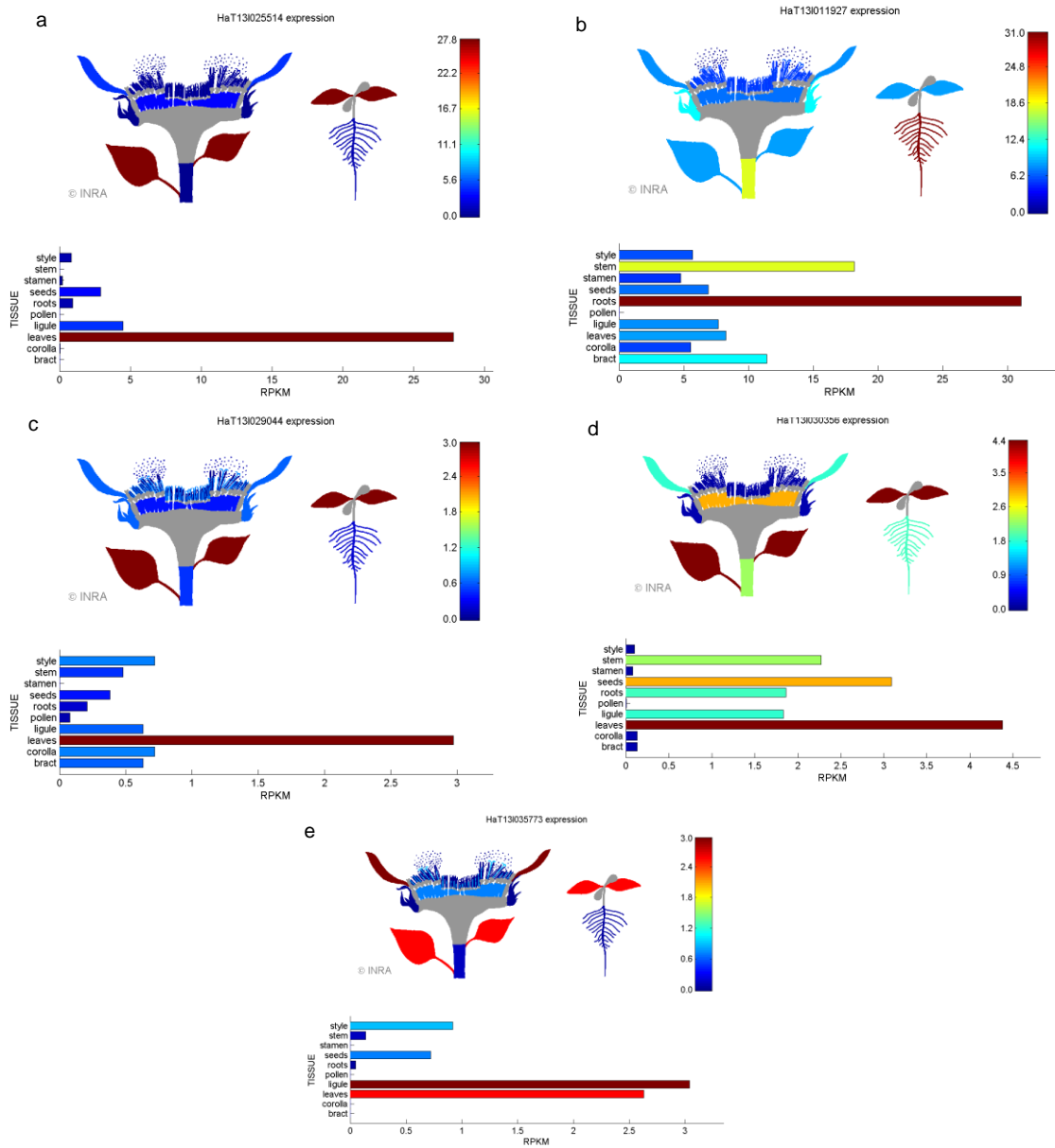
De los 17 *contigs* validados, diez presentaron sus máximos niveles de expresión en hojas (Tabla 2.15). En la Figura 2.24 se muestra la interfaz gráfica de los patrones de expresión de cinco de los *contigs* validados.

---

<sup>a</sup> <https://www.heliagene.org>

**Tabla 2.15.** Familia y número de *contigs* con máxima expresión en cada tejido evaluado para los 17 *contigs* validados por RTqPCR. Los niveles de expresión normalizados se cuantifican en RPKM (*reads per kilobase million*).

Familia y número de <i>contigs</i>					
Tejido	Citocromos P450	Transportadores ABC	UDP-glucuronosil/UDP-glucosiltransferasas	glicosiltransferasas	glutación S-transferasas
Hoja	7	2	1	-	-
Lígula	1	1	-	-	1
Bráctea	1	-	-	-	-
Semilla	-	-	1	-	-
Raíz	-	1	-	1	-
Niveles	0,7<RPKM<84	0,1<RPKM<4,4	3<RPKM<435	30 RPKM	3 RPKM



**Figura 2.24.** Patrones de expresión tisular de cinco de los *contigs* validados, cada uno correspondiente a una de las familias de detoxificación validada. a) citocromo P450 b) glicosiltransferasa c) UDP-glucuronosil/UDP-glicosiltransferasa d) transportador ABC e) glutatión S-transferasa.

## DISCUSIÓN

Los mecanismos de resistencia no relacionados al sitio de acción (NTSR) provocan una reducción en la cantidad de moléculas de herbicida que logran alcanzar la enzima blanco evitando los efectos nocivos del xenobiótico (Petit et al., 2010). Implican la reducción de los niveles de absorción, translocación del herbicida y/o el aumento en la degradación de las moléculas de xenobiótico por parte de enzimas que contribuyen al metabolismo general de la planta debido a una mayor expresión de los genes involucrados en dichos procesos en plantas resistentes comparado con las susceptibles (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000; Van Eerd et al., 2003; Délye, 2012). Los mecanismos NTSR pueden deberse a: i) *sobreexpresión constitutiva*: los genes de resistencia se sobreexpresan en el genotipo resistente antes y después del tratamiento con el herbicida y ii) *sobreexpresión inducida por el herbicida*: los genes de resistencia se sobreexpresan en el genotipo resistente después de la aplicación del herbicida (Zhang et al., 2007; Duhoux y Délye, 2013). En la mayoría de los casos estudiados en la literatura la resistencia es constitutiva y aparece como resultado a un aumento en el metabolismo que también puede ser detectado en el genotipo susceptible (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000) y este aumento en el metabolismo se debe a procesos de amplificación génica, sobreexpresión génica o modificaciones génicas que resultan en una degradación más eficiente del pesticida (R4P Network, 2016). Los mecanismos NTSR constitutivos resultarían más eficientes para evitar daños fisiológicos irremediables (Duhoux et al., 2015). Este modelo de resistencia se evidenció para *Lolium sp.* donde el genotipo resistente a herbicidas posee una expresión constitutiva de P450s más alta que el genotipo susceptible (Duhoux y Délye, 2013).

En el presente capítulo se llevaron a cabo dos caracterizaciones del transcriptoma de girasol Imisun en respuesta al tratamiento con imazetapir: la primera caracterización fue de dos genotipos de girasol resistente y susceptible a imidazolinonas, respectivamente mediante la técnica cDNA-AFLP y la segunda fue del genotipo resistente mediante la técnica TruSeq Stranded RNA-Seq.

Para el caso del análisis cDNA-AFLP se aislaron 49 fragmentos diferencialmente expresados. Los mismos fueron re-amplificados, secuenciados y caracterizados asignando potenciales categorías funcionales mediante búsquedas BLAST contra bases de datos de nucleótidos, ESTs, proteicas y contra el transcriptoma *de novo* de girasol HaT13l. Dieciocho secuencias alinearon con genes relacionados a detoxificación de xenobióticos y estrés:

. 10 secuencias correspondientes al genotipo R. Cuatro fueron obtenidas en el tiempo de colecta 12 hs y seis en el tiempo 24 hs.

. Seis secuencias correspondientes al genotipo S. Cuatro se encontraron en el tiempo de colecta 12 hs, una en el tiempo 18 hs y una en el tiempo 24 hs.

. Dos secuencias se encontraron simultáneamente en ambos genotipos en el tiempo de colecta 24 hs.

Por otra parte, teniendo en cuenta los tratamientos efectuados:

. De las 10 secuencias correspondientes al genotipo R, cuatro fueron encontradas únicamente en el tratamiento control, tres en el tratamiento IMI y tres fueron encontradas en ambos tratamientos.

. De las seis secuencias correspondientes al genotipo S, una fue encontrada únicamente en el tratamiento control, tres en el tratamiento IMI y dos fueron encontradas en ambos tratamientos.

. Las dos secuencias encontradas simultáneamente en ambos genotipos corresponden al tratamiento IMI del genotipo R y a los tratamientos control e IMI del genotipo S.

La presencia de *contigs* relacionados a detoxificación de xenobióticos tanto en el genotipo R como en el S sugiere que la resistencia aparece como un aumento de un metabolismo común a ambos genotipos. No se encontró una tendencia de expresión de los *contigs* en relación al tiempo de colecta del tejido foliar. Una hipótesis sería que el incremento de la expresión génica en el genotipo R ocurriría en un momento determinado del desarrollo de la planta o del tratamiento con el xenobiótico que no ha sido evaluado en este trabajo. Tampoco se encontró una tendencia de expresión de los *contigs* en relación al tratamiento, lo que refuerza la teoría de que se trata de una sobreexpresión constitutiva de los genes de resistencia.

En el caso del análisis TruSeq Stranded RNA-Seq se realizó una búsqueda específica de genes de interés relacionados con procesos de detoxificación y metabolismo de xenobióticos para el genotipo R: en el análisis de expresión previo mapeo con multiHits se encontraron 61 *contigs* mientras que en el análisis sin multiHits se encontraron 47 *contigs*. Estos *contigs* corresponden a las familias: citocromos P450, transportadores ABC, UDP-glucuronosil/UDP-glucosiltransferasas, glicosiltransferasas y glutatión S-transferasas. El análisis de estos genes no mostró expresión diferencial entre las plantas bajo tratamiento

control e IMI lo que sugiere que el metabolismo de herbicidas en el genotipo resistente es de expresión constitutiva.

Los resultados de ambos análisis del transcriptoma concuerdan con la hipótesis de que los genes que participan en la detoxificación del herbicida imazetapir en girasoles Imisun son de expresión constitutiva y que la resistencia aparece como resultado de un aumento de la expresión de los mismos en un momento determinado del desarrollo de la planta o del tratamiento con el xenobiótico. Estos genes participan en procesos metabólicos generales que también puede ser detectados en el genotipo susceptible. Estos mecanismos de resistencia no relacionados al sitio de acción podrían contribuir a la resistencia a imidazolinonas en girasol y estar relacionados al locus *Imr2*. Existiría una relación entre el locus *Imr2* presente únicamente en el genotipo R y un incremento en el metabolismo del herbicida en un momento determinado del tratamiento.

El análisis global de la expresión génica es una herramienta valiosa para determinar funciones y patrones génicos espaciales y temporales así como de las redes metabólicas a las que pertenecen. Puede ser llevado a cabo mediante técnicas de hibridación como son los microchips o microarreglos. Sin embargo, su utilidad se ve restringida a un número pequeño de organismos y de genes de referencia, poseen una sensibilidad limitada y presentan dificultades a la hora de distinguir transcritos de genes homólogos. Estas limitaciones son superadas por métodos alternativos basados en secuenciación o amplificación por PCR (Breyne et al., 2003). El método cDNA-AFLP ha sido ampliamente utilizado para caracterización génica y para análisis cualitativos de expresión génica global (Durrant et al., 2000; Sutcliffe et al., 2000; Kornmann et al., 2001; Breyne et al., 2003). Permite realizar caracterizaciones robustas y reproducibles particularmente en organismos no modelo para los cuales no hay disponible aún información genómica. Además de permitir la identificación de marcadores dominantes (presencia-ausencia) permite realizar análisis cuantitativos de la expresión génica (Stölting et al., 2009).

Varios factores determinan el número absoluto de factores derivados de transcritos (FDTs) analizados por cada amplificación selectiva en un análisis de cDNA-AFLP, entre ellos el número de bases selectivas utilizadas durante las amplificaciones de PCR selectivas, el tamaño del pool inicial de ADNc y la combinación de enzimas de restricción elegidas. Ha sido demostrado que si el número de fragmentos visualizados excede los 20 por PCR, existe un riesgo significativo de co-migración de secuencias de diferentes tamaños por lo cual los factores antes mencionados deben ser particularmente analizados para un análisis global del transcriptoma (Gort et al., 2006). En el presente estudio, la elección de la combinación óptima

de enzimas de restricción se llevó a cabo mediante un análisis computacional o *in silico*. Debido a que las búsquedas de AFLP consisten esencialmente en búsquedas de motivos de secuencia particulares, la implementación de un análisis *in silico* es una herramienta directa e inequívoca. Cada motivo de secuencia analizado está compuesto por los sitios de reconocimiento de las dos enzimas de restricción y tres o menos pares de bases selectivas para la amplificación, generando búsquedas para un máximo de  $4^3 \times 4^3 = 4096$  motivos de secuencia (Stölting et al., 2009). Esta aproximación *in silico* brindó un marco cuantitativo realista para el diseño del experimento de cDNA-AFLP y permitió determinar el par de enzimas de restricción que ofrece la mayor cobertura en las líneas de girasol en estudio: *Cvi*AI1 – *Mse*I.

La tecnología cDNA-AFLP es una herramienta poderosa para realizar perfiles transcriptómicos. Cada vez que esta técnica se aplica a nuevos sistemas biológicos los protocolos existentes deben modificarse para ser adaptados a la nueva especie. El procedimiento cDNA-AFLP llevado a cabo en el presente trabajo presenta dos variantes principales: el método *one gene - one tag* y la detección de bandas mediante tinción con plata. En el método *one gene - one tag* el número de fragmentos AFLP por transcripto se ve reducido a una única secuencia mediante la selección del fragmento de restricción 3' de cada transcripto previo a la amplificación. Esta variante ofrece algunas ventajas sobre la original: (i) sólo se genera un único FDT por transcripto lo que incrementa la eficiencia de cobertura del transcriptoma (fracción del transcriptoma cubierto dada una cantidad determinada de recursos y dada una combinación de cebadores usada) (ii) disminución en el número total de fragmentos analizados por electroforesis (iii) los FDTs derivados del fragmento de restricción 3' se ven menos afectados por la variación debida a una incompleta retrotranscripción de los ARNm, disminuyendo así el número de templados de ADNc necesarios para obtener un análisis reproducible (Vuylsteke et al., 2007). En cuanto al método de detección de bandas, actualmente la mayoría de los ensayos de cDNA-AFLP incluyen el revelado de los geles con autoradiografía mientras que sólo algunos reportes utilizan tinción con  $\text{AgNO}_3$ . Sin embargo, el uso de isótopos radioactivos está altamente controlado en la mayoría de los países y solo se permite su uso en cámaras específicas. La tinción con plata utilizada como método de detección en el presente trabajo es segura, relativamente económica y permite recuperar los FDTs directamente del gel de poliacrilamida (Xiao et al., 2009).

En la actualidad las tecnologías de secuenciación de última generación como RNA-seq permiten el estudio más profundo y confiable y ofrecen muchas ventajas para la caracterización de la expresión génica global incluyendo alta sensibilidad y especificidad para la detección de transcriptos poco abundantes, discriminación entre secuencias muy similares

y cuantificación digital. Estas tecnologías pueden aplicarse a especies no modelo debido a que los transcriptomas de referencia necesarios para la cuantificación de la expresión pueden ser obtenidos incluso cuando no hay datos previos de secuencias transcriptómicas disponibles (Gaines et al., 2014). La técnica RNA-Seq resulta ideal para caracterizar los patrones generales de expresión de genes de interés y para mejorar las técnicas de selección fenotípica permitiendo identificar potenciales genes relacionados a mecanismos de NTSR (Duhoux et al., 2015). Su importancia radica en que se realiza una búsqueda exploratoria de aquellas familias génicas vinculadas a procesos de detoxificación de xenobióticos que se expresan en el momento puntual del análisis. Esta foto de un momento particular de la expresión génica permite considerar los niveles de expresión de todos los *contigs* de interés en conjunto y podría utilizarse como predictor de mecanismos NTSR (Duhoux et al., 2015). Las técnicas modernas basadas en secuenciación de última generación tal como RNA-Seq permiten detectar extensos grupos de genes diferencialmente regulados, aproximación de alto potencial cuando los mecanismos de resistencia son multigénicos tal como se sugiere para los mecanismos NTSR (R4P Network, 2016).

La técnica RNA-Seq es llevada a cabo mediante tecnología de secuenciación de última generación que produce millones de *reads* cortos de ADNc. Luego, dos estrategias pueden ser utilizadas para construir transcriptos a partir de estos *reads*: alinear-ensamblar, donde el transcripto se reconstruye alineando los *reads* cortos contra un genoma de referencia o ensamblar-alinear, donde los *reads* se ensamblan *de novo* para construir los transcriptos y estos se alinean al genoma de referencia. Más aun, la estrategia de ensamblado *de novo* también se aplica para la construcción de transcriptomas que servirán de referencia para el resto de las secuencias obtenidas (Fan et al., 2013). La alineación de secuencias contra un genoma de referencia se limita a un número muy pequeño de especies modelo para las cuales se dispone de la totalidad de la información genómica y esta ha sido publicada. Por otra parte, las técnicas de secuenciación de última generación han permitido obtener transcriptomas completos de especies no modelo de gran importancia agronómica que pueden ser utilizados como referencia para estudios RNA-Seq (Farrell et al., 2014). A partir del desarrollo de complejos algoritmos se logra reconstruir el transcriptoma de una especie *de novo*, sin ayuda de un genoma de referencia y este se convierte en una referencia en sí mismo, posibilitando estudios de variación genética en regiones transcritas y de expresión génica global. Brevemente, para el ensamblado de transcriptomas *de novo* se identifican secuencias contiguas en los *reads* y mediante complejos algoritmos se superponen generando *contigs* cuya identidad puede ser determinada. Existe una serie de factores que afectan el éxito del ensamblado: grado de heterocigosis, secuencias repetitivas y error intrínseco del método de

secuenciación así como la complejidad de identificar potenciales variantes de *splicing* (Farrell et al., 2014). Por ello, para que el ensamblado resulte robusto el mismo debe provenir del máximo número de muestras posible, de una cantidad abundante de *reads* y de algoritmos desarrollados particularmente para dicha especie y para dicha técnica de secuenciación.

Mientras que la tecnología de pirosecuenciación 454 es útil para generar transcriptomas de referencia *de novo* debido a la mayor longitud de sus *reads* (400–500 pb), la tecnología *Illumina HiSeq* provee *reads* más cortos y una mayor cobertura, permitiendo la detección y cuantificación de transcriptos, incluso de aquellos poco abundantes (Lister et al., 2009). En el presente estudio la secuenciación fue llevada cabo mediante tecnología *Illumina HiSeq2000* y los mapeos se realizaron contra el transcriptoma de referencia de girasol *non redundant clusters* HaT13I gentilmente facilitado por el *Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organisms* LIPM, INRA/CNRS, Francia. El mismo proviene de un ensamblado *de novo* de secuencias RNA-Seq de 55 muestras de girasol correspondientes a una línea altamente emparentada con las líneas utilizadas en el presente trabajo de tesis. Sus 91860 *contigs* (90266 péptidos) permitieron realizar un mapeo sumamente confiable y una amplia búsqueda exploratoria de genes relacionados a mecanismos NTSR. La estrategia utilizada en el presente trabajo constituye la opción más informativa y conveniente para el estudio de la expresión génica global y la identificación de genes de interés involucrados a la resistencia a IMI dada la no disponibilidad del genoma secuenciado para la especie.

Uno de los principales obstáculos que un experimento de RNA-seq debe superar es la determinación exacta del origen del transcripto detectado. Para aquellas especies no modelo cuyas secuencias de referencia no están disponibles los *reads* se autoensamblan basados en su similitud de secuencia. La redundancia genómica debida al alto número de genes duplicados presente en organismos superiores y/o poliploides aumenta la probabilidad de que transcriptos derivados de diferentes genes se ensamblen juntos provocando importantes errores en la cuantificación. Incluso aunque exista un genoma de referencia disponible muchos *reads* cortos, especialmente los generados en experimentos *Illumina*, alinean con fragmentos de idéntica secuencia en diferentes loci y por ello se excluyen de la cuantificación afectando los niveles de expresión estimados para el gen en cuestión (Ilut et al., 2012). En el ensayo de RNA-seq realizado en el presente trabajo se realizaron dos tipos de mapeo contra el transcriptoma de referencia: *mapeo incluyendo y excluyendo multiHits*. Esto permitió analizar los niveles de redundancia genómica en girasol ya que incluir los multiHits implica visualizar aquellos *reads* que mapean con el mismo *E-value* en varias regiones del transcriptoma de referencia aunque se pierda el poder de cuantificación de la técnica. El

porcentaje de mapeo total se incrementó de 71,5 % a 90,5 % para las estrategias sin y con multiHits respectivamente, lo que implica un análisis cualitativo y exploratorio de aproximadamente un 19 % más de *contigs* en cada muestra. Aquellos *reads* que alinean de manera ambigua, es decir que mapean con idéntica probabilidad a diferentes loci en el genoma de referencia no pueden ser asignados a un modelo génico específico ni cuantificados confiablemente y son generalmente descartados. Ignorar este tipo de *reads* puede producir resultados falsos creando señales de expresión diferencial entre genes con diferentes grados de redundancia de secuencia. Por otro lado, mantenerlos implica la partición equitativa de los *reads* y por ello se producen falsos resultados cuando los genes a los cuales estos *reads* son asignados poseen grandes diferencias en sus niveles de expresión (Ilut et al., 2012). Por ello, realizar y considerar ambas estrategias de mapeo genera un resultado más robusto y confiable y es de suma utilidad cuando se trata un análisis global de las redes metabólicas involucradas en un proceso particular como es el presente estudio de los mecanismos NTSR. A diferencia del método RNA-seq cuyo análisis permite identificar secuencias ambiguas, el error por redundancia es mucho mayor y casi imposible de eliminar en técnicas de hibridación como microarreglos y de corte y amplificación como cDNA-AFLP para las cuales el nivel de profundidad de cobertura del transcriptoma es mucho menor.

El presente estudio amplía la información general disponible sobre secuencias transcriptómicas en la especie girasol y particularmente sobre la expresión génica relacionada a procesos de resistencia a herbicidas de la familia imidazolinonas en girasol Imisun. Las técnicas utilizadas cDNA-AFLP y RNA-Seq están diseñadas para el estudio global del transcriptoma y permitieron detectar potenciales genes de detoxificación implicados en el carácter bajo estudio mediante la identificación de transcritos asociados a mecanismos de resistencia no relacionados al sitio de acción.

## CONCLUSIONES

- La concentración óptima de herbicida imazetapir (1  $\mu$ M) y los tiempos de colecta del tejido foliar post tratamiento con imazetapir (12 hs, 18 hs y 24 hs) elegidos resultaron adecuados para el estudio del transcriptoma.
- El análisis de la actividad AHAS para el genotipo susceptible (S) en los tiempos de colecta del tejido foliar elegidos mostró reducciones significativas en las plantas tratadas con IMI respecto de los controles para todos los tiempos evaluados. Esto sugiere que el herbicida ya se encuentra unido a su sitio blanco en la enzima.
- El análisis de la actividad AHAS para el genotipo resistente (R) no mostró diferencias significativas entre plantas tratadas con IMI y sus controles para el tiempo temprano de 12 hs, pero si para los tiempos intermedio (18 hs) y tardío (24 hs). Esto sugiere que la mutación *Imr1* es de eficiencia moderada y que el herbicida inhibe progresivamente en el tiempo la actividad enzimática.
- El análisis de la actividad AHAS para el genotipo resistente (R) en los tiempos intermedio y tardío refuerza la teoría de que la resistencia presente en la fuente Imisun no se debe exclusivamente a la mutación en el gen *ahas* sino que el locus *Imr2* interviene y la refuerza.
- Las enzimas de restricción elegidas para el ensayo de cDNA-AFLP resultaron adecuadas para una alta cobertura del transcriptoma.
- Mediante el análisis de cDNA-AFLP se encontraron *contigs* relacionados a detoxificación de xenobióticos tanto en el genotipo R como en el S, sugiriendo que la resistencia aparece como un aumento de un metabolismo que también está presente en el genotipo S. Este incremento de la expresión génica ocurriría en un momento determinado del desarrollo de la planta o del tratamiento con el xenobiótico.
- En el ensayo de cDNA-AFLP los *contigs* relacionados a detoxificación de xenobióticos no mostraron una tendencia de expresión en relación al tiempo de colecta del tejido foliar.
- El análisis TruSeq Stranded RNA-Seq para el genotipo R permitió identificar genes de detoxificación de herbicida pertenecientes a las familias citocromos P450, transportadores ABC, UDP-glucuronosil/UDP-glucosiltransferasas, glicosiltransferasas y glutatión S-transferasas. Los genes de detoxificación analizados no mostraron expresión diferencial entre

las plantas bajo tratamiento control e IMI. Esto sugiere que el metabolismo de herbicidas en el genotipo resistente es de expresión constitutiva.

- Los resultados sugieren que el metabolismo de herbicidas en girasol Imisun es constitutivo y aparece como resultado a un aumento en el metabolismo que también puede ser detectado en el genotipo susceptible.
- Estos resultados sugieren que mecanismos NTSR contribuirían a la resistencia a herbicidas en esta especie y que estos mecanismos estarían relacionados al locus modificador *Imr2*.

## **CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

## CONCLUSIONES GENERALES

Los índices de reducción estimados para los tratamientos combinados de herbicida con inhibidores de citocromo P450s en los ensayos en plantas completas sugieren que en la fuente de resistencia Imisun descubierta en Kansas existiría un mecanismo de detoxificación mediado por isoformas de P450s particularmente inhibidas por ABT y PBO. Dichas isoformas poseen diferente especificidad por los distintos inhibidores y tendrían un comportamiento tejido-específico expresándose principalmente en raíz y hoja. El aumento de la fitotoxicidad del herbicida al combinarse con inhibidores de P450s en la línea resistente sugiere que un mecanismo de resistencia no relacionado al sitio de acción (NTSR) mediado por metabolismo P450 estaría asociado al locus *Imr2* y completaría a la resistencia conferida por la mutación la mutación en el codón 205 del gen *ahas* (*Imr1*).

La caracterización del transcriptoma de las líneas HA 425 (R) y HA 89 (S) sugiere que la resistencia aparece como un aumento de un metabolismo que está presente en ambos genotipos y que el incremento de la expresión génica ocurriría en un momento determinado del desarrollo de la planta o del tratamiento con el xenobiótico. Se identificaron genes de detoxificación de herbicida pertenecientes a las familias citocromos P450, transportadores ABC, UDP-glucuronosil/UDP-glucosiltransferasas, glicosiltransferasas y glutatión S-transferasas. Estas familias génicas involucradas en mecanismos NTSR contribuirían a la resistencia a herbicidas en girasol y podrían estar relacionados al locus modificador *Imr2*.

Los resultados de este trabajo sugieren que el metabolismo de herbicidas en girasol Imisun es constitutivo y aparece como resultado a un aumento en el metabolismo que también puede ser detectado en el genotipo susceptible. Mecanismos NTSR contribuirían a la resistencia a herbicidas en esta especie y estarían vinculados al locus modificador *Imr2*.

## PERSPECTIVAS

El mecanismo de resistencia NTSR presente en girasoles Imisun constituye una potencial fuente de variabilidad disponible para el mejoramiento del cultivo. La caracterización de sus bases genéticas, bioquímicas y moleculares provee nuevas oportunidades para explotar tanto la resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS como de otras familias químicas. Destinar esfuerzos a su estudio permite generar información de utilidad para desarrollar nuevas variedades y estrategias efectivas de manejo de malezas.

La participación y niveles de contribución de nuevas isoformas de citocromo P450s en el metabolismo de xenobióticos podrían evaluarse con nuevas combinaciones herbicida-inhibidor, empleando diferentes compuestos de la familia de las imidazolinonas u otras familias químicas e inhibidores de citocromo P450s adicionales como malatión o terbufos.

Los genes involucrados en el control de los mecanismos de detoxificación relacionados al locus modificador *Imr2* podrían aislarse de girasoles Imisun y utilizarse para transformar otros cultivos de interés con el objeto de desarrollar nuevas variedades resistentes a herbicidas. Para continuar con el estudio de la expresión génica realizado en el presente trabajo, sería interesante llevar a cabo análisis con genotipos de resistencia intermedia a IMI, en nuevos tiempos de colecta del tejido foliar e incluso en otros tejidos y bajo el tratamiento con otros herbicidas de la familia.

Dado que los mecanismos NTSR presentan resistencia cruzada a herbicidas de diferentes familias químicas, el estudio y la identificación de los genes relacionados a *Imr2* permitiría la implementación de estrategias de rotación de herbicidas en el cultivo, disminuyendo la probabilidad de generar malezas resistentes por el uso de herbicidas de un único modo de acción. La versatilidad de las enzimas relacionadas a metabolismo de xenobióticos podría aprovecharse para el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en una oferta más amplia de ingredientes activos y adyuvantes, mejorando las formulaciones y orientando a un manejo más eficiente y sustentable del control de malezas.

Los herbicidas son la herramienta principal para el control de malezas pero la resistencia a estos químicos aumenta rápidamente a nivel mundial amenazando a la producción global de alimento. Los mecanismos NTSR son actualmente impredecibles, confieren resistencia a múltiples modos de acción incluso aunque no haya habido una aplicación previa, poseen generalmente un control poligénico y devienen de vías de estrés

preexistentes en la planta. Por lo tanto, resulta de suma importancia continuar con la identificación de genes vinculados a estos mecanismos así como elucidar las bases genéticas de su control, sus dinámicas evolutivas y desarrollar eficientes herramientas de diagnóstico. Este es actualmente el mayor desafío para la investigación de resistencia a herbicidas.

Poco se conoce acerca de los genes que controlan los mecanismos de resistencia no relacionada a sitio de acción (NTSR) y sin embargo, comprender estos mecanismos y conocer los genes involucrados servirá para elaborar y definir estrategias de manejo proactivo que permitan un control más eficiente de las malezas en el cultivo de girasol.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abit, M. J. M., & Al-Khatib, K. (2013). Metabolism of quizalofop and rimsulfuron in herbicide resistant grain sorghum. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(1), 24–27. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.11.003>
- Al-Khatib, K., Baumgartner, J. R., Peterson, D. E., & Currie, R. S. (1998). Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Science*, 46(4), 403–407.
- Andrews, C. J., Cummins, I., Skipsey, M., Grundy, N. M., Jepson, I., Townson, J., & Edwards, R. (2005). Purification and characterisation of a family of glutathione transferases with roles in herbicide detoxification in soybean (*Glycine max* L.); selective enhancement by herbicides and herbicide safeners. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82(3), 205–219. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.11.009>
- Badouin, H., Gouzy, J., Grassa, C., Murat, F., Staton, S., Cottret, L., Lelandais-brière, C., Owens, G., Carrère, S., Mayjonade, B., Legrand, L., Gill, N., Kane, N., Bowers, J., Hubner, S., Bellec, A., Bérard, A., Bergès, H., Blanchet, N., Boniface, M., Brunel, D., Catrice, O., Chaidir, N., Claudel, C., Donnadiou, C., Faraut, T., Fievet, G., Helmstetter, N., King, M., Knapp, S., Lai, Z., Pegot-espagnet, P., Pouilly, N., Raftis, F., Sallet, E., Schiex, T., Thomas, J., Vandecasteele, C., Varès, D., Vear, F., Vautrin, S., Crespi, M., Mangin, B., Burke, J., Salse, J., Muñoz, S., Vincourt, P., Rieseberg, L. & Langlade, N. (2017). The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature*, 546, 148-152.
- Bartholomew, D. M., Van Dyk, D. E., Lau, S.-M. C., O'Keefe, D. P., Rea, P. A., & Viitanen, P. V. (2002). Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. *Plant Physiology*, 130(3), 1562–1572. <http://doi.org/10.1104/pp.008334>
- Baucom, R. S. (2016). The remarkable repeated evolution of herbicide resistance. *American Journal of Botany*, 103(2), 181–183. <http://doi.org/10.3732/ajb.1500510>
- Beckie, H. J., Warwick, S. I., & Sauder, C. A. (2012). Basis for Herbicide Resistance in Canadian Populations of Wild Oat (*Avena fatua*). *Weed Science*, 60(1), 10–18. <http://doi.org/10.1614/WS-D-11-00110.1>
- Blamey, F. P., & Zollinger, R. K. (1997). Sunflower production and culture. En: Sunflower Technology and Production (ed A.A. Schneiter), pp. 596-670. American Society of Agronomy Inc., Crop Science Society of America Inc., Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Breccia, G., Gil, M., Vega, T., Altieri, E., Bulos, M., Picardi, L., & Nestares, G. (2017). Contribution of non-target-site resistance in imidazolinone-resistant Imisun sunflower. *Bragantia*, (In press).
- Breccia, G., Vega, T., Felitti, S. A., Picardi, L., & Nestares, G. (2013). Differential expression of acetohydroxyacid synthase genes in sunflower plantlets and its response to imazapyr herbicide. *Plant Science*, 208, 28–33. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.008>
- Breccia, G., Vega, T., Nestares, G., Mayor, M. L., Zorzoli, R., & Picardi, L. (2011). Rapid test for detection of imidazolinone resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding*, 130(1), 109–113. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01756.x>

- Breyne, P., Dreesen, R., Cannoot, B., Rombaut, D., Vandepoele, K., Rombauts, S., Vanderhaeghen, R., Inzé, D., & Zabeau, M. (2003). Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 269(2), 173–179. <http://doi.org/10.1007/s00438-003-0830-6>
- Bruniard, J. M. (2001). Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of crossresistance pattern and identification of molecular markers in sunflower (*Helianthus annuus* L.). PhD, North Dakota State University.
- Bruniard, J. M., & Miller, J. F. (2001). Inheritance of imidazolinone-herbicide resistance in sunflower. *Helia*, 24(35), 11–16.
- Bulos, M., Sala, C. A., Altieri, E., & Ramos, M. L. (2013). Marker assisted selection for herbicide resistance in sunflower. *Helia*, 36(59), 1–16. <http://doi.org/10.2298/HEL1359001B>
- Burnet, M. W. M., Loveys, B. R., Holtum, J. A. M., & Powles, S. B. (1993). A mechanism of chlorotoluron resistance in *Lolium rigidum*. *Planta*, 190, 182–189.
- Busi, R., Vila-Aiub, M. M., & Powles, S. B. (2010). Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity*, 106(5), 817–824. <http://doi.org/10.1038/hdy.2010.124>
- Cavallini, A., Natali, L., Zuccolo, A., Giordani, T., Jurman, I., Ferrillo, V., Vitacolonna, N., Sarri, V., Cattonaro, F., Ceccarelli, M., Cionini, P. G. & Morgante, M. (2010). Analysis of transposons and repeat composition of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(3), 491–508. <http://doi.org/10.1007/s00122-009-1170-1177>
- Chipman, D., Barak, Z., & Schloss, J. V. (1998). Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1385(2), 401–419. [http://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00083-1](http://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00083-1)
- Cho, H. Y., & Kong, K. H. (2005). Molecular cloning, expression, and characterization of a phi-type glutathione S-transferase from *Oryza sativa*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 83(1), 29–36. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.03.005>
- Coleman, J. O. D., Blake-kalff, M. M. A., & Davies, T. G. E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.*, 2(4), 144–151.
- Cummins, I., Bryant, D. N., & Edwards, R. (2009). Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Plant Biotechnology Journal*, 7(8), 807–820. <http://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00445.x>
- Cummins, I., Cole, D., & Edwards, R. (1997). Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 59, 35–49. <http://doi.org/10.1006/pest.1997.2308>
- Das, M., Reichman, J. R., Haberer, G., Welzl, G., Aceituno, F. F., Mader, M. T., Watrud, L. S., Pflieger, T. G., Gutiérrez, R. A., Schäffner, A. R., & Olszyk, D. M. (2010). A composite transcriptional signature differentiates responses towards closely related herbicides in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*, 72(4), 545–556. <http://doi.org/10.1007/s11103-009-9590-y>
- De Prado, R. A., & Franco, A. R. (2004). Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Science*, 52(3), 441–447. <http://doi.org/10.1614/P2002-168A>

- Délye, C. (2012). Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: A major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science*, 69(2), 176–187. <http://doi.org/10.1002/ps.3318>
- Délye, C., Gardin, J. A. C., Boucansaud, K., Chauvel, B., & Petit, C. (2011). Non-target-site-based resistance should be the centre of attention for herbicide resistance research: *Alopecurus myosuroides* as an illustration. *Weed Research*, 51(5), 433–437. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2011.00864.x>
- Délye, C., Jasieniuk, M., & Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), 649–658. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.001>
- Deng, F., & Hatzios, K. K. (2003). Characterization of cytochrome P450-mediated bensulfuron-methyl O-demethylation in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74, 102–115. [http://doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00151-7](http://doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00151-7)
- Devine, M. D., & Shukla, A. (2000). Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection*, 19, 881–889. [http://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00123-X](http://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00123-X)
- Didierjean, L., Gondet, L., Perkins, R., Lau, S. C., Schaller, H., O'Keefe, D. P., & Werck-Reichhart, D. (2002). Engineering Herbicide Metabolism in Tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a Cytochrome P450 Enzyme from *Jerusalem Artichoke*. *Plant Physiology*, 130(1), 179–189. <http://doi.org/10.1104/pp.005801>
- Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P., & Barnes, J. (2006). Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Coryza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(1), 30–41. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.004>
- Doley, W. P. (2001). Clearfield® sunflower: variety qualification system and other technical considerations. In *2001 Sunflower Research Workshop*.
- Duggleby, R. G., Mccourt, J. A., & Guddat, L. W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 309–324. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.004>
- Duggleby, R. G., & Pang, S. S. (2000). Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1), 1–36. <http://doi.org/10.1107/S09074444901011635>
- Duhoux, A., Carrère, S., Gouzy, J., Bonin, L., & Délye, C. (2015). RNA-Seq analysis of ryegrass transcriptomic response to an herbicide inhibiting acetolactate-synthase identifies transcripts linked to non-target-site-based resistance. *Plant Molecular Biology*, 87(4–5), 473–487. <http://doi.org/10.1007/s11103-015-0292-3>
- Duhoux, A., & Délye, C. (2013). Reference genes to study herbicide stress response in *Lolium* sp.: up-regulation of P450 genes in plants resistant to acetolactate-synthase inhibitors. *PLoS ONE*, 8(5), e63576. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063576>
- Durner, J., Gailus, V., & Böger, P. (1991). New aspects on inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. *Plant Physiology*, 95(4), 1144–1149. <http://doi.org/10.1104/pp.95.4.1144>
- Durrant, W. E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G. (2000). cDNA-AFLP Reveals a Striking Overlap in Race-Specific Resistance and Wound Response Gene Expression Profiles. *The Plant Cell*, 12(June), 963–977. <http://doi.org/10.1105/tpc.12.6.963>

- Edwards, R., & Dixon, D. P. (2005). Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401, 169–186. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01011-6](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01011-6)
- Fan, H., Xiao, Y., Yang, Y., Xia, W., Mason, A. S., Xia, Z., Qiao, F., Zhao, S., & Tang, H. (2013). RNA-Seq analysis of *Cocos nucifera*: transcriptome sequencing and *de novo* assembly for subsequent functional genomics approaches. *PLoS ONE*, 8(3), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059997>
- Farrell, J. D., Byrne, S., Paina, C., & Asp, T. (2014). *De novo* assembly of the perennial ryegrass transcriptome using an RNA-seq strategy. *PLoS ONE*, 9(8), e103567. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0103567>
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol*, 44, 507–33. <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.507>
- Fischer, A. J., Bayer, D. E., Carriere, M. D., Ateh, C. M., & Yim, K. O. (2000). Mechanisms of resistance to bispyribac-sodium in an *Echinochloa phyllopogon* accession. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68(3), 156–165. <http://doi.org/10.1006/pest.2000.2511>
- Gaillard, C., Dufaud, A., Tommasinib, R., Kreuzc, K., Amrheinb, N., & Martinoiaa, E. (1994). A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Letters*, 352, 219–221.
- Gaines, T. A., Lorentz, L., Figge, A., Herrmann, J., Maiwald, F., Ott, M. C., Han, H., Busi, R., Yu, Q., Powles, S. B., & Beffa, R. (2014). RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. *Plant Journal*, 78(5), 865–876. <http://doi.org/10.1111/tpj.12514>
- Gardin, J. A. C., Gouzy, J., Carrère, S., & Délye, C. (2015). ALOMYbase, a resource to investigate non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in the major grass weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *BMC Genomics*, 16(1), 590. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1804-x>
- Gil, M. (2011). Trabajo final de tesina para optar al grado académico de Licenciado en biotecnología. *Mecanismos involucrados en la resistencia genética a imidazolinonas en Helianthus annuus L.* Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.
- Gill, N., Buti, M., Kane, N., Bellec, A., Helmstetter, N., Berges, H., & Rieseberg, L. H. (2014). Sequence-based analysis of structural organization and composition of the cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. *Biology*, 3(2), 295–319. <http://doi.org/10.3390/biology3020295>
- Gort, G., Koopman, W. J. M., & Stein, A. (2006). Fragment length distributions and collision probabilities for AFLP markers. *Biometrics*, 62(4), 1107–1115. <http://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2006.00613.x>
- Graseum, B., Chaubet, N., Gigot, C., Loper, J., & Benveniste, P. (1995). Functional expression of *Saccharomyces cerevisiae* CYP51A1 encoding lanosterol-14-demethylase in tobacco results in bypass of endogenous sterol biosynthetic pathway and resistance to an obtusifoliol-14-demethylase herbicide inhibitor. *The Plant Journal*, 7(5), 761–770.
- Guo, J., Riggins, C. W., Hausman, N. E., Hager, A. G., Riechers, D. E., Davis, A. S., & Tranel, P. J. (2015). Non-target-site resistance to ALS inhibitors in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Science*, 63(2), 399–407. <http://doi.org/10.1614/WS-D-14-00139.1>

- Han, H., Yu, Q., Vila-Aiub, M., & Powles, S. B. (2014). Genetic inheritance of cytochrome P450-mediated metabolic resistance to chlorsulfuron in a multiple herbicide resistant *Lolium rigidum* population. *Crop Protection*, 65, 57–63. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.026>
- Heap, I. (2017). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Último acceso: febrero de 2017. [http:// www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2), R19. <http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Hinz, J. R. R., Owen, M. D. K., & Barrett, M. (1997). Nicosulfuron, primisulfuron, and bentazon hydroxylation by corn (*Zea mays*), woolly cupgrass (*Eriochloa villosa*), and shattercane (*Sorghum bicolor*) cytochrome P450. *Weed Science*, 45(4), 474–480.
- Hirose, S., Kawahigashi, H., Ozawa, K., Shiota, N., Inui, H., Ohkawa, H., & Ohkawa, Y. (2005). Transgenic rice containing human CYP2B6 detoxifies various classes of herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3461–3467. <http://doi.org/10.1021/jf050064z>
- Ilut, D. C., Coate, J. E., Luciano, A. K., Owens, T. G., May, G. D., Farmer, A., & Doyle, J. J. (2012). A comparative transcriptomic study of an allotetraploid and its diploid progenitors illustrates the unique advantages and challenges of RNA-Seq in plant species. *American Journal of Botany*, 99(2), 383–396. <http://doi.org/10.3732/ajb.1100312>
- Inui, H., & Ohkawa, H. (2005). Herbicide resistance in transgenic plants with mammalian P450 monooxygenase genes. *Pest Management Science*, 61(3), 286–291. <http://doi.org/10.1002/ps.1012>
- Iwakami, S., Uchino, A., Kataoka, Y., Shibaie, H., Watanabe, H., & Inamura, T. (2014). Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Management Science*, 70(4), 549–558. <http://doi.org/10.1002/ps.3572>
- Kaspar, M., Grondona, M., Leon, A., & Zambelli, A. (2011). Selection of a sunflower line with multiple herbicide tolerance that is reversed by the P450 inhibitor malathion. *Weed Science*, 59(2), 232–237. <http://doi.org/10.1614/WS-D-10-00120.1>
- Kemp, M. S., Moss, S. R., & Thomas, T. H. (1990). Herbicide resistance in *Alopecurus myosuroides*. En: *Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies* (eds. M. B. Green, H. M. LeBaron, & W. K. Moberg), pp. 373–393. American Chemical Society, Washington, D.C. <http://doi.org/doi:10.1021/bk-1990-0421.ch026>
- Klein, M., Burla, B., & Martinoia, E. (2006). The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Letters*, 580(4), 1112–1122. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.056>
- Koeppe, M. K., Hirata, C. M., Brown, H. M., Kenyon, W. H., O'Keefe, D. P., Lau, S. C., Zimmerman, W.T. & Green, J. M. (2000). Basis of selectivity of the herbicide rimsulfuron in maize. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66, 170–181. <http://doi.org/10.1006/pest.1999.2470>

- 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. & Knapp, S. J. (2004). Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(6), 1147–1159. <http://doi.org/10.1007/s00122-004-1716-7>
- Kornmann, B., Preitner, N., Rifat, D., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2001). Analysis of circadian liver gene expression by ADDER, a highly sensitive method for the display of differentially expressed mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 29(11), E51-1. <http://doi.org/10.1093/nar/29.11.e51>
- Kreuz, K., Tommasini, R., & Martinoia, E. (1996). Old Enzymes for a New Job. *Plant Physiology*, 111, 349–353.
- Kvesitadze, G., Khatishashvili, G., T., S., & Ramsden, J. J. (2006). The fate of organic contaminants in the plant cell. En: *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants* (ed. S. V. B. Heidelberg), pp. 103–133.
- Kwon, C. S., & Penner, D. (1995). Response of a chlorsulfuron-resistant biotype of *Kochia scoparia* to ALS inhibiting herbicides and piperonyl butoxide. *Weed Science*, 43, 561–565.
- Lancien, M., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2007). Amino Acid Synthesis in Plastids. En: *The Structure and Function of Plastids* (eds R. Wise & J. Hooper), pp. 355–385, Springer.
- Lee, A., Gatterdam, P., Chiu, T., Mallipudi, N., & Fiala, R. (1991). Plant metabolism. En: *The imidazolinone herbicides* (eds. D. L. Shaner & S. L. O'Connor), pp. 151–165. CRC Press, Inc.. Boca Raton, Florida
- León, A. J., Morata, M. M., & Zambelli, A. D. (2012). Herbicide-resistant sunflower plants and methods of use. US Patent, 2012/0023601 A1, Advanta Seeds B.V., AJ Kapelle (NL); BASF
- Letouzé, A., & Gasquez, J. (2001). Inheritance of fenoxaprop-P-ethyl resistance in a blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) population. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 288–296. <http://doi.org/10.1007/s001220100607>
- Letouzé, A., & Gasquez, J. (2003). Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes : a suggested mechanism responsible for multiple resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). *Agronomie*, 23, 601–608. <http://doi.org/10.1051/agro:2003036>
- Li, P., Piao, Y., Shon, H. S., & Ryu, K. H. (2015). Comparing the normalization methods for the differential analysis of Illumina high-throughput RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, 1–9. <http://doi.org/10.1186/s12859-015-0778-7>
- Lister, R., Gregory, B. D., & Ecker, J. R. (2009). Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 107–118. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.11.004>
- Liu, G., Sánchez-Fernández, R., Li, Z. S., & Rea, P. A. (2001). Enhanced multispecificity of *Arabidopsis* vacuolar multidrug resistance-associated protein-type ATP-binding cassette transporter, AtMRP2. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 8648–8656. <http://doi.org/10.1074/jbc.M009690200>
- Lundqvist, E., Johansson, I., & Ingelman-Sundberg, M. (1999). Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene*, 226(2), 327–338. [http://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00567-8](http://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00567-8)

- Malik, V. S. (2016). RNA sequencing as a tool for understanding biological complexity of abiotic stress in plants. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 25(1), 1–2.
- Manabe, Y., Tinker, N., Colville, A., & Miki, B. (2007). CSR1, the sole target of imidazolinone herbicide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 48(9), 1340–1358. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcm105>
- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K., & Amrhein, N. (1993). ATP-dependent glutathione S-conjugate “export” pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, 364(6434), 247–249. <http://doi.org/10.1038/364247a0>
- McCourt, J. A., & Duggleby, R. G. (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids*, 31(2), 173–210. <http://doi.org/10.1007/s00726-005-0297-3>
- Menendez, J., & de Prado, R. (1996). Diclofop-methyl cross-resistance in a chlorotoluron-resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 56, 123–133. <http://doi.org/10.1006/pest.1996.0066>
- Miller, J. F., & Al-Khatib, K. (2002). Registration of imidazolinone herbicide-resistant sunflower maintainer (HA 425) and fertility restorer (RHA 426 and RHA 427) germplasms. *Crop Science*, 42(3), 988–989. <http://doi.org/10.2135/cropsci2005.006>
- Minton, B., Matocha, M., & Senseman, S. (2008). The influence of malathion on trifloxysulfuron absorption and translocation in cotton. *The Journal of Cotton Science*, 12, 48–52.
- Mithila, J., McLean, M. D., Chen, S., & Christopher Hall, J. (2012). Development of near-isogenic lines and identification of markers linked to auxinic herbicide resistance in wild mustard (*Sinapis arvensis* L.). *Pest Management Science*, 68(4), 548–556. <http://doi.org/10.1002/ps.2289>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Ochogavía, A. C., Gil, M., Picardi, L., & Nestares, G. (2014). Precision phenotyping of imidazolinone-induced chlorosis in sunflower. *Breeding Science*, 64, 416–421. <http://doi.org/10.1270/jsbbs.64.416>
- Pan, G., Ping, S., Yu, Q., Tu, J., & Powles, S. (2012). Non-target site mechanism of metribuzin tolerance in induced tolerant mutants of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Crop & Pasture Science*, 63, 452–458.
- Pan, G., Zhang, X., Liu, K., Zhang, J., Wu, X., Zhu, J., & Tu, J. (2006). Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene CYP81A6 that confers resistance to two different classes of herbicides. *Plant Molecular Biology*, 61(6), 933–943. <http://doi.org/10.1007/s11103-006-0058-z>
- Pan, L., Gao, H., Xia, W., Zhang, T., & Dong, L. (2016). Establishing a herbicide-metabolizing enzyme library in *Beckmannia syzigachne* to identify genes associated with metabolic resistance. *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1745–1757. <http://doi.org/10.1093/jxb/erv565>
- Pang, S. S., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2003). Molecular basis of sulfonyleurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7639–7644. <http://doi.org/10.1074/jbc.M211648200>
- Pang, S. S., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2004). Crystallization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase in complex with the sulfonyleurea herbicide chlorimuron ethyl. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(1), 153–155. <http://doi.org/10.1107/S0907444903025423>

- Petit, C., Duhieu, B., Boucansaud, K., & Délye, C. (2010). Complex genetic control of non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetyl-coenzyme A carboxylase and acetolactate-synthase in *Alopecurus myosuroides* Huds. *Plant Science*, *178*, 501–509. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.03.007>
- Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 317–347. <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Preston, C. (2003). Inheritance and linkage of metabolism-based herbicide cross-resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science*, *51*, 4–12.
- Preston, C., Tardif, F. J., Christopher, J. T., & Powles, S. B. (1996). Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *134*, 123–134. <http://doi.org/10.1006/pest.1996.0016>
- R4P Network (2016). Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. *Trends in Plant Science*, *21*(10), 834–853. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.006>
- R Development Core Team (2010). R: A Language and Environment for Stastical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ray, T. B. (1984). Site of action of chlorsulfuron. *Plant Physiology*, *75*(3), 827–831. <http://doi.org/10.1104/pp.75.3.827>
- Riechers, D. E., Kreuz, K., & Zhang, Q. (2010). Detoxification without intoxication: herbicide safeners activate plant defense gene expression. *Plant Physiology*, *153*(1), 3–13. <http://doi.org/10.1104/pp.110.153601>
- Rieseberg, L. (2016). Sunflower Genome Database. Último acceso: diciembre de 2016. <http://sunflowergenome.org/>
- Robineau, T., Batard, Y., Nedelkina, S., Cabello-Hurtado, F., LeRet, M., Sorokine, O., Didierjean, L., & Werck-Reichhart, D. (1998). The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant Physiology*, *118*(3), 1049–1056. <http://doi.org/10.1104/pp.118.3.1049>
- Rodríguez, G. R., Moyseenko, J. B., Robbins, M. D., Morejón, N. H., Francis, D. M., & 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*, e1856. <http://doi.org/10.3791/1856>
- Rombauts, S., Van de Peer, Y., & Rouzé, P. (2003). AFLPinSilico, simulating AFLP fingerprints. *Bioinformatics*, *19*(6), 776–777. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg090>
- Rost, T. L., & Reynolds, T. (1985). Reversal of chlorsulfuron-induced inhibition of mitotic entry by isoleucine and valine. *Plant Physiology*, *77*, 481–482.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds S. Krawetz & S. Misener), pp. 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- Saari, L. L., Cotterman, J. C., & Hill, D. C. (1994). Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. En: *Herbicides Resistance in Plants. Biology and Biochemistry.* (eds S.B. Powles & J.A. Holtum), pp. 83-139. Lewis, Boca Raton.
- Saari, L. L., Cotterman, J. C., & Primiani, M. M. (1990). Mechanism of sulfonyleurea herbicide resistance in the broadleaf weed *Kochia scoparia*. *Plant Physiology*, *93*, 55–61.

- Sabbatini, M., Irigoyen, J., & Vernavá, M. (2004). Estrategias para el manejo integrado de malezas: problemática, resistencia a herbicidas y aportes de la biotecnología. INTA. En: Biotecnología y mejoramiento genético vegetal, (eds. V. Echenique, C. Rubinstein & L. Mroginski), pp. 343-353. Ediciones INTA, Buenos Aires.
- Sala, C. A., Bulos, M., Altieri, E., & Ramos, M. L. (2012). Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. *Helia*, 35(57), 57–70. <http://doi.org/10.2298/HEL1257057S>
- Sala, C. A., Bulos, M., & Echarte, A. M. (2008a). Genetic analysis of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Crop Science*, 48(5), 1817–1822. <http://doi.org/10.2135/cropsci2007.11.0625>
- Sala, C. A., Bulos, M., Echarte, M., Whitt, S. R., & Ascenzi, R. (2008b). Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 105–112. <http://doi.org/10.1111/ppl.12445>
- Sandermann, H. (2004). Molecular ecotoxicology of plants. *Trends in Plant Science*, 9, 406–413. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.06.001>
- Scheffé, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., & Unger, T. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis : current concepts and the novel “gene expression’s  $C_T$  difference” formula. <http://doi.org/10.1007/s00109-006-0097-6>
- Schneiter, A. A., & Miller, J. F. (1981). Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, 21(3), 901–903. <http://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100060024x>
- Schuler, M. A., & Werck-Reichhart, D. (2003). Functional genomics of P450s. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 629–667. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134840>
- Schulz, B., & Kolukisaoglu, H. Ü. (2006). Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes?. *FEBS Letters*, 580(4), 1010–1016. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.002>
- Shaner, D., & Singh, B. (1997). Acetohydroxyacid synthase inhibitors. En: Herbicide activity: toxicology, biochemistry, and molecular biology (eds. M. R. Roe, J. D. Burton, & R. J. Kuhr), pp. 69–110. IOS press, Washington, DC.
- Siminszky, B. (2006). Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochemistry Rev*, 5, 445–458.
- Simon, P. (2003). Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, 19(11), 1439–1440. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg157>
- Singh, B. K., & Shaner, D. L. (1995). Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. *The Plant Cell*, 7, 935–944. <http://doi.org/10.1105/tpc.7.7.935>
- Singh, S., Kirkwood, R. C., & Marshall, G. (1998). Effect of the monooxygenase inhibitor piperonyl butoxide on the herbicidal activity and metabolism of isoproturon in herbicide resistant and susceptible biotypes of *Phalaris minor* and wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 59, 143–153. <http://doi.org/10.1006/pest.1998.2318>
- Snape, J. W., Leckie, D., Parker, B. B., & Nevo, E. (1991). The genetical analysis and exploitation of differential responses to herbicides in crop species. En: Herbicide resistance in weeds and crops (eds. J. C. Caseley, G. W. Cussans, & R. K. Atkin), pp. 305–317. Butterworth- Heinemann, Oxford, UK.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1962). *Biometry. The principles and practices of statistics in biological research*. Biometry. WH, Freeman & Co., San Francisco.

- Stölting, K. N., Gort, G., Wüst, C., & Wilson, A. B. (2009). Eukaryotic transcriptomics *in silico*: optimizing cDNA-AFLP efficiency. *BMC Genomics*, *10*, 565. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-10-565>
- Storey, J. D., & Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(16), 9440–9445. <http://doi.org/10.1073/pnas.1530509100>
- SUNRISE: une culture pour le futur. (2017). Último acceso: marzo de 2017. <http://www.sunrise-project.fr/>
- Sutcliffe, J. G., Foye, P. E., Erlander, M. G., Hilbush, B. S., Bodzin, L. J., Durham, J. T., & Hasel, K. W. (2000). TOGA: an automated parsing technology for analyzing expression of nearly all genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(5), 1976–1981. <http://doi.org/10.1073/pnas.040537997>
- Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., & Shaner, D. L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science*, *61*(3), 246–257. <http://doi.org/10.1002/ps.993>
- Tan, S., Evans, R., & Singh, B. (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*, *30*(2), 195–204. <http://doi.org/10.1007/s00726-005-0254-1>
- Thyssen, G., McCarty, J. C., Li, P., Jenkins, J. N., & Fang, D. D. (2014). Genetic mapping of non-target-site resistance to a sulfonylurea herbicide (Envoke) in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Breeding*, *33*(2), 341–348. <http://doi.org/10.1007/s11032-013-9953-6>
- Tranel, P. J., & Wright, T. R. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science*, *50*(6), 700–712. [http://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0700:RROWTA\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0700:RROWTA]2.0.CO;2)
- Tuesca, D., & Nisensohn, L. (2001). Resistencia de *Amaranthus quitensis* a imazetapir y clorimurón-etil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *36*(4), 601–606.
- Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablutowicz, R. M., & Hall, J. C. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms: An overview. *Weed Science*, *51*, 472–495. <http://doi.org/10.1021/bk-2001-0777.ch001>
- Vega, T., Breccia, G., Gil, M., Zorzoli, R., Picardi, L., & 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.
- Vega, T., Breccia, G., Nestares, G., Laura Mayor, M., Zorzoli, R., & Picardi, L. (2009). Soil-less bioassays for early screening for resistance to imazapyr in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pest Management Science*, *65*(9), 991–995. <http://doi.org/10.1002/ps.1784>
- Veldhuis, L. J., Hall, L. M., O'Donovan, J. T., Dyer, W., & Hall, J. C. (2000). Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 2986–2990. <http://doi.org/10.1021/jf990752g>
- Vuylsteke, M., Peleman, J. D., & van Eijk, M. J. T. (2007). AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Protocols*, *2*(6), 1399–1413. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.174>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, *10*(1), 57–63. <http://doi.org/10.1038/nrg2484>

- Weed Science Society of America and Allen Press. (1998). Technology notes. *Weed Technology*, 12(4), 789.
- Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6), 1–9.
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A., & Didierjean, L. (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science*, 5(3), 116–123. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01567-3](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01567-3)
- Westerfeld, W. W. (1945). A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem*, 161, 495–502.
- Whitcomb, C. E. (1999). An introduction to ALS-inhibiting herbicides. *Toxicology and Industrial Health*, 15, 232–240.
- White, A. D., Owen, M. D. K., Hartzler, R. G., & Cardina, J. (2002). Common sunflower resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Science*, 50(4), 432–437. [http://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0432:CSRTAS\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0432:CSRTAS]2.0.CO;2)
- Xiao, X., Li, H., & Tang, C. (2009). A silver-staining cDNA-AFLP protocol suitable for transcript profiling in the latex of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree). *Molecular Biotechnology*, 42(1), 91–99. <http://doi.org/10.1007/s12033-008-9139-3>
- Yang, Q., Deng, W., Li, X., Yu, Q., Bai, L., & Zheng, M. (2016). Target-site and non-target-site based resistance to the herbicide tribenuron-methyl in flixweed (*Descurainia sophia* L.). *BMC Genomics*, 17, 551–564. <http://doi.org/10.1186/s12864-016-2915-8>
- Yu, Q., Abdallah, I., Han, H., Owen, M., & Powles, S. (2009). Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta*, 230(4), 713–723. <http://doi.org/10.1007/s00425-009-0981-8>
- Yu, Q., Friesen, L. J. S., Zhang, X. Q., & Powles, S. B. (2004). Tolerance to acetolactate synthase and acetyl-coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Vulpia bromoides* is conferred by two co-existing resistance mechanisms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78(1), 21–30. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2003.07.004>
- Yu, Q., & Powles, S. (2014a). Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant Physiol*, 166(3), 1106–1118. <http://doi.org/10.1104/pp.114.242750>
- Yu, Q., & Powles, S. B. (2014b). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Management Science*, 70(9), 1340–1350. <http://doi.org/10.1002/ps.3710>
- Yuan, J. S., Tranel, P. J., & Stewart, C. N. (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science*, 12(1), 6–13. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.001>
- Yun, M. S., Shim, I. S., & Usui, K. (2001). Involvement of cytochrome P-450 enzyme activity in the selectivity and safening action of pyrazosulfuron-ethyl. *Pest Management Science*, 57, 283–288.
- Zabalza, A., Orcaray, L., Gaston, S., & Royuela, M. (2004). Carbohydrate accumulation in leaves of plants treated with the herbicide chlorsulfuron or imazethapyr is due to a decrease in sink strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7601–7606. <http://doi.org/10.1021/jf0486996>

- Zhang, L., Lu, Q., Chen, H., Pan, G., Xiao, S., Dai, Y., Li, Q., Zhang, J., Wu, X., Wu, J., Tu, J., & Liu, K. (2007). Identification of a cytochrome P450 hydroxylase, CYP81A6, as the candidate for the bentazon and sulfonyleurea herbicide resistance gene, Bel, in rice. *Molecular Breeding*, 19(1), 59–68. <http://doi.org/10.1007/s11032-006-9044-z>
- Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y., & Liu, K. K. (2007). Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(2), 89–96. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.04.004>
- Zollinger, R. K. (2004). Advances in sunflower weed control in the USA. Proceedings 16th International Sunflower Conference, pp. 435-439, Fargo, North Dakota, USA.

## ANEXO

**Tabla a.1.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de hipocótilo (LH) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	1,27	2	0,63	0,74	0,4929
IMI	18,23	3	6,08	7,13	0,0008
PBO	0,68	1	0,68	0,80	0,3867
PBO*IMI	1,64	3	0,55	0,64	0,6010
Error	11,93	14	0,85		

**Tabla a.2.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable raíz cuadrada (sqrt) de los valores de área foliar total (AFT) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	70,39	2	35,19	2,51	0,1171
IMI	1047,43	3	349,14	24,90	9,55E-08
PBO	2,46	1	2,46	0,18	0,6818
PBO*IMI	41,40	3	13,80	0,98	0,4284
Error	196,34	14	14,02		

**Tabla a.3.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz principal (LP) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	15,13	2	7,57	3,59	0,0552
IMI	7,83	3	2,61	1,24	0,3328
PBO	0,17	1	0,17	0,08	0,7806
PBO*IMI	2,27	3	0,76	0,36	0,7830
Error	29,51	14	2,11		

**Tabla a.4.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz lateral más larga (LL) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	5,31	2	2,66	4,41	0,0326
IMI	8,46	3	2,82	4,69	0,0181
PBO	0,61	1	0,61	1,02	0,3293
PBO*IMI	0,32	3	0,11	0,18	0,9095
Error	8,42	14	0,60		

**Tabla a.5.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable índice de coloración de las hojas (*hue*) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	8,39	2	4,20	1,48	0,2614
IMI	772,11	3	257,37	90,70	2.066e-09
PBO	4,84	1	4,84	1,71	0,2125
PBO*IMI	17,45	3	5,82	2,05	0,1531
Error	39,73	14	2,84		

**Tabla a.6.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de hipocótilo (LH) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	0,43	2	0,22	0,39	0,6815
IMI	22,59	3	7,53	13,76	0,0002
PBO	3,37	1	3,37	6,15	0,0264
PBO*IMI	0,83	3	0,28	0,51	0,6849
Error	7,66	14	0,55		

**Tabla a.7.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable área foliar total (AFT) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	35,90	2	17,95	1,68	0,2210
IMI	2393,85	3	797,95	74,89	7.315e-11
PBO	0,01	1	0,01	1,3E-03	0,9721
PBO*IMI	1,06	3	0,35	0,03	0,9916
Error	149,18	14	10,66		

**Tabla a.8.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz principal (LP) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	0,07	2	0,04	0,02	0,9827
IMI	18,28	3	6,09	2,86	0,0747
PBO	0,35	1	0,35	0,16	0,6923
PBO*IMI	1,81	3	0,60	0,28	0,8369
Error	29,84	14	2,13		

**Tabla a.9.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz lateral más larga (LL) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	9,22	2	4,61	5,07	0,0221
IMI	36,41	3	12,14	13,34	0,0002
PBO	0,55	1	0,55	0,61	0,4491
PBO*IMI	0,46	3	0,15	0,17	0,9161
Error	12,74	14	0,91		

**Tabla a.10.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable índice de coloración de las hojas (*hue*) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 1,10 y 100  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	147,85	2	73,92	5,64	0,0159
IMI	1645,12	3	548,37	41,86	3.063e-07
PBO	17,87	1	17,87	1,36	0,2623
PBO*IMI	37,40	3	12,47	0,95	0,4424
Error	183,39	14	13,10		

**Tabla a.11.** Efecto del inhibidor de P450s (PBO) sobre las variables AFT, área foliar total ( $\text{cm}^2$ ); LH, longitud de hipocótilo (cm); *hue*, índice de coloración de las hojas (grados); LP, longitud de raíz principal (cm) y LL, longitud de raíz lateral más larga (cm) en la línea HA 89 susceptible a imazetapir.

Variable	Imazetapir ( $\mu\text{M}$ )	Imazetapir + PBO		<i>p-value</i> <sup>a</sup>
		medias $\pm$ error estándar		
<b>AFT</b>	1	1,37 $\pm$ 0,31	1,59 $\pm$ 0,11	ns
	10	0,93 $\pm$ 0,17	1,22 $\pm$ 0,16	ns
	100	0,97 $\pm$ 0,18	1,03 $\pm$ 0,35	ns
<b>LH</b>	1	6,64 $\pm$ 0,31	6,17 $\pm$ 0,35	ns
	10	6,74 $\pm$ 0,68	5,40 $\pm$ 0,59	ns
	100	5,62 $\pm$ 0,25	4,83 $\pm$ 0,41	ns
<b><i>hue</i></b>	1	106,71 $\pm$ 2,52	104,81 $\pm$ 1,58	ns
	10	104,44 $\pm$ 4,07	108,34 $\pm$ 0,99	ns
	100	107 $\pm$ 2,76	111,20 $\pm$ 4,55	ns
<b>LP</b>	1	7,58 $\pm$ 0,26	6,99 $\pm$ 0,58	ns
	10	6,43 $\pm$ 1,43	6,60 $\pm$ 0,42	ns
	100	6,14 $\pm$ 0,63	6,54 $\pm$ 0,82	ns
<b>LL</b>	1	4,16 $\pm$ 0,43	4,33 $\pm$ 0,27	ns
	10	3,46 $\pm$ 0,89	3,09 $\pm$ 0,72	ns
	100	2,97 $\pm$ 0,87	2,48 $\pm$ 1,07	ns

<sup>a</sup> valores de probabilidad del análisis de contrastes ortogonales; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

**Tabla a.12.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de hipocótilo (LH) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	14,75	2	7,37	13,84	0.0004823
IMI	18,20	3	6,07	11,39	0.0006756
PBO	0,14	1	0,14	0,26	0.6149600
PBO*IMI	0,22	3	0,07	0,13	0.9370578
Error	7,46	14	0,53		

**Tabla a.13.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable área foliar total (AFT) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	75,58	2	37,79	4,58	0,0295
IMI	884,50	3	294,83	35,74	8.168e-07
PBO	3,29	1	3,29	0,40	0,5377
PBO*IMI	0,94	3	0,31	0,04	0,9896
Error	115,50	14	8,25		

**Tabla a.14.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz principal (LP) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	4,01	2	2,01	1,25	0,3169
IMI	52,06	3	17,35	10,80	0,0006
PBO	2,65	1	2,65	1,65	0,2196
PBO*IMI	3,68	3	1,23	0,76	0,5333
Error	22,50	14	1,61		

**Tabla a.15.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz lateral más larga (LL) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	0,62	2	0,31	1,36	0,2886
IMI	7,46	3	2,49	10,84	0,0006
PBO	0,76	1	0,76	3,33	0,0896
PBO*IMI	2,64	3	0,88	3,84	0,0339
Error	3,21	14	0,23		
Total	14,70	23			

**Tabla a.16.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable índice de coloración de las hojas (*hue*) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	20,78	2	10,39	8,31	0,0042
IMI	299,66	3	99,89	79,87	4.788e-09
PBO	2,15	1	2,15	1,72	0,2105
PBO*IMI	9,52	3	3,17	2,54	0,0987
Error	17,51	14	1,25		

**Tabla a.17.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de hipocótilo (LH) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	6,93	2	3,43	12,96	0.0006507
IMI	34,09	3	11,36	42,51	2.78e-07
PBO	1,37	1	1,37	5,14	0.0397072
PBO*IMI	0,59	3	0,19	0,73	0.5482051
Error	3,74	14	0,26		

**Tabla a.18.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable función logaritmo natural de los valores de área foliar total (AFT) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	20,63	2	10,32	1,97	0,1757
IMI	1763,94	3	587,98	112,53	4.9e-11
PBO	0,31	1	0,31	0,06	0,8107
PBO*IMI	0,66	3	0,22	0,04	0,9879
Error	73,15	14	5,23		

**Tabla a.19.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz principal (LP) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	0,53	2	0,26	0,43	0,6586
IMI	8,09	3	2,70	4,40	0,0223
PBO	0,68	1	0,68	1,12	0,3086
PBO*IMI	5,44	3	1,81	2,96	0,0686
Error	8,58	14	0,61		

**Tabla a.20.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz lateral más larga (LL) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	1,52	2	0,76	2,12	0,1570
IMI	24,67	3	8,22	22,98	1.132e-05
PBO	0,60	1	0,60	1,67	0,2169
PBO*IMI	0,52	3	0,17	0,48	0,7007
Error	5,01	14	0,36		

**Tabla a.21.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable índice de coloración de las hojas (*hue*) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (PBO), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (PBO\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	83,69	2	41,84	7,88	0,0051
IMI	1819,05	3	606,35	114,13	4.457e-10
PBO	0,01	1	0,01	1,6E-03	0,9691
PBO*IMI	17,85	3	5,95	1,12	0,3745
Error	74,38	14	5,31		

**Tabla a.22.** Efecto del inhibidor de P450s (PBO) sobre las variables AFT, área foliar total ( $\text{cm}^2$ ); LH, longitud de hipocótilo (cm); *hue*, índice de coloración de las hojas (grados); LP, longitud de raíz principal (cm) y LL, longitud de raíz lateral más larga (cm) en la línea HA 89 susceptible a imazetapir.

Variable	Imazetapir ( $\mu\text{M}$ )	Imazetapir medias $\pm$ error estándar	Imazetapir + PBO error estándar	<i>p-value</i> <sup>a</sup>
<b>AFT</b>	3,3	0,90 $\pm$ 0,05	1,10 $\pm$ 0,06	ns
	6,6	1,28 $\pm$ 0,35	1,10 $\pm$ 0,10	ns
	20	1,07 $\pm$ 0,15	1,21 $\pm$ 0,06	ns
<b>LH</b>	3,3	6,44 $\pm$ 0,39	6,46 $\pm$ 0,39	ns
	6,6	6,36 $\pm$ 0,48	5,91 $\pm$ 0,47	ns
	20	6,54 $\pm$ 0,57	5,76 $\pm$ 0,71	ns
<b><i>hue</i></b>	3,3	106,86 $\pm$ 2,21	105,65 $\pm$ 2,53	ns
	6,6	107,44 $\pm$ 2,65	106,45 $\pm$ 1,84	ns
	20	111,36 $\pm$ 1,78	114,37 $\pm$ 0,94	ns
<b>LP</b>	3,3	6,24 $\pm$ 0,66	7,09 $\pm$ 0,30	ns
	6,6	6,83 $\pm$ 0,59	5,65 $\pm$ 0,46	ns
	20	6,06 $\pm$ 0,39	4,70 $\pm$ 0,47	ns
<b>LL</b>	3,3	4,43 $\pm$ 0,33	4,07 $\pm$ 0,36	ns
	6,6	3,74 $\pm$ 0,37	3,70 $\pm$ 0,47	ns
	20	2,74 $\pm$ 0,54	1,97 $\pm$ 0,35	ns

<sup>a</sup> valores de probabilidad del análisis de contrastes ortogonales; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).

**Tabla a.23.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de hipocótilo (LH) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	6,42	2	3,20	8,57	0,003706
ABT	0,20	1	0,20	0,54	0.474161
IMI	20,47	3	6,82	18,26	4.121e-05
ABT*IMI	2,07	3	0,69	1,84	0.184825
Error	5,23	14	0,37		

**Tabla a.24.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable área foliar total (AFT) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	15,29	2	7,64	3,09	0,0773
ABT	3,90	1	3,90	1,58	0,2299
IMI	282,99	3	94,33	38,15	5.461e-07
ABT*IMI	0,15	3	0,05	0,02	0,9960
Error	34,62	14	2,47		

**Tabla a.25.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz principal (LP) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	4,25	2	2,12	4,55	0,0300
ABT	2,99	1	2,99	6,42	0,0239
IMI	7,30	3	2,43	5,22	0,0325
ABT*IMI	1,01	3	0,34	0,72	0,5549
Error	6,53	14	0,47		
Total	22,08	23			

**Tabla a.26.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz lateral más larga (LL) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	0,46	2	0,23	3,58	0,0554
ABT	0,39	1	0,39	6,14	0,0266
IMI	3,41	3	1,14	17,77	4.791e-07
ABT*IMI	0,13	3	0,04	0,68	0,5808
Error	0,90	14	0,06		

**Tabla a.27.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable índice de coloración de las hojas (*hue*) de la línea HA 425 de genotipo resistente considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	35,29	2	17,65	6,06	0,0127
ABT	2,67	1	2,67	0,92	0,3546
IMI	275,54	3	91,85	31,54	1.75e-06
ABT*IMI	5,88	3	1,96	0,67	0,5829
Error	40,77	14	2,91		
Total	360,15	23			

**Tabla a.28.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de hipocótilo (LH) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	4,91	2	2,45	16,46	0.0002104
ABT	0,21	1	0,21	1,43	0.2507873
IMI	57,33	3	19,11	128,11	2.049e-10
ABT*IMI	3,06	3	1,02	6,84	0,9439
Error	2,08	14	0,14		

**Tabla a.29.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable área foliar total (AFT) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	41,74	2	20,87	3,05	0,0795
ABT	0,99	1	0,99	0,14	0,7094
IMI	1529,71	3	509,90	74,54	7.54e-09
ABT*IMI	2,56	3	0,85	0,12	0,9439
Error	95,77	14	6,84		

**Tabla a.30.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz principal (LP) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	8,59	2	4,30	17,24	0,0002
ABT	0,36	1	0,36	1,45	0,2488
IMI	7,09	3	2,36	9,49	0,0011
ABT*IMI	0,48	3	0,16	0,65	0,5975
Error	3,49	14	0,25		

**Tabla a.31.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable longitud de raíz lateral más larga (LL) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu$ M.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	2,17	2	1,08	5,12	0,0214
ABT	0,03	1	0,03	0,13	0,7283
IMI	3,39	3	1,13	5,34	0,0116
ABT*IMI	0,38	3	0,13	0,60	0,6226
Error	2,96	14	0,21		

**Tabla a.32.** Análisis de la variancia (ANOVA) para la variable índice de coloración de las hojas (*hue*) de la línea HA 89 de genotipo susceptible considerando efecto de inhibidor de P450s (ABT), efecto de herbicida (IMI) y la interacción entre ellos (ABT\*IMI). Concentraciones de IMI evaluadas: 3,3, 6,6 y 20  $\mu\text{M}$ .

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
bloque	51,75	2	25,87	4,22	0,0367
ABT	17,12	1	17,12	2,80	0,1167
IMI	4112,00	3	1370,67	223,80	4.619e-11
ABT*IMI	1,69	3	0,56	0,09	0,9634
Error	85,74	14	6,12		

**Tabla a.33.** Efecto del inhibidor de P450s (ABT) sobre las variables AFT, área foliar total ( $\text{cm}^2$ ); LH, longitud de hipocótilo (cm); *hue*, índice de coloración de las hojas (grados); LP, longitud de raíz principal (cm) y LL, longitud de raíz lateral más larga (cm) en la línea HA 89 susceptible a imazetapir.

Variable	Imazetapir ( $\mu\text{M}$ )	Imazetapir medias $\pm$ error estándar	Imazetapir + ABT medias $\pm$ error estándar	p-value <sup>a</sup>
<b>AFT</b>	3,3	1,20 $\pm$ 0,23	1,13 $\pm$ 0,44	ns
	6,6	1,02 $\pm$ 0,23	0,91 $\pm$ 0,27	ns
	20	0,78 $\pm$ 0,19	0,86 $\pm$ 0,10	ns
<b>LH</b>	3,3	6,76 $\pm$ 0,70	6,79 $\pm$ 0,47	ns
	6,6	6,40 $\pm$ 0,86	6,31 $\pm$ 0,76	ns
	20	8,35 $\pm$ 0,87	7,02 $\pm$ 0,48	ns
<b>hue</b>	3,3	98,08 $\pm$ 3,75	96,72 $\pm$ 1,19	ns
	6,6	98,14 $\pm$ 3,47	97,15 $\pm$ 2,97	ns
	20	100,87 $\pm$ 1,81	98,63 $\pm$ 5,07	ns
<b>LP</b>	3,3	7,74 $\pm$ 0,65	7,08 $\pm$ 0,71	ns
	6,6	7,36 $\pm$ 1,00	7,50 $\pm$ 0,86	ns
	20	6,40 $\pm$ 1,13	6,19 $\pm$ 1,14	ns
<b>LL</b>	3,3	4,24 $\pm$ 0,60	4,35 $\pm$ 0,65	ns
	6,6	4,50 $\pm$ 0,81	4,06 $\pm$ 0,70	ns
	20	3,88 $\pm$ 0,22	4,09 $\pm$ 0,41	ns

<sup>a</sup> valores de probabilidad del análisis de contrastes ortogonales; ns: no significativo ( $p > 0.05$ ).