



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO  
Facultad de Ciencias Agrarias

**Resistencia a imidazolinonas en girasol:  
evaluación fenotípica, bioquímica  
y de la expresión de genes *ahas***

**Lic. GABRIELA BRECCIA**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Agrarias

*Directora:* Dra. Liliana A. Picardi

*Co-Director:* Ing. Agr. (MSc) Graciela M. Nestares y Dra. Silvina Felitti

**Resistencia a imidazolinonas en girasol:  
evaluación fenotípica, bioquímica y de la expresión de genes *ahas***

**Gabriela Breccia**

**Lic. en Biotecnología – 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 Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias de Agrarias de la UNR, durante el período comprendido entre 2008 y 2012, bajo la dirección de la Dra. Liliana Picardi y la codirección de la *MSc.* Graciela Nestares y la Dra. Silvina Felitti.

Nombre y firma del Doctorando

Nombre y firma del Director

Nombre y firma de Codirectores

Defendida el día:.....de 2013

## AGRADECIMIENTOS

La presentación de este trabajo de Tesis es el producto de muchos años de trabajo y la colaboración de un hermoso grupo de trabajo. Me resulta difícil expresar en palabras el agradecimiento a todas las personas que de distintas maneras me apoyaron durante este trayecto de la vida...

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras Liliana, Graciela y Silvina, quienes confiaron en mí y me guiaron durante todos estos años, siempre con la libertad para la discusión y el desarrollo de nuevas ideas. Al resto de los integrantes de la cátedra de Genética, Roxana, Guillermo, Gustavo y Fernando, por sus aportes, sugerencias y buena predisposición. En particular, al *sunflower team* con el cual es una satisfacción compartir las actividades de investigación y especialmente a Graciela a quien debo gran parte de mi formación.

A todos los que son o fueron compañeros de laboratorio: Euge, Mechi, Tati, Caro, Javier, Andre, Ignacio, Esteban, Sabina, Vani, David, Ezequiel, Paula, Mica, Mariel; con los cuales compartimos muchos logros y también atravesamos algunas adversidades, pero siempre con buena onda y viviendo lindos momentos dentro y fuera del lab.

A mis amigas Analía, Flor, Emily, Eli, Angie, Luchi, Pali, Anita y Juli, que siempre estuvieron para darme ánimo en las dificultades y compartir las alegrías.

A mi familia, en especial a mis padres y hermanas, a quienes debo todo lo que soy y lo que pude lograr y fueron el sostén en todos los momentos de mi vida. ¡Gracias por tanto!

A Ramón, que estuvo junto a mi lado y dio su apoyo durante todos estos años, primero como compañero de vida y ahora también como padre de mi solcito Simón, que desde la panza me ayudó durante la preparación de este manuscrito.

A todos, ¡muchas gracias!

***A mis padres y hermanas***

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas:

### Trabajos completos

✓ 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: 109-113.

✓ Vega T., Breccia G., Gil M., Zorzoli R., Picardi L. & Nestares G. Acetohydroxyacid synthase (AHAS) *in vivo* assay for screening imidazolinone-resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 61: 103-107.

✓ Breccia G., Vega T., Felitti S., Picardi L. & Nestares G. Differential expression of acetohydroxyacid synthase genes in sunflower plantlets and its response to imazapyr herbicide. *Plant Science* (en prensa).

### Presentaciones a reuniones científicas

#### **Internacionales:**

✓ Breccia G., Vega T., Felitti S., Picardi L. & Nestares, G. Expresión de genes *ahas* en plántulas de girasol y su respuesta al tratamiento con herbicida. XV Congreso Latinoamericano de Genética (ALAG), Rosario, Argentina, 28 al 31 de octubre de 2012.

✓ Breccia G., Gil M., Vega T., Zorzoli R., Picardi L. & Nestares G. *Effect of cytochrome P450s inhibitors on imidazolinone resistance in sunflower*. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata & Balcarce, Argentina, 27 de febrero al 1 de marzo de 2012.

✓ Gil M., Breccia G., Vega T., Nestares G., Zorzoli R. & Picardi L. Caracterización de los mecanismos involucrados en la resistencia a imidazolinonas en girasol (*Helianthus annuus* L.). XIV Jornadas de Jóvenes Investigadores organizadas por la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), Ciudad del Este, Alto Paraná, Paraguay, 25 al 27 de octubre de 2011.

✓ Breccia G., Vega T., Nestares G., Zorzoli R. & Picardi L. Bioensayo de germinación para la selección por resistencia a imazapir en girasol. XIII Reunión Latinoamericana y XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Rosario, Argentina, 21 al 24 de septiembre de 2008.

### **Nacionales:**

✓ Breccia G., Gil M., Vega T., Nestares G., Zorzoli R. & Picardi L. Efecto del 1-aminobenzotriazol (ABT) sobre la resistencia a imidazolinonas en girasol. XL Congreso Argentino de Genética, Corrientes, 18 al 21 de septiembre de 2011.

✓ Breccia G., Gianotto L., Montero N., Piermatei C., Vega T. & Nestares G. Evaluación de la resistencia a imidazolinonas en híbridos de girasol en la etapa de germinación. XII Congreso y XXX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, UNR, 2 y 3 de diciembre de 2010.

✓ Vega T., Breccia G., Gil M., Nestares G., Mayor M.L., Zorzoli R. & Picardi L. Actividad enzimática *in vivo* y curvas dosis-respuesta para la evaluación de genotipos resistentes a imidazolinonas en girasol. XII Congreso y XXX Reunión Anual de la SBR, Rosario, 2 y 3 de diciembre de 2010.

✓ Breccia G., Vega T., Gil M., Nestares G., Mayor M.L., Zorzoli R. & Picardi L. Cuantificación de actividad ALS a través de ensayos "in vivo" para la identificación de genotipos resistentes a imidazolinonas. 5to. Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires, 1 y 2 de junio de 2010.

✓ Breccia G., Vega T., Nestares G., Mayor M.L., Zorzoli R. & Picardi L. Selección por resistencia a imidazolinonas en etapas tempranas del desarrollo de plántulas. 5to. Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires, 1 y 2 de junio de 2010.

✓ Lescano M.C., Breccia G., Vega T. & Nestares G. Efecto del herbicida imazapir sobre la germinación en placas en distintos genotipos de girasol. XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la SBR, Rosario, 3 y 4 de diciembre de 2009.

✓ Breccia G., Vega T., Nestares G., Zorzoli R. & Picardi L. Resistencia a imidazolinonas en girasol: crecimiento aéreo y radical en plántulas de distintos genotipos. XXXVIII Congreso Argentino de Genética, Tucumán, 20 al 23 de septiembre de 2009.

✓ Breccia G., Relling G., Di Pego J.M., Anibalini V., Vega T. & Nestares G. Crecimiento radical en plántulas de girasol tratadas con el herbicida imazapir. X Congreso y XXVIII Reunión Anual de la SBR, Rosario, 3 al 5 de diciembre de 2008.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT .....	iv
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
HIPÓTESIS .....	13
OBJETIVOS .....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
CAPÍTULO 1: Caracterización de la resistencia a imidazolinonas en etapas tempranas del desarrollo de plántulas	
Introducción .....	15
Materiales y Métodos .....	20
Resultados .....	27
Discusión .....	51
Conclusiones .....	57
CAPÍTULO 2: Análisis transcriptómico y bioquímico de la expresión de genes <i>ahas</i>	
Introducción .....	58
Materiales y Métodos .....	63
Resultados .....	70
Discusión .....	83
Conclusiones .....	90
CAPÍTULO 3: Efecto de inhibidores de citocromos P450 monooxigenasas sobre la resistencia a imazapir	
Introducción .....	91
Materiales y Métodos .....	99
Resultados .....	103
Discusión .....	112
Conclusiones .....	118
CONCLUSIONES GENERALES .....	119
PERSPECTIVAS .....	120
BIBLIOGRAFÍA.....	121

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abs: absorbancia	g: fuerza centrífuga
ABT: 1-aminobenzotriazol	g: gramos
ADN: ácido desoxirribonucleico	GC: guanina y citosina
ADNc: ADN copia	GR <sub>50</sub> : concentración de herbicida que reduce la variable de crecimiento en un 50%
AF: área foliar	
<i>ahas</i> : gen de la acetohidroxiácido sintasa	
AHAS: acetohidroxiácido sintasa	h: horas
ALS: acetolactato sintasa	
ANOVA: Análisis de la Variancia	I: línea endocriada de girasol 1058-1 con resistencia intermedia a IMI
ARN: ácido ribonucleico	I <sub>50</sub> : concentración de herbicida que reduce la actividad enzimática en un 50%
ARNasa: nucleasa de ARN	
<i>b</i> : parámetro estimado en el ajuste de curvas dosis-respuesta al modelo log-logístico que corresponde a la pendiente de la curva en el punto de inflexión	KARI: cetol-ácido reductoisomerasa
	l: litros
°C: grados Celsius	LF: longitud de hoja
cm: centímetros	LH: longitud de hipocótilo
CPCA: ácido 1,1-ciclopropilcarboxílico	LL: longitud de raíz lateral más larga
Cq: <i>quantification cycle</i> , ciclo de cuantificación	LP: longitud de raíz principal
	LP': longitud de raíz principal que presenta raíces laterales mayores a 5 mm
DEPC: dietil pirocarbonato	LR: longitud de radícula
DH: dihidroxiácido deshidratasa	
dNTPs: desoxirribonucleótidos	m: metros
	M: molar
E: eficiencia de PCR	mg: miligramos
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	ml: mililitros
ER: expresión relativa	mm: milímetros
EST: <i>Expressed Sequence Tag</i> , etiqueta de secuencia expresada	mM: milimolar
	min: minutos
FAD: flavina adenina dinucleótido	MS: base salina de Murashige y Skoog (1962)

nm: nanómetros

oligo(dT)<sub>12-18</sub>: cebador compuesto por 12 a 18 desoxitimidinas

p: probabilidad

P450s: P450 monooxigenasas

pb: pares de bases

PBO: piperonil butóxido

PCR: *Polimerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PFA: peso fresco de la biomasa aérea

PFR: peso fresco de la biomasa radical

PSA: peso seco de la biomasa aérea

PSR: peso seco de la biomasa radical

p/v: peso en volumen

PVPP: polivinil polipirrolidona

R: línea endocriada de girasol HA425 con resistencia a IMI

RT: transcriptasa reversa

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

s: segundos

S: línea de girasol HA89 susceptible a IMI

TA: transaminasa

TAE: tampón Tris-acetato-EDTA

TBE tampón Tris-borato-EDTA

Tris: N-tris-(hidroximetil) aminometano

TPP: tiamina pirofosfato

U: unidades de enzima

μl: microlitros

μM: micromolar

μmol: micromoles

UV: ultravioleta

V: voltio

valor E: probabilidad de que un alineamiento de secuencias con un valor igual o superior al obtenido sea debido al azar

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

VE: estadio vegetativo de emergencia de acuerdo a Schneiter y Miller (1981)

## RESUMEN

La acetohidroxiácido sintasa (AHAS) cataliza la primera reacción en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada. Esta enzima es el sitio de acción de herbicidas dentro de los que se incluyen las imidazolinonas. La resistencia a imidazolinonas en girasol cultivado, incorporada a partir de una población de girasol maleza, está controlada por dos genes: *Imr1* e *Imr2*. El primer gen se corresponde con una mutación de *ahas1*, el cual es uno de los tres genes que codifica para la subunidad catalítica de AHAS. Se desconoce el mecanismo relacionado con el segundo gen. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la resistencia a imidazolinonas en estadios tempranos del desarrollo, a nivel fenotípico y bioquímico, evaluar la expresión de los tres genes *ahas* y determinar el mecanismo de resistencia relacionado a *Imr2*. La utilización de bioensayos de germinación en condiciones controladas permitió caracterizar la respuesta al herbicida imazapir en genotipos con distinto grado de resistencia a imidazolinonas. El crecimiento y desarrollo del sistema radical y la expansión del primer par de hojas verdaderas fueron los parámetros más sensibles para discriminar estos genotipos. De manera similar, la actividad AHAS *in vivo* permitió distinguir genotipos que difieren a nivel de *Imr1*. Los niveles relativos de transcritos *ahas* fueron cuantificados mediante RT-qPCR en hojas y raíces de plántulas control y tratadas con imazapir. Estos niveles se correspondieron con la actividad AHAS evaluada *in vivo* e *in vitro* en dichos tejidos. El tratamiento con imidazolinonas produjo respuestas tejido-específicas y gen-específicas. Los niveles de expresión AHAS en plántulas control no difirieron entre los genotipos evaluados, por lo que la alteración o sobreexpresión de AHAS no serían mecanismos de resistencia presentes en las líneas de girasol bajo estudio. Para evaluar la participación de citocromo P450 monooxigenasas (P450s) en la detoxificación del herbicida, se evaluó la respuesta de plántulas sensibles y resistentes bajo el tratamiento combinado de imazapir e inhibidores de citocromo P450s. Se observó una disminución de parámetros de crecimiento por el tratamiento combinado en la línea resistente, por lo que existiría un mecanismo de detoxificación del herbicida imazapir mediado por isoformas de citocromo P450s. Este mecanismo estaría relacionado al locus *Imr2* y completaría a la resistencia conferida por la mutación en *ahas1*.

**Imidazolinone resistance in sunflower:  
phenotypic and biochemical evaluation, and expression patterns of *ahas* genes**

**ABSTRACT**

Acetohydroxyacid synthase (AHAS) catalyzes the first reaction in branch chain amino acids biosynthesis. This enzyme is the target of several herbicides, including all members of the imidazolinone family. In sunflower, imidazolinone resistance from a wild population have been introgressed to elite inbred lines. Two resistance genes, *Imr1* and *Imr2*, were proposed as the genetic basis of the inheritance of imidazolinone resistance. *Imr1* is an allelic variant of the *ahas1* gene that codes for the AHAS catalytic subunit. The effect of the modifier locus, *Imr2*, remains unknown. The objectives of this work were to evaluate imidazolinone resistance at early stages of development, both at whole plant and biochemical level, to study the *ahas* gene expression pattern and to determine the resistance mechanism related to *Imr2*. The imazapyr response in genotypes differing in imidazolinone resistance was characterized through several bioassays in controlled conditions. Root system growth and leaf expansion were the most sensitive parameters to discriminate these genotypes. Similarly, *in vivo* AHAS activity allowed the distinction among genotypes that differed at *Imr1* locus. Relative transcript levels of *ahas* genes were measured through RT-qPCR in leaf and root tissues of control and imazapyr-treated plantlets. *In vivo* and *in vitro* AHAS activities were consistent with *ahas* transcriptional levels in those tissues. A gene- and tissue-specific response was observed in treated plantlets. Given that no differences in AHAS expression were found among genotypes, the possibility that *Imr2* could be associated with higher levels of AHAS expression is excluded. The growth response to imazapyr in combination with cytochrome P450 monooxygenases (P450s) inhibitors was evaluated in sunflower plantlets. The increased phytotoxicity of imazapyr in the resistant line when P450s inhibitor was present suggests that P450s mediates a detoxification mechanism and contributes to herbicide resistance. This mechanism could be related to the effect of the modifier gene *Imr2*.

# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El girasol (*Helianthus annuus*) es uno de los cultivos oleaginosos más importantes a nivel mundial, junto con la soja, colza y algodón. La producción mundial de este cultivo alcanza las 30 millones de toneladas<sup>1</sup>. Argentina se constituye en uno de los principales exportadores mundiales de aceite y harina de girasol, con una superficie cultivada de casi tres millones de hectáreas<sup>2</sup>.

Las malezas causan considerables pérdidas en el rendimiento de cultivos debido a la competencia por luz, agua y nutrientes. En la agricultura moderna, los herbicidas se han convertido en una herramienta fundamental dado que resultan económicamente rentables, son de fácil manejo y permiten el control de un amplio espectro de malezas. Los herbicidas también pueden contribuir a la conservación del suelo a través de su uso en la práctica de siembra directa, donde se reemplaza la labranza por el control químico de malezas previo a la siembra (Mazur y Falco, 1989).

Los herbicidas pueden clasificarse considerando el proceso metabólico implicado en su acción fitotóxica. De esta manera, se han descrito 17 grupos según el Comité Internacional de Resistencia a Herbicidas (HRCA, *Herbicide Resistance Action Committee*)<sup>3</sup> y la Sociedad de Malezas de Estados Unidos (WSSA, *Weed Science Society of America*)<sup>4</sup>. Tres de estos grupos corresponden a herbicidas inhibidores de vías metabólicas de aminoácidos, en particular de la biosíntesis de glutamina, aminoácidos aromáticos y de cadena lateral ramificada. Dado que los animales no poseen estas vías metabólicas, estos herbicidas tienen menor impacto ecológico que otros compuestos con diferentes mecanismos de acción (Tan *et al.*, 2006). Las tres enzimas de la biosíntesis de aminoácidos que son inhibidas por herbicidas comerciales son: la acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, la 5-enoilpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) en la vía del shikimato y la glutamina sintetasa (GS) en la asimilación del amonio (Duke, 1990).

La enzima AHAS (2.2.1.6), también conocida como acetolactato sintasa (ALS), se encuentra en bacterias, hongos, algas y plantas. Existen dos clases principales para esta enzima, las cuales participan en diferentes procesos metabólicos. En ciertos microorganismos, un tipo de enzima participa de una vía fermentativa cuyos productos

---

<sup>1</sup> <http://www.sunflowernsa.com/stats/world-supply/>

<sup>2</sup> <http://www.asagir.org.ar/asagir2008/importancia-economica.asp>

<sup>3</sup> <http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideSiteofAction/tabid/222/Default.aspx>

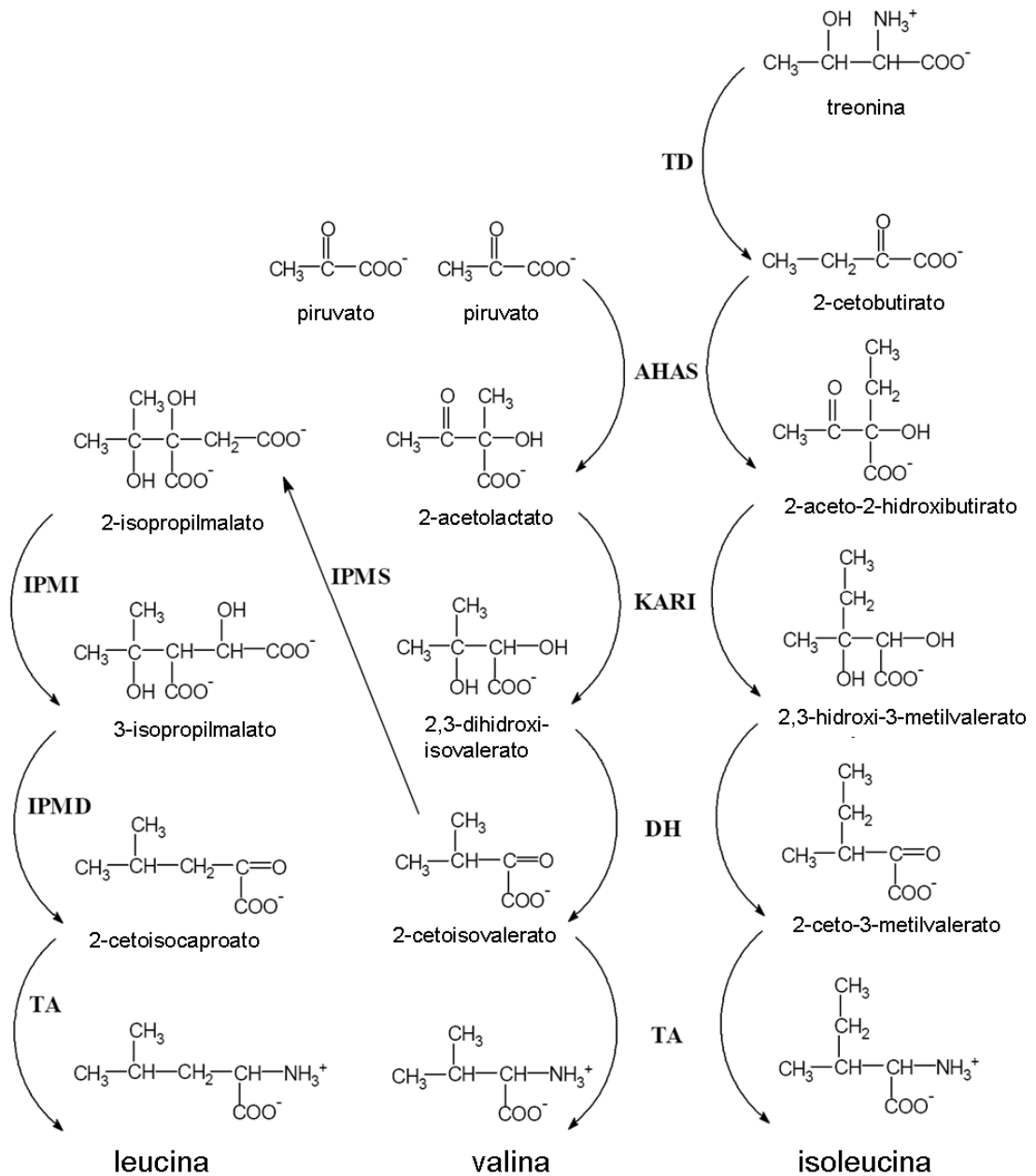
<sup>4</sup> <http://wssa.net/Weeds/Resistance/HerbicideMOAClassification.pdf>

finales son butanodiol y compuestos relacionados. Esta enzima difiere en varios aspectos de su contraparte anabólica implicada en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Chipman *et al.*, 1998; Duggleby y Pang, 2000). Dado que la enzima catabólica sólo produce acetolactato y la versión anabólica sintetiza dos acetohidroxiácidos (acetolactato y acetohidroxiacetato) la nomenclatura sugerida es ALS para la primera y AHAS para la segunda (Duggleby y Pang, 2000; Duggleby *et al.*, 2008). De esta manera, la acepción correcta para el tipo de enzima que se encuentra en plantas es AHAS y será utilizada en el presente trabajo. Sin embargo, parece no haber acuerdo en la bibliografía y ambas nomenclaturas son usadas como sinónimos. Además, “inhibidores de ALS” es el término utilizado en la clasificación de los herbicidas por las asociaciones internacionales (HRAC - *Herbicide Resistance Action Committee* - , IWSS -*International Weed Science Society*-).

La enzima AHAS cataliza las dos primeras reacciones paralelas en la biosíntesis de aminoácidos de cadena lateral ramificada: valina, leucina e isoleucina (Figura 1). Una característica única de esta vía es que valina e isoleucina son sintetizadas de manera paralela con un set de cuatro enzimas idénticas pero que catalizan reacciones con diferentes sustratos. La AHAS cataliza el primero de los pasos paralelos de esta ruta y constituye un punto crítico de ramificación puesto que cataliza dos reacciones que determinan en última instancia el flujo de carbono destinado a la biosíntesis de estos aminoácidos. El precursor común a la síntesis de los tres aminoácidos es el piruvato. La síntesis de isoleucina requiere la intervención de un segundo precursor, el 2-cetobutirato, que proviene de la desaminación de la treonina. Las reacciones catalizadas por AHAS consisten en la descarboxilación irreversible del piruvato y condensación del acetaldehído resultante con una segunda molécula de piruvato para dar 2-acetolactato, o con una molécula de 2-cetobutirato para dar 2-aceto-2-hidroxiacetato (Chipman *et al.*, 2005). Cada uno de estos productos es convertido por las enzimas cetolácido reductoisomerasa (KARI), dihidroxiácido deshidratasa (DH) y transaminasa (TA) para dar valina e isoleucina, respectivamente. Para la síntesis de leucina se requieren enzimas adicionales que utilizan 2-cetoisovalerato como sustrato de partida (McCourt y Duggleby, 2006; Binder *et al.*, 2007; Lancien *et al.*, 2007).

La síntesis de aminoácidos de cadena ramificada y por consiguiente la actividad AHAS se localiza en plastidios (Mifflin, 1974; Binder *et al.*, 2007). Si bien la biosíntesis se lleva a cabo en toda la planta, ocurre una mayor expresión de esta enzima en los tejidos más jóvenes (Schmitt y Singh, 1990; Singh y Shaner, 1995).

**Figura 1.** Vía biosintética de aminoácidos de cadena lateral ramificada. TD: treonina desaminasa, KARI: cetolácido reductoisomerasa, DH: dihidroxiácido deshidratasa, TA: transaminasa, IPMS: 2-isopropilmalato sintasa, IPMI: 2-isopropilmalato isomerasa, IPMD: 3-isopropilmalato deshidrogenasa. Adaptado de Duggleby y Pang (2000) y McCourt y Duggleby (2006).



La AHAS se compone de dos tipos de subunidades, una catalítica y otra regulatoria, también referidas como subunidad mayor y menor, respectivamente. Esta última denominación surgió de estudios en microorganismos dado que presentan subunidades regulatorias pequeñas. Sin embargo, en plantas las subunidades catalíticas y regulatorias son de peso similar (Hershey *et al.*, 1999; Lee y Duggleby, 2001). La subunidad catalítica es un homodímero (Chang y Duggleby, 1997) mientras que la subunidad regulatoria consiste en un monómero (Hershey *et al.*, 1999; Lee y Duggleby, 2002).

La subunidad catalítica de AHAS es la encargada de la actividad de esta enzima y requiere tres cofactores: tiamina pirofosfato (TPP), flavina adenina dinucleótido (FAD) y un catión divalente como  $Mg^{++}$ . Cada polipéptido de la subunidad catalítica de AHAS consta de tres dominios  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y una cola C-terminal. El sitio activo de la enzima se localiza en la interfase de estos monómeros (Duggleby *et al.*, 2008).

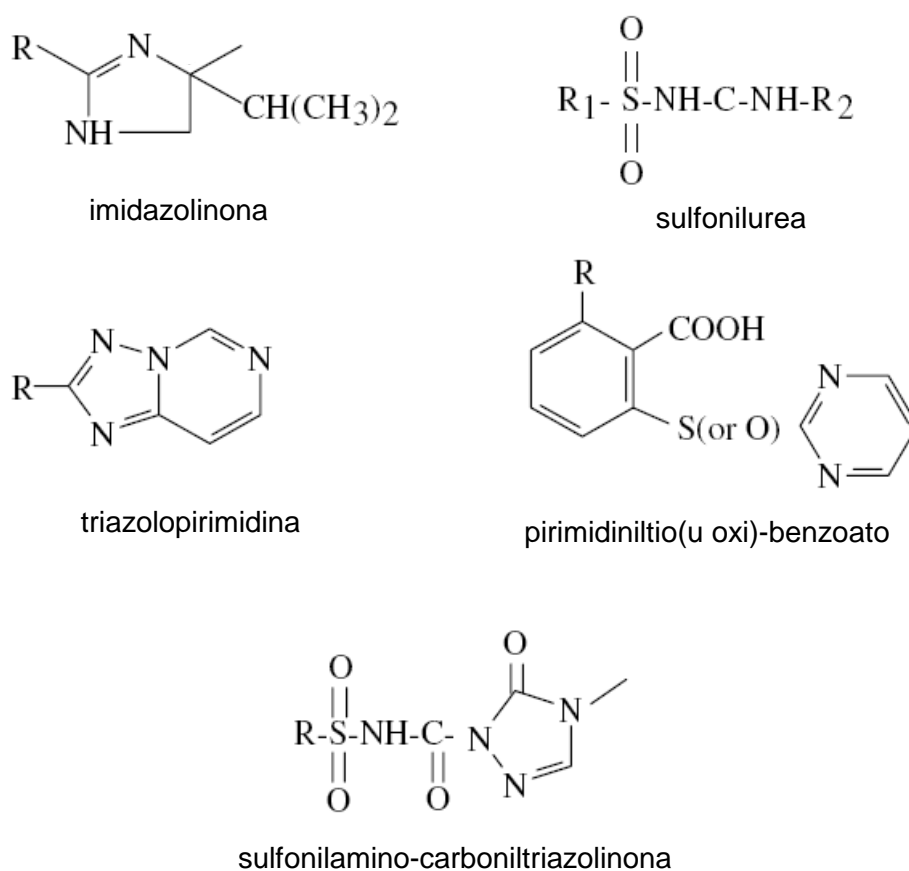
La subunidad regulatoria de AHAS participa en la regulación por retroalimentación negativa, lo que implica que la enzima es inhibida por los productos finales de la vía. Además, se encontró que leucina produce una acción sinérgica junto a valina o isoleucina debido a una duplicación en los sitios alostéricos de la subunidad regulatoria. Hasta el momento, la holoenzima no fue aislada directamente de tejidos vegetales (Barak y Chipman, 2012). Sin embargo, proteínas regulatorias recombinantes junto con la subunidad catalítica purificada de *A. thaliana* reconstituyeron una alta actividad sensible a la inhibición por los tres aminoácidos finales de la vía de igual forma que la enzima nativa en extractos crudos (Hershey *et al.*, 1999; Lee y Duggleby, 2001). La subunidad regulatoria contiene sitios de unión separados para leucina y valina/isoleucina en la interfase de los dos dominios. La ocupación de alguno de los sitios por sus ligandos es señalado a la subunidad catalítica y produce su inhibición (Lee y Duggleby, 2002).

Los herbicidas inhibidores de AHAS son un grupo numeroso de compuestos que incluyen cinco familias con características químicas diversas (Figura 2): las sulfonilureas (Chaleff y Mauvais, 1984; Ray, 1984), imidazolinonas (Shaner *et al.*, 1984, 2012; Shaner y O'Connor, 1991), triazolopirimidinas (Gerwick *et al.*, 1990), pirimidiltio (u oxi)-benzoatos y sulfonil-amino-carboniltriazolinonas (Tan *et al.*, 2006).

Numerosas aproximaciones bioquímicas comprobaron que los inhibidores AHAS se comportan como inhibidores no competitivos o incompetivos de la enzima. Esto implica que no se comportan como análogos de sustrato (Shaner *et al.*, 1984; Muhitch *et al.*, 1987; Durner *et al.*, 1991). En los años 80 se propuso que el sitio de unión a herbicidas correspondía a un vestigio de sitio de unión a quinonas del ancestro evolutivo de la piruvato

oxidasa (Schloss *et al.*, 1988). Sin embargo, recientemente se ha demostrado mediante estudios cristalográficos y de difracción de rayos X que los herbicidas se unen en la entrada del canal de acceso del sustrato al sitio activo, en la interfase de las subunidades catalíticas. Distintas clases de herbicidas ocupan sitios parcialmente solapados y adoptan distintas formas de unión, pero todos bloquean a la enzima en el llamado sitio de unión a herbicidas (Pang *et al.*, 2002, 2003, 2004; McCourt *et al.*, 2005, 2006).

**Figura 2.** Estructuras moleculares básicas de las 5 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 inhibidores de AHAS se absorben tanto por raíces como por el follaje y en función de ello pueden ser empleados en preemergencia o postemergencia. El transporte del herbicida por la planta puede ocurrir por simplasto o apoplasto (Little y Shaner, 1991; Tuesca y Nisensohn, 2004). Los síntomas que manifiestan las plantas tratadas con estos herbicidas incluyen: detención del crecimiento, acortamientos de entrenudos, clorosis en márgenes de hojas jóvenes, coloración rojiza o púrpura, inhibición de raíces laterales, necrosis, etc. La muerte de la planta se produce luego de varias semanas de la aplicación del herbicida (Saari *et al.*, 1994; Whitcomb, 1999).

Numerosas evidencias de naturaleza bioquímica, fisiológica y genética, sugieren que la enzima AHAS es el único blanco de estos herbicidas (Muhitch *et al.*, 1987; Manabe *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). Si bien se conoce que la inhibición de AHAS es el mecanismo de acción primario, los mecanismos precisos que conectan esta inhibición con la muerte de la planta no han sido del todo elucidados (Zhou *et al.*, 2007). Avances recientes demostraron que la acumulación de carbohidratos y aminoácidos libres producen la detención en el crecimiento de las plantas y desencadenan posteriormente procesos fermentativos con producción de compuestos tóxicos que explicarían el proceso de muerte de las mismas (Gaston *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2004, 2005, 2011).

Los herbicidas inhibidores de AHAS controlan un amplio espectro de malezas y tienen alta potencia biológica por lo que pueden utilizarse a bajas dosis de aplicación, en el orden de gramos por hectárea, mientras que otros herbicidas se requieren en niveles de kilogramos por hectárea. La introducción de estos herbicidas en los 80' fue responsable de la disminución de la cantidad de herbicida total utilizado en el mundo (Saari *et al.*, 1994; Tan *et al.*, 2006).

La base para la selectividad de varios cultivos a ciertos herbicidas inhibidores de AHAS se debe a diferencias en la naturaleza o tasa de metabolismo del herbicida (Mazur y Falco, 1989; Brown, 1990). De esta manera, la soja es tolerante a aplicaciones de imazaquin e imazetapir (Teclé *et al.*, 1993) y nicosulfuron es selectivo para maíz (Green y Ulrich, 1993). Por otro lado, la resistencia a estos herbicidas también puede estar dada por la modificación del sitio de acción, esto es, una modificación en la estructura de la AHAS que hace que la enzima pierda la sensibilidad a estos compuestos (Duggleby *et al.*, 2008).

Cabe mencionar que existen en la literatura algunas divergencias en cuanto a los términos resistencia y tolerancia. En este trabajo serán consideradas las definiciones más

ampliamente aceptadas<sup>1</sup>. La definición de resistencia se refiere a la capacidad de sobrevivir y reproducirse después de la aplicación de una dosis de herbicida que normalmente sería letal para la especie. La resistencia puede ocurrir naturalmente o puede inducirse por técnicas artificiales como ingeniería genética, selección en programas de mutagénesis y cultivo de tejidos. La tolerancia, en cambio, se refiere a la habilidad inherente de una especie a sobrevivir y reproducirse luego de la aplicación de herbicida; lo cual implica que no hubo selección o manipulación genética (Powles y Holtum, 1994; WSSA, 1998).

Los mecanismos de resistencia o tolerancia a herbicidas pueden clasificarse en dos grandes grupos: i) con modificación en el sitio de acción y ii) sin modificación en el sitio de acción. En el primer caso, el herbicida puede alcanzar el sitio de acción en una dosis letal pero éste es insensible a la acción del mismo. 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). La detoxificación o metabolismo del herbicida es el mecanismo más común en el segundo grupo, dentro del cual se destacan dos sistemas enzimáticos correspondientes a citocromo P450s y glutatión S-transferasas (Yuan *et al.*, 2007; Beckie y Tardif, 2012)

La resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS generalmente está conferida por una mutación puntual en el gen que codifica para la subunidad catalítica de esta enzima. En diferentes especies de malezas se han descrito 20 sustituciones en ocho aminoácidos conservados: Ala122, Pro197, Asp376, Arg377, Ala205, Trp574, Ser653 y Gly654 (numeración de aminoácidos en referencia a *Arabidopsis thaliana* L.). Estas mutaciones pueden conferir resistencia cruzada entre las distintas familias químicas o ser específicas para alguna en particular. La tendencia general indica que la mutación Ala122Thr confiere altos niveles de resistencia a imidazolinonas, las sustituciones en Pro197 a sulfonilureas y en menor medida a triazolopirimidinas, Ala205 a imidazolinonas, Arg377His a sulfonilureas, sustituciones en Arg377 y Trp574 a todas las clases de herbicida, Ser653 a imidazolinonas y en menor medida a pirimidiltiobenzoatos y Gly654 a imidazolinonas (Tranel y Wright, 2002; Beckie y Tardif, 2012).

---

<sup>1</sup> <http://wssa.net/Weeds/Resistance/definitions.htm>

En Argentina se comercializan herbicidas pertenecientes a las cinco familias químicas de inhibidores de AHAS. Dentro de la familia de las imidazolinonas se utilizan cinco ingredientes activos en diversas formulaciones: imazamox en soja para latifoliadas anuales, imazapic en caña de azúcar y maní para el control de *Cyperus rotundus*, *Cynodon dactylon* y *Sorghum halepense* y latifoliadas anuales; imazaquin en soja para latifoliadas anuales; imazetapir en alfalfa, arveja, maíz Clearfield®, maní, soja y poroto para latifoliadas anuales; imazapir en alambrados y áreas no cultivadas para un amplio espectro de malezas, en caña de azúcar y girasol Clearfield® contra *Cyperus rotundus*, *Cynodon dactylon* y *Sorghum alepense* y latifoliadas anuales; imazapir + imazetapir en maíz Clearfield® contra *Cyperus rotundus*, *Cynodon dactylon* y *Sorghum alepense* y latifoliadas anuales (Arregui y Puricelli, 2008). Además, la formulación imazapir + imazamox comenzó a comercializarse recientemente para los girasoles CLPlus®.

Desde la introducción del maíz resistente a imidazolinonas en 1992, otros cultivos (colza, lenteja, arroz, trigo y girasol) han sido lanzados al mercados bajo el nombre de Clearfield® y CLPlus® (Tan *et al.*, 2005; Shaner *et al.*, 2012).

Si bien se han producido plantas resistentes a inhibidores de AHAS mediante transgénesis, todos los cultivos resistentes a imidazolinonas actualmente comercializados fueron desarrollados mediante métodos no transgénicos (Tan *et al.*, 2005; Shaner *et al.*, 2012). Las técnicas utilizadas incluyeron selección a partir de cultivo de tejidos y mutagénesis de polen en maíz (Newhouse *et al.*, 1991a,b), selección de microsporas en canola (Swanson *et al.*, 1989), mutagénesis de semillas en trigo (Newhouse *et al.*, 1992), arroz (Croughan, 1998) y girasol (Sala *et al.*, 2008a,b); y la incorporación del carácter desde un biotipo de maleza resistente emparentado en el caso de girasol (Miller y Al-Khatib, 2002). En todos los casos, el mecanismo de resistencia corresponde a la alteración en el sitio de acción de estos herbicidas.

En el cultivo de girasol, la competencia por malezas puede causar pérdidas de 20 a 70% de rendimiento (Blamey y Zollinger, 1997). Si bien la utilización de herbicidas es el método elegido para el control de malezas en la agricultura moderna, la disponibilidad de herbicidas selectivos para girasol es limitado. El desarrollo de nuevos herbicidas es un proceso lento y costoso, por lo que los mayores esfuerzos de investigación están inclinados al desarrollo de tecnologías de resistencia a herbicidas conocidos (Devine *et al.*, 2005; Sala *et al.*, 2012a).

Los mecanismos de resistencia a herbicidas descritos en girasol incluyen modificaciones en el sitio de acción y detoxificación de herbicida. En cuanto a la modificación en el sitio de acción, se han encontrado numerosas alteraciones en AHAS que producen resistencia a los herbicidas inhibidores de dicha enzima (White *et al.*, 2003; Kolkman *et al.*, 2004; Hawley, 2005; Sala *et al.*, 2008a; Sala y Bulos, 2012a). La participación de citocromo P450s también ha sido descrita en diversos materiales como responsable de otorgar resistencia a herbicidas con diferentes modos de acción (Kaspar *et al.*, 2011; León *et al.*, 2012).

La resistencia a inhibidores de AHAS por modificación en el sitio de acción se corresponde a diversas mutaciones puntuales en el gen *ahas1* que codifica para la subunidad catalítica 1 de AHAS (AHAS1) de girasol. A modo de resumen, estas mutaciones se describen en la Tabla 1 y se muestran esquematizadas en la Figura 3.

La primera fuente de resistencia a imidazolinonas en girasol, denominada *Imisun*, fue desarrollada a partir de una población de girasol maleza descubierta en Kansas, EEUU (Al-Khatib *et al.*, 1998). La herencia de este carácter está controlada por 2 genes: uno principal con acción semidominante (inicialmente llamado *Imr1*) y un segundo gen, *Imr2*, con efecto modificador cuando el primero está presente (Bruniard y Miller, 2001). *Imr1* fue denominado como *Ar<sub>pur</sub>* (Kolkman *et al.*, 2004) y posteriormente como *Ahas1-1* (Sala *et al.*, 2008a). Este gen corresponde a un alelo para *ahas1* con una mutación en la posición 205. Con respecto al segundo locus (*Imr2*), también denominado *enhancer*, se postula que podría corresponderse a determinantes génicos adicionales involucrados en la eficiencia de absorción, transporte o metabolismo del herbicida (Kolkman *et al.*, 2004).

En la actualidad existen líneas públicas americanas liberadas por el Departamento de Agricultura de los EEUU (USDA-ARS -United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service-) a las que se les ha incorporado resistencia a imidazolinonas a partir de la fuente mencionada (Miller y Al-Khatib, 2002; Miller *et al.*, 2006). Este germoplasma es homocigota y resistente a los herbicidas imazamox e imazetapir y está disponible para su uso en la creación de híbridos, líneas parentales, o germoplasma resistente. Varias compañías semilleras introdujeron esta resistencia en sus líneas propias de girasol y distintas variedades fueron comercializadas por primera vez en Estados Unidos, Argentina y Turquía en el 2003 como Girasol Clearfield® (Tan *et al.*, 2005).

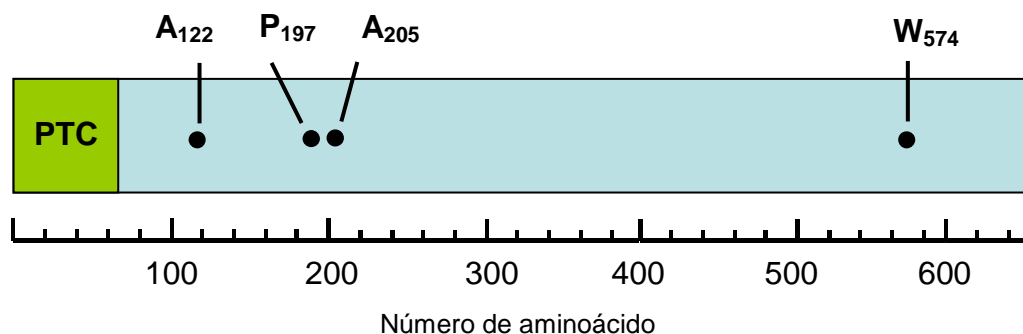
La segunda fuente de resistencia a imidazolinonas en girasol surge a partir de un programa de mutagénesis de semillas y selección con imazapir (Sala *et al.*, 2008b). El gen involucrado fue denominado *Ahas1-3* y se corresponde con una mutación en la posición

122 (Sala *et al.*, 2008a). Los híbridos con esta resistencia fueron comercializados bajo el nombre de Clearfield Plus® y mostraron niveles de resistencia mayores que los materiales *Imisun* (Sala *et al.*, 2012b).

**Tabla 1.** Mutaciones que confieren resistencia a inhibidores de AHAS en girasol. IMI: imidazolinonas, SU: sulfonilureas, TP: triazolopirimidinas y POB: pirimidinil-oxibenzoatos.

Aminoácido	Sustitución	Resistencia a inhibidores AHAS	Referencia
<b>Ala 122</b>	Thr	resistencia a IMI	Sala <i>et al.</i> (2008a,b)
<b>Pro 197</b>	Leu	resistencia a SU	Kolkman <i>et al.</i> (2004) Hawley (2005)
<b>Ala 205</b>	Val	resistencia a IMI	Baumgartner <i>et al.</i> (1999) Kolkman <i>et al.</i> (2004) White <i>et al.</i> (2002, 2003)
<b>Trp 574</b>	Leu	resistencia a IMI, SU, TP y POB	Sala y Bulos (2012a)

**Figura 3.** Representación esquemática de la subunidad catalítica de la acetohidroxiácido sintasa 1 (AHAS1) de girasol (adaptado de Tranel y Wright, 2002). Se muestran los cuatro aminoácidos conservados cuya alteración ha sido atribuida a resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS. El péptido de tránsito cloroplástico (PTC) contiene la información para el transporte del precursor a los plastidios, donde es removido dando origen a la proteína madura. La numeración de los aminoácidos se basa en el precursor AHAS de *Arabidopsis thaliana* (Sathasivan *et al.*, 1990).



Con respecto a la resistencia a sulfonilureas, también se disponen de fuentes naturales y artificiales, inducidas por programas de mutagénesis. La fuente de resistencia natural fue encontrada en una población de girasol maleza y fue incorporada a girasol cultivado (Miller y Al-Khatib, 2004; Jocić *et al.*, 2011). Si bien la herencia de este carácter no ha sido estudiada, se ha reportado una mutación en la posición 197 de *ahas1* (Kolkman *et al.*, 2004). Este alelo ha sido denominado *Ar<sub>kan</sub>* (Kolkman *et al.*, 2004) y *Ahas1-2* (Sala *et al.*, 2008a). Además, la presencia de genes modificadores también estaría implicada (Miller y Zollinger, 2004).

Otra fuente de resistencia a sulfonilureas fue registrada bajo el nombre de ExpressSun™ en girasoles comerciales en 2007 (Streit, 2012). Los materiales resistentes fueron desarrollados a partir de un programa de mutagénesis sobre la línea HA89 y posterior selección con el herbicida tribenuron-metil (Gabard y Huby, 2004). Esta resistencia se debe a una mutación en la posición 197, idéntica a la encontrada en la fuente natural (Hawley, 2005).

Por otra parte, recientemente se ha encontrado un nuevo alelo que confiere resistencia a un amplio espectro de inhibidores de AHAS. Esta fuente de resistencia fue encontrada en una población de girasol silvestre en la localidad de Jovita (provincia de Córdoba, Argentina) y fue incorporada a una línea de girasol cultivado. Este nuevo alelo corresponde a una mutación en la posición 574 de *ahas1* que confiere resistencia a imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas y pirimidinil-oxibenzoatos (Sala y Bulos, 2012a). Por tratarse de un material de reciente obtención no se encuentra aún disponible en el mercado.

Si bien se ha reportado en girasol la resistencia a múltiples herbicidas conferida por citocromo P450s, estos materiales no se encuentran disponibles comercialmente. Por un lado, se ha identificado una línea de girasol (ToIP450-1) resistente a un amplio espectro de herbicidas que revierte su resistencia por aplicación de malatión, un inhibidor de citocromo P450s. Una mayor transcripción de un gen codificante para una enzima de la familia de citocromo P450s (HaCYP71A10) en tejido foliar sería responsable de la resistencia a múltiples herbicidas observada en esta línea (Kaspar *et al.*, 2010, 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).

Además del gen *ahas1* donde se encontraron las mutaciones que confieren resistencia por mutación de sitio de acción, en girasol existen otros dos genes que codifican para la subunidad catalítica AHAS: *ahas2* y *ahas3* (Kolkman *et al.*, 2004), pero se desconoce si tienen alguna participación en lo que respecta a la resistencia. *Ahas1* es el miembro más

polimórfico de esta familia y el más preponderante en las bases de datos ESTs (*Expressed Sequence Tag*, etiqueta de secuencia expresada) (Kozik *et al.*, 2002). Sin embargo, no se dispone de información acerca de los patrones de expresión de estos tres genes. Los estudios de expresión permitirían esclarecer si los distintos transcritos difieren o no en su representación en los distintos tejidos de la planta, en particular aquellos que son afectados por el herbicida como ser hoja y raíz. Este tipo de estudios sobre distintos genotipos posibilitaría establecer si las diferencias de expresión están asociadas a la resistencia a imidazolinonas en esta especie.

Dentro de los programas de mejoramiento que buscan incorporar la resistencia a inhibidores de AHAS a sus materiales, la selección de genotipos resistentes se realiza actualmente a campo mediante la aplicación foliar del herbicida en el estadio V6 del cultivo (Bruniard y Miller, 2001). Disponer de una metodología alternativa que permita la identificación de fenotipos que porten los genes de resistencia en etapas tempranas del cultivo se traduciría en un ahorro de tiempo y recursos dentro de los programas de mejoramiento. En este sentido, los estudios del presente grupo de trabajo constituyen el primer aporte al desarrollo de pruebas diagnósticas en girasol para la identificación de plantas resistentes a imidazolinonas (Vega, 2009; Vega *et al.*, 2009; Breccia *et al.*, 2009). En particular, los ensayos se han desarrollado sobre materiales *Imisun*. La herencia digénica de este carácter da lugar a mayor número de genotipos y fenotipos que portan distintos grados de resistencia, agregando complejidad al proceso de identificación de individuos en esquemas de mejoramiento (Bruniard, 2001). Las metodologías de diagnóstico que resultaron efectivas para la clasificación de individuos con distintos grados de resistencia incluyen pruebas de actividad enzimática AHAS mediante un protocolo *in vivo* (Vega, 2009) y la evaluación de plántulas germinadas en un sistema de multimacetas en presencia de herbicida (Vega *et al.*, 2009). En este sentido, el presente trabajo pretende extender los estudios previos considerando un número mayor de genotipos y un ingrediente activo diferente. Además, el abordaje de estudios sobre el mecanismo que contribuye a la resistencia conferida por la mutación en el gen *ahas1* es fundamental para ampliar la frontera del conocimiento en lo que respecta al segundo locus *Imr2*.

## **HIPÓTESIS**

## HIPÓTESIS

La resistencia a imidazolinonas en girasol puede ser verificada a nivel de planta completa como así también por la actividad enzimática AHAS en etapas tempranas del desarrollo de plántulas.

Existe expresión diferencial de los genes que codifican para la subunidad catalítica de AHAS (*ahas1*, *ahas2* y *ahas3*) y estas diferencias podrían estar asociadas a la resistencia a imidazolinonas en esta especie.

Uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a imidazolinonas en esta especie, relacionado al *locus Imr2*, es la detoxificación del herbicida mediada por citocromo P450s.

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la resistencia a imidazolinonas en estadios tempranos del desarrollo, a nivel fenotípico y bioquímico, y cuantificar la expresión de los genes *ahas* en girasol.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Caracterizar la resistencia a imazapir a nivel de planta completa y de actividad enzimática *in vivo* durante el desarrollo de plántulas de girasol de genotipos con diferentes grados de resistencia.

2) Estudiar la expresión de los genes *ahas* a nivel transcriptómico y bioquímico en plantas jóvenes de distintas líneas de girasol.

3) Determinar si la detoxificación vía citocromo P450s es un mecanismo que contribuye a la resistencia conferida por la mutación de la enzima AHAS.

# **CAPÍTULO 1**

**Caracterización de la resistencia a imidazolinonas  
en etapas tempranas del desarrollo de plántulas**

**CAPÍTULO 1:**  
**Caracterización de la resistencia a imidazolinonas**  
**en etapas tempranas del desarrollo de plántulas**

**INTRODUCCIÓN**

Los programas de mejoramiento actuales de girasol se basan en el desarrollo de líneas endocriadas que son posteriormente empleadas en la producción de híbridos. Las tecnologías de control de malezas recientemente adoptadas incluyen cultivares resistentes a imidazolinonas que permiten el control de diversas especies de gramíneas y latifoliadas anuales, así como algunas malezas perennes tales como cebollín (*Cyperus rotundus*) y sorgo de alepo (*Sorghum halepense*). Una sola aplicación postemergente temprana es suficiente para un amplio espectro de control y la posterior reducción de nuevos nacimientos de malezas. Otra de las ventajas que posee esta tecnología es la de posibilitar la siembra directa. Asimismo, el uso de estos girasoles evita los riesgos de fitotoxicidad al ser sembrados en lotes que provengan de aplicaciones de imidazolinonas en soja o maíz resistente. La incorporación de la resistencia a imidazolinonas en girasol representó el mayor avance para el control de malezas y consecuentemente para el incremento de la producción de este cultivo (Zollinger, 2004; Sala y Weston, 2010).

La fuente de resistencia a imidazolinonas en los materiales denominados *Imisun* proviene de una población de girasol maleza encontrada en 1996 en un campo de soja cerca de la localidad de Rossville (Kansas, Estados Unidos), en el que se había utilizado el herbicida imazetapir durante siete años consecutivos. El biotipo resistente encontrado era casi 200 veces más resistente al herbicida con respecto a plantas susceptibles (Al-Khatib *et al.*, 1998). Las semillas recolectadas de esta población, denominada PUR *H. annuus*, fueron utilizadas para incorporar este carácter al girasol cultivado. Los materiales IMISUN-1 e IMISUN-2 corresponden a las plantas resistentes BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> a partir de las cruces HA89/ PUR *H. annuus* y RHA409//RHA376/ PUR *H. annuus*, respectivamente (Al-Khatib y Miller, 2000). Posteriormente se desarrollaron las líneas mantenedora HA425 (BC<sub>2</sub>F<sub>6</sub>) a partir de IMISUN-1 y restauradoras RHA426 y RHA427 a partir de IMISUN-2 (Miller y Al-Khatib, 2002). Las semillas de IMISUN-1 e IMISUN-2 al igual que de diversas líneas públicas resistentes (Miller

y Al-Khatib, 2002; Miller *et al.*, 2006) están disponibles para los mejoradores, compañías semilleras y grupos de investigación<sup>1</sup>.

Bruniard y Miller (2001) estudiaron el tipo de herencia de la resistencia al herbicida imazamox en el cruzamiento entre la línea resistente HA425 y la línea susceptible HA89 a través del análisis de la segregación de plantas de una población  $F_2$  y de cruzamientos prueba. Estos autores concluyeron que la resistencia estaba controlada por dos *loci*, el primero con un gen de acción génica semidominante (*Imr1*) y el segundo con un gen (*Imr2*) que tiene efecto modificador sobre el primer *locus*. De acuerdo con la interacción que se establece entre estos dos *loci*, los únicos genotipos que presentan resistencia son *Imr1Imr1Imr2Imr2* y *Imr1Imr1Imr2imr2*. El fenotipo intermedio para la resistencia corresponde a los genotipos *Imr1Imr1imr2imr2*, *Imr1imr1Imr2Imr2*, *Imr1imr1Imr2imr2* e *Imr1imr1imr2imr2* mientras que los genotipos *imr1imr1Imr2Imr2*, *imr1imr1Imr2imr2* e *imr1imr1imr2imr2* son los que manifiestan susceptibilidad al herbicida (Bruniard, 2001).

De acuerdo al modelo de herencia de la resistencia a imidazolinonas, para lograr híbridos completamente resistentes ambas líneas progenitoras deben tener constitución genotípica homocigota. Las estrategias de mejoramiento convencional utilizadas por los mejoradores para su transferencia a germoplasma *elite* son la conversión de líneas *elite* por retrocruza así como la selección de líneas a partir de poblaciones segregantes. En el caso de la conversión de líneas por retrocruza debido al modo particular de herencia se hace necesario además intercalar una generación de autofecundación y pruebas de progenie. La identificación y selección de individuos resistentes se realiza actualmente a campo mediante la aplicación foliar del agente selectivo a partir del estadio V6 del cultivo (Bruniard y Miller, 2001). La selección a campo, además de consumir principalmente tiempo, recursos y espacio, posee la dificultad de ser afectada por las condiciones ambientales (Bozic *et al.*, 2012). Disponer de una metodología efectiva y rápida que asista en el proceso de selección permitiría reducir los tiempos y el material a evaluar, minimizando costos en los programas de mejoramiento.

Los experimentos de dosis-respuesta utilizando múltiples dosis de herbicida resultan útiles para la caracterización de la resistencia en materiales de interés. A su vez, los ensayos con genotipos de respuesta conocida permiten poner a punto protocolos de diagnóstico para su posterior uso de rutina en la evaluación de un gran número de individuos (Beckie *et al.*, 2000). Dentro de los ensayos de diagnóstico empleados para evaluar resistencia o susceptibilidad a los inhibidores de AHAS pueden mencionarse

---

<sup>1</sup> <http://www.ag.ndsu.nodak.edu/aginfo/seedstock/varieties/VH-SUNF.htm>

diversas técnicas moleculares (Corbett y Tardif, 2008; Délye y Boucansaud; 2008), experimentos bioquímicos basados en la cuantificación de actividad AHAS (Ray, 1984; Gerwick *et al.*, 1993; Simpson *et al.*, 1995) o la acumulación de metabolitos (Loper *et al.*, 2002; Li y Wang, 2005), ensayos de germinación de polen en presencia de herbicida (Ritcher y Powles, 1993), de germinación de semillas tanto en placas (Heap y Knight, 1986; Burnet *et al.*, 1994; Cirujeda *et al.*, 2001; Blair *et al.*, 2006; Kuk *et al.*, 2003a;2008) como en hidroponía (Jettner *et al.*,1999; Santín Montanyá *et al.*, 2006) y los ensayos tradicionales en maceta con posterior aplicación de herbicida (Boutsalis y Powles, 1995).

Los ensayos tradicionales se realizan en maceta con suelo en los cuales el tratamiento con herbicida se lleva a cabo por aplicación foliar. Si bien resultan apropiados para discriminar distintos grados de resistencia, demandan una gran cantidad de recursos, espacio y tiempo y no se justifica el trabajo extra que implican en *screenings* de rutina (Beckie *et al.*, 2000). A su vez, la relación entre la respuesta de la planta y la dosis de herbicida se ve afectada por numerosos factores que afectan la biodisponibilidad del mismo, tales como la absorción efectiva del herbicida por hoja, la degradación del ingrediente activo y la disponibilidad del resto del mismo en el suelo. Los bioensayos sin suelo con aplicación del herbicida mediante el agregado del mismo en la solución de riego, por su parte, presentan la ventaja de permitir la máxima biodisponibilidad del herbicida, eliminando muchos de los factores que afectan los ensayos tradicionales (Jettner *et al.*, 1999; Sandín España *et al.*, 2011).

Dentro de los ensayos enzimáticos que miden la actividad de AHAS, la metodología más utilizada es la cuantificación *in vitro* (Ray 1984; Singh *et al.*, 1988). Sin embargo, también es posible medir los productos de AHAS en hojas incubadas en una solución de herbicida. Este método, denominado *in vivo*, fue inicialmente desarrollado por Gerwick *et al.* (1993) y se basa en la inhibición de la cetol-ácido reductoisomerasa (KARI, EC 1.1.1.86), enzima que actúa a continuación de la AHAS en la ruta metabólica de síntesis de aminoácidos de cadena lateral ramificada. La exposición del tejido vegetal a un compuesto inhibidor de esta enzima provoca la acumulación de los productos de AHAS (acetolactato y 2-cetobutirato) en la hoja. Los productos de AHAS producidos y acumulados en estas condiciones pueden cuantificarse mediante una reacción colorimétrica (Westerfeld, 1945; Epelbaum *et al.*, 1990). Trabajos posteriores introdujeron algunas modificaciones al método *in vivo*, las cuales incluían la aplicación de los herbicidas en plantas enteras en cambio de en hojas aisladas (Simpson *et al.*, 1995; Lovell *et al.*, 1996a).

En aquellos trabajos donde se conducen los dos tipos de ensayos de actividad AHAS, *in vitro* e *in vivo*, los resultados en general son consistentes para ambas metodologías pero el grado de resistencia detectado no es el mismo (Kuk *et al.*, 2003a,b; Figueroa *et al.*, 2008). Los ensayos *in vivo* han mostrado una mejor correlación con la respuesta observada a nivel de planta entera, dado que son el resultado no sólo de la inhibición de la enzima, sino también del grado de absorción, translocación y metabolismo del herbicida (Simpson y Stoller, 1996; Hwang *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2010).

Los ensayos de actividad AHAS *in vivo* han sido aplicados mayormente en el estudio de resistencia en malezas (Lovell *et al.*, 1996a,b; Sprague *et al.*, 1997a,b; Lee y Owen, 2000; Hinz y Owen, 1997; Uchino *et al.*, 1999, Vollenberg *et al.*, 2000, 2001; Christofolletti, 2001; Shim *et al.*, 2003; Kuk *et al.*, 2002, 2003a,b; Zelaya y Owen, 2004; Hanson *et al.*, 2004; Lamego *et al.*, 2009). De manera similar, estos ensayos han permitido distinguir genotipos con diferentes grados de resistencia en cultivos tales como soja (Simpson *et al.*, 1995), trigo (Rainbolt *et al.*, 2005, Dastgheib y Field, 1998) y girasol (Vrbničanin *et al.*, 2008; Vega, 2009); y comparar los efectos de diferentes ingredientes activos (Simpson y Stoller, 1996; Hwang *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2010).

La resistencia a inhibidores de AHAS que manifiestan las plantas tratadas a campo podría verificarse en etapa de plántula a través de la evaluación del crecimiento en presencia de herbicida y de ensayos de actividad enzimática. De esta manera, la identificación y selección de individuos resistentes en estadios tempranos de desarrollo resultaría en una herramienta importante para reducir tiempos y costos en los programas de mejoramiento que pretendan incorporar este carácter.

Trabajos recientes de nuestro grupo de investigación abordaron la caracterización inicial de tres líneas endocriadas de girasol con diferentes grados de resistencia mediante en ensayos de germinación en condiciones *in vitro* y no estériles (sistema de multimacetas con perlita como soporte inerte) en presencia de herbicida. La germinación en multimacetas resultó menos laboriosa e igualmente eficiente para discriminar distintos grados de resistencia (Vega *et al.*, 2009). En el presente trabajo de tesis se realizó una caracterización más exhaustiva de la respuesta a imazapir en condiciones no estériles, extendiéndose el estudio a seis genotipos y evaluando las plántulas en diferentes estadios. De manera similar, el trabajo de Vega (2009) permitió poner a punto un protocolo de actividad enzimática AHAS *in vivo*, el cual fue utilizado en el presente trabajo para la caracterización de la respuesta a imazapir de seis genotipos de girasol.

El objetivo de este Capítulo fue caracterizar la resistencia a imidazolinonas en etapas tempranas del desarrollo de plántulas de girasol, tanto a nivel fenotípico como de actividad enzimática *in vivo*; y desarrollar bioensayos que permitan identificar genotipos con diferentes grados de resistencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron tres líneas endocriadas de girasol HA89, HA425 y 1058-1 y los tres cruzamientos entre ellas. Para dichos cruzamientos se recurrió al uso de androesterilidad génico-citoplasmática, dado que se disponía de las líneas HA425 y HA89 en sus formas citoplasmáticas androestéril (A) y normal (B).

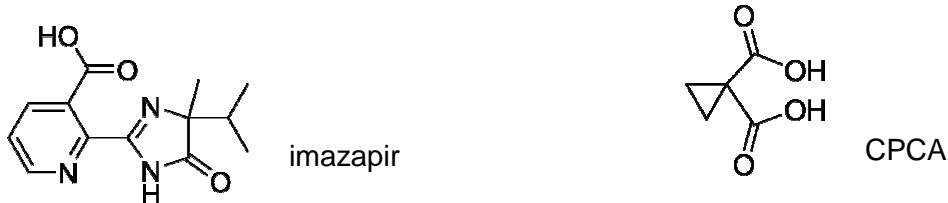
Las líneas HA425 y HA89 son líneas públicas americanas desarrolladas por el Departamento de Agricultura de EEUU en cooperación con la Estación Experimental de North Dakota (EEUU). La línea HA425 fue obtenida a partir de la cruce entre la línea HA89\*3 y PUR *H. annuus* utilizando el método de *pedigree* para desarrollar semillas BC<sub>2</sub>F<sub>6</sub>, con imazamox 1X como agente selectivo. El material parental PUR *H. annuus* fue seleccionado a partir de una población silvestre de girasol resistente a imazetapir, encontrada en un lote de Kansas (Estados Unidos) en el que había sido utilizado dicho herbicida durante siete años consecutivos para el control del girasol silvestre en el cultivo de soja. La línea HA425 constituye un germoplasma homocigota resistente a imidazolinonas (Miller y Al-Khatib, 2002). La línea 1058-1 es material experimental obtenido por retrocruza entre HA425 y HA89 y selección con imazamox 2X. Esta línea presenta un comportamiento intermedio en presencia del herbicida mientras que la línea HA89 es totalmente susceptible. Las líneas HA425 y HA89 son líneas casi isogénicas (NILs) (Bruniard, 2001). En la Tabla I.I se detalla el material vegetal utilizado, las abreviaturas empleadas, el genotipo para la resistencia y el fenotipo observado a campo.

**Tabla I.I.** Material vegetal. Se utilizaron tres líneas endocriadas de girasol y los cruzamientos entre ellas. Se muestra la abreviatura utilizada, el genotipo para la resistencia a imidazolinonas y el fenotipo observado a campo según descrito por Bruniard (2001).

Material vegetal	Abreviatura	Genotipo	Fenotipo
<b>Líneas endocriadas</b>			
HA425	R	<i>lmr1lmr1lmr2lmr2</i>	resistente
1058-1	I	<i>lmr1lmr1imr2imr2</i>	intermedio
HA89	S	<i>imr1imr1imr2imr2</i>	susceptible
<b>Cruzamientos</b>			
HA425 x 1058-1	RxI	<i>lmr1lmr1lmr2imr2</i>	resistente
HA425 x HA89	RxS	<i>lmr1imr1lmr2imr2</i>	intermedio
HA89 x 1058-1	SxI	<i>lmr1imr1imr2imr2</i>	intermedio

## Herbicidas

Se utilizó como inhibidor de AHAS un herbicida de la familia de las imidazolinonas cuyo ingrediente activo es el imazapir (ácido 2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il) nicotínico). Como inhibidor de la KARI se utilizó el ácido 1,1-ciclopropilcarboxílico (CPCA).



## Condiciones de crecimiento de plántulas

La germinación y el desarrollo de plántulas fueron llevados a cabo en cámara climática bajo condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), fotoperíodo (16/8 h luz/oscuridad) e intensidad lumínica ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

## Ensayo de germinación en placa

Se emplearon placas de Petri de 10 cm de diámetro preparadas con una base de algodón y dos discos de papel de filtro. En cada placa se dispusieron 25 aqenios que fueron regados con 50 ml de distintas concentraciones de imazapir: 0 (control) – 1 – 10 – 100 – 1000 – 10000  $\mu\text{M}$ . La incubación se realizó durante cuatro días en oscuridad y condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C). Las variables evaluadas fueron:

- porcentaje de germinación
- longitud de radícula (LR)

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Para cada combinación de genotipo y concentración de herbicida se realizaron tres repeticiones. Cada repetición consistió en una placa con 25 aqenios ( $N_{\text{total}} = 2700$ ).

## Ensayo de germinación en multimacetas de 8 días

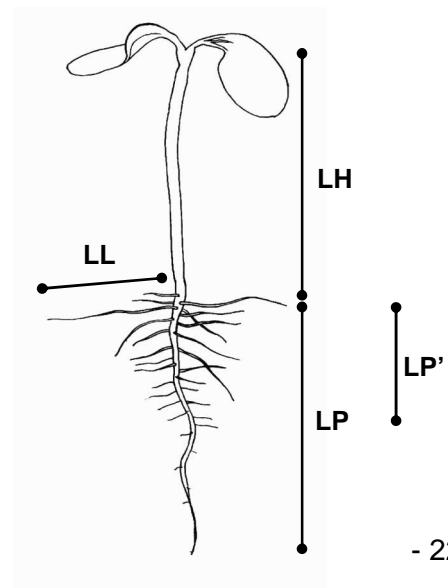
Se utilizaron geminadores tipo multimaceta, rellenos con perlita como soporte inerte. En cada geminador, de 5,5 cm de alto y 4 cm de ancho, se sembraron dos aqenios a 1 cm de profundidad. Treinta geminadores fueron colocados en bandejas de plástico y regados

por capilaridad con solución nutritiva. Estas bandejas se mantuvieron tapadas con polietileno durante los primeros 4 días de incubación. La solución nutritiva de riego fue formulada a base de sales de Murashige y Skoog (1962) o MS al 25%, con el agregado de diferentes concentraciones de imazapir: 0 (control) – 1,25 – 2,5 – 5 – 7,5 y 10  $\mu\text{M}$ . Las bandejas fueron rotadas diariamente para minimizar variaciones locales que pudieran ocurrir en la cámara climática.

Finalizado el período de incubación de 8 días se evaluaron las siguientes variables:

- longitud de hipocótilo (LH)
- longitud de raíz principal (LP)
- longitud de raíz principal que presenta raíces laterales mayores a 5 mm (LP')
- longitud de raíz lateral más larga (LL)
- peso fresco de la biomasa aérea (PFA)
- peso fresco de la biomasa radical (PFR)
- peso seco de la biomasa aérea (PSA)
- peso seco de la biomasa radical (PSR)

Las plántulas fueron seccionadas en partes aérea (hipocótilo y cotiledones) y radical. Los restos de perlita fueron cuidadosamente removidos de los tejidos vegetales. Las medidas de longitud fueron obtenidas mediante el uso de un calibre digital (150 mm, Digimess ®) y se esquematizan en la Figura 1.1. Para la determinación del resto de las variables se utilizó una balanza digital de precisión (120 g, Scaltec ®) y se midió el peso de 10 plántulas. En cuanto al peso seco el material vegetal fue incubado en estufa a 70 °C durante 4 días. Finalmente, las variables de peso fueron expresadas por planta individual.



**Figura 1.1.** Variables de longitud medidas sobre plántulas de 8 días: longitud de hipocótilo (LH), de raíz principal (LP), de longitud de raíz principal que presenta raíces laterales mayores a 5 mm (LP') y longitud de raíz lateral más larga (LL).

El diseño experimental fue en bloques completamente aleatorizados. Para cada combinación de genotipo y concentración de herbicida, se sembraron tres repeticiones de diez aquenios cada una ( $N_{\text{total}} = 1080$  plántulas).

### Ensayo de germinación en multimacetas de 15 días

El bioensayo de germinación en multimacetas anteriormente descrito fue realizado para un período de incubación de 15 días (Figura 1.2). Se evaluaron las variables que ya fueron mencionadas y los siguientes parámetros de crecimiento foliar:

- longitud de hoja (LF)
- área foliar (AF)

Para la medida de área foliar se utilizó un integrador de área foliar o *areameter* (Li-Cor®, LI-3000 C). El diseño experimental fue en bloques completamente aleatorizados. Para cada combinación de genotipo y concentración de herbicida, se sembraron tres repeticiones de diez aquenios cada una ( $N_{\text{total}} = 1080$  plántulas).

**Figura 1.2.** Sistema de multimacetas con perlita como soporte inerte y riego por capilaridad. Plantas control de 15 días de incubación (estadio V2).



### **Medición *in vivo* de la actividad enzimática AHAS**

El ensayo *in vivo* de actividad AHAS se llevó a cabo según fue descrito previamente para girasol silvestre (White *et al.*, 2002) con modificaciones (Gerwick *et al.*, 1993; Vega, 2009). Se utilizaron plantas en estadio V2 (Schneiter y Miller, 1981) cultivadas en cámara climática (Figura 1.2). Para la obtención de plantas se utilizó un sistema de germinadores de tipo multimacetas (*speedlings*) rellenos con perlita como soporte inerte y regados por capilaridad con una solución nutritiva consistente en la base salina MS (Murashige y Skoog, 1962) diluida al 25%.

### Condiciones de absorción del herbicida y acumulación de los productos de la enzima

Las hojas del primer par fueron incubadas en placas de Petri de 5 cm sumergidas en 6 ml de solución nutritiva de sales de MS 25%, 500  $\mu$ M CPCA, 0,025% Tritón X-100 y 0 (control) – 0,1 – 1 – 3,16 – 10 – 31,6 – 100 – 316 – 1000  $\mu$ M imazapir. El control sin agregado de imazapir se realizó para cada dosis, dado que control y dosis correspondían a hojas opuestas provenientes de la misma planta. La incubación se realizó bajo luz a  $25 \pm 2$  °C durante 6 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las hojas fueron pesadas y conservadas en microtubos a -20 °C.

### Determinación colorimétrica de los productos de la enzima

Para la determinación de los productos de la enzima acumulados en las hojas, el material vegetal fue molido con micro-pilón en nitrógeno líquido. El polvo obtenido a partir de cada hoja fue homogeneizado en 6 ml de agua destilada por gramo de tejido. Los tubos fueron agitados vigorosamente con vórtex, incubados 15 min a 60 °C y luego 45 min a temperatura ambiente, agitando con vórtex cada 15 min. El homogeneizado resultante en cada tubo fue centrifugado a 20.000 *g* por 10 min y se recuperó el sobrenadante, el cual fue centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones. Se tomó el sobrenadante y se lo dividió en dos alícuotas de 350  $\mu$ l cada una. Una de las alícuotas fue utilizada para la descarboxilación de los productos de la enzima, por lo que se le agregaron 35  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,5 N para dar el medio ácido necesario. A la alícuota restante, considerada como control negativo, se adicionaron 35  $\mu$ l de NaOH 2 N. Ambas alícuotas fueron incubadas 15 min a 60 °C. A continuación, los tubos fueron centrifugados a temperatura ambiente por 5 min a 20.000 *g* y se recuperaron 250  $\mu$ l de sobrenadante que fueron utilizados para la reacción de Westerfeld (1945). Para esta reacción, se adicionaron 250  $\mu$ l de una solución de creatina (0,5%) y 250  $\mu$ l de  $\alpha$ -naftol (5 %) ambos preparados en NaOH 2,5 N justo antes de ser

utilizados. Los tubos se incubaron a 60 °C por 15 min y una vez que alcanzaron temperatura ambiente se midió absorbancia a 530 nm.

Los datos de absorbancia corregidos por el control negativo fueron utilizados para obtener el porcentaje de actividad en presencia de imazapir respecto al control sin imazapir. Esta relación fue calculada para cada concentración de herbicida y genotipo evaluado y los porcentajes obtenidos se analizaron mediante la construcción de curvas dosis-respuesta.

### Análisis estadístico

El ajuste de curvas dosis-respuesta se realizó de acuerdo al modelo log-logístico de cuatro parámetros (Streibig *et al.*, 1993; Seefeldt *et al.*, 1995). La expresión matemática que relaciona la respuesta ( $y$ ) con la dosis ( $x$ ) es la siguiente:

$$y = c + \frac{d - c}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b}$$

donde:

Parámetro	Significado
$b$	Pendiente de la curva en el punto de inflexión
$c$	Límite inferior: respuesta a altas dosis de herbicida
$d$	Límite superior: respuesta al tratamiento control
$e$	Dosis de herbicida que reduce la variable respuesta al 50%

En el caso en que el parámetro  $c$  no difiriera significativamente de cero, los datos se analizaron nuevamente, ajustando simultáneamente todas las curvas al modelo logístico de tres parámetros, que describe una curva sigmoidea simétrica respecto de su punto de inflexión, con límite inferior igual a cero y donde  $b$ ,  $d$  y  $e$  equivalen al modelo de cuatro parámetros. El parámetro  $e$  adopta el nombre de  $I_{50}$  para actividad enzimática y  $GR_{50}$  para variables que evalúan crecimiento de las plantas.

Para el ajuste de curvas y la estimación de parámetros se utilizó el paquete *drc* (del inglés *dose-response curve*) desarrollado por Ritz y Streibig (2005) dentro del programa estadístico R (R Development Core Team, 2011). Para determinar si el modelo describía adecuadamente la variación de los datos, se llevó a cabo la prueba F de falta de ajuste (*lack of fit*) que compara el modelo de regresión no lineal utilizado con uno que toma a cada dosis como un tratamiento independiente. Un valor de probabilidad asociado a F no significativo ( $p > 0,01$ ) significa que el modelo de regresión no lineal provee una descripción aceptable de los datos (Ritz y Streibig, 2005). Con el objeto de analizar las diferencias entre las curvas

obtenidas para cada uno de genotipos en estudio, se realizaron tests de similitud de parámetros utilizando la función *compParm* del paquete estadístico *drc* (Ritz y Streibig, 2005).

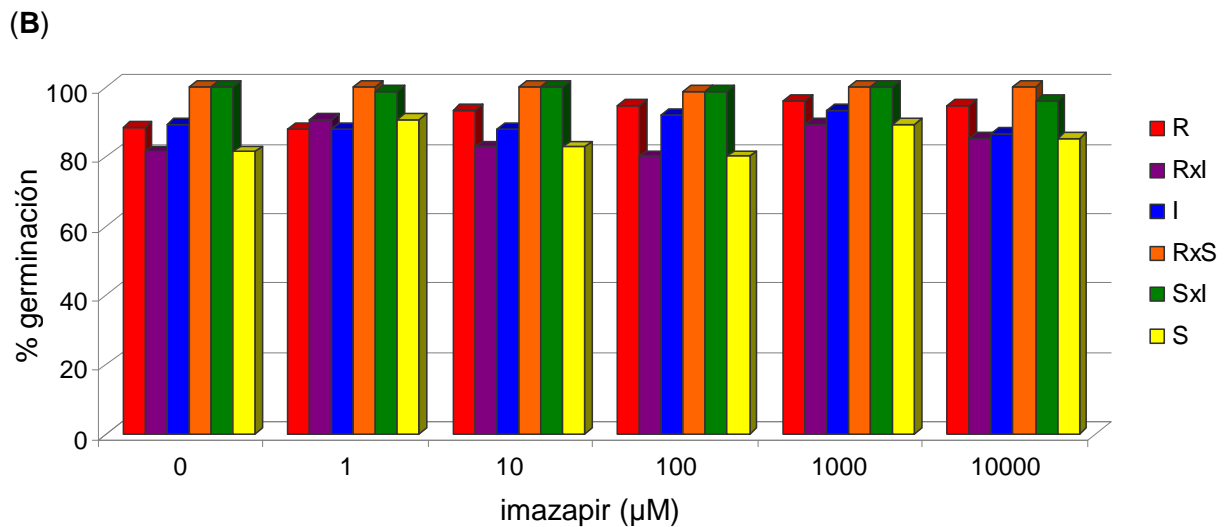
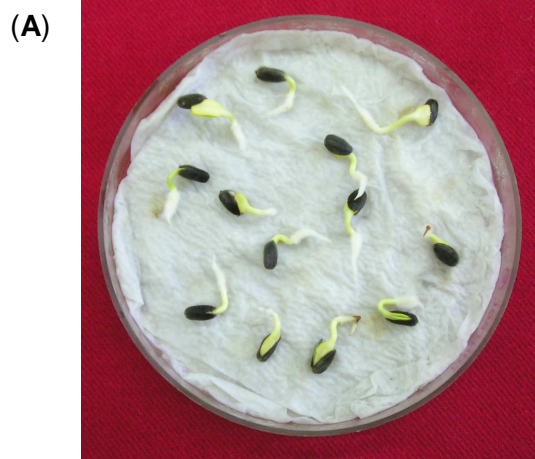
Para los ensayos en los que el análisis de regresión no lineal no describía adecuadamente los datos, los análisis se realizaron a través de ANOVA (Análisis de la Variancia). Se efectuaron pruebas de normalidad y homogeneidad de variancias para todas las variables. Para analizar la normalidad se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk para las variables y los residuales del modelo de ANOVA. La homogeneidad de variancias se evaluó a través de la prueba de Bartlett y de los gráficos de valores residuales versus valores estimados o predichos. En caso de no cumplir con alguno de los supuestos del ANOVA, las variables fueron transformadas por la función logarítmica o raíz cuadrada. Los valores medios de las variables evaluadas para cada genotipo fueron comparados utilizando la prueba de comparación múltiple de Tukey (Sokal y Rolhf, 1969). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa estadístico R (R Development Core Team, 2011).

## RESULTADOS

### Ensayo de germinación en placa

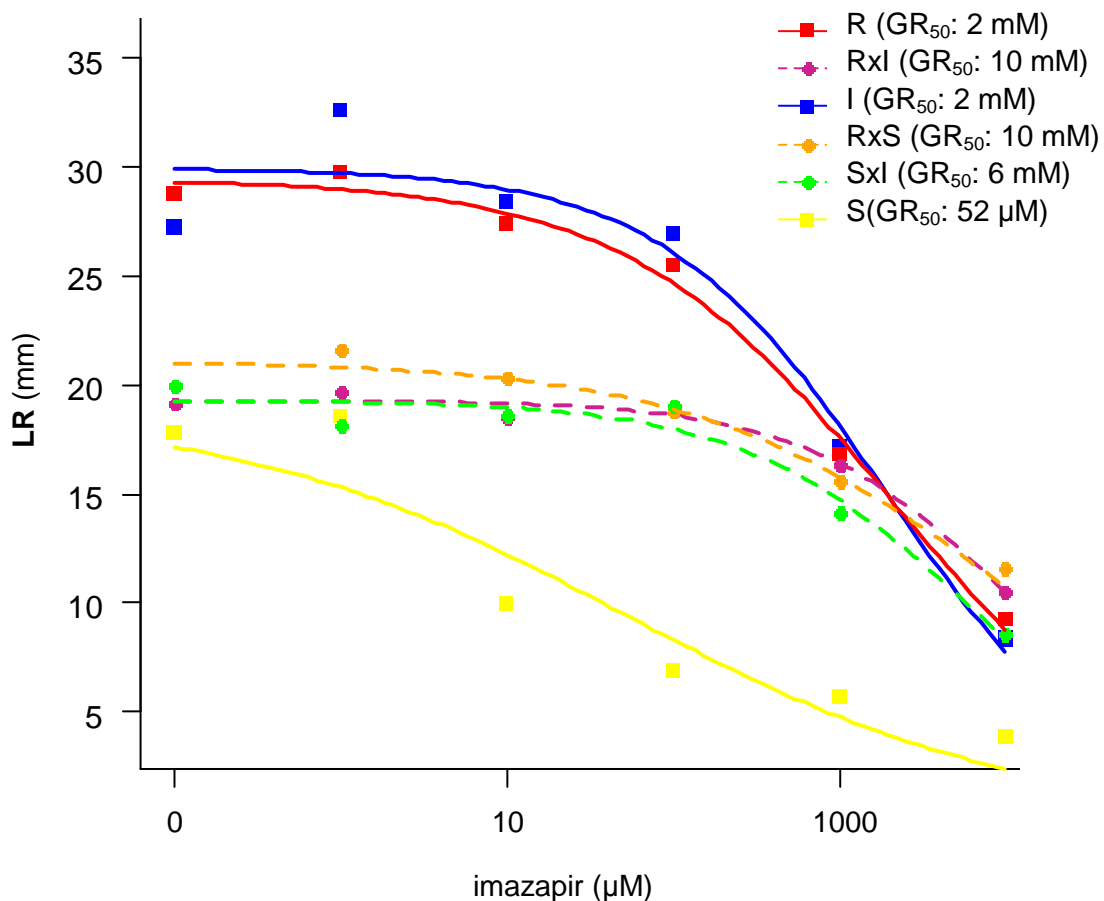
Para cada uno de los genotipos evaluados no se encontraron diferencias significativas en la germinación de tratamiento control y las diferentes concentraciones de imazapir ( $p > 0,05$ ), lo cual indica que la presencia del herbicida no afectó la germinación de los achenios (Figura 1.3).

**Figura 1.3.** (A) Achenios germinados en el ensayo en placa durante cuatro días de incubación en oscuridad. (B) Efecto del herbicida imazapir sobre el porcentaje de germinación de achenios de tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI).

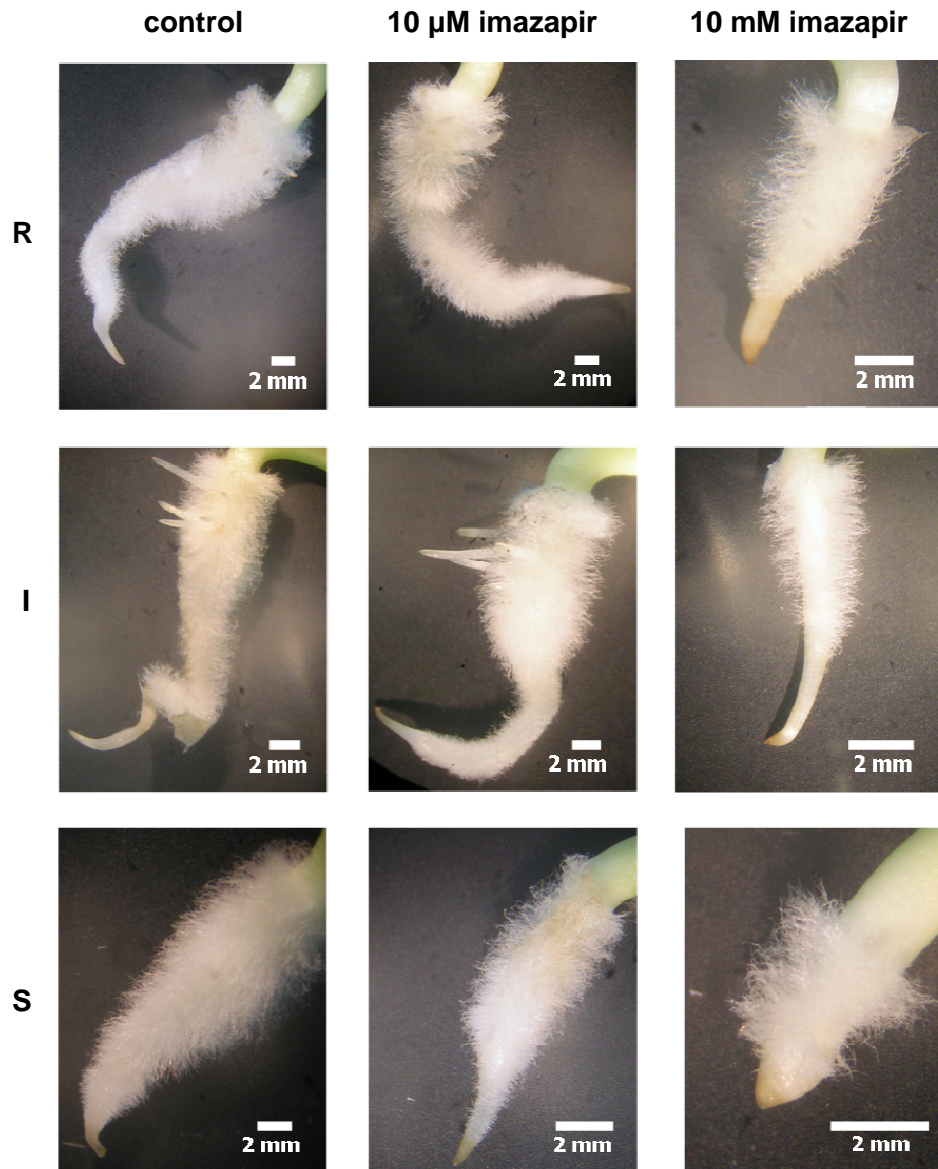


Los valores medios de longitud de radícula y la curva estimada de regresión no lineal para cada genotipo se muestran en la Figura 1.4. El modelo log-logístico de tres parámetros permitió describir los datos adecuadamente (prueba F de falta de ajuste  $p > 0,05$ ). Para todos los genotipos evaluados se observó una reducción de crecimiento radicular al aumentar la concentración de imazapir. Se encontraron diferencias significativas entre el valor de  $GR_{50}$  de la línea susceptible y los demás genotipos ( $p < 0,05$ ). Para concentraciones de imazapir de 10-100  $\mu\text{M}$ , los aquenios susceptibles presentaron una longitud de radícula menor a 1 cm mientras que el resto de los genotipos alargaron a casi 2 cm o más. A su vez, pudo observarse una disminución en la presencia de pelos radicales por acción del herbicida (Figura 1.5).

**Figura 1.4.** Curvas dosis-respuestas obtenidas por regresión log-logística (modelo de tres parámetros) para la longitud de radícula (LR) evaluada sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). La curva estimada para cada genotipo se muestra junto con los valores medios de LR en función de la concentración del herbicida imazapir.  $GR_{50}$ : concentración de herbicida que reduce la variable respuesta en un 50%.



**Figura 1.5.** Detalle del crecimiento radicular de aquenios germinados en diferentes concentraciones de imazapir (0 –control–, 10  $\mu$ M y 10 mM) para las tres líneas de girasol evaluadas: (R) HA425 de genotipo resistente, (I) 1058-1 de genotipo intermedio y (S) HA89 de genotipo susceptible.



### Ensayo de germinación en multimacetas de 8 días

Las plántulas de la línea susceptible obtenidas en presencia de imazapir se vieron considerablemente afectadas tanto en su desarrollo aéreo como radical. Se observaron raíces principales no elongadas (< 1cm) y necrosadas en su extremo y ausencia de raíces secundarias. Para la línea de genotipo intermedio y todos los cruzamientos se observó una disminución en el crecimiento aéreo y radical. Por el contrario, la línea resistente no se vio afectada por acción del herbicida aún en la mayor concentración evaluada (Figura 1.6).

No fue posible realizar el análisis de regresión no lineal dado que el modelo log-logístico no describía a los datos de manera adecuada (pruebas F de falta de ajuste  $p < 0,05$ ). Por lo tanto, se llevaron a cabo pruebas de ANOVA y de comparación de medias.

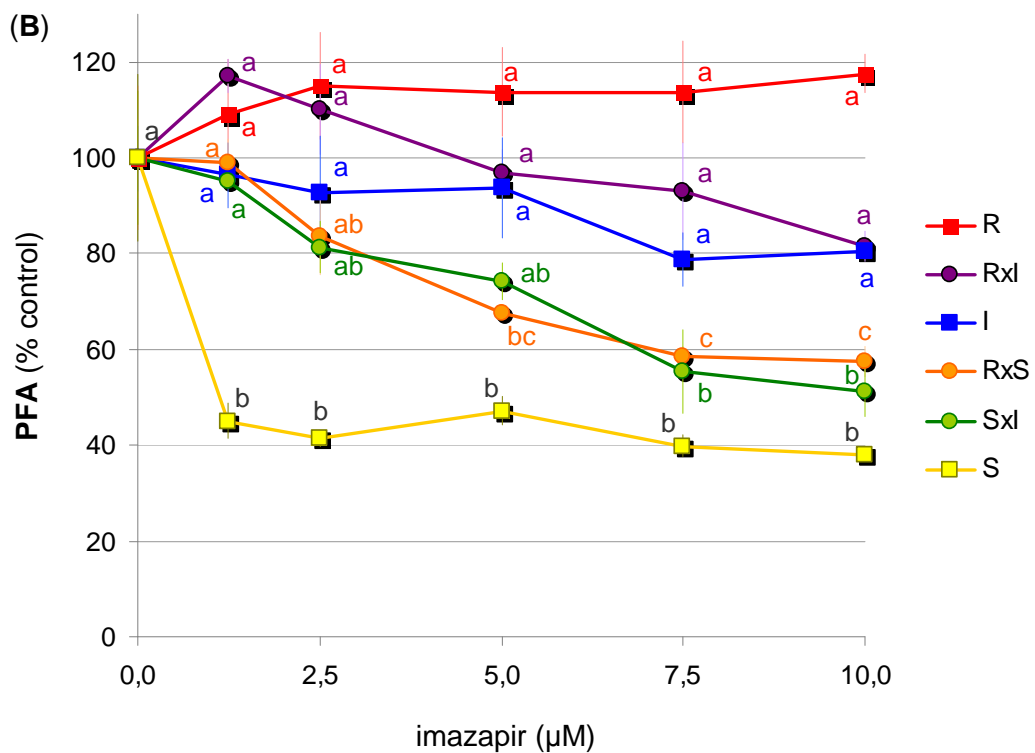
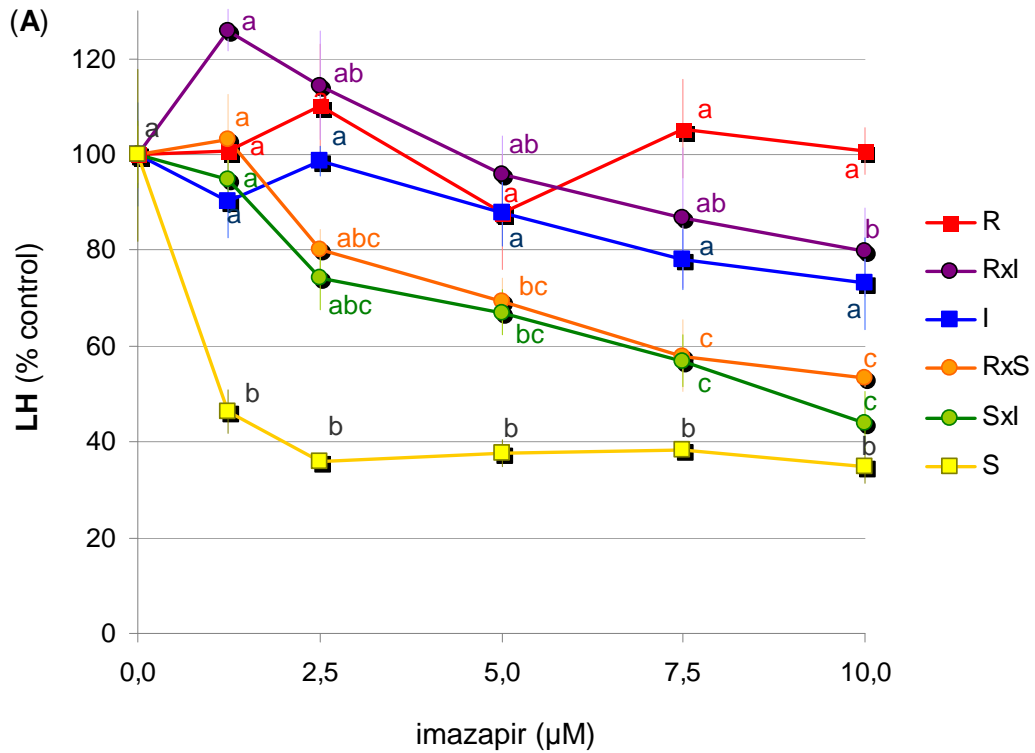
En cuanto al crecimiento aéreo, para la línea susceptible y los cruzamientos de genotipo intermedio se encontraron diferencias significativas entre el control y tratamiento con herbicida para todas las variables, excepto para peso seco aéreo que no mostró diferencias significativas para ninguno de los genotipos evaluados (Figura 1.7). Las plántulas de la línea resistente presentaron una longitud de hipocótilo mayor a 6 cm para la mayor concentración de imazapir (10  $\mu\text{M}$ ), mientras que el resto de los genotipos mostraron valores de 4 cm o menos. La menor concentración de herbicida evaluada permitió la discriminación de plántulas susceptibles, las mismas presentaron hipocótilos menores a 2 cm mientras que el resto de los genotipos alargaron a más de 3,5 cm.

Los variables de crecimiento radicular como porcentaje respecto al control se muestran en la Figura 1.8. La línea resistente no se vio afectada significativamente por la acción del herbicida, excepto para la variable longitud de raíz lateral más larga (Figura 1.8C) en la concentración 10  $\mu\text{M}$  de imazapir. Las plántulas del híbrido resistente disminuyeron significativamente su crecimiento radical para concentraciones de herbicida mayores a 5  $\mu\text{M}$  respecto a su control. La línea intermedia fue significativamente afectada por el herbicida a partir de 1,25 o 5  $\mu\text{M}$  de imazapir. Para los cruzamientos de genotipo intermedio y la línea susceptible se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos de herbicida para todas las variables de crecimiento radical evaluadas (Figura 1.8).

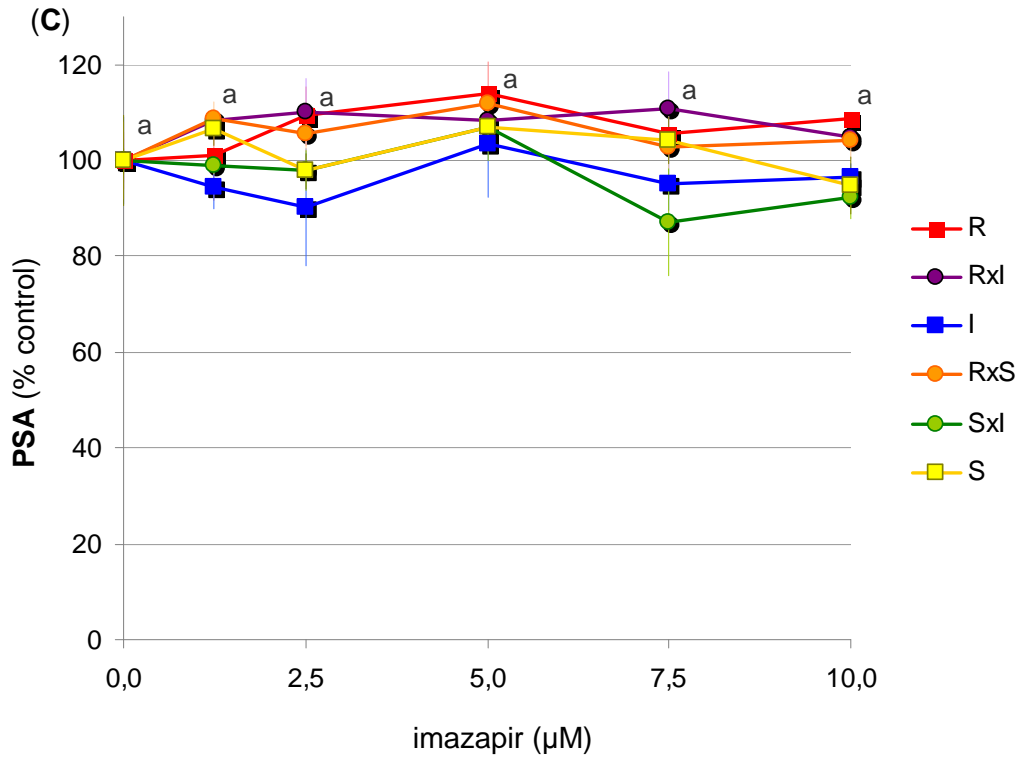
**Figura 1.6.** Plántulas de 8 días obtenidas por germinación en multimacetas. En cada foto, tratamiento control a la izquierda y tratamiento con imazapir 10  $\mu$ M a la derecha para los seis genotipos estudiados: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S) y los tres cruzamientos entre ellas (Rxl, RxS, Sxl). En cada foto la barra de escala corresponde a 1 cm.



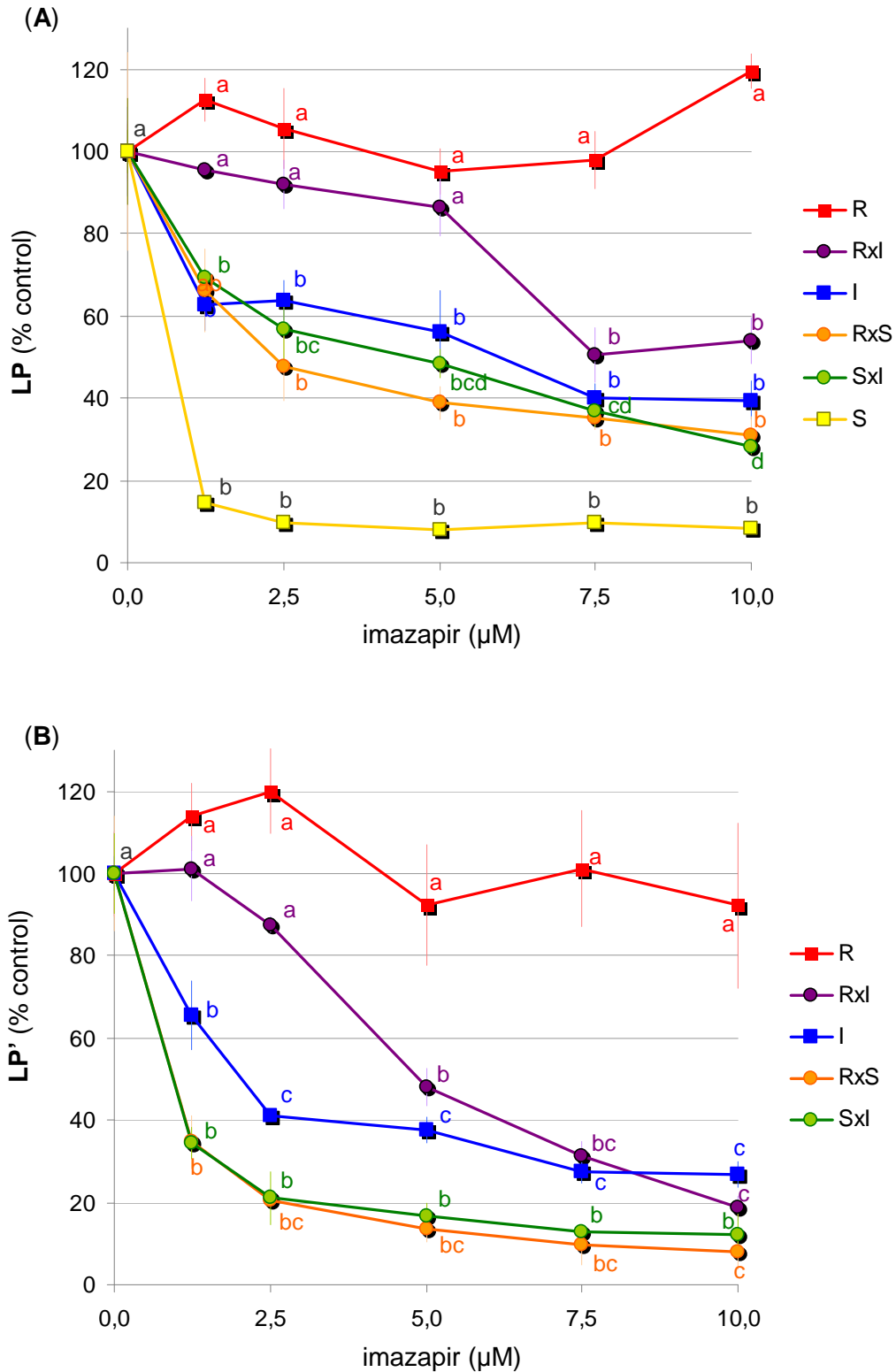
**Figura 1.7.** Efecto del herbicida imazapir sobre variables de crecimiento aéreo en plántulas de 8 días: **(A)** longitud de hipocótilo (LH) y **(B)** peso fresco aéreo (PFA) expresadas como porcentaje respecto al control y evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Los valores medios con la misma letra no difieren significativamente a nivel de  $p < 0,05$ .



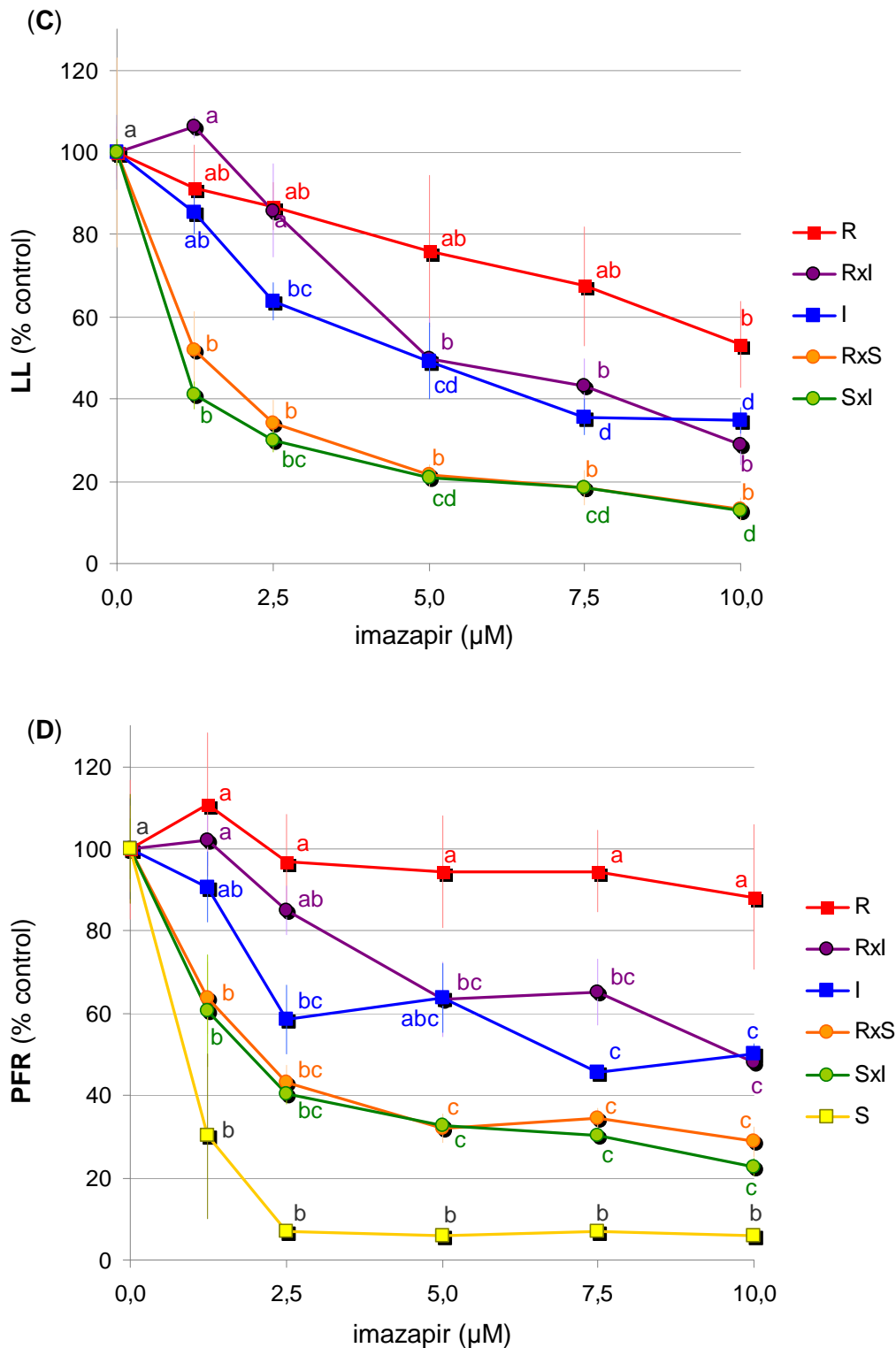
**Figura 1.7** (continuación) **(C)** Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 8 días sobre la variable peso seco aéreo (PSA) expresadas como porcentaje respecto al control y evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Los valores medios con la misma letra no difieren significativamente a nivel de  $p < 0,05$ .



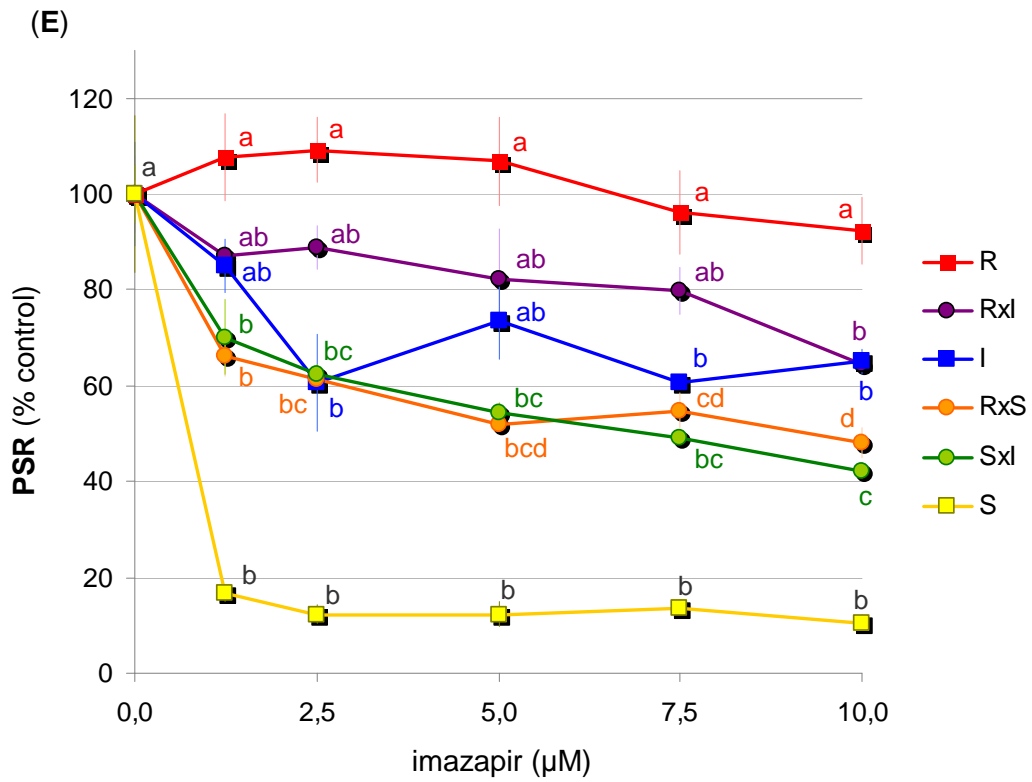
**Figura 1.8.** Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 8 días sobre variables de crecimiento radical: **(A)** longitud de raíz principal (LP) y **(B)** longitud de la raíz principal que presenta raíces secundarias mayores a 5 mm (LP'), expresadas como porcentaje respecto al control y evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Los valores medios con la misma letra no difieren significativamente a nivel de  $p < 0,05$ .



**Figura 1.8** (continuación). Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 8 días sobre variables de crecimiento radical: **(C)** longitud de la raíz secundaria más larga (LL) y **(D)** peso fresco de biomasa radical (PFR), expresadas como porcentaje respecto al control y evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Los valores medios con la misma letra no difieren significativamente a nivel de  $p < 0,05$ . Los valores de PFR para RxI fueron transformados por raíz cuadrada: los valores medios se muestran en base a los datos sin transformar y las letras se refieren a las medias de los valores transformados.



**Figura 1.8** (continuación). Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 8 días sobre la variable **(E)** peso seco de biomasa radical (PSR) expresada como porcentaje respecto al control y evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Los valores medios con la misma letra no difieren significativamente a nivel de  $p < 0,05$ .



Las principales diferencias entre los genotipos pudieron observarse a nivel del sistema radical. Para la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de imazapir, las plántulas de la línea resistente presentaron una longitud de raíz principal mayor a 8 cm mientras que el resto de los genotipos alargaron a 5 cm o menos. De manera similar, plántulas de la línea y el cruzamiento resistentes se diferenciaron del resto en presencia de imazapir 5  $\mu\text{M}$  (Figura 1.8A). La longitud de raíz lateral más larga permitió discriminar plántulas de la línea resistente, las mismas presentaron raíces laterales mayores a 3 cm mientras que el resto de los genotipos menores a 2 cm para la concentración de 7,5  $\mu\text{M}$  imazapir (Figura 1.8C).

Dado que la disminución en el crecimiento de raíces secundarias por acción del herbicida fue más pronunciada en las regiones más próximas al ápice, se decidió evaluar este efecto mediante la variable de longitud de raíz principal con raíces secundarias mayores a 5 mm ( $LP'$ ) (Figura 1.8B). La concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  imazapir permitió discriminar distintos grados de resistencia: mayor a 4 cm para la línea resistente, 3 cm para el cruzamiento resistente, 1,5 cm para la línea intermedia y menor a 1 cm para el resto de los genotipos. Para la concentración de imazapir 10  $\mu\text{M}$ , esta variable mostró la mayor diferencia entre las plántulas de línea resistente ( $LP' > 3,5$  cm) con el resto de los genotipos ( $LP' < 1$  cm).

### **Ensayo de germinación en multimacetas de 15 días**

Las plantas control obtenidas luego de 15 días de la siembra alcanzaron el estadio V2 (Schneiter y Miller, 1981). Las plantas tratadas por 15 días con herbicida (Figura 1.9) en general se mostraron más afectadas respecto a las tratadas durante 8 días (Figura 1.6). La línea susceptible detuvo su crecimiento en el estadio VE, no desarrolló hojas ni raíces laterales para todas las concentraciones evaluadas. En general, las plantas de la línea resistente disminuyeron su crecimiento con respecto al control para las concentraciones a partir de 5  $\mu\text{M}$ , mientras que el cruzamiento de genotipo resistente se vio afectado a partir de 2,5  $\mu\text{M}$  de imazapir. Las plántulas de la línea intermedia y de los cruzamientos de genotipo intermedio mostraron un pobre desarrollo aéreo y radicular en presencia del herbicida (Figura 1.9).

**Figura 1.9.** Plántulas de 15 días obtenidas por germinación en multimacetas. En cada foto, tratamiento control a la izquierda y tratamiento con imazapir 10  $\mu$ M a la derecha para los seis genotipos estudiados: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S) y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS, SxI). En cada foto la barra de escala corresponde a 1 cm.



Los datos obtenidos en este ensayo pudieron ser ajustados por regresión no lineal a curvas dosis-respuesta del tipo log-logístico (Figura 1.10 y 1.11). A partir de los resultados de las pruebas F de falta de ajuste (*lack-of-fit*), pudo corroborarse que el modelo de tres parámetros describía a los datos de manera adecuada ( $p > 0,05$ ). Para cada una de las variables evaluadas no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los genotipos para los valores del parámetro *b* (pendiente de la curva en el punto de inflexión).

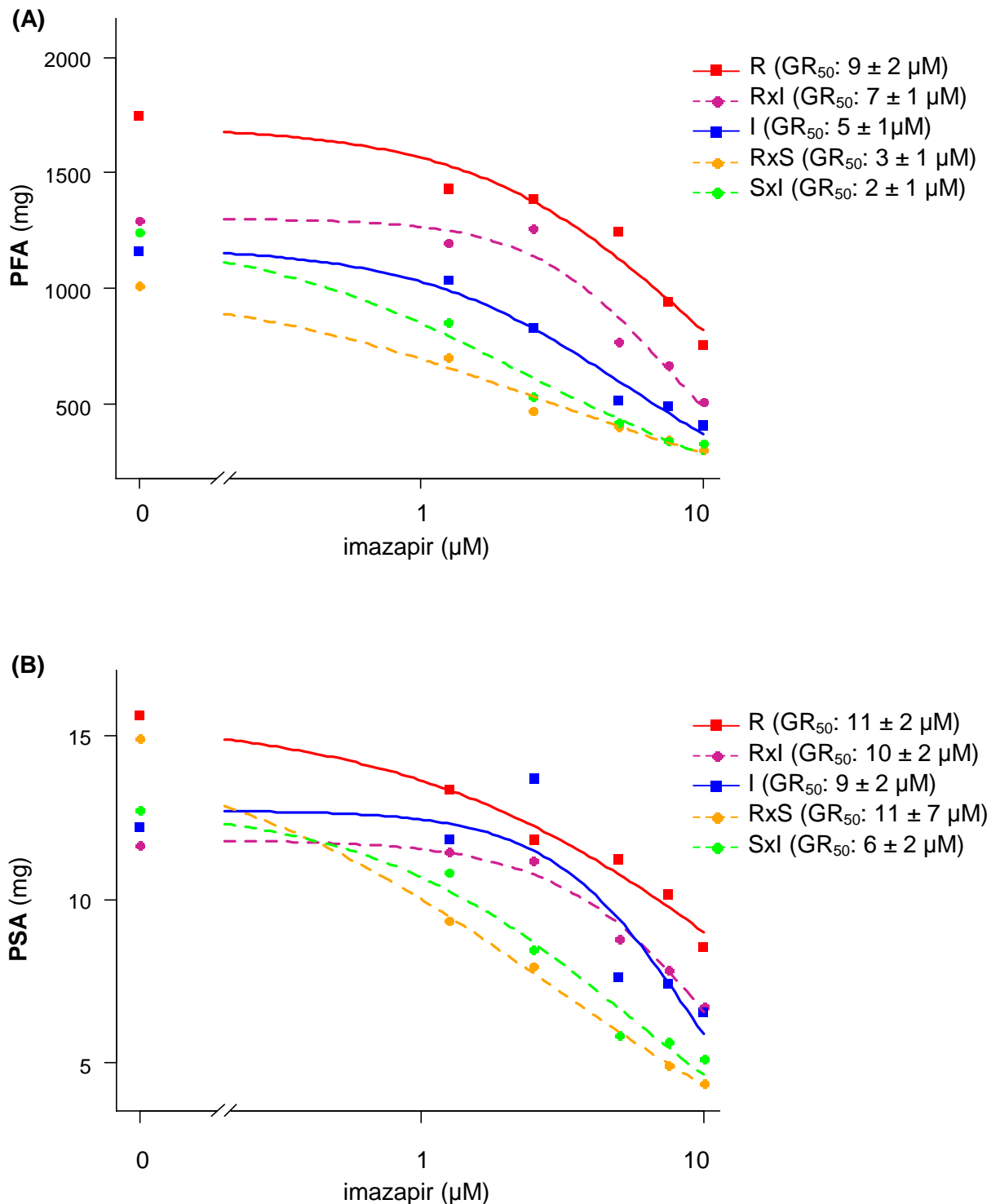
Las curvas dosis-respuesta y los valores estimados de GR<sub>50</sub> para las variables de crecimiento aéreo se muestran en la Figura 1.10. En general, los genotipos intermedios (I, RxS, SxI) presentaron valores de GR<sub>50</sub> menores a 5 µM de imazapir mientras que los resistentes superaron los 10 µM. Para el área foliar se encontraron valores menores de GR<sub>50</sub>, indicando que la expansión del primer par de hojas verdaderas es el parámetro de crecimiento aéreo más sensible.

La inhibición del crecimiento del primer par de hojas por acción del herbicida permitió discriminar entre genotipos con distintos grados de resistencia. Se encontraron diferencias significativas para los valores de GR<sub>50</sub> que difieren en el locus *Imr1* que controla la resistencia. También se observaron diferencias entre genotipos que sólo difieren a nivel del segundo locus *Imr2*. Sin embargo, no fue posible distinguir entre la línea resistente (*Imr1Imr1Imr2Imr2*) y el cruzamiento resistente (*Imr1Imr1Imr2imr2*) (Tabla I.II).

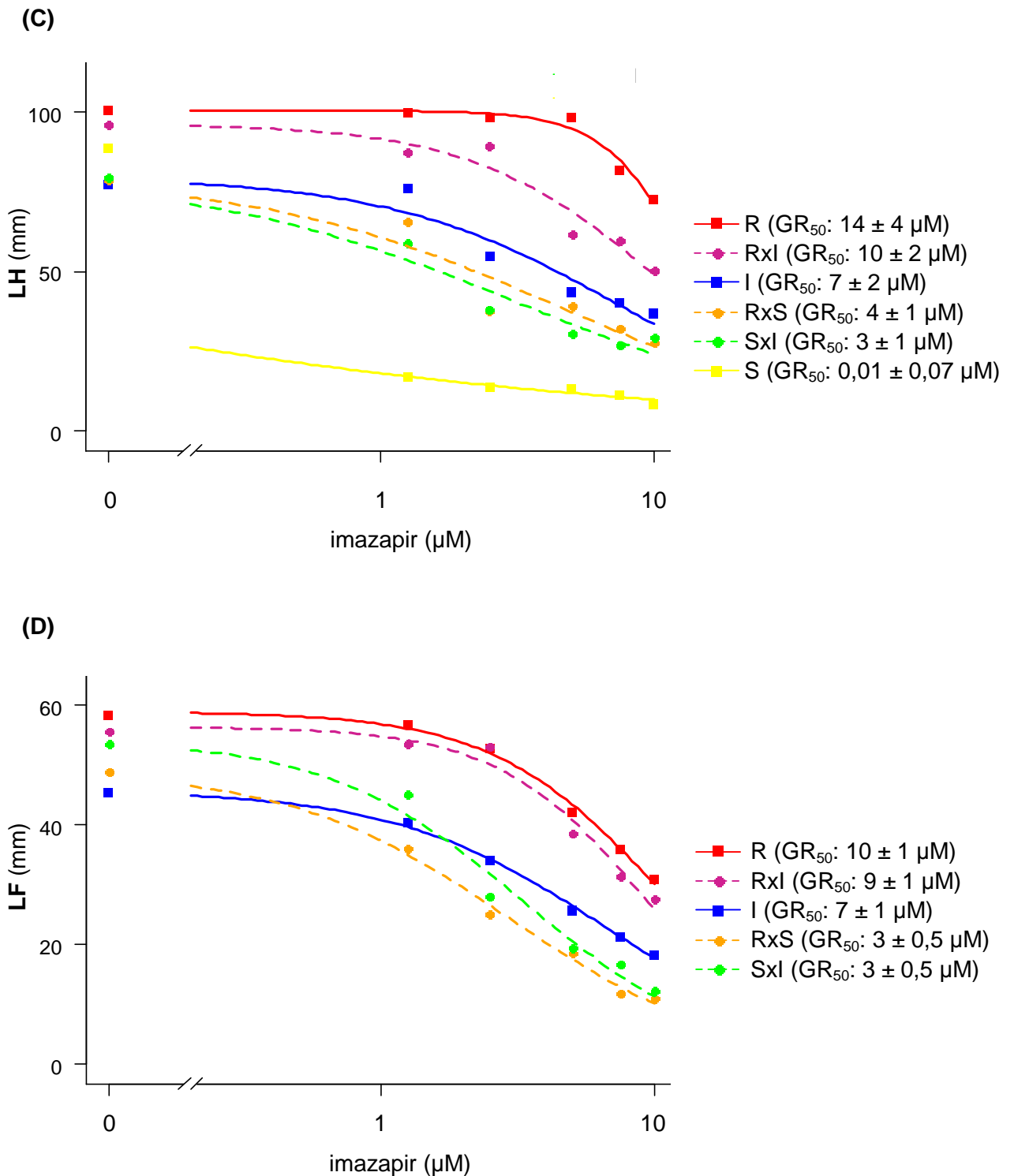
Los valores de GR<sub>50</sub> para las variables de crecimiento de raíces (Figura 1.11) fueron similares a los de crecimiento aéreo (Figura 1.10). Al igual que en el ensayo de 8 días, el sistema radical se vio afectado principalmente en cuanto al desarrollo y crecimiento de raíces secundarias. La variable longitud de raíz lateral más larga mostró los menores valores de GR<sub>50</sub> (Figura 1.11).

De la comparación de los valores estimados de GR<sub>50</sub> para las variables de crecimiento radical se desprende que aquellos genotipos que difieren a nivel del primer locus involucrado en la resistencia a imidazolinonas (*Imr1*) presentaron diferencias significativas, independientemente de la constitución genética del segundo locus (*Imr2*). También se encontraron diferencias significativas entre genotipos que difieren para los dos loci y para aquellos que difieren a nivel del segundo locus pero con la misma constitución genética a nivel del primero. La variable LP' resultó la más informativa dado que permitió la distinción entre un mayor número de genotipos (Tabla I.III).

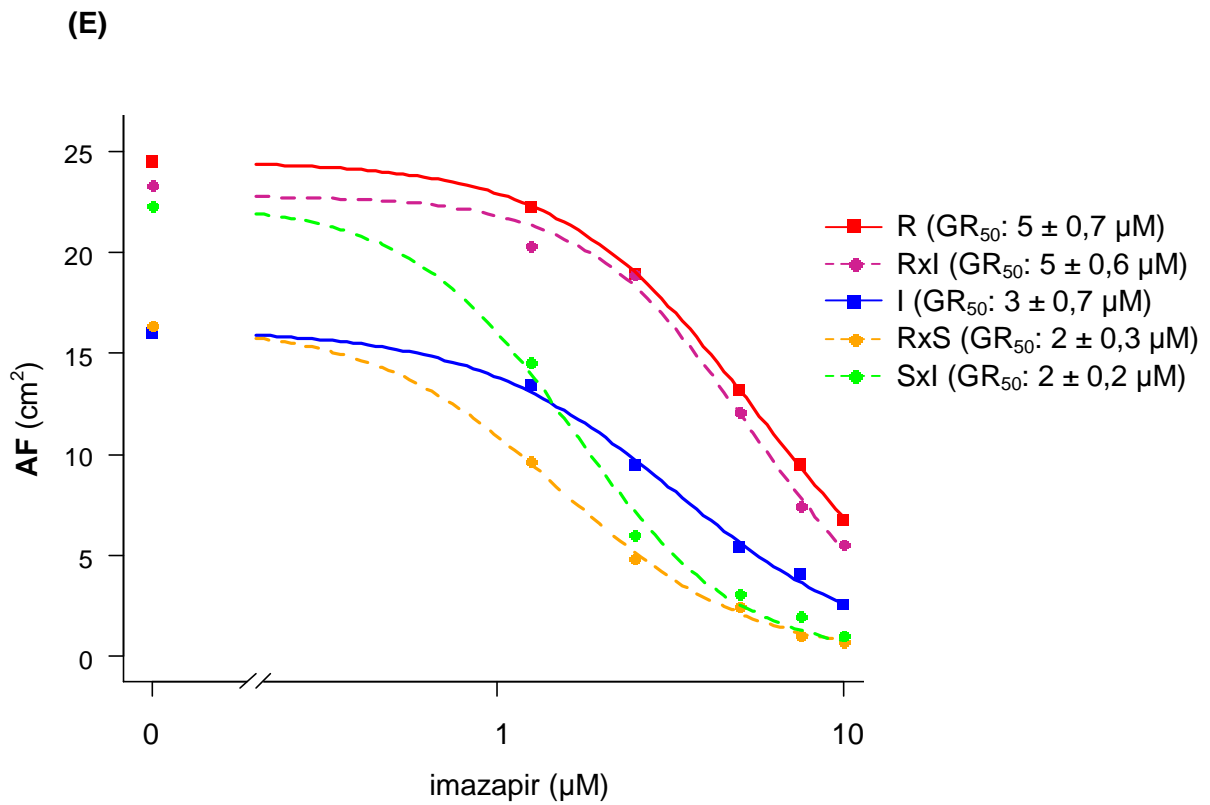
**Figura 1.10.** Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 15 días sobre variables de crecimiento aéreo: **(A)** peso fresco (PFA) y **(B)** peso seco de biomasa aérea (PSA) evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Las curvas estimadas se muestran con los valores promedio para cada concentración de imazapir y los valores estimados de  $GR_{50}$  (concentración de herbicida que reduce la respuesta en un 50%) para cada genotipo. La línea susceptible no presentó hojas en presencia del herbicida por lo que no fue considerada en el análisis de estas variables.



**Figura 1.10** (continuación). Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 15 días sobre variables de crecimiento aéreo: **(C)** longitud de hipocótilo (LH) y **(D)** longitud de hoja (LF) evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Las curvas estimadas se muestran con los valores promedio para cada concentración de imazapir y los valores estimados de  $GR_{50}$  (concentración de herbicida que reduce la respuesta en un 50%) para cada genotipo. La línea susceptible no presentó hojas en presencia del herbicida por lo que no fue considerada en el análisis excepto para la variable LH.



**Figura 1.10** (continuación). Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 15 días sobre la variable de crecimiento aéreo área foliar (**E**) evaluada sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Las curvas estimadas se muestran con los valores promedio para cada concentración de imazapir y los valores estimados de  $GR_{50}$  (concentración de herbicida que reduce la respuesta en un 50%) para cada genotipo. La línea susceptible no presentó hojas en presencia del herbicida por lo que no fue considerada en el análisis.



**Tabla I.II.** Valores de probabilidad asociados a la comparación del parámetro GR<sub>50</sub> (concentración de herbicida que reduce la respuesta en un 50%) de las curvas estimadas para las variables de crecimiento aéreo en plántulas de 15 días: longitud de hipocótilo (LH), longitud de hoja (LF), área foliar (AF) peso fresco (PFA) y seco de biomasa aérea (PSA) en función de la concentración del herbicida imazapir. Las curvas fueron estimadas por medio del modelo log-logístico de tres parámetros para las tres líneas endocriadas bajo estudio: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S) y los cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). La línea susceptible no desarrolló hojas en presencia del herbicida por lo que sólo fue considerada en la variable LH. **(A)** Comparación entre genotipos que difieren para el primer *locus lmr1* **(B)** Comparación entre genotipos que difieren para el *locus lmr2* **(C)** Comparación entre genotipos que difieren para los dos *loci* involucrados en la resistencia a imidazolinonas.

(A)

Comparación n	<i>locus lmr1</i>	<i>locus lmr2</i>	LH	LF	AF	PFA	PSA
RxI – RxS	<i>lmr1lmr1</i> vs <i>lmr1imr1</i>	<i>lmr2imr2</i>	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,05	ns
I – SxI	<i>lmr1lmr1</i> vs <i>lmr1imr1</i>	<i>imr2imr2</i>	ns	p<0,01	p<0,05	ns	ns
I-S	<i>lmr1lmr1</i> vs <i>imr1imr1</i>	<i>imr2imr2</i>	p<0,01	--	--	--	--

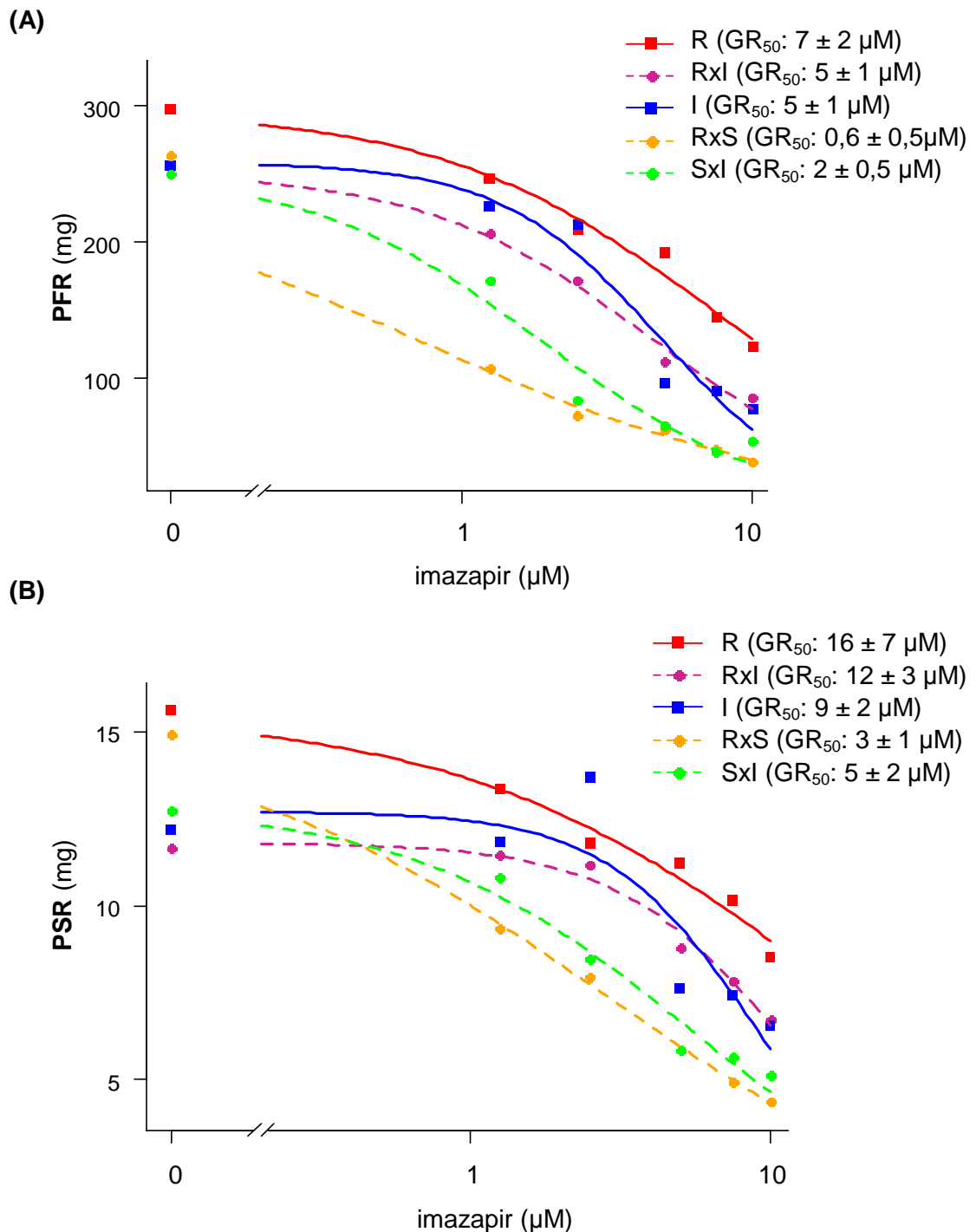
(B)

Comparación n	<i>locus lmr1</i>	<i>locus lmr2</i>	LH	LF	AF	PFA	PSA
R – RxI	<i>lmr1lmr1</i>	<i>lmr2lmr2</i> vs <i>lmr2imr2</i>	ns	ns	ns	ns	ns
RxI – I	<i>lmr1lmr1</i>	<i>lmr2imr2</i> vs <i>imr2imr2</i>	ns	ns	p<0,05	ns	ns
R – I	<i>lmr1lmr1</i>	<i>lmr2lmr2</i> vs <i>imr2imr2</i>	ns	p<0,05	p<0,05	ns	ns
RxS – SxI	<i>lmr1imr1</i>	<i>lmr2imr2</i> vs <i>imr2imr2</i>	ns	ns	ns	ns	ns

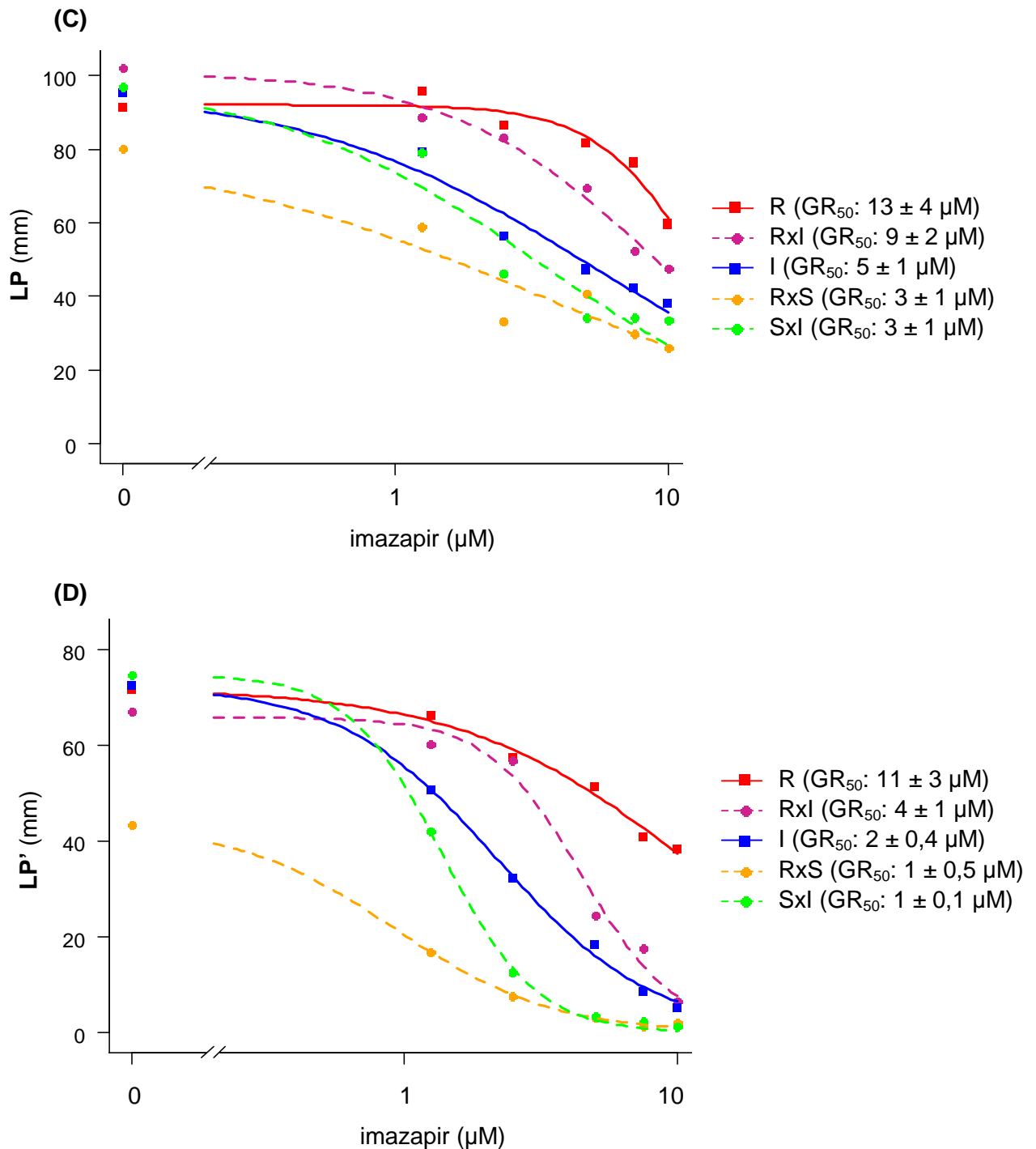
(C)

Comparación	Genotipos	LH	LF	AF	PFA	PSA
R – S	<i>lmr1lmr1lmr2lmr2</i> vs <i>imr1imr1imr2imr2</i>	p<0,01	--	--	--	--
RxI – SxI	<i>lmr1lmr1lmr2imr2</i> vs <i>lmr1imr1imr2imr2</i>	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	ns
R – RxS	<i>lmr1lmr1lmr2lmr2</i> vs <i>lmr1imr1lmr2imr2</i>	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,05	ns
R – SxI	<i>lmr1lmr1lmr2lmr2</i> vs <i>lmr1imr1imr2imr2</i>	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05	ns
I – RxS	<i>lmr1lmr1imr2imr2</i> vs <i>lmr1imr1lmr2imr2</i>	ns	p<0,01	p<0,05	ns	ns
RxI – S	<i>lmr1lmr1lmr2imr2</i> vs <i>imr1imr1imr2imr2</i>	p<0,01	--	--	--	--
RxS – S	<i>lmr1imr1lmr2imr2</i> vs <i>imr1imr1imr2imr2</i>	p<0,01	--	--	--	--
SxI – S	<i>lmr1imr1imr2imr2</i> vs <i>imr1imr1imr2imr2</i>	p<0,01	--	--	--	--

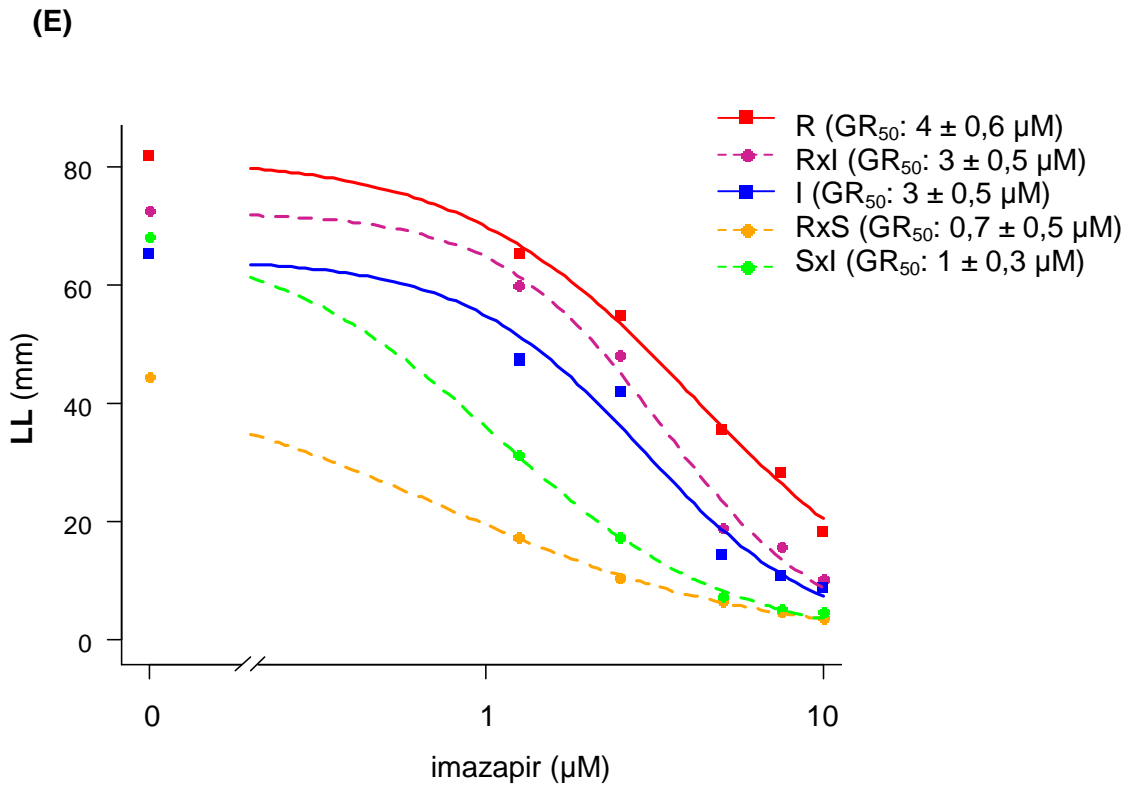
**Figura 1.11.** Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 15 días sobre variables de crecimiento radical: **(A)** peso fresco (PFR) y **(B)** peso seco de biomasa radical (PSR) evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Las curvas estimadas se muestran con los valores promedio para cada concentración de imazapir y los valores estimados de  $GR_{50}$  (concentración de herbicida que reduce la respuesta en un 50%) para cada genotipo. La línea susceptible no desarrolló sistema radicular en presencia del herbicida por lo que no fue considerada en el análisis.



**Figura 1.11** (continuación). Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 15 días sobre variables de crecimiento radical: **(C)** longitud de raíz principal (LP) y **(D)** longitud de la raíz principal que presenta raíces secundarias mayores a 5 mm (LP') evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Las curvas estimadas se muestran con los valores promedio para cada concentración de imazapir y los valores estimados de GR<sub>50</sub> (concentración de herbicida que reduce la respuesta en un 50%) para cada genotipo. La línea susceptible no desarrolló sistema radicular en presencia del herbicida por lo que no fue considerada en el análisis.



**Figura 1.11** (continuación). Efecto del herbicida imazapir en plántulas de 15 días sobre la variable de crecimiento radical **(E)** longitud de la raíz secundaria más larga (LL) evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Las curvas estimadas se muestran con los valores promedio para cada concentración de imazapir y los valores estimados de  $GR_{50}$  (concentración de herbicida que reduce la respuesta en un 50%) para cada genotipo. La línea susceptible no desarrolló sistema radicular en presencia del herbicida por lo que no fue considerada en el análisis.



**Tabla I.III.** Valores de probabilidad asociados a la comparación del parámetro GR<sub>50</sub> (valor de la variable independiente que reduce la respuesta en un 50%) de las curvas de variables de crecimiento radical en plántulas de 15 días: longitud de raíz principal (LP), longitud de la raíz principal que presenta raíces secundarias mayores a 5 mm (LP'), longitud de la raíz secundaria más larga (LRL), peso fresco (PFR) y peso seco de biomasa radical (PSR) en función de la concentración del herbicida imazapir. Las curvas fueron estimadas por medio del modelo log-logístico de tres parámetros para las tres líneas endocriadas bajo estudio: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S) y los cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). La línea susceptible no desarrolló sistema radicular en presencia del herbicida por lo que no fue considerada. **(A)** Comparación entre genotipos que difieren para el primer *locus lmr1*. **(B)** Comparación entre genotipos que difieren para el *locus lmr2*. **(C)** Comparación entre genotipos que difieren para los dos *loci* involucrados en la resistencia a imidazolinonas.

(A)

Comparación	<i>locus lmr1</i>	<i>locus lmr2</i>	LP	LP'	LRL	PFR	PSR
RxI – RxS	<i>lmr1lmr1 vs lmr1imr1</i>	<i>lmr2imr2</i>	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
I – SxI	<i>lmr1lmr1 vs lmr1imr1</i>	<i>imr2imr2</i>	ns	ns	p<0,01	p<0,01	ns

(B)

Comparación	<i>locus lmr1</i>	<i>locus lmr2</i>	LP	LP'	LRL	PFR	PSR
R – RxI	<i>lmr1lmr1</i>	<i>lmr2lmr2 vs lmr2imr2</i>	ns	p<0,05	ns	ns	ns
RxI – I	<i>lmr1lmr1</i>	<i>lmr2imr2 vs imr2imr2</i>	ns	p<0,01	ns	ns	ns
R – I	<i>lmr1lmr1</i>	<i>lmr2lmr2 vs imr2imr2</i>	ns	p<0,01	ns	ns	ns
RxS – SxI	<i>lmr1imr1</i>	<i>lmr2imr2 vs imr2imr2</i>	ns	ns	ns	ns	ns

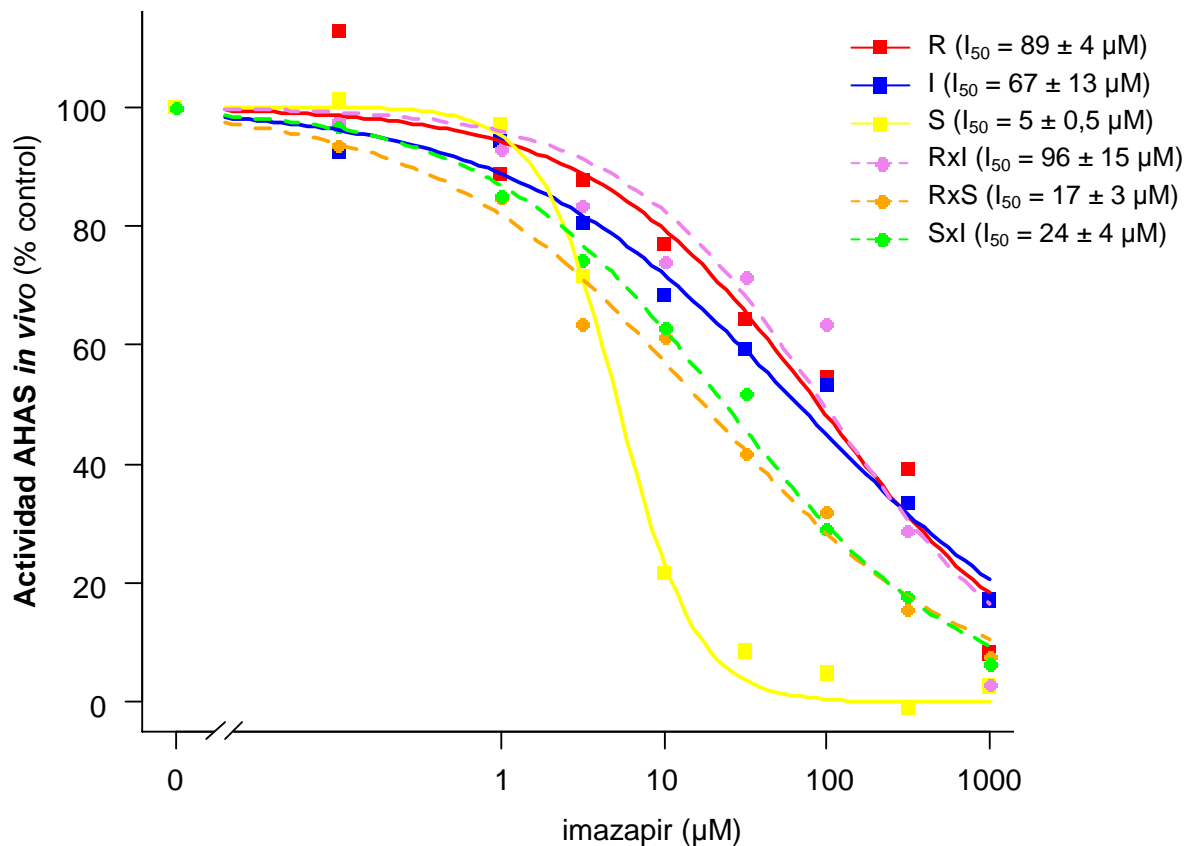
(C)

Comparación	Genotipos	LP	LP'	LRL	PFR	PSR
RxI – SxI	<i>lmr1lmr1lmr2imr2 vs lmr1imr1imr2imr2</i>	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,05	ns
R – RxS	<i>lmr1lmr1lmr2lmr2 vs lmr1imr1lmr2imr2</i>	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	ns
R – SxI	<i>lmr1lmr1lmr2lmr2 vs lmr1imr1imr2imr2</i>	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	ns
I – RxS	<i>lmr1lmr1imr2imr2 vs lmr1imr1lmr2imr2</i>	ns	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01

### Actividad enzimática AHAS *in vivo*

Los valores de actividad enzimática, expresados como porcentaje respecto al control sin herbicida, pudieron ser ajustados por regresión no lineal a curvas dosis-respuesta del tipo log-logístico con un valor fijo de 100% para el límite superior (Figura 1.12). A partir de los resultados de las pruebas F de falta de ajuste (*lack-of-fit*), pudo corroborarse que este modelo de tres parámetros describía a los datos de manera adecuada ( $p > 0,05$ ).

**Figura 1.12.** Efecto del herbicida imazapir sobre la actividad AHAS *in vivo* evaluadas sobre tres líneas de girasol: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S); y los tres cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). Las curvas estimadas se muestran con los valores promedio para cada concentración de imazapir y los valores estimados de  $I_{50}$  (concentración de herbicida que inhibe la actividad enzimática en un 50%) para cada genotipo.



La comparación del parámetro  $I_{50}$  de las curvas estimadas para las líneas permitió encontrar diferencias significativas entre la línea de genotipo susceptible y las líneas restantes. Las líneas de genotipo resistente e intermedio no pudieron ser discriminadas entre sí mediante esta comparación. Con respecto a los cruzamientos, se encontraron diferencias significativas entre el genotipo RxI y los genotipos RxS y SxI. En general, pudo observarse que aquellos genotipos que difieren a nivel del primer *locus* involucrado en la resistencia a imidazolinonas (*Imr1*) presentaron diferencias significativas a nivel del parámetro  $I_{50}$ , independientemente de la constitución genética del segundo *locus* (*Imr2*). Para los genotipos comparados en este experimento que difieren a nivel del segundo *locus* pero con la misma constitución genética a nivel del primero no se observaron diferencias significativas. Con respecto al parámetro  $b$ , se encontraron diferencias significativas en todas aquellas comparaciones que incluyen la línea susceptible y entre el cruzamiento resistente y la línea intermedia (Tabla I.IV).

**Tabla I.IV.** Valores de probabilidad asociados a la comparación de los parámetros  $I_{50}$  (concentración de herbicida que reduce la respuesta en un 50%) y  $b$  (pendiente de la curva en el punto de inflexión) de las curvas de actividad enzimática AHAS *in vivo* en función de la concentración del herbicida imazapir estimadas por medio del modelo log-logístico de tres parámetros para las tres líneas endocriadas HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S) y los cruzamientos entre ellas (RxI, RxS y SxI). **(A)** Comparación entre genotipos que difieren para el primer locus *Imr1*. **(B)** Comparación entre genotipos que difieren para el locus *Imr2*. **(C)** Comparación entre genotipos que difieren para los dos loci involucrados en la resistencia a imidazolinonas.

(A)

Comparación	locus <i>Imr</i> <sub>1</sub>	locus <i>Imr</i> <sub>2</sub>	$I_{50}$	$b$
RxI – RxS	<i>Imr1Imr1</i> vs <i>Imr1imr1</i>	<i>Imr2imr2</i>	p<0,001	ns
I – SxI	<i>Imr1Imr1</i> vs <i>Imr1imr1</i>	<i>imr2imr2</i>	p<0,005	ns
I-S	<i>Imr1Imr1</i> vs <i>imr1imr1</i>	<i>imr2imr2</i>	p<0,001	p<0,001

(B)

Comparación	locus <i>Imr</i> <sub>1</sub>	locus <i>Imr</i> <sub>2</sub>	$I_{50}$	$b$
R – RxI	<i>Imr1Imr1</i>	<i>Imr2Imr2</i> vs <i>Imr2imr2</i>	ns	ns
RxI – I	<i>Imr1Imr1</i>	<i>Imr2imr2</i> vs <i>imr2imr2</i>	ns	p<0,01
R – I	<i>Imr1Imr1</i>	<i>Imr2Imr2</i> vs <i>imr2imr2</i>	ns	ns
RxS – SxI	<i>Imr1imr1</i>	<i>Imr2imr2</i> vs <i>imr2imr2</i>	ns	ns

(C)

Comparación	Genotipos	$I_{50}$	$b$
R – S	<i>Imr1Imr1Imr2Imr2</i> vs <i>imr1imrimr2imr2</i>	p<0,001	p<0,001
RxI – SxI	<i>Imr1Imr1Imr2imr2</i> vs <i>Imr1imr1imr2imr2</i>	p<0,001	ns
R – RxS	<i>Imr1Imr1Imr2Imr2</i> vs <i>Imr1imr1Imr2imr2</i>	p<0,005	ns
R – SxI	<i>Imr1Imr1Imr2Imr2</i> vs <i>Imr1imr1imr2imr2</i>	p<0,001	ns
I – RxS	<i>Imr1Imr1imr2imr2</i> vs <i>Imr1imr1Imr2imr2</i>	p<0,05	ns
RxI – S	<i>Imr1Imr1Imr2imr2</i> vs <i>imr1im1imr2imr2</i>	p<0,001	p<0,005
SxI – S	<i>Imr1imr1imr2imr2</i> vs <i>imr1imr1imr2imr2</i>	p<0,01	p<0,001
RxS – S	<i>Imr1imr1Imr2imr2</i> vs <i>imr1imr1imr2imr2</i>	p<0,001	p<0,001

## DISCUSIÓN

La evaluación de la resistencia a imidazolinonas en estadios tempranos del desarrollo de plántulas permitió distinguir genotipos de girasol cultivado con diferentes grados de resistencia. La exposición al agente selectivo pudo efectuarse a partir de la etapa de germinación. De la comparación de los valores de  $GR_{50}$  en el ensayo de germinación en placa se desprende que la línea susceptible puede discriminarse del resto de los genotipos. De esta manera, a los 4 días desde la siembra se puede seleccionar el material susceptible por observación visual de la elongación de la radícula utilizando la concentración de imazapir 100  $\mu$ M. Los aquenios susceptibles presentaron una longitud de radícula menor a 1 cm mientras que el resto de los genotipos alargaron 2 cm o más. Los aquenios germinados en dichas condiciones pudieron ser transferidos a macetas para continuar su crecimiento y desarrollo.

Los ensayos germinativos son ampliamente utilizados para detectar niveles de resistencia o tolerancia a diferentes herbicidas, ya sea en malezas o cultivos. También para la selección inicial de líneas obtenidas por tratamientos mutagénicos o transgénesis (Sandín España *et al.*, 2011). En el caso de inhibidores de AHAS, los ensayos de germinación han permitido evaluar resistencia en numerosas especies (Cirujeda *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2006; Kuk *et al.*, 2008). Para la maleza *Lolium rigidum* se han implementado con éxito diferentes pruebas en placas utilizando papel de filtro o agar como soporte. La elongación de los coleótilos o de la primera hoja luego de un período de incubación de pocos días permitió distinguir biotipos resistentes y susceptibles (Heap y Knight, 1986; Burnet *et al.*, 1994). Por su parte, ensayos de tolerancia a imazetapir en arroz demostraron que la longitud de la radícula resultó más sensible que la longitud de parte aérea (Kuk *et al.*, 2008). Las técnicas de germinación en placa también se han utilizado con éxito para evaluar residuos de herbicidas en suelo, de esta manera la inhibición de la longitud de la radícula en maíz a las 48 hs desde la siembra permitió detectar la presencia de inhibidores de AHAS (Sunderland *et al.*, 1991).

Los denominados “bioensayos sin suelo” en los que se utilizan macetas con soportes inertes o sistemas hidropónicos permiten detectar distintos grados de resistencia a herbicidas y fueron exitosamente utilizados en la evaluación de la respuesta de diferentes especies vegetales, en la caracterización de germoplasma y en esquemas de selección (Sixto *et al.*, 1995; Jettner *et al.*, 1999; Villaroya *et al.*, 2000; Santín Montanyá *et al.*, 2006).

El sistema de multimacetas con perlita como soporte inerte puesto a punto por nuestro grupo de investigación (Vega *et al.*, 2009) y utilizado en el presente trabajo permitió la caracterización de la respuesta a diferentes concentraciones de imazapir en seis genotipos de girasol que difieren en el grado de resistencia a imidazolinonas. Los parámetros relacionados tanto con el crecimiento de biomasa aérea como radical en plántulas de 8 días resultaron útiles para la evaluación del efecto del herbicida. En este estadio, el efecto fue más pronunciado sobre el sistema radical de las plántulas. La inspección visual de las raíces tratadas con herbicida permitiría discriminar distintos grados de resistencia. Por su parte, las plántulas susceptibles serían rápidamente distinguidas, dado que mostraron raíces principales menores a 1cm y ausencia de raíces secundarias en presencia del herbicida. Para discriminar las plántulas de la línea resistente la variable más informativa fue la longitud de raíz principal con raíces secundarias mayores a 5 mm en presencia de imazapir 10  $\mu$ M. Por lo tanto, este genotipo homocigota para los dos *loci* que controlan la resistencia a imidazolinonas (*Imr1Imr1 Imr2Imr2*) pudo ser discriminado por la presencia de raíces secundarias (mayores a 5 mm) a lo largo de más de 3 cm sobre la raíz principal; mientras que el resto de los genotipos presentó valores menores a 1 cm para esta variable.

La evaluación del crecimiento de raíces de girasol ha sido caracterizada como un parámetro sensible para evaluar la respuesta a herbicidas (Günther *et al.*, 1993; Kotoula-Syka *et al.*, 1993; Hernández Sevillano *et al.*, 2001; Alonso Prados *et al.*, 2002). Dentro las variables que evalúan el crecimiento radical, se ha demostrado en diversos bioensayos que la longitud de raíces resulta más sensible y adecuada para describir el grado de resistencia a herbicidas o medir los residuos de inhibidores de AHAS en suelo (Landi *et al.*, 1989; Stork y Hannah, 1996; Hernandez Sevillano *et al.*, 2001). La disminución en el crecimiento de raíces laterales por acción de estos herbicidas ha sido reportada para girasol y otras especies (Beckie y McKercher, 1989; Hernández Sevillano *et al.*, 2001; Alonso Prados *et al.*, 2002; Hammamura *et al.*, 2003; Santín Montanyá *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009). Sin embargo, son escasos los trabajos que cuantifican este efecto sobre la morfología del sistema radical (Beckie y McKercher, 1989; Zhou *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que los herbicidas de la familia de las imidazolinonas causan daños en la estructura celular de las raíces en una primera instancia y posteriormente producen síntomas fitotóxicos como clorosis y reducción en el crecimiento de la planta (Zhou *et al.*, 2009). Plántulas de diversas especies expuestas a la acción de herbicidas inhibidores de AHAS mostraron cambios en la ultraestructura de las células radiculares, principalmente a nivel de la caliptra (Fayez y Kristen 1996; Flaburiari y Kristen 1996; Holmes *et al.*, 2006;

Zhou *et al.*, 2009) y una disminución en la tasa mitótica de las raíces en presencia de estos herbicidas (Rost y Reynolds, 1985; Yim y Bayer, 1996; Spackman y Cobb, 1999).

Las variables de crecimiento aéreo demostraron ser menos informativas en lo que respecta al efecto de herbicidas inhibidores de AHAS (Günther *et al.*, 1993; Yim y Bayer, 1996; Blancaver *et al.*, 2001; Alonso Prados *et al.*, 2002; Santín Montanyá *et al.*, 2006; Kuk *et al.*, 2008). En el presente trabajo, la evaluación visual del crecimiento aéreo a los 8 días permitiría discriminar sólo los genotipos susceptibles y los resistentes utilizando distintas concentraciones de herbicida. El tratamiento con imazapir 1,25 uM resultó útil para discriminar el material susceptible por selección de aquellas plántulas con hipocótilos menores a 2 cm, mientras que para la concentración de 10 µM las plántulas resistentes fueron distinguidas del resto por presentar una longitud de hipocótilo mayor a 6 cm. Cabe destacar que la elongación del hipocótilo es altamente dependiente de las condiciones de luz y temperatura por lo que pequeñas fluctuaciones en la cámara climática podrían arrojar resultados confusos.

Los resultados de la evaluación del ensayo de germinación en multimacetas de 15 días fueron similares al ensayo de 8 días en cuanto al crecimiento del sistema radical. Las variables más informativas fueron las relacionadas al crecimiento de raíces secundarias, principalmente la longitud de raíz principal con raíces secundarias mayores a 5 mm. En cuanto al crecimiento aéreo, la expansión del primer par de hojas verdaderas resultaría útil para discriminar los genotipos intermedios de los resistentes. Sin embargo, no sería viable discriminar entre genotipos resistentes que difieran a nivel del segundo *locus* (*Imr1Imr1Imr2Imr2* vs *Imr1Imr1Imr2imr2*).

Considerando las diferencias entre las respuestas a nivel aéreo y radical obtenidas para los ensayos en multimacetas del presente trabajo, puede considerarse que el *locus Imr2* presenta una acción génica dominante a nivel aéreo y un comportamiento semidominante a nivel radical. Estas diferencias pueden estar relacionadas con una expresión tejido específica de la acción de *Imr2*. Otra explicación puede corresponderse con el hecho de que el crecimiento radical es más rápido en comparación con el de la parte aérea en girasol (Aguirrezábal *et al.*, 2001) por lo que los efectos de *Imr2* pueden evaluarse en raíces de manera anticipada. Dado que no se observaron diferencias entre los cruzamientos de respuesta intermedia (*Imr1imr1Imr2imr2* vs *Imr1imr1imr2imr2*) puede inferirse que la acción modificadora de *Imr2* podría sólo ser detectable en presencia de homocigosis para *Imr1*, al menos en los estadios de crecimiento evaluados (VE y V2).

El efecto del herbicida imazapir sobre la actividad AHAS en distintos genotipos de girasol pudo cuantificarse utilizando el ensayo *in vivo* previamente reportado para imazetapir (Vega, 2009). Los resultados obtenidos fueron muy similares para ambos ingredientes activos, excepto para la línea susceptible. Los valores estimados de  $I_{50}$  para este genotipo fueron de 5 y 1  $\mu\text{M}$  para imazapir e imazetapir, respectivamente. Esta diferencia ha sido previamente reportada y se considera que el imazetapir es un inhibidor más fuerte que el imazapir (Stidham y Singh, 1991). Estructuralmente, estos herbicidas sólo difieren en cuanto a la presencia de un grupo funcional etilo ( $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) en el anillo piridínico. La presencia de este grupo no modifica la interacción con la AHAS sino que produce un metabolismo diferencial de estos compuestos que explica la diferencia de su actividad como herbicidas (Shaner y Mallipudi, 1991; Tan *et al.*, 2005). Los resultados encontrados por nuestro grupo de trabajo confirman la ventaja de la metodología *in vivo* al detectar diferencias no sólo entre genotipos que difieren en el grado de resistencia sino también entre ingredientes activos, aún para diferencias relacionadas con el metabolismo del herbicida.

Los ensayos *in vivo* de AHAS obtenidos en el presente trabajo mostraron valores de  $I_{50}$  similares a los encontrados para girasol silvestre. White *et al.* (2002) estudiaron un biotipo resistente de girasol silvestre encontrado en Howard (Dakota del Sur, Estados Unidos) y encontraron un valor de  $I_{50}$  de 200  $\mu\text{M}$  de imazetapir (39 veces mayor que el del biotipo susceptible). Para la línea resistente utilizada en el presente trabajo se encontró un  $I_{50}$  de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  de imazapir, siendo éste 18 veces mayor que el de la línea susceptible. Vrbničanin *et al.* (2008) evaluaron un híbrido de girasol resistente a imazetapir que mostró una actividad AHAS *in vivo* 210 veces mayor que el híbrido sensible.

Los ensayos de actividad *in vitro* también fueron utilizados para determinar el grado de resistencia a inhibidores de AHAS. Al-Khatib *et al.* (1998) determinaron en el biotipo de girasol silvestre resistente a imidazolinonas encontrado en Kansas que el  $I_{50}$  se hallaba en el orden de los nanomolar (nM) de imazetapir siendo 210 veces mayor con respecto a los biotipos susceptibles. Se encontraron valores similares para este mismo biotipo en presencia de imazamox (Baumgartner *et al.*, 1999). Para un híbrido de girasol resistente el valor estimado de  $I_{50}$  para imazamox fue 51  $\mu\text{M}$ , 2500 veces mayor que para el híbrido susceptible (Bozic *et al.*, 2012). Si bien los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* son consistentes con los obtenidos *in vitro*, el grado de resistencia detectado no es el mismo para los dos métodos. En los experimentos *in vitro* se utiliza un extracto de la enzima aislada y diferentes concentraciones de herbicida, siendo la actividad enzimática independiente de los mecanismos de absorción y transporte del herbicida que ocurren en la hoja. Debido a

ello, los niveles de resistencia observados *in vitro* son mayores a los encontrados mediante el ensayo *in vivo* (Simpson *et al.*, 1995).

La actividad AHAS cuantificada mediante la metodología *in vivo* ha permitido discriminar genotipos con diferentes grados de resistencia. En el presente trabajo, se encontraron diferencias entre los genotipos que difieren para *Imr1*. De manera similar, en el caso de trigo (Rainbolt *et al.*, 2005) y maíz (Currie *et al.*, 1995) este ensayo permitió discriminar entre genotipos homocigotos y heterocigotos para el *locus* que controla la resistencia a imidazolinonas.

Es interesante destacar que en los ensayos mencionados anteriormente donde se comparan genotipos con diferentes grados de resistencia, la respuesta enzimática de genotipos heterocigotos no es un intermedio entre los correspondientes homocigotos (Currie *et al.*, 1995; Rainbolt *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos para los genotipos que difieren a nivel de *Imr1* (con igual constitución de *Imr2*) este trabajo muestran una tendencia similar. Los valores estimados de  $I_{50}$  fueron de 96 y 17  $\mu\text{M}$  para los cruzamientos de genotipos *Imr1Imr1Imr2imr2* e *Imr1imr1Imr2imr2*, respectivamente (Figura 1.12). Según lo sugerido por Currie *et al.* (1995), estas diferencias se deben a la presencia de otras isoformas susceptibles codificadas por genes adicionales. Otros autores agregan complejidad al análisis y además del efecto de dilución por isoformas susceptibles proponen la formación de heterocomplejos. Los heterocomplejos se definen como aquellas enzimas que se componen de una mezcla de subunidades susceptibles y resistentes. El comportamiento susceptible de los heterocomplejos explicarían la disminución de actividad en los heterocigotos (Endo *et al.*, 2007; Iwakami *et al.*, 2012).

A modo de resumen, se comparan en el siguiente cuadro las características de los ensayos utilizados para caracterizar la respuesta a imidazolinonas en girasol y los resultados obtenidos:

Bioensayo	Estadio	Duración	Selección entre genotipos	Equipamiento	Entrenamiento del operador
<b>Germinación en placa</b>	VE	4 días	susceptible se selecciona del resto	cámara climática, material para preparación de soluciones	muy sencillo, inspección visual de radículas
<b>Germinación en multimacetas</b>	VE-V2	8-15 días	genotipos que difieren para <i>Imr1</i> y para <i>Imr1</i> y <i>Imr2</i> en el caso de homocigosis de <i>Imr1</i>	idem anterior	sencillo, inspección visual del sistema radical
<b>Actividad AHAS <i>in vivo</i></b>	V2	>16 días	genotipos que difieren para <i>Imr1</i>	idem anterior + centrífuga, espectrofotómetro	intermedia, manejo de equipamiento de laboratorio

La germinación en placa es la técnica más rápida y sencilla pero presenta la desventaja de discriminar solo los materiales susceptibles. El ensayo en multimacetas (de 8 o 15 días) resultaría de mayor utilidad dado que permite discriminar entre genotipos resistentes homocigotos para dos *loci* involucrados en la resistencia (*Imr1Imr1Imr2Imr2*) de los resistentes heterocigotos para *Imr2*, y a su vez distinguir los genotipos de respuesta intermedia y susceptible. Este ensayo requiere la habilidad visual del operador para detectar diferencias en el sistema radical. Por su parte, la metodología de actividad *in vivo* requiere equipamiento especial de laboratorio y entrenamiento del operador en su uso. Las ventajas principales de la actividad AHAS *in vivo* es que permite distinguir entre homocigotos y heterocigotos que difieren a nivel del primer *locus*, *Imr1*, tiene un control interno en la misma planta y permite detectar diferencias en cuanto al metabolismo de distintos ingredientes activos.

Cabe destacar que los bioensayos desarrollados en el presente trabajo se podrían extender para conocer la respuesta a otros ingredientes activos de la familia de las imidazolinonas u otra familia química de inhibidores de AHAS, para establecer patrones de resistencia cruzada o en la evaluación de residuos en suelo. A su vez, la implementación de los mismos en los programas de mejoramiento, como se mencionó anteriormente, permitiría ahorrar gran cantidad de tiempo y recursos.

## CONCLUSIONES

- La resistencia a imidazolinonas en girasol pudo ser verificada en plántulas obtenidas a partir de la germinación de aquenios en presencia de herbicida.
- El genotipo susceptible pudo discriminarse del resto de los genotipos a los 4 días desde la siembra a través de un test germinativo en placa.
- El crecimiento del sistema radical en plántulas de 8 y 15 días manifestó una relación con la constitución genética a nivel de los dos *loci* *Imr1* e *Imr2* que controlan la resistencia a imidazolinonas en girasol cultivado.
- La cuantificación de la actividad AHAS *in vivo* en hojas jóvenes permitió distinguir genotipos que difieren a nivel del locus *Imr1*.

## **CAPÍTULO 2**

**Análisis transcriptómico y bioquímico  
de la expresión de genes *ahas***

## CAPÍTULO 2: Análisis transcriptómico y bioquímico de la expresión de genes *ahas*

### INTRODUCCIÓN

En girasol, tres genes que codifican para la subunidad catalítica de AHAS fueron identificados y denominados *ahas1*, *ahas2* y *ahas3* (Kolkman *et al.*, 2004). Múltiples genes *ahas* han sido caracterizados en otras especies: dos en tabaco (*Nicotiana tabacum*, Lee *et al.*, 1988), dos en maíz (*Zea mays*, Fang *et al.*, 1992), tres en trigo (Pozniak *et al.*, 2004), cinco en colza (*Brassica napus*, Rutledge *et al.*, 1991), seis en algodón (*Gossypium hirsutum*; Grula *et al.*, 1995), entre otros.

Los genes *ahas1*, *ahas2* y *ahas3* de girasol fueron mapeados en los grupos de ligamiento 9, 6 y 2, respectivamente. A partir del análisis de secuencias de *ahas1* en 23 líneas endocriadas, se identificaron 48 SNPs (polimorfismos de nucleótido único, del inglés *single nucleotide polymorphism*) y una repetición [ACC]<sub>n</sub>. Los alelos encontrados para *ahas1* fueron agrupados en 5 haplotipos. Por el contrario, no se encontraron polimorfismos de ADN en las secuencias de *ahas2* de las líneas. Un segundo haplotipo de *ahas2* pudo ser encontrado a partir de secuencias de girasol silvestre. De manera similar, los polimorfismos de ADN fueron escasos para los alelos de *ahas3* encontrándose dos haplotipos en las líneas de girasol cultivado (Kolkman *et al.*, 2004). Un trabajo posterior amplía el conocimiento sobre la diversidad génica para la familia AHAS en girasol incluyendo 15 líneas domesticadas y 12 accesiones silvestres. La frecuencia de SNPs fue mayor para las accesiones silvestres. La mayor diversidad génica fue encontrada para *ahas1*, para el cual se encontraron 19 haplotipos. Seis y 16 haplotipos fueron encontrados para *ahas2* y *ahas3*, respectivamente. Para *ahas2* se encontró la menor diversidad nucleotídica (Hawley, 2005). El grupo de ligamiento 6, donde se encuentra *ahas2*, ha sido caracterizado previamente por bajo polimorfismo (Burke *et al.*, 2005).

Los patrones de expresión de las familias génicas *ahas* varían dependiendo de la complejidad de cada familia. En *Arabidopsis*, un único gen es constitutivamente expresado (Mazur *et al.*, 1987). Por otro lado, en algodón se encontraron seis genes de los cuales cuatro son constitutivos y al menos dos son de expresión tejido-específica (Grula *et al.*, 1995). En plantas en desarrollo al menos un gen *ahas* debe ser constitutivamente expresado.

La información disponible en la bibliografía sobre la organización y/o expresión de genes *ahas* en diferentes especies vegetales fue compilada en la siguiente tabla:

<b>Especie</b>	<b>Nº de genes</b>	<b>Patrón de expresión</b>	<b>Referencias</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	único gen constitutivo	Mazur <i>et al.</i> (1987)
<i>Cichorium intybus</i>	1	único gen constitutivo	Degrande <i>et al.</i> (2000)
<i>Hordeum vulgare</i>	1	único gen constitutivo	Lee <i>et al.</i> (2011)
<i>Zea mays</i>	2	no estudiado, se infiere 1 de mayor expresión	Newhouse <i>et al.</i> (1991a,b) Fang <i>et al.</i> (1992)
<i>Nicotiana tabacum</i>	2	2 genes constitutivos, 1 de mayor expresión	Lee <i>et al.</i> (1988) Keeler <i>et al.</i> (1993)
<i>Daucus carota</i>	2	no estudiado	Caretto <i>et al.</i> (1994)
<i>Lindernia</i> spp.	2	no estudiado	Uchino y Watanabe (2002)
<i>Camelina microcarpa</i>	2	no estudiado	Hanson <i>et al.</i> (2004)
<i>Schoenoplectus juncooides</i>	2	de igual expresión	Uchino <i>et al.</i> (2007)
<i>Sinapis arvensis</i>	2	no estudiado	Christoffers <i>et al.</i> (2006)
<i>Salsola tragus</i>	2	no estudiado	Warwick <i>et al.</i> (2010)
<i>Anthemis cotula</i>	2	no estudiado	Intanon <i>et al.</i> (2011)
<i>Echinochloa phyllopogon</i>	2	2 genes constitutivos, 1 de mayor expresión	Iwakami <i>et al.</i> (2012)
<i>Glycine max</i>	3	no estudiado	Mazur y Falco (1989) Simpson y Stoller (1996)
<i>Triticum aestivum</i>	3	todas se expresan, patrón no estudiado	Pozniak y Hucl (2004) Pozniak <i>et al.</i> (2004)
<i>Helianthus annuus</i>	3	1 de mayor expresión	Kolkman <i>et al.</i> (2004) Hawley (2005)
<i>Bidens subalternans</i>	3	no estudiado	Lamego <i>et al.</i> (2009)

<i>Schoenoplectus mucronatus</i>	3	los 3 detectados en hoja	Scarabel <i>et al.</i> (2010)
<i>Monochoria vaginalis</i>	4	1 pseudogen, se expresan todas transcripcionalmente, patrón no estudiado	Ohsako y Tominaga (2007)
<i>Brassica napus</i>	5	2 genes constitutivos, 1 específico de tejido reproductivo, 2 pseudogenes	Rutledge <i>et al.</i> (1991) Ouellet <i>et al.</i> (1992)
<i>Gossypium hirsutum</i>	6	2 genes constitutivos, 1 o 2 específicos de anteras y 1 o 2 de baja expresión en varios tejidos	Gruha <i>et al.</i> (1995)

A partir del análisis de mutantes de tabaco resistentes a sulfonilureas aisladas por selección en cultivo de tejidos, se encontraron dos *loci* denominados *SurA* y *SurB* involucrados en la resistencia (Chaleff y Ray, 1984). Estudios posteriores caracterizaron estos dos genes, los cuales codifican para la subunidad catalítica de AHAS y mostraron 95% de identidad en la secuencia codificante. *N. tabacum* es un alotetraploide originado por hibridación de dos especies diploides (*Nicotiana tomentosiformis* y *Nicotiana sylvestris*). A partir del análisis de las secuencias se propuso que *SurB* y *SurA* derivan de los progenitores *N. tomentosiformis* y *N. sylvestris*, respectivamente (Lee *et al.*, 1988). La expresión de los genes *SurB* y *SurA* fue detectada en todos tejidos de plantas de tabaco, con una mayor expresión en tejidos jóvenes y de activo crecimiento. Para *SurB* se encontraron niveles de expresión más altos que para *SurA*. La modulación coordinada de estos genes sugiere un mecanismo de regulación en común. Se propone que los genes son funcionalmente redundantes y son mantenidos debido a la naturaleza tetraploide de *N. tabacum* (Keeler *et al.*, 1993).

En maíz se encontraron dos genes *ahas* a partir del estudio de mutantes resistentes a imidazolinonas y otros herbicidas inhibidores de AHAS (Newhouse *et al.*, 1991a,b; Fang *et al.*, 1992). Ensayos enzimáticos sobre diferentes mutantes permitieron inferir que uno de los *loci* aportaría el 80% de la actividad mientras que el otro *locus* contribuiría con el restante 20%, lo que a su vez explicaría diferencias a nivel de planta entera para las mutantes (Newhouse *et al.*, 1991a). Sin embargo, un estudio posterior postula que ambos genes se expresarían con igual magnitud (Currie *et al.*, 1995). En la bibliografía no se disponen

estudios concluyentes sobre los patrones de expresión de estos genes. De manera similar, en trigo se identificaron 3 genes *ahas* pero sus niveles de expresión no fueron medidos. Cada uno de los genes corresponde a cada uno de los genomas (A, B y D) de trigo. Los mayores niveles de resistencia se lograron al apilar dos o más genes resistentes en el mismo genotipo. A partir del estudio de isolíneas con diferentes mutaciones pudo inferirse que uno de los genes se expresaría en niveles más bajos que los otros (Pozniak y Hucl, 2004; Pozniak *et al.*, 2004).

En la especie alotetraploide *Brassica napus* se encontraron cinco genes *ahas* (*ahas1-5*). Dos de los genes, *ahas1* y *ahas3* presentan una alta identidad de secuencias mientras que *ahas2* difiere significativamente. Los dos genes restantes, *ahas4* y *ahas5*, presentaron secuencias codificantes interrumpidas. A partir del análisis de las secuencias de los progenitores *Brassica campestris*, donador del genoma A, y *Brassica oleracea*, donador del genoma C, se propuso que *ahas2*, *ahas3* y *ahas4* derivan del progenitor *B. campestris* mientras que *ahas1* y *ahas5* se originaron de *B. oleracea* (Rutledge *et al.*, 1991). El estudio del patrón de expresión de esta familia génica mostró que *ahas1* y *ahas3* corresponden a las isoformas constitutivas con igual expresión en diversos tejidos como raíces, hojas, flores y semillas de distintos estadios de desarrollo. Por otro lado, se observó expresión tejido específica para *ahas2*, cuyo ARNm fue detectado en mayor abundancia en pistilos, en particular en óvulos en antesis, y en tejidos extra-embriogénicos de semillas inmaduras. Una menor expresión de *ahas2* fue encontrada en anteras (Ouellet *et al.*, 1992).

La mayor complejidad en cuanto a la organización y expresión de genes *ahas* fue encontrada en el algodón alotetraploide (*G. hirsutum*). En dicha especie, se encontraron seis genes de los cuales cuatro se organizan en pares de tándem. Dos genes se expresan de manera constitutiva, con mayor expresión en semillas y callos embriogénicos, expresión intermedia en hojas y pericarpios y menor expresión en raíz. De los cuatro genes organizados en pares, al menos dos se expresan. Uno o los dos genes hacia el extremo 5' (*upstream*) de los pares de genes en tándem presentaron expresión específica en anteras, mientras que para al menos uno de los genes del otro extremo del par (*downstream*) se observó una expresión constitutiva pero baja y con un patrón diferente al de los genes de mayor expresión. Se pudo corroborar que cada uno de los genes constitutivos y un par de los genes en tándem provienen de cada genoma parental del alotetraploide *G. hirsutum* (Gruła *et al.*, 1995).

Estudios más recientes examinaron la expresión de genes *ahas* mediante la técnica de PCR en tiempo real, también conocida como RT-qPCR (del inglés *reverse transcription*

*quantitative polymerase chain reaction*). Esta técnica es una variante de la reacción de RT-PCR, que corresponde a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tras una reacción de transcripción reversa (RT), que permite la cuantificación de los transcritos de interés. Iwakami *et al.* (2012) reportaron patrones de expresión de los dos genes *ahas* de *Echinochloa phyllopogon* en diferentes tejidos. Los dos genes mostraron mayores niveles de transcritos en tejidos meristemáticos, pero con una contribución diferencial entre diferentes tejidos. Por otro lado, esta técnica también fue utilizada para evaluar la respuesta al tratamiento con enantiómeros de imazetapir en arroz (Qian *et al.*, 2009).

Si bien la expresión de los genes *ahas* en girasol fue estudiada en varias ocasiones, no fue posible cuantificar los niveles de los transcritos debido a problemas técnicos (Kolkman *et al.*, 2004; Hawley, 2005). La principal dificultad se debe a la elevada similitud de los genes, lo cual complica el diseño de cebadores parálogo-específicos. Hawley (2005) reportó que la mayor expresión a nivel transcripcional ocurre para *ahas1* en tejidos foliares. A su vez, las mutaciones que confieren resistencia a inhibidores de AHAS en girasol se han identificado en *ahas1*. El conocimiento sobre los patrones de expresión de esta familia génica sería importante para comprender porqué *ahas1* es el parálogo blanco de las mutaciones que confieren resistencia y para considerar el papel que puedan tener *ahas2* o *ahas3* en el desarrollo de nuevas líneas resistentes.

La actividad enzimática AHAS en girasol sólo fue reportada para tejidos foliares (Al-Khatib *et al.*, 1998; Baumgartner *et al.*, 1999; White *et al.*, 2002; Zelaya y Owen, 2004; Vrbničanin *et al.*, 2008; Bozic *et al.*, 2012; Sala *et al.*, 2012b). El estudio de la dicha actividad en diferentes tejidos sería importante para profundizar el conocimiento de la expresión de esta enzima. En maíz, distintos niveles de actividad AHAS en raíces permitieron explicar los diferentes niveles de tolerancia a herbicidas observados en distintos híbridos (Forlani *et al.*, 1991). La evaluación de la expresión de genes *ahas* en líneas de girasol que difieren en cuanto al grado de resistencia podría esclarecer si existe una mayor actividad AHAS o algún mecanismo de sobreexpresión de genes *ahas* en el genotipo resistente y por lo tanto inferir alguna relación con el mecanismo del *locus* de acción desconocida *Imr2*. A su vez, la comparación de los niveles de transcripción, de actividad AHAS detectable *in vitro* y los de actividad enzimática *in vivo* permitiría inferir relaciones entre estos niveles de expresión génica.

El objetivo de este Capítulo fue estudiar la expresión de los genes *ahas1*, *ahas2* y *ahas3* a nivel transcriptómico y la actividad enzimática AHAS *in vivo* e *in vitro* en hojas y raíces de plantas jóvenes de líneas de girasol que difieren en su grado de resistencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Se utilizaron tres líneas endocriadas de girasol: HA425, 1058-1 y HA89 de genotipos resistente (*Imr1Imr1Imr2Imr2*), intermedio (*Imr1Imr1imr2imr2*) y susceptible (*imr1imr1imr2imr2*) respectivamente. La descripción de las líneas utilizadas se realizó en el Capítulo anterior.

Se evaluaron muestras de hoja y raíz de plántulas en estadio V2 obtenidas mediante germinación en el sistema de multimacetas previamente descrito. El tratamiento con herbicida se realizó mediante el agregado de imazapir a la solución de riego, en una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ , por 48 horas previo a la toma de la muestra. La incubación de las plántulas se realizó en condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), fotoperíodo (16/8 h luz/oscuridad) e intensidad lumínica ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### Extracción y purificación de ARN total

Las muestras de tejido fresco (10 mg) en microtubos de 1,5 ml fueron sumergidas en nitrógeno líquido y trituradas utilizando un mortero hasta obtener un polvo fino. La purificación de ARN total se realizó utilizando el sistema de extracción comercial *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para el tratamiento con ADNasa se empleó el sistema *PureLink™ DNase* (Invitrogen Life Technologies). Las muestras de ARN fueron almacenadas a -80 °C.

Tanto la calidad como la cantidad de ARN extraído fueron determinadas utilizando espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm de las muestras de ARN diluídas en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) en una relación 1:50. Para estimar la concentración de ARN se consideró que un valor de absorbancia de 1 corresponde a 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . El rendimiento obtenido fue de 0,3 a 0,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La pureza de las muestras fue controlada por la relación de absorbancia 260 nm/280 nm, la cual resultó cercana a 2.

La integridad del ARN fue verificado a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado en solución tampón 1x TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 1 mM, pH=8). La cuba de electroforesis y el peine fueron previamente lavados con NaOH 0,4 N y enjuagados con agua tratada con DEPC. Las muestras de ARN (2  $\mu\text{l}$ ) se sembraron junto a una solución de siembra (azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25%, glicerol 30%) en proporción 6:1. Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se observaron bajo transiluminador de luz UV. Las muestras presentaron dos

bandas definidas, correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S, y una banda difusa de bajo peso molecular que corresponde a los ARN de transferencia.

### Transcripción reversa

La transcripción reversa se llevó a cabo utilizando el kit comercial *SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen Life Technologies). 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	csp 2 µg
dNTPs 10 mM	1 µl
oligo(dT) <sub>12-18</sub>	1 µl
agua tratada con DEPC	csp 10 µl

La mezcla se mantuvo en hielo. A continuación, se agregaron 9 µl de la siguiente mezcla:

solución tampón (Tris 200 mM, pH=8,4, KCl 500 mM) 10X	2 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl
Inhibidor de ARNasa (RNAsa Out™) 40 U/µl	1 µl

Luego de homogeneizar la mezcla se incubó a 42 °C durante 2 min. Para comenzar la reacción de retrotranscripción se adicionó 1 µl de *Superscript II RT* (50 U/µl) y se incubó 60 min a 42 °C. La reacción finalizó mediante la incubación a 70 °C por 15 min. Para la remoción del ARN se adicionó 1 µl de ARNasa H (2 U/µl) y se realizó otro paso de incubación a 37 °C durante 20 min. El ADN copia (ADNc) sintetizado fue conservado a -20 °C.

### Diseño de oligonucleótidos específicos

Para la amplificación de transcritos de genes *ahas* y su posterior cuantificación, se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los genes *ahas* y de la subunidad β de la tubulina, cuya expresión fue considerada como referencia. Las secuencias de los genes mencionados fueron obtenidas en el banco de datos *GeneBank* del sitio del NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) (Tabla II.I). Dada la elevada similitud de estos genes, se buscaron secuencias de tipo EST que incluyeran las secuencias de las regiones 5' y 3' no traducidas. Los análisis de similitud de secuencia con las bases de datos de ESTs se realizaron mediante los servicios de búsqueda proporcionada por el NCBI. La búsqueda fue confinada a la especie *Helianthus annuus* (taxid: 4232) utilizando el programa *Blast 2.2.26*

(Zhang *et al.*, 2000). Las secuencias de genes y de ESTs utilizados para el diseño de oligonucleótidos específicos para genes *ahas* se detallan en la Tabla II.I. En cuanto al gen de referencia, la secuencia de tubulina de girasol se obtuvo de la entrada 2125113 (Han.4638) de la base de datos *UniGene* del NCBI. El gen de tubulina ha sido utilizado como gen de referencia en otros trabajos (Oracz *et al.*, 2008; 2009) y fue reportado como un gen estable (Fernández *et al.*, 2011).

Para la alineación de las secuencias y la obtención de secuencias consenso se empleó el programa *CLC Sequence Viewer*<sup>1</sup> (versión 6.5.2) y *Sequencher*<sup>2</sup> (versión 4.1.4).

Los oligonucleótidos específicos fueron desarrollados mediante el programa *Primer-Blast*<sup>3</sup> y *Primer3*<sup>4</sup> (Rozen y Skaletsky, 2000). Los parámetros establecidos para el diseño incluyeron una longitud de los cebadores de entre 18 y 25 nucleótidos, un contenido de GC de 50 a 70 % y una temperatura de hibridación (*annealing*) de 57 a 65 °C. Los cebadores diseñados para cada uno de los tres genes *ahas* y para tubulina se muestran en la Tabla II.II. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por IDT®<sup>5</sup> (*Integrated DNA Technologies*).

**Tabla II.I.** Secuencias disponibles en el *GeneBank* que fueron utilizadas para el diseño de oligonucleótidos específicos de los genes *ahas1*, *ahas2*, *ahas3* y tubulina.

Nº de accesoión	Descripción	Organismo	Referencia
AY541451	<i>ahas1</i> haplotipo 1	<i>Helianthus annuus</i>	Kolkman <i>et al.</i> , 2004
AY541452	<i>ahas1</i> haplotipo 2	<i>Helianthus annuus</i>	Kolkman <i>et al.</i> , 2004
AY541453	<i>ahas1</i> haplotipo 3	<i>Helianthus annuus</i>	Kolkman <i>et al.</i> , 2004
AY541454	<i>ahas1</i> haplotipo 4	<i>Helianthus annuus</i>	Kolkman <i>et al.</i> , 2004
AY541455	<i>ahas1</i> haplotipo 5	<i>Helianthus annuus</i>	Kolkman <i>et al.</i> , 2004
AY541456	<i>ahas2</i> haplotipo 1	<i>Helianthus annuus</i>	Kolkman <i>et al.</i> , 2004
AY541457	<i>ahas2</i> haplotipo 2	<i>Helianthus annuus</i>	Kolkman <i>et al.</i> , 2004
AY541458	<i>ahas3</i> haplotipo 1	<i>Helianthus annuus</i>	Kolkman <i>et al.</i> , 2004
DY909668	secuencia EST	<i>Helianthus annuus</i>	Michelmore <i>et al.</i> , 2006
DY906644	secuencia EST	<i>Helianthus annuus</i>	Michelmore <i>et al.</i> , 2006
DY912682	secuencia EST	<i>Helianthus annuus</i>	Michelmore <i>et al.</i> , 2006

<sup>1</sup> <http://www.clcbio.com>

<sup>2</sup> <http://genecodes.com/demo-download>

<sup>3</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<sup>4</sup> <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>

<sup>5</sup> <http://www.idtdna.com/site>

**Tabla II.II.** Oligonucleótidos específicos para genes *ahas1*, *ahas2*, *ahas3* y tubulina utilizados como cebadores en PCR convencional y a tiempo real.

Gen blanco	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto
<i>ahas1</i>	<i>ahas1</i> F	CGAACGGTAACCCTAGAACAC	139 bp
	<i>ahas1</i> R	AAGTGATGGGTAATGCGAAAC	
<i>ahas2</i>	<i>ahas2</i> F	GCCGCCATACATCCTCCCC	167 pb
	<i>ahas2</i> R	CCGGTGGTGGTGGTGGAGTC	
<i>ahas3</i>	<i>ahas3</i> F	GTTGTTGGCGTTTGGCGTCCG	340 pb
	<i>ahas3</i> R	GATCGCGTTCCCACCCGTCAC	
tubulina	tub_F	TCTGCCACCATGTGGGAGTT	243 pb
	tub_R	GTAACGCCCGTGTCGTGGGTC	

### Detección de transcritos de *ahas1*, *ahas2* y *ahas3*

Se optimizó un protocolo de PCR para los cebadores diseñados. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl bajo las siguientes condiciones:

solución de amplificación 5x ( <i>Green GoTaq® reaction buffer</i> , Promega)	5 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
cebador sentido 10 µM	0,5 µl
cebador antisentido 10 µM	0,5 µl
ADN polimerasa 5 U/µl ( <i>GoTaq®</i> , Promega)	0,2 µl
ADNc (dilución 1:5)	2 µl
agua ultrapura	16,3 µl

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

- paso inicial de desnaturalización: 95 °C por 2 min
- 35 ciclos: 15 s a 95 °C (desnaturalización)
- 30 s a 60 °C (hibridación)
- 40 s a 72 °C (elongación)
- paso final de elongación: 10 min a 72 °C.

Las productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) preparados en solución tampón TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1mM, pH=8,3). Se sembraron 2 µl de los productos de PCR. Como marcador de peso molecular se utilizó un conjunto de fragmentos de ADN doble cadena de 100 pb a 1000 pb

en incrementos de 100 pb (*CienMarker*, Biodynamics). Las corridas electroforéticas se realizaron a 90-110 V en solución tampón TBE 0,5X. Los productos de PCR fueron visualizados mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) una vez finalizada la corrida.

Para confirmar la especificidad de la amplificación, los productos de PCR obtenidos (sin purificar) fueron enviados para su secuenciación a *Macrogen Inc. Korea*<sup>1</sup>. Las secuencias y cromatogramas provistos fueron analizados con el programa *Chromas 2.0*. Los análisis de similitud de secuencia con las bases de datos públicas se realizaron utilizando el programa *Blast 2.2.26* del sitio del NCBI.

### Cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real

Para cuantificar cada uno de los transcritos en las distintas muestras se llevó a cabo la técnica de PCR en tiempo real utilizando el termociclador Rotor-Gene Q (QIAGEN®). Se utilizaron dos muestras biológicas para cada combinación de genotipo, tejido y tratamiento. Cada reacción se corrió por triplicado. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla II.II.

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:

cebador sentido 10 µM	1 µl
cebador antisentido 10 µM	1 µl
Mezcla Real 2X (Biodynamics)	12,5 µl
ADNc dilución 1:5	2,5 µl
agua ultrapura	8 µl

Además se incorporaron controles negativos a los que no se les agregó ADNc. El protocolo de ciclado fue:

- desnaturalización a 95 °C por 2 min
- 40 ciclos: 15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 40 s a 72 °C
- paso final de elongación de 10 min a 72 °C

La curva de fusión del producto de amplificación se construyó al final del ciclado de la siguiente manera: ciclos de 10 s 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 (*quantification cycle* –Cq-, llamados *take off* por el programa utilizado) y los valores de eficiencia de reacción calculados por el programa *comparative quantitation* del

<sup>1</sup> <http://dna.macrogen.com/eng/>

*Rotor-Gene Q software* (versión 1.7, Corbett Research). La expresión normalizada (EN) fue calculada para cada gen teniendo en cuenta la eficiencia (E) de la reacción y los valores de Cq tanto para el gen de interés (*goi*) como para el gen de referencia (*ref*), considerando un promedio de eficiencia para cada amplicón (Simon, 2003; Schecke *et al.*, 2006):

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

Para la cuantificación relativa de los transcritos de genes *ahas* la expresión normalizada se expresó como relativa a la expresión de *ahas1* en hoja ( $ER = EN_{goi,tejido} / EN_{ahas1,hoja} \times 100$ ). Para la expresión relativa de genes *ahas* en tejidos de plántulas tratadas con herbicida ( $ER_{imi}$ ), los niveles de expresión normalizados respecto a tubulina fueron expresados relativos a su control:  $ER_{imi} = EN_{imi} / EN_{control}$ .

### **Medición *in vitro* de actividad enzimática AHAS**

Se implementó un protocolo simplificado descrito por Yu *et al.* (2003) y Degrande *et al.* (2000) con modificaciones para el ensayo de actividad AHAS *in vitro*. Hojas y raíces de plántulas en estadio V2 fueron pesadas, congeladas en nitrógeno líquido y molidas con micro-pilón en un microtubo. Se utilizó entre 100 y 200 mg de tejido. El tejido fue homogeneizado en una solución de reacción (50 mM HEPES pH=7, 200 mM piruvato de sodio, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM TPP y 20 μM FAD) en una relación de 5 ml por gramo de tejido. La solución de reacción fue preparada justo antes de ser utilizada. Se adicionó PVPP en una relación 6:1. Todas las operaciones fueron realizadas manteniendo los reactivos y el material vegetal a 4 °C. El homogeneizado fue centrifugado a 27.000 g por 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, el cual fue centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones. El sobrenadante fue utilizado inmediatamente como extracto crudo y medio de reacción para el ensayo enzimático: 400 μl del sobrenadante se incubaron con el mismo volumen de agua destilada estéril durante 60 min a 37 °C. Una vez finalizada la incubación, el contenido del tubo de reacción se dividió en dos alícuotas de 350 μl. Una de las alícuotas fue utilizada para la descarboxilación del acetolactato a acetoína, por lo tanto se le agregaron 70 μl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,5 N 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 70 μl de NaOH 2N. Ambas alícuotas fueron incubadas 15 min a 60 °C. A continuación, los tubos fueron centrifugados a temperatura ambiente por 5 min a 20.000 g y se recuperaron 350 μl de sobrenadante que fueron utilizados para el dosaje de acetoína por la reacción de Westerfeld (1945). Para esta reacción, se adicionaron 350 μl de

una solución de creatina (0,5% p/v) y 350 µl de α-naftol (5 % p/v) ambos preparados en NaOH 2,5 N justo antes de ser utilizados. Los tubos se incubaron a 60 °C por 15 min y se midió absorbancia a 530 nm. Se realizaron tres repeticiones para cada combinación de tratamientos (genotipo, tejido y tratamiento con herbicida).

### **Medición *in vivo* de actividad enzimática AHAS**

El ensayo *in vivo* de actividad AHAS en hojas fue realizado según fue descrito en el Capítulo 1, utilizando para la incubación las concentraciones de 0 (control) y 10 µM imazapir. Este mismo ensayo sobre raíces arrojó resultados negativos. A fin de poner a punto el protocolo de determinación de actividad para raíces, se llevó a cabo el ensayo *in vivo* en planta completa con modificaciones (Simpson *et al.*, 1995). El herbicida CPCA (500 µM) fue aplicado en la solución de riego junto a 0 (control) y 10 µM imazapir en plántulas en estadio V2. Al finalizar la incubación de 24 horas, las raíces fueron pesadas y conservadas en freezer para su posterior homogeneización. Se utilizó menos de 200 mg y más de 300 mg de tejido por tubo para hoja y raíz, respectivamente. La determinación de los productos de la enzima acumulados en los tejidos fue llevada a cabo según Westerfeld (1945) con modificaciones, según lo descrito previamente en el Capítulo anterior. Los valores de absorbancia fueron corregidos por un negativo (tejidos de plantas sin aplicación de CPCA) y calculados por peso del tejido y por hora de acumulación de productos de la enzima (tiempo de incubación con CPCA). Se realizaron tres repeticiones para cada combinación de tratamientos (genotipo, tejido y tratamiento con herbicida).

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa estadístico R (R Development Core Team, 2011). Para comparar los niveles de transcritos o los valores de actividad enzimática se realizó el análisis de la variancia (ANOVA) previa prueba de normalidad y homogeneidad de variancias. Los valores medios entre tejidos o genotipos fueron comparados por la prueba de Tukey. Para comparar valores de expresión normalizada o de actividad enzimática entre tratamiento control y con herbicida se utilizó la prueba *t* (Sokal y Rohlf, 1969).

## RESULTADOS

### Cuantificación relativa de transcritos de los genes *ahas1*, *ahas2* y *ahas3*

#### Análisis bioinformático para el diseño de cebadores específicos

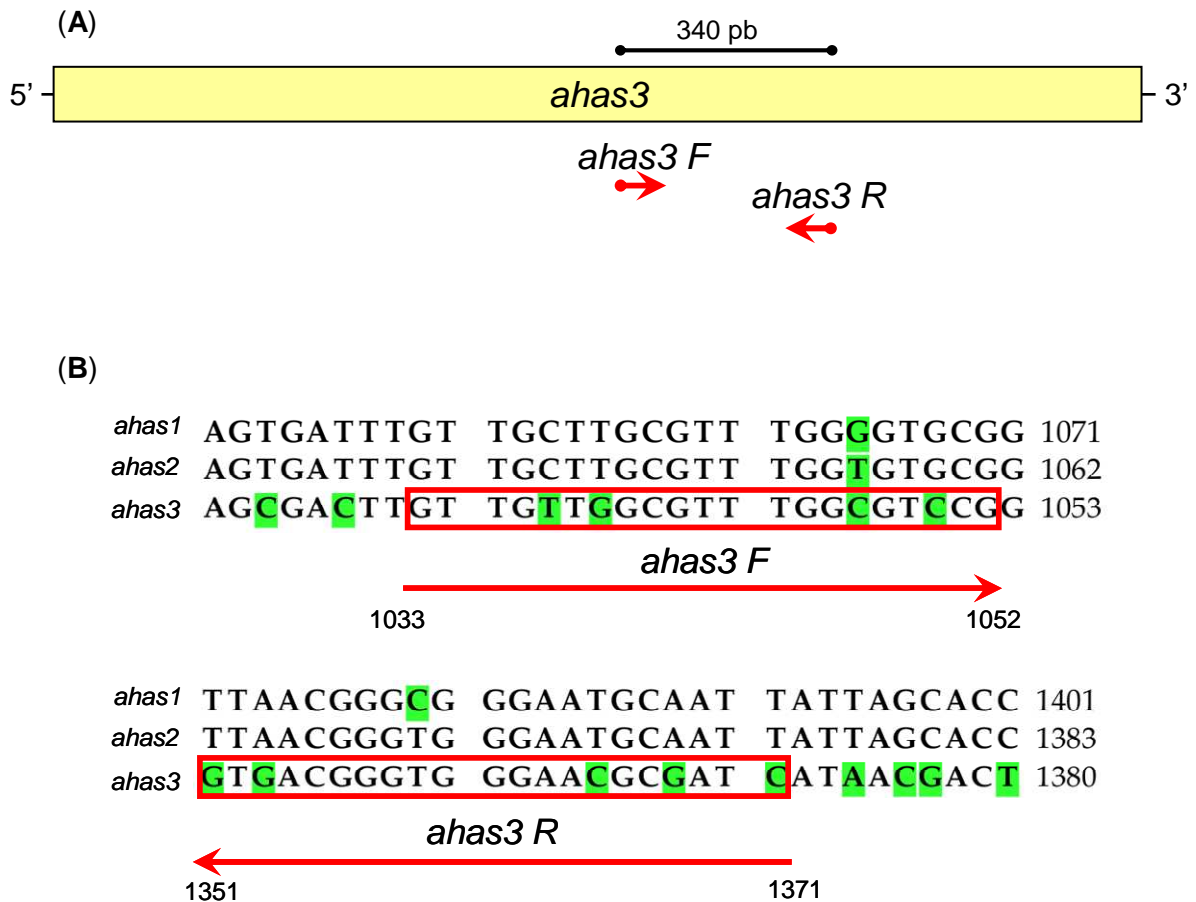
Las secuencias de los genes *ahas* de girasol cultivado disponibles en base de datos públicas fueron utilizadas para el diseño de cebadores específicos que permitieran la amplificación parólogo-específica de los genes *ahas1*, *ahas2* y *ahas3* (Tabla II.I). Los análisis de alineamiento local de los tres genes de a pares efectuada con *Blastn* produjeron una identidad máxima de 94% entre *ahas1* y *ahas2* y 79% entre *ahas1* y *ahas3* y entre *ahas2* y *ahas3*. La secuencia de *ahas3* mostró la mayor diferencia con respecto a sus parálogos y por lo tanto presentó menor dificultad para el diseño de oligonucleótidos específicos. Para lograr este propósito, se buscaron regiones de la secuencia de *ahas3* que presentaran diferencias respecto a las secuencias de *ahas1* y *ahas2*. La búsqueda de cebadores por el programa *Primer3* se limitó para estas regiones y se eligió el par que se muestra en la Figura 2.1. Por otro lado, el diseño de oligonucleótidos específicos para *ahas1* y *ahas2* resultó de gran dificultad debido al elevado grado de similitud entre estos genes. Por este motivo, se procedió a la búsqueda de ESTs que permitieran extender las secuencias hacia los extremos 5' o 3' no traducidos.

La búsqueda en la base de ESTs de *Helianthus annuus* realizada en marzo de 2011 permitió encontrar 16 alineamientos significativos para *ahas1*, 14 para *ahas2* y uno para *ahas3*. La secuencia de EST encontrada para *ahas3* también produjo alineamientos significativos con *ahas1* y *ahas2* y corresponde a una región conservada entre los genes. La asignación de los ESTs a sólo una secuencia *ahas* se realizó de acuerdo a los parámetros arrojados por el programa *Blastn*, siendo el menor valor de E y la mayor identidad los criterios de selección. De esta manera, 12 ESTs se asignaron a *ahas1* y 4 a *ahas2* (Tabla II.III).

Tres ESTs permitieron extender la secuencia del transcripto de *ahas1* hacia el extremo 5' no traducido. Una secuencia de EST arrojó información sobre el extremo 3' no traducido del transcripto de *ahas2* (Tabla II.III). La búsqueda de oligonucleótidos realizada con el programa *Primer3* fue confinada para distintas regiones que incluyan alguno de los extremos no traducidos, de manera que uno de los cebadores de cada par hibride en dicha región. El par de cebadores elegido para *ahas1* se muestra en la Figura 2.2. Para *ahas2* no se logró obtener amplificación con esta estrategia. Por lo tanto, se diseñaron oligonucleótidos sobre la región codificante utilizando el programa *Primer-Blast*, el cual evita automáticamente los

pares de cebadores que puedan producir amplificación de otras secuencias blanco. El par de oligonucleótidos elegido pudo ser utilizado y se muestra en la Figura 2.3.

**Figura 2.1.** (A) Cebadores específicos para *ahas3* indicados como *ahas3 F* (cebador sentido) y *ahas3 R* (cebador antisentido) (B) Cebadores específicos para *ahas3* mostrados sobre el alineamiento de las secuencias de los tres genes *ahas*. Las bases que difieren entre los genes están sombreadas en verde.



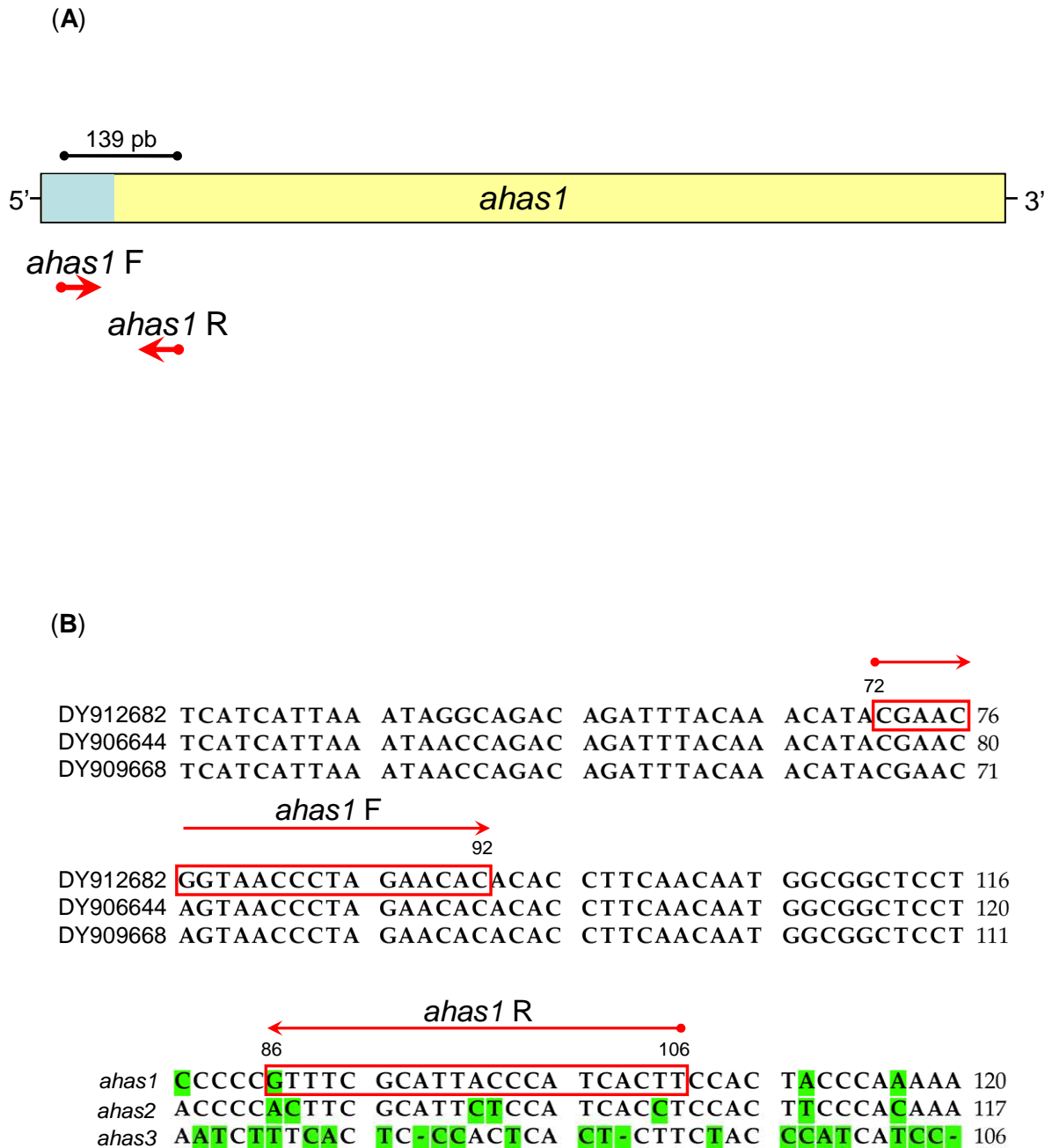
**Tabla II.III.** Secuencias de ESTs asignadas a las secuencias de los genes *ahas* de *Helianthus annuus*. Los ESTs utilizados que incluyen las secuencias de los extremos no traducidos se muestran sombreados en gris.

Secuencia de entrada	Nº accesión EST	valor E*	Identidad máxima	Año	Biblioteca	Autores
<b><i>ahas1</i></b>	DY912682.1	0	98%	2006	CHA(XYZ) (hojas, raíz y flores)	Michelmore <i>et al.</i> (2006)
	DY906644.1	0	98%	2006	CHA(XYZ) (hojas, raíz y flores)	Michelmore <i>et al.</i> (2006)
	BQ914288.1	0	100%	2011	QH(ABCDI) (línea RHA801, 11 tejidos)	Kozik <i>et al.</i> (2002)
	BQ965970.1	0	100%	2011	QH(ABCDI) (línea RHA801, 11 tejidos)	Kozik <i>et al.</i> (2002)
	BU016897.1	0	99%	2011	QH(EFGHJ) (línea RHA280, 11 tejidos)	Kozik <i>et al.</i> (2002)
	BQ975718.1	0	98%	2011	QH(ABCDI) (línea RHA801, 11 tejidos)	Kozik <i>et al.</i> (2002)
	CD851280.1	4E-146	99%	2010	HaDevR5 (cultivar psc8, embrión 4 días)	Genoplante (2003)
	CD851082.1	9E-138	100%	2010	HaDevR5 (cultivar psc8, embrión 4 días)	Genoplante (2003)
	DY909668.1	9E-93	95%	2006	CHA(XYZ) (hojas, raíz y flores)	Michelmore <i>et al.</i> (2006)
	BQ913768.1	1E-91	100%	2011	QH(ABCDI) (línea RHA801, 11 tejidos)	Kozik <i>et al.</i> (2002)
	BU016117.1	3E-88	98%	2011	QH(EFGHJ) (línea RHA280, 11 tejidos)	Kozik <i>et al.</i> (2002)
	AJ828880.1	7E-79	100%	2011	HaCotR (línea Ha300b, embrión)	Ben <i>et al.</i> (2005)
	<b><i>ahas2</i></b>	BU023933.1	0	100%	2011	QH(EFGHJ) (línea RHA280, 11 tejidos)
CD846028.1		0	95%	2010	HaDevR1 (cultivar psc8, hojas)	Genoplante (2003)
BU024279.1		5E-105	96%	2011	QH(EFGHJ) (línea RHA280, 11 tejidos)	Kozik <i>et al.</i> (2002)
GH160467.1		4E-52	92%	2008	Ha_SSH48 (raíces y hojas)	Priya <i>et al.</i> (2008)

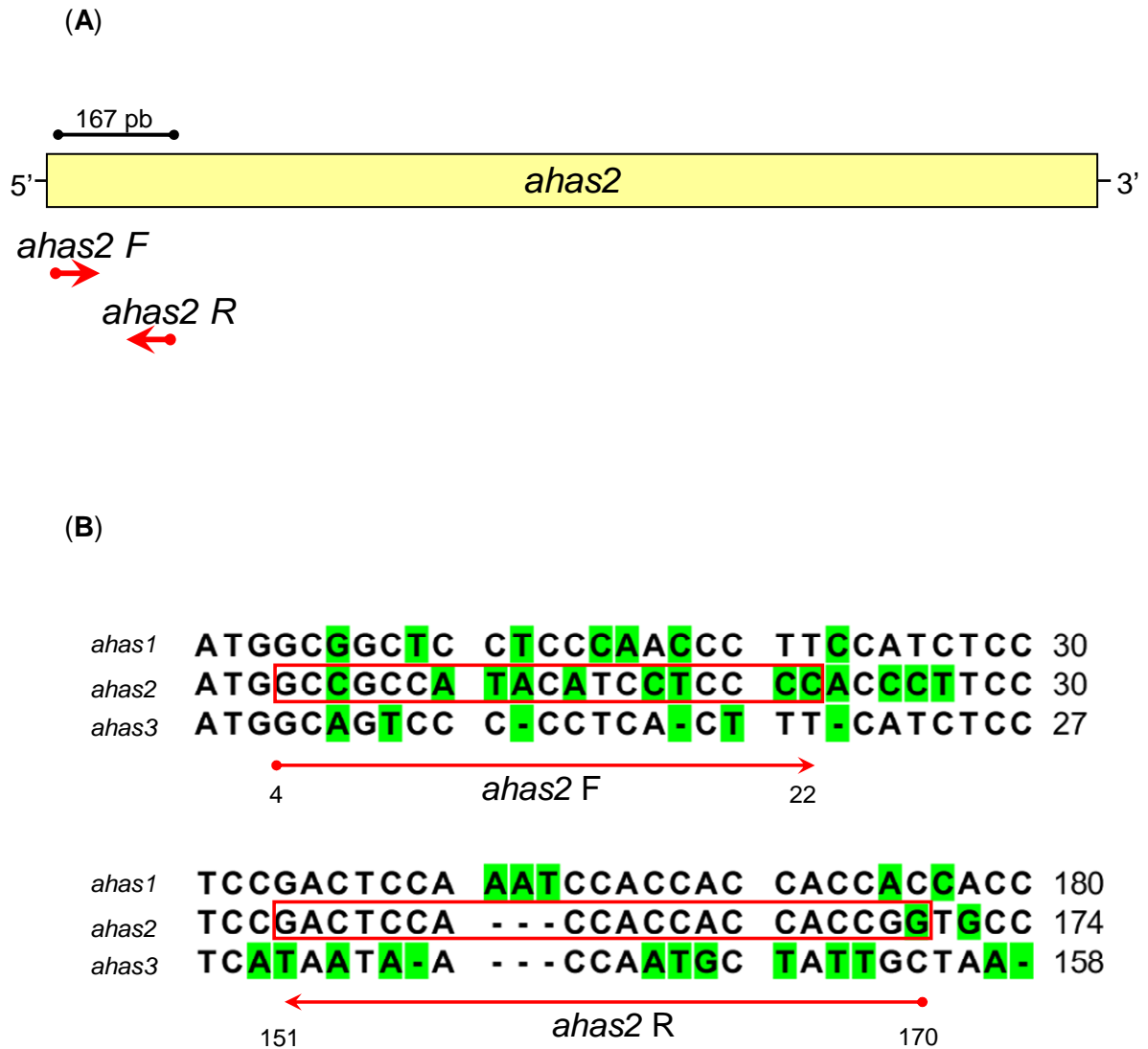
Búsqueda realizada con el programa *Blastn* 2.2.26 en la base de ESTs de girasol disponibles en la base de datos *GeneBank* del NCBI (marzo de 2011).

\*El valor E es la probabilidad de que un alineamiento con un valor igual o superior al obtenido sea debido al azar.

**Figura 2.2. (A)** Cebadores específicos para *ahas1* indicados como *ahas1 F* (cebador sentido) y *ahas1 R* (cebador antisentido). En azul se esquematiza el extremo 5' no traducido. **(B)** Cebadores específicos para *ahas1* mostrados sobre el alineamiento de las secuencias de los tres genes *ahas*. El cebador sentido se muestra sobre el alineamiento de ESTs que se extienden hacia la región 5' no traducida. El cebador antisentido (*ahas1 R*) se muestra sobre el alineamiento de los tres genes *ahas*. Las bases que difieren entre los genes están sombreadas en verde.



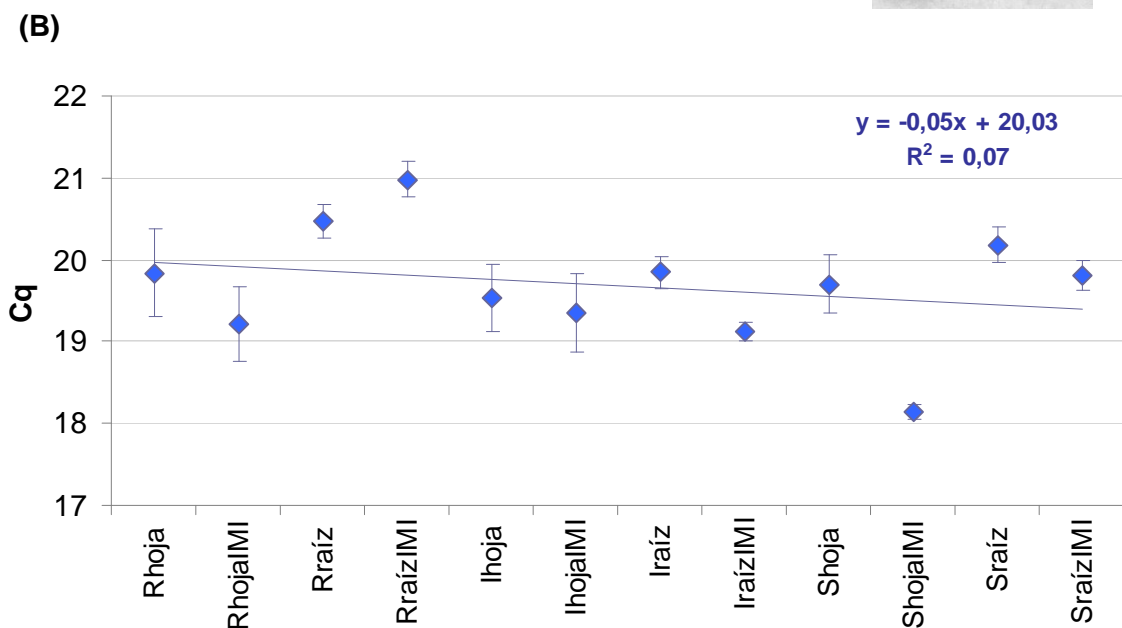
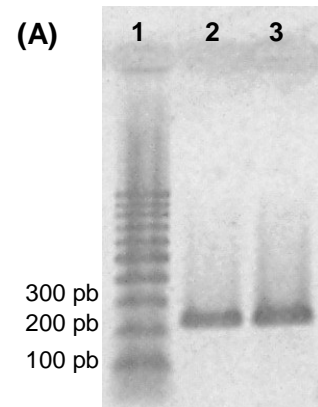
**Figura 2.3.** (A) Cebadores específicos para *ahas2* indicados como *ahas2 F* (cebador sentido) y *ahas2 R* (cebador antisentido) (B) Cebadores específicos para *ahas2* mostrados sobre el alineamiento de las secuencias de los tres genes *ahas*. Las bases que difieren entre los genes están sombreadas en verde.



Expresión de la subunidad  $\beta$  de tubulina como gen de referencia

Los cebadores diseñados para el gen de referencia permitieron amplificar una región de 243 pb de la secuencia codificante de la subunidad  $\beta$  de tubulina (Figura 2.4A). El comportamiento de este gen como gen de referencia pudo ser comprobado mediante la inspección de las desviaciones estándar para los valores de Cq obtenidos para los distintos tejidos y tratamientos analizados, los cuales fueron menores a 1 (Pfaffl *et al.*, 2004). Una segunda aproximación para estudiar la estabilidad de la expresión del gen de referencia consistió en hacer una regresión lineal de los valores medios de Cq (Figura 2.4B). Cuanto menor sea la pendiente de la recta, mayor la estabilidad de la expresión del gen (Brunner *et al.*, 2004). Cuando no se ordenan los valores de Cq, tanto la pendiente como el ajuste ( $R^2$ ) de la recta deben ser bajos (Regier y Frey, 2010).

**Figura 2.4.** (A) Sección de gel de agarosa (2% p/v): marcador de peso molecular (calle 1) y los productos de amplificación de tubulina en hoja (calle 2) y raíz (calle 3). (B) Regresión lineal de los valores medios de Cq para tubulina en diferentes tejidos (hoja y raíz), líneas (genotipo resistente -R-, intermedio -I- y susceptible -S-) y tratamientos (control y herbicida -IMI-).



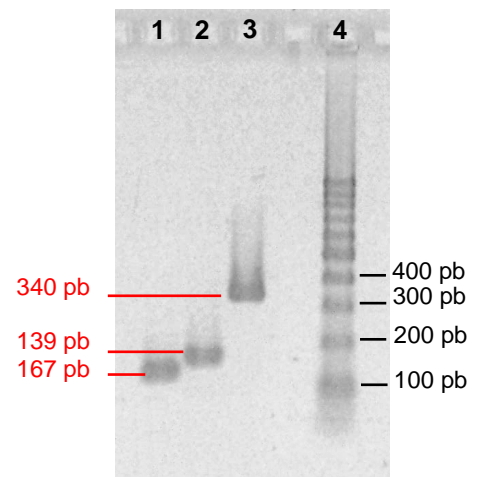
### Niveles de expresión de genes *ahas* en hoja y raíz

Utilizando los oligonucleótidos diseñados pudieron amplificarse los tres genes *ahas* para el posterior estudio de su patrón de expresión en diferentes líneas y tejidos mediante la técnica de PCR en tiempo real. Los productos de amplificación resultaron de los tamaños esperados (Figura 2.5). Para corroborar la identidad de los amplicones obtenidos, éstos fueron enviados para su secuenciación. El análisis de las secuencias obtenidas confirmó la especificidad de los cebadores diseñados. La búsqueda mediante *Blastn* en la base de datos a partir de cada secuencia resultante de la secuenciación arrojó como único resultado o *hit* el gen esperado en cada caso (96% de identidad máxima y valor  $E=6.10^{-46}$  para *ahas1*, 94% de identidad máxima y valor  $E=8.10^{-70}$  para *ahas2*, 100% de identidad máxima y valor  $E=2.10^{-178}$  para *ahas3*).

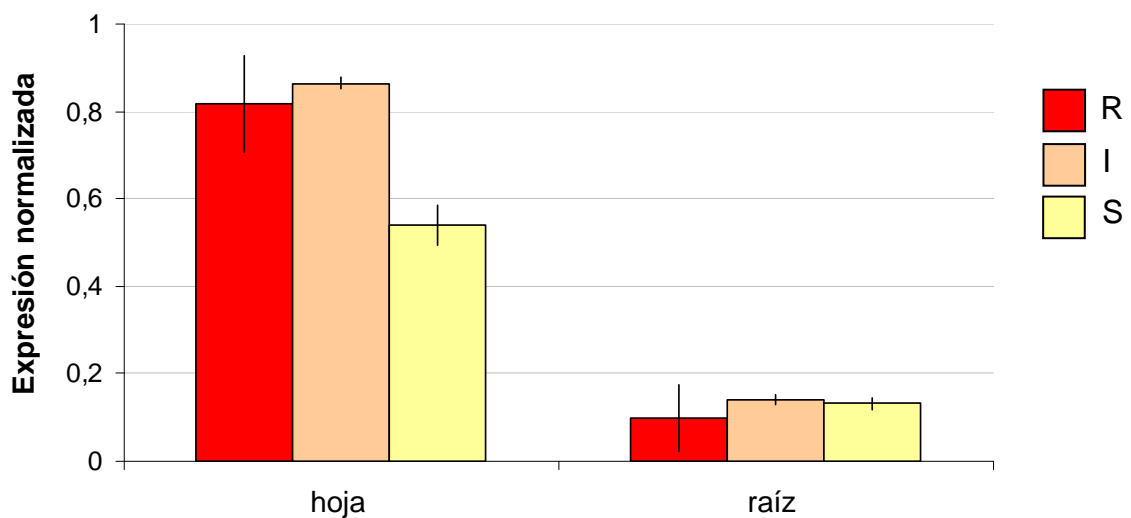
La expresión de los genes *ahas* pudo ser cuantificada mediante PCR en tiempo real (Figuras 2.6-7). La abundancia de los transcritos *ahas*, considerando la suma de *ahas1*, *ahas2* y *ahas3*, fue mayor en hoja con respecto a raíces ( $p<0,01$ ) para los tres genotipos evaluados (Figura 2.6). No se encontraron diferencias entre genotipos ( $p>0,05$ ).

La mayor expresión fue observada en hoja para el gen *ahas1*, mientras que la menor expresión correspondió a *ahas3* en raíces. Si bien la expresión de este último gen es muy baja, pudo detectarse tanto en hoja como en raíz. Los niveles de expresión de los transcritos de *ahas1* y de *ahas3* en hoja fueron aproximadamente diez veces mayores que en raíz. En cuanto a la expresión de los genes *ahas* en hoja, se encontraron diferencias significativas entre ellos, excepto para el genotipo susceptible, donde *ahas1* y *ahas2* no difirieron significativamente. También en raíces se observaron diferencias significativas en la abundancia de transcritos y *ahas3* presentó la menor expresión. No se encontraron diferencias entre *ahas1* y *ahas2* en raíces, excepto para el genotipo susceptible en el cual se observó mayor expresión de *ahas2*. Para los tres genotipos evaluados, la abundancia de los transcritos fue significativamente mayor en hoja que en raíz excepto para *ahas2* (Figura 2.7).

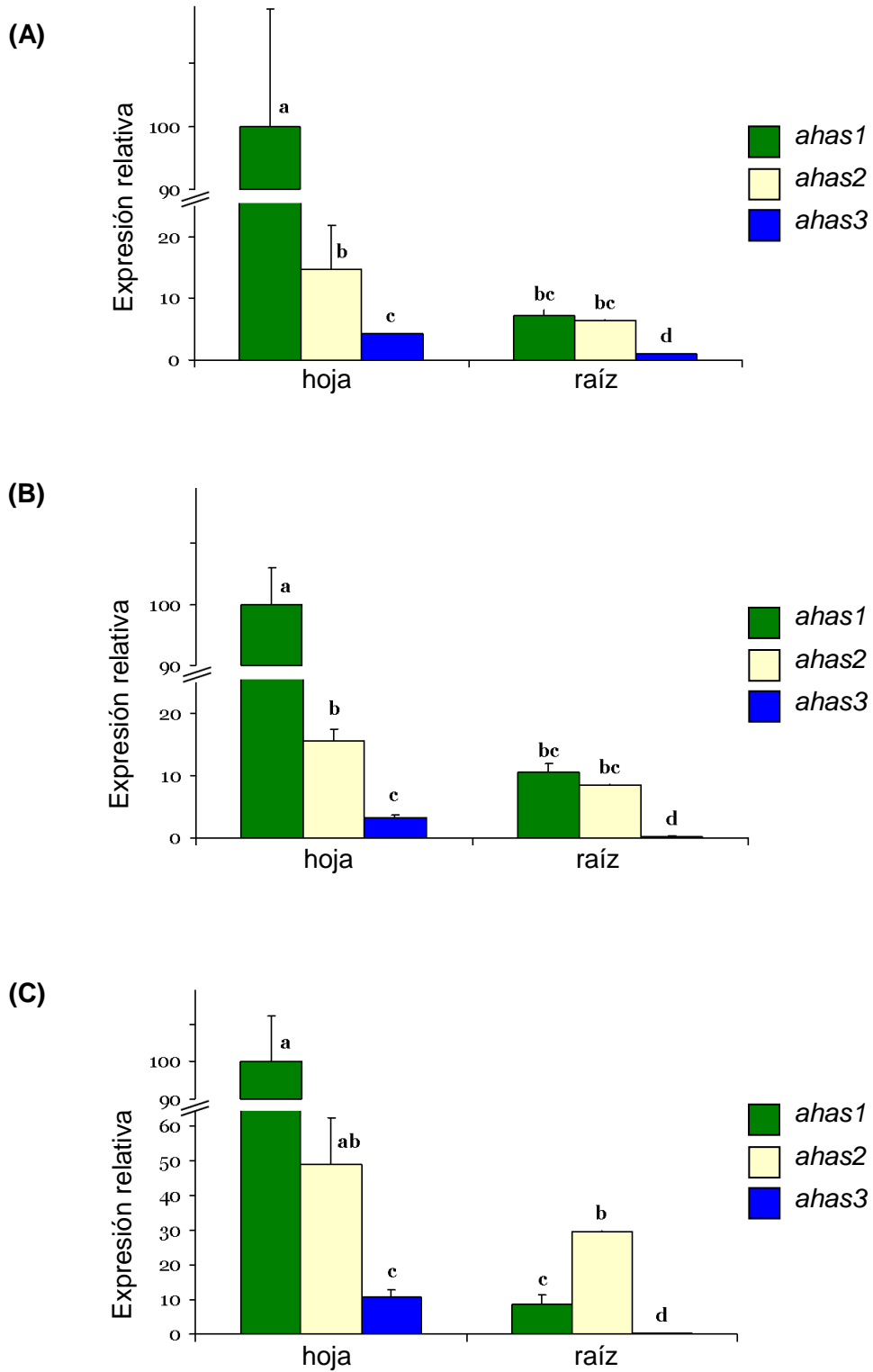
**Figura 2.5.** Sección de gel de agarosa (2% p/v). Productos de amplificación mediante RT-PCR convencional de *ahas1* (calle 1), *ahas2* (calle 2), *ahas3* (calle 3) y marcador de peso molecular (calle 4). Los pesos moleculares calculados para cada amplicón se muestran en rojo.



**Figura 2.6.** Abundancia relativa de transcritos de *ahas* en hoja y raíz para las tres líneas bajo estudio: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S). Los valores de expresión están normalizados respecto a tubulina.



**Figura 2.7.** Cuantificación relativa de transcritos de *ahas1*, *ahas2* y *ahas3* en hoja y raíz para las líneas: **(A)** HA425 de genotipo resistente, **(B)** 1058-1 de genotipo intermedio y **(C)** HA89 de genotipo susceptible. Los niveles de expresión normalizados respecto a tubulina se expresan relativos a *ahas1* en hoja. Para cada línea, los valores medios con distinta letra difieren significativamente a nivel de  $p < 0,05$  según la prueba de Tukey sobre los valores transformados con la función logarítmica.



### Expresión relativa de genes *ahas* en hoja y raíz de plántulas tratadas con imazapir

El efecto del tratamiento con herbicida sobre los niveles de expresión se muestra en la Figura 2.8. En el caso de la línea resistente no se observaron diferencias significativas entre control y tratamiento con herbicida para ninguno de los genes ni tejidos analizados.

La abundancia relativa de transcritos de *ahas2* se duplicó en respuesta al herbicida en la línea intermedia. En cuanto a la expresión del gen *ahas3*, en raíces se observó un incremento de 4-5 veces para las líneas intermedia y susceptible. Por el contrario, *ahas3* y *ahas1* mostraron una inhibición significativa de su expresión en hojas de la línea susceptible.

### **Actividad enzimática AHAS mediante ensayos *in vitro* e *in vivo***

#### Medición de actividad AHAS en hoja y raíz

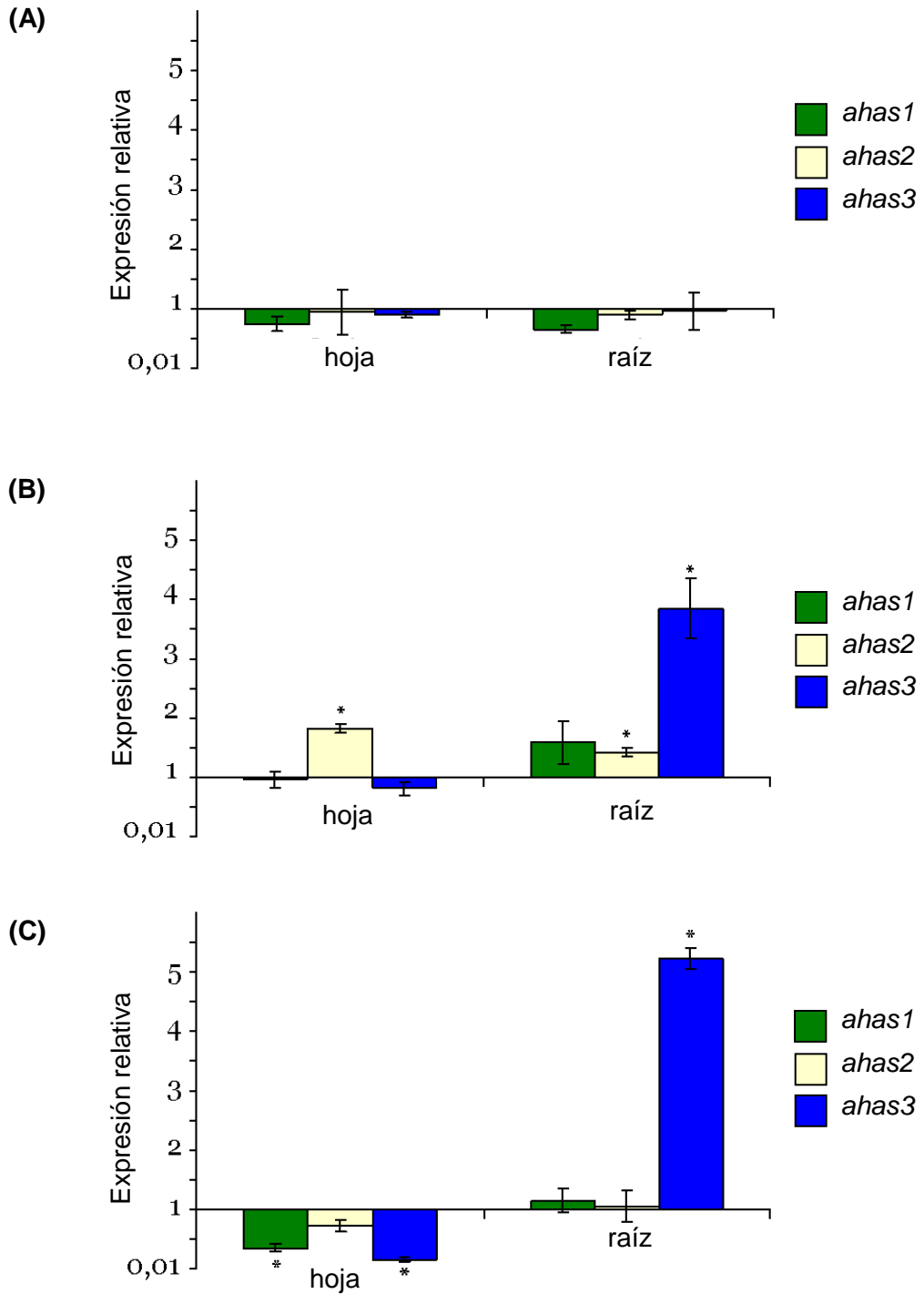
El ensayo de actividad AHAS *in vitro* permitió detectar actividad en todos los tejidos evaluados. En cuanto a la actividad *in vivo*, se observaron valores de actividad en un orden de magnitud menor que en el ensayo *in vitro*. No se observaron diferencias significativas tanto en hoja como en raíz entre las líneas evaluadas. Sin embargo, en hoja se detectaron mayores niveles de actividad que en raíz (Figura 2.9).

#### Medición de actividad AHAS en hoja y raíz de plántulas tratadas con imazapir

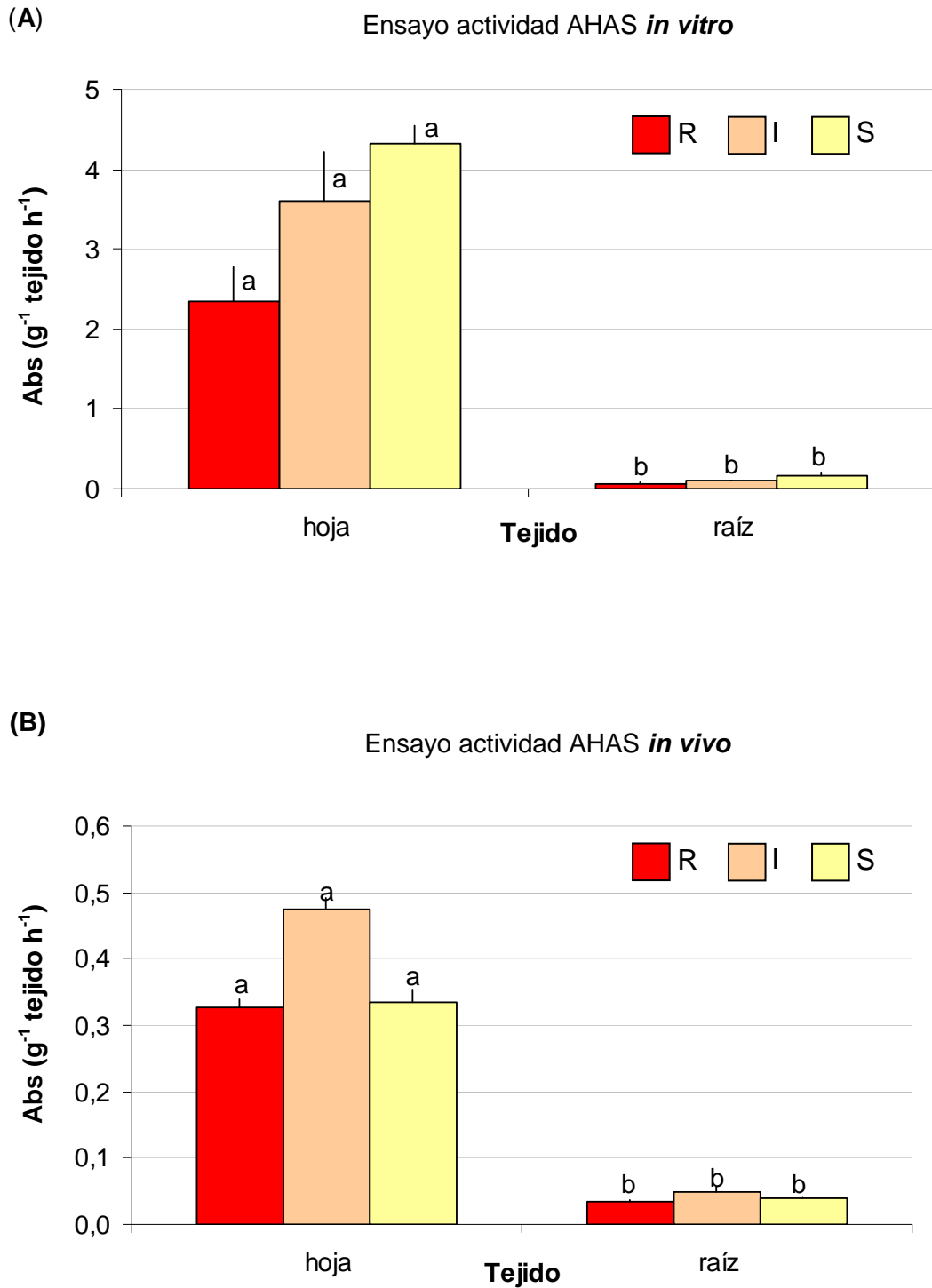
La actividad AHAS *in vitro* en plántulas tratadas con imazapir durante 48 horas disminuyó significativamente respecto a su control sólo para hojas de la línea susceptible ( $p < 0,05$ ). La actividad en hojas de esta línea fue menor al 5%. Por el contrario, en raíces se observó una disminución de aproximadamente 40% de actividad extractable (Figura 2.10A).

Se observó una disminución significativa de la actividad enzimática *in vivo* en plántulas tratadas con respecto a su controles ( $p < 0,05$ ) tanto en hoja como en raíz. La línea susceptible mostró los valores más bajos mientras que la línea intermedia y resistente se comportaron de manera similar (Figura 2.10B).

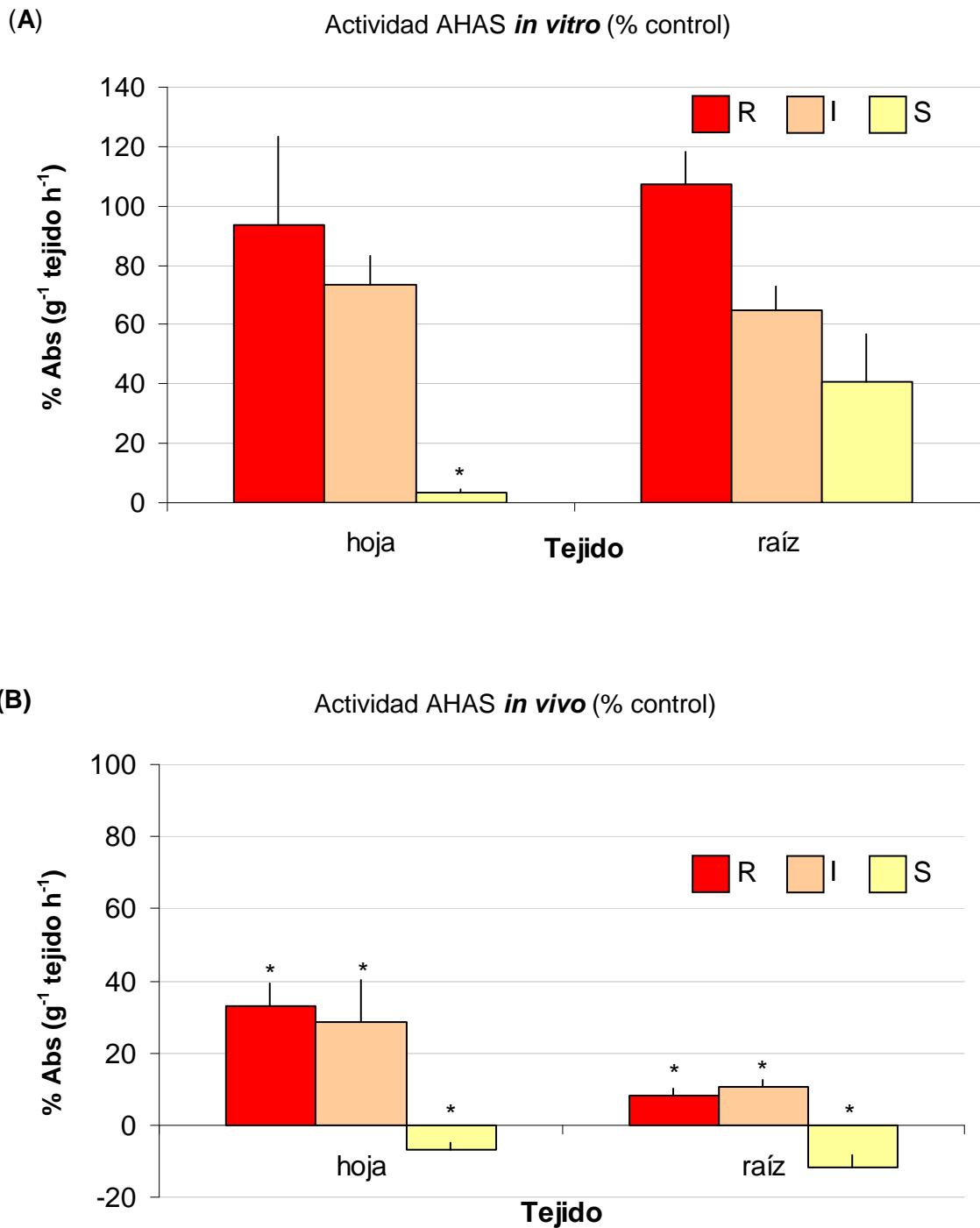
**Figura 2.8.** Expresión relativa de genes *ahas* en hojas y raíces de plántulas tratadas con herbicida. Los niveles de expresión normalizados respecto a tubulina se expresan relativos a su control, para los genes *ahas1*, *ahas2* y *ahas3* en hoja y raíz de las tres líneas evaluadas: **(A)** HA425 de genotipo resistente, **(B)** 1058-1 de genotipo intermedio y **(C)** HA89 de genotipo susceptible. \*El valor de expresión normalizada para el tratamiento con herbicida difiere significativamente respecto a su control según la prueba *t* ( $p < 0,05$ ) sobre los valores transformados con la función logarítmica.



**Figura 2.9.** Actividad enzimática AHAS evaluada en hojas y raíces de las tres líneas bajo estudio: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S). La actividad se expresó como Abs g<sup>-1</sup> tejido h<sup>-1</sup> (absorbancia a 530 nm por gramo de tejido por hora). **(A)** Actividad medida a través del ensayo *in vitro*. Los valores de actividad fueron transformados con la función logarítmica: los valores medios están calculados en base a los datos sin transformar y las letras se refieren a las medias de los valores transformados. **(B)** Actividad medida a través del ensayo *in vivo*. Los valores con distinta letra difieren significativamente a nivel de p<0,05).



**Figura 2.10.** Actividad enzimática AHAS evaluada en hojas y raíces de plántulas tratadas con 10  $\mu\text{M}$  imazapir para las tres líneas bajo estudio: HA425 de genotipo resistente (R), 1058-1 de genotipo intermedio (I) y HA89 de genotipo susceptible (S). **(A)** Actividad medida a través del ensayo *in vitro*. **(B)** Actividad medida a través del ensayo *in vivo*. La actividad en ambos ensayos se expresó como porcentaje respecto al control de  $\text{Abs g}^{-1} \text{tejido h}^{-1}$  (% absorbancia a 530 nm por gramo de tejido por hora). \*Difiere significativamente respecto a su control según la prueba *t* ( $p < 0,05$ ) sobre los valores transformados con la función logarítmica.



## DISCUSIÓN

En el presente trabajo pudo cuantificarse la abundancia de los transcritos de los genes *ahas* de girasol mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Según lo reportado en la bibliografía, en dos ocasiones se intentó cuantificar la expresión de estos genes pero no fue posible dado que los cebadores producían eficiencias desiguales (Kolkman *et al.*, 2004; Hawley, 2005). En el presente trabajo, la eficiencia obtenida fue 1,68 para *ahas1*, 1,67 para *ahas2* y 1,72 para *ahas3*; y fueron consideradas en el cálculo de expresión relativa. A su vez, en uno de estos trabajos no se detectó amplificación mediante RT-qPCR para *ahas3* (Hawley, 2005). El análisis de los cebadores utilizados por estos estudios permite reconocer que los mismos hibridan en regiones con escasas diferencias entre los genes *ahas*. Además del problema de eficiencias reportado, la especificidad de estos cebadores también estaría comprometida.

La estrategia utilizada en el presente trabajo, dada la elevada similitud entre los genes *ahas*, incluyó una extensiva búsqueda de cebadores que hibridasen en regiones con la mayor cantidad de diferencias de bases para el diseño de oligonucleótidos parálogo-específicos. A su vez, la recopilación de información en la base de datos de ESTs permitió extender la secuencia del transcripto *ahas1* hacia el extremo 5' no traducido para el diseño del cebador sentido (*ahas1F*) en dicha región. Estrategias similares fueron adoptadas para el estudio de otras familias génicas, dado que la divergencia en los extremos no traducidos permite diferenciar la expresión de cada uno de los miembros (Miki *et al.*, 2005; Chen y McManus, 2006; Vinje *et al.*, 2011).

La proporción de ESTs correspondientes a un determinado gen respecto a un conjunto de ESTs generados en ciertas condiciones experimentales refleja el nivel de expresión del mismo (Paniego *et al.*, 2010). Según lo indicado por algunos autores, la búsqueda en la base de datos de ESTs de girasol produjo diez alineamientos significativos para *ahas1*, uno para *ahas2* y ninguno para *ahas3* (Kozik *et al.*, 2002; Kolkman *et al.*, 2004; Hawley, 2005). Estos resultados permitían explicar que AHAS1 se constituía en la isoforma más abundante. La base de datos disponible en la actualidad se amplió a más del doble con respecto a la consultada por los autores (116.245 entradas de ESTs para *Helianthus annuus* a la fecha). Esto puede explicar que la búsqueda realizada en la actualidad, mostrada en la Tabla II.III, arroje resultados diferentes ampliando la cantidad de ESTs que fueron asignados a *ahas2*.

Los resultados encontrados en este trabajo indican que los tres genes *ahas* se expresan a nivel transcripcional, siendo *ahas1* el transcripto más abundante en hoja y *ahas3*

el de menor expresión. A su vez, la expresión fue significativamente mayor en hoja que en raíz excepto para *ahas2*. Estos resultados coinciden en parte con los reportados por Kolkman *et al.* (2004), quienes encontraron que los tres genes *ahas* se expresaban en meristemas apicales y hojas; si bien no pudo cuantificarlos por los problemas técnicos antes mencionados. Por su parte, Hawley (2005) en su trabajo de tesis reportó que *ahas1* es el transcripto con mayor expresión en hoja, encontrándose 50 veces más que en raíz. En el presente trabajo, la relación hoja/raíz encontrada para *ahas1* fue de diez. De manera similar, en el mencionado trabajo de tesis se reportó que *ahas2* se expresa ocho veces más en hoja que en raíz mientras que en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas para *ahas2* entre hoja y raíz. Estas discrepancias pueden estar dadas por los diferentes estadios de los tejidos utilizados, además de las diferencias técnicas anteriormente mencionadas.

Las mutaciones, tanto naturales como inducidas, que confieren resistencia a inhibidores de AHAS en girasol fueron encontradas sólo en *ahas1* por lo que se ha inferido que este gen codificaría para la isoforma principal de la subunidad catalítica de AHAS (White *et al.*, 2003; Kolkman *et al.*, 2004; Hawley, 2005; Sala *et al.*, 2008b; Sala y Bulos, 2012a). Sin embargo, el gen *ahas2* se ubica en una región de bajo polimorfismo (Kolkman *et al.*, 2004) por lo tanto este hecho también debe tomarse en consideración dado que puede explicar que no se hayan encontrado mutantes para el mismo. Si bien *ahas1* corresponde al transcripto más abundante en hoja, considerando los resultados del presente trabajo se deduce que el aporte de *ahas2* al *pool* de enzima no resulta despreciable. Futuras investigaciones deberían ser llevadas a cabo para conocer los niveles de genes *ahas* en otros tejidos y estadios de desarrollo. En particular, sería interesante cuantificar la expresión en tejidos reproductivos dado que en otras especies como colza y algodón se encontraron isoformas AHAS de expresión específica en óvulos y tejidos extra-embriónicos (Ouellet *et al.*, 1992) y anteras (Gruła *et al.*, 1995). En este sentido, es interesante considerar que el tratamiento con imazapir en estadios reproductivos de plantas de girasol de genotipos resistentes produce esterilidad. Si bien no se conoce la causa de este hecho, podría atribuirse a la inhibición de isoformas diferentes de la codificada por *ahas1*, el cual porta alelos resistentes en dichos materiales (Sala y Bulos, 2012b).

La presencia de múltiples copias *ahas* puede reflejar el origen evolutivo de la especie, como es el caso de tabaco (Lee *et al.*, 1988), colza (Rutledge *et al.*, 1991), algodón (Gruła *et al.*, 1995) y trigo (Pozniak *et al.*, 2004). Los genes duplicados pueden retener su función original, diversificarse en cuanto a su regulación o función, o silenciarse al menos una de sus isoformas (Adams y Wendel, 2005). El mantenimiento de más de un gen funcional que

codifica para AHAS puede resultar a partir de la necesidad de expresión variable de estos genes en diferentes órganos o etapas de desarrollo. A su vez, las diferentes formas de AHAS pueden tener diferentes propiedades bioquímicas tales como distintos pH óptimos o distintas respuestas a la inhibición por *feedback* que permiten mantener el *pool* de enzima necesario para el crecimiento de la planta en diferentes condiciones.

En el caso de girasol, la existencia de tres genes *ahas* puede corresponderse con el origen paleopoliploide propuesto para el género *Helianthus* (Jackson y Murray, 1983). A su vez, considerando que estos genes no poseen intrones y la gran abundancia de retrotransposones en el genoma de girasol (Cavallini *et al.*, 2010), el origen de la familia génica *ahas* podría deberse a eventos de duplicación por retrotransposición. El estudio filogenético de estos genes y sus secuencias flanqueantes en especies del género *Helianthus* permitiría dilucidar el origen de esta familia génica.

La respuesta al tratamiento con herbicida a nivel de transcripción no fue uniforme entre los genes *ahas* en los distintos tejidos y genotipos evaluados. El cambio más pronunciado se observó para *ahas3* en raíces de las líneas de genotipos intermedio y susceptible mostrando un aumento de 4-5 veces. Sólo para hojas de la línea susceptible se encontró una disminución en cuanto a los niveles de transcritos *ahas*. Los resultados encontrados en el presente trabajo coinciden en parte con estudios previos realizados en *Arabidopsis*, los cuales mostraron que el genotipo resistente tratado con imazapir no exhibía cambios significativos en su transcriptoma (Manabe *et al.*, 2007). En dicho estudio, el genotipo susceptible o *wild type* mostró numerosos cambios en su perfil transcriptómico al ser tratado con imazapir, incluyendo un leve aumento en la expresión de *ahas*. Por otro lado, se ha observado en arroz un efecto inhibitorio del herbicida imazetapir sobre la expresión de *ahas* en hojas pero no en raíces (Qian *et al.*, 2009). Si bien la regulación transcripcional no es un mecanismo de regulación principal en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Manabe *et al.*, 2007; Odell *et al.*, 1990), existirían diferencias entre especies y tejidos. A su vez, la transcripción de cada uno de los genes *ahas* en girasol parecería estar sujeta a diferentes mecanismos de regulación.

La actividad enzimática en hojas y raíces de plantas control y tratadas con herbicida pudo ser cuantificada mediante dos metodologías denominadas *in vivo* e *in vitro*. Es importante destacar que, según lo encontrado en la bibliografía, el ensayo *in vivo* sólo se ha empleado para tejidos aéreos. El protocolo desarrollado en el presente trabajo se constituye en la primera aplicación reportada de esta técnica para medir actividad enzimática *in vivo* en raíces. Las técnicas *in vivo* se constituyen en una herramienta importante para investigar de

manera sencilla la actividad AHAS en diferentes tejidos, estadios reproductivos y genotipos, tanto para fines de investigación básica como para su aplicación en el diagnóstico de resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS.

Tanto en la cuantificación relativa de transcriptos como en los ensayos de actividad enzimática, la mayor expresión de genes *ahas* se observó en hoja. La relación hoja/raíz observada a nivel transcriptómico fue igual a 6 en promedio para los tres genes. En cuanto a la actividad enzimática *in vitro*, esta diferencia entre tejidos se magnificó encontrándose 32 veces más actividad en hoja que en raíz. Por el contrario, el ensayo de actividad AHAS *in vivo* mostró una relación similar al encontrado a nivel de transcripto.

La correspondencia entre nivel de transcripto y cantidad de enzima pudo ser corroborada en varios estudios (Degrande *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2011). En un trabajo reciente, una línea de cebada resistente a imidazolinonas mostró una abundancia de transcripto *ahas* cuatro veces mayor que la línea original. De igual manera, se observó una mayor cantidad de enzima en la línea resistente. Los autores sostienen que una mayor expresión podría compensar una menor funcionalidad de la isoforma mutada y contribuir a la viabilidad completa de la planta (Lee *et al.*, 2011). Por otro lado, en ciertos estudios se observó una mayor actividad específica AHAS para ciertos genotipos que no se correlacionaba a nivel transcripcional (Dewaele *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2003). En dichos casos, la mayor actividad medida puede deberse a una distinta funcionalidad de la enzima en cada genotipo o por modificaciones post-transcripcionales.

La sobreexpresión del gen *ahas* de *A. thaliana* en tabaco transgénico resultó en un aumento de 25 veces la cantidad de transcripto pero sólo el doble de la actividad enzimática, sugiriendo una falta de correlación entre la cantidad de enzima y el ARNm (Odell *et al.*, 1990). Por otro lado, la falta de niveles igualmente altos de la subunidad regulatoria de la enzima puede explicar esta falta de correspondencia. Los resultados del mencionado estudio resultan importantes para entender las limitaciones de la sobreexpresión de genes *ahas* como mecanismo de resistencia y sus implicancias agronómicas.

Dado que no se encontraron diferencias entre las líneas evaluadas para la expresión de AHAS en plantas control, quedaría excluida la posibilidad de que las diferencias genotípicas en cuanto al grado de resistencia estuvieran asociadas a mayores niveles de actividad o transcriptos *ahas*. La sobreexpresión de genes *ahas* que conlleven a una mayor actividad enzimática específica no es un mecanismo de resistencia común para estos herbicidas. Los dos casos reportados en la bibliografía corresponden a materiales obtenidos por mutagénesis y selección (Harms *et al.*, 1992; Caretto *et al.*, 1994).

Como se mencionó anteriormente, los niveles de expresión AHAS por masa de tejido fueron mayores en hojas que en raíces. Resultados similares fueron encontrados para la actividad AHAS medida en plántulas de maíz (Rubin y Casida, 1985; Sander y Barret, 1989; Forlani *et al.*, 1991), sorgo (Barret, 1989), haba de Lima (Schmitt y Singh, 1990), trigo (Dastgheib y Field, 1998) y cebada (Zhang *et al.*, 2009). Por el contrario, en otras especies como colza o achicoria se reportaron niveles similares de actividad en ambos tejidos (Degrande *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Es interesante destacar que la distribución de la actividad AHAS en diferentes tejidos varía según el estadio de desarrollo. Plantas de habas de 14 días mostraron una mayor actividad en hojas mientras que a partir de los 28 días se revirtió esta situación, encontrándose un mayor nivel en raíces que en hojas (Schmitt y Singh, 1990).

Las mutaciones que producen cambios aminoacídicos en AHAS y confieren resistencia a herbicidas pueden causar modificaciones en la actividad enzimática. En este sentido, se han encontrado resultados divergentes. En varias especies se ha reportado un aumento en la actividad específica de genotipos resistentes (Boutsalis *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003, Figueroa *et al.*, 2008; Ashigh *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010) mientras que en otras se ha reportado lo opuesto (Bernasconi *et al.*, 1995; Eberlein *et al.*, 1997; Preston *et al.*, 2006; Ashigh y Tardif, 2007) aún para mutaciones equivalentes. Por ejemplo, la mutación Trp574Leu aumentó la actividad específica en un 30% en *A. thaliana* (Chang y Duggleby, 1998) mientras que la misma mutación en *Xanthium* sp. resultó en una disminución del 80% (Bernasconi *et al.*, 1995). En el presente trabajo, los niveles de actividad AHAS en plantas control no difirieron entre los genotipos evaluados por lo que la presencia de la mutación Ala205Val en las líneas resistente e intermedia no estaría afectando la actividad enzimática en girasol. Esta mutación ha sido encontrada en cuatro especies, tres de las cuales corresponden a las malezas resistentes *Xanthium strumarium* (Woodworth *et al.*, 1996), *Amaranthus retroflexus* (McNaughton *et al.*, 2005) y *Solanum ptychanthum* (Ashigh y Tardif; 2007). En el último caso, se encontró una menor actividad específica AHAS para el biotipo resistente. Estas diferencias entre enzimas provenientes de genotipos susceptible y resistente no estarían necesariamente relacionados con la mutación que confiere resistencia, sino que podrían explicarse considerando diferencias de expresión, estabilidad o de la capacidad catalítica intrínseca de la enzima de cada biotipo.

La inhibición enzimática de las imidazolinonas incubadas *in vitro* no es comparable a la actividad extractable de plantas tratadas previamente con estos herbicidas (Muhitch *et al.*, 1987; Stidham y Shaner, 1990; Zhou *et al.*, 2010). Este hecho se debe a que estos herbicidas son inhibidores enzimáticos de unión fuerte pero de acción lenta (Muhitch *et al.*,

1987; Durner *et al.*, 1991). Considerando estos antecedentes, el ensayo *in vitro* se realizó con plantas control y plantas tratadas, midiéndose la actividad AHAS extractable en cada caso. Los resultados encontrados (Figura 2.10A) son similares a los reportados para girasol silvestre, en los que el tratamiento con 10  $\mu$ M imazetapir o imazamox redujo la actividad a un 62% y 20% con respecto a los controles en biotipos silvestres resistentes y susceptibles, respectivamente (Al-Khatib *et al.*, 1998; Baumgartner *et al.*, 1999). Del estudio enzimático en híbridos de girasol cultivado en respuesta a imazamox se desprenden valores de inhibición muy similares, 66% y 18% para la dosis de 10  $\mu$ M (Bozic *et al.*, 2012). Paralelamente se llevaron a cabo estudios de actividad *in vivo*, mediante el cual los productos de la enzima se acumulan en los propios tejidos y luego son cuantificados. Con este ensayo, la inhibición enzimática causada por el tratamiento con 10  $\mu$ M imazapir fue más pronunciada que en el ensayo *in vitro* (Figura 2.10). De manera similar, Zelaya y Owen (2004) reportaron para girasol silvestre una actividad *in vivo* del 56% en el biotipo resistente y del 3% en el biotipo susceptible al tratarse las plantas con 10  $\mu$ M imazetapir, presentando ambos genotipos el mismo nivel de actividad para los controles.

Los niveles de resistencia observados *in vitro* en general son mayores que para los ensayos *in vivo*, según lo reportado en trabajos donde se conducen los dos tipos de experimentos para diferentes especies vegetales (Dastgheib y Field, 1998; Hwang *et al.*, 2000; Kuk *et al.*, 2003a,b; Kuk *et al.*, 2004; Figueroa *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, ambas metodologías permiten detectar tendencias similares respecto a lo observado en cuanto a la fitotoxicidad en planta entera. Los menores niveles de resistencia en ensayos enzimáticos *in vivo*, comparados con la respuesta obtenida *in vitro*, sugieren que factores adicionales a la inhibición del sitio de acción como son la absorción, transporte y metabolismo del herbicida estarían mediando la respuesta *in vivo* a los inhibidores AHAS (Simpson *et al.*, 1995).

En diversas especies con isoformas AHAS susceptibles a herbicidas se ha reportado que la actividad *in vitro* en raíces resultaba menos sensible a inhibidores de AHAS comparada con la respuesta en hojas (Rubin y Casida, 1985; Schmitt y Singh, 1990; Royuela *et al.*, 1991). Un comportamiento similar fue observado en la línea susceptible evaluada en el presente trabajo, cuya actividad *in vitro* fue menor al 5% en hoja pero más de 40% en raíces de plantas tratadas con 10  $\mu$ M imazapir (Figura 2.10A). La respuesta diferencial entre hojas y raíces podría estar relacionada con el comportamiento a nivel transcripcional, para el cual se observó una inducción en los niveles de transcriptos *ahas* en raíz y una inhibición en hoja (Figura 2.8C). Esta regulación génica tejido-específica

posibilitaría la presencia de una mayor cantidad de enzima en raíces, lo que a su vez podría “diluir” el efecto del herbicida y arrojar mayores niveles de resistencia en dicho tejido.

Las líneas de genotipo resistente e intermedio coinciden en la constitución genética para *Imr1* (*Imr1Imr1*), portando alelos resistentes para *ahas1*, mientras que el genotipo susceptible es homocigota recesivo para este *locus*. Estas diferencias se vieron reflejadas en la actividad AHAS, ya que las líneas resistente e intermedia se comportaron de manera similar mientras que la línea susceptible se vio más afectada por el herbicida (Figura 2.10). A su vez, las líneas resistente e intermedia presentaron una mayor inhibición *in vivo* en raíces que en hojas (Figura 2.10B), lo que podría corresponderse a una mayor presencia en raíces de isoformas susceptibles codificadas por *ahas2* presentes en el *pool* de enzima. Esta explicación resulta consistente con los resultados obtenidos para raíces a nivel transcripcional, en los cuales la expresión de *ahas1* y *ahas2* son equivalentes. De manera similar, estos resultados están de acuerdo con lo encontrado a nivel fenotípico ya que los parámetros de crecimiento radical resultaron los más sensibles para discriminar grados de resistencia (Vega *et al.*, 2009; Breccia *et al.*, 2011).

## CONCLUSIONES

- Una mayor abundancia de transcriptos *ahas* fue encontrada en hoja con respecto a raíces en plántulas de girasol en estadio V2, los cuales se correspondieron a los niveles de actividad AHAS observados tanto en el ensayo *in vivo* como *in vitro*.
- La mayor expresión fue observada en hoja para el gen *ahas1*. Los menores niveles de transcriptos fueron encontrados para *ahas3*. Los genes *ahas1* y *ahas2* mostraron similar abundancia de transcriptos en raíces.
- La respuesta al tratamiento con 10  $\mu$ M de imazapir difirió entre genotipos y a su vez fue gen y tejido-dependiente. La línea resistente no exhibió cambios significativos en sus niveles de transcriptos. Raíces de las líneas de genotipos intermedio y susceptible mostraron un aumento de 4-5 veces en la expresión de *ahas3*. Sólo para hojas de la línea susceptible se encontró una disminución en cuanto a la abundancia de transcriptos *ahas* en respuesta al tratamiento con herbicida.
- La actividad AHAS *in vitro* se vio afectada por la aplicación de imazapir sólo para hojas de la línea susceptible. La actividad en raíces mostró una menor sensibilidad a la inhibición por el herbicida.
- Para la actividad enzimática *in vivo* se encontró una mayor inhibición causada por el tratamiento con herbicida que en el ensayo *in vitro*. El genotipo susceptible fue el más afectado. A su vez, las raíces mostraron una disminución más pronunciada que en hojas para las tres líneas evaluadas en el ensayo *in vivo*.

## **CAPÍTULO 3**

**Efecto de inhibidores de citocromo P450 monooxigenasas  
sobre la resistencia a imazapir**

**CAPÍTULO 3:**  
**Efecto de inhibidores de citocromo P450 monooxigenasas**  
**sobre la resistencia a imazapir**

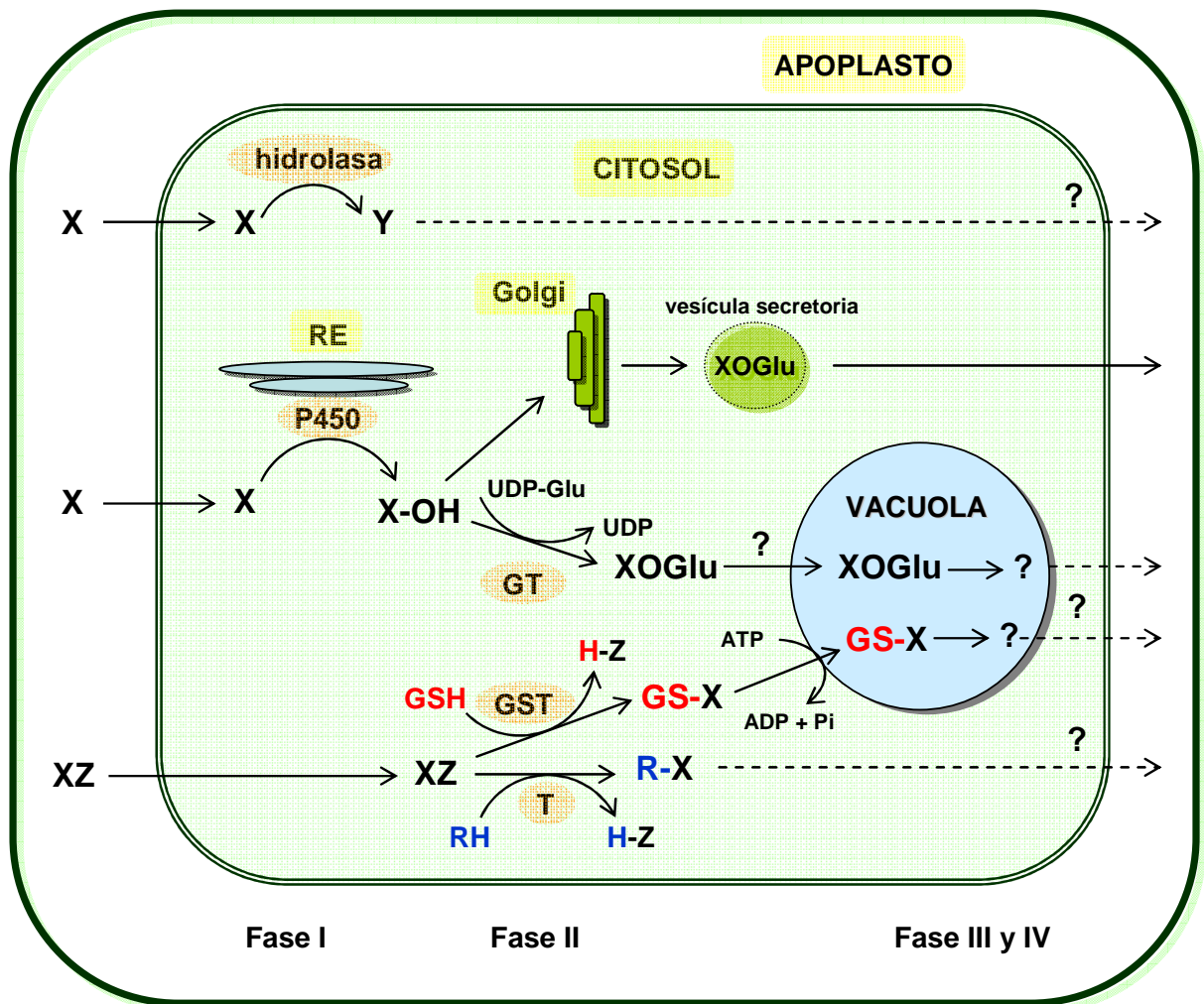
**INTRODUCCIÓN**

El metabolismo de un herbicida incluye a todas aquellas reacciones bioquímicas que producen la modificación en la estructura química de la molécula de herbicida. Un cambio químico menor en el compuesto puede causar un cambio drástico en su actividad biológica (Cole, 1994). Cuando los procesos metabólicos transforman el herbicida a compuestos no tóxicos y minimizan la cantidad de herbicida activo que alcanza el sitio de acción son considerados mecanismos de resistencia o tolerancia (Preston, 2004; De Prado y Franco, 2004).

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, o sea de aquellos compuestos químicos extraños presentes en el medio ambiente (Van Eerd *et al.*, 2003; Sandermann, 2004; Kvesitadze *et al.*, 2006). Algunas plantas son tolerantes a ciertos herbicidas que afectan a especies cercanas, este fenómeno se conoce como selectividad y se basa en la capacidad diferencial de detoxificación del compuesto (Kreuz *et al.*, 1996; Carvahlo *et al.*, 2009). La selectividad es un fenómeno explotado en la agricultura para el control de malezas en cultivos que son tolerantes a un herbicida en particular (Brown, 1990; Cole, 1994). Esta propiedad también se ha utilizado para producir cultivos resistentes por ingeniería genética (Cole, 1994; Tan *et al.*, 2006; Duke, 2011). Por otro lado, el metabolismo del herbicida es uno de los mecanismos de resistencia en malezas que emergen por el uso continuo de los mismos (De Prado y Franco, 2004; Powles y Yu, 2010; Beckie y Tardif, 2012).

El metabolismo de los herbicidas puede describirse en cuatro fases: (I) funcionalización o activación, (II) conjugación, (III) deposición o compartimentación y (IV) degradación adicional (Yuan *et al.*, 2007). Estos procesos se esquematizan en la Figura 3.1. En la fase I, las moléculas de herbicida son activadas para que ciertos grupos funcionales sean expuestos a las enzimas de fase II. Las reacciones de fase I incluyen reacciones químicas como oxidación, reducción o hidrólisis y en algunos casos producen metabolitos menos tóxicos e hidrosolubles (Van Eerd *et al.*, 2003). Las reacciones de oxidación

**Figura 3.1.** Metabolismo de xenobióticos y probables vías asociadas. X y XZ son herbicidas, Z representa a un grupo electrofílico dentro de la molécula de herbicida que puede ser desplazado por glutatión (GSH) u otro grupo conjugable (RH). P450: citocromo P450 monooxigenasa, RE: retículo endoplasmático, GT: glucosiltransferasa, Glu: glucosa, GST: glutatión-S-transferasa, T: transferasa. Adaptado de Kreuz *et al.* (1996), Coleman (1997) y De Prado y Franco (2004).



mediadas por las citocromo P450 monooxigenasas (P450s) u oxidasas de función mixta juegan un rol importante de detoxificación en la fase I (Siminsky, 2006). La fase II involucra la conjugación del herbicida activado con una molécula más grande e hidrofílica que permite el reconocimiento por los transportadores de fase III. Los xenobióticos puede conjugarse con, glucosa, otros azúcares, glutatión, otros aminoácidos o péptidos (Coleman, 1997; Cummins *et al.*, 2011). Esta transformación enzimática produce una molécula más polar y menos tóxica. En algunos casos, los herbicidas pueden ser directamente conjugados sin haber sufrido reacciones de fase I (Kreuz *et al.*, 1996). También pueden ocurrir conjugaciones secundarias, siendo el caso más común la esterificación con malonato de los gluco-conjugados (Van Eerd *et al.*, 2003). En la fase III ocurre el transporte de la molécula conjugada hacia la vacuola o al espacio extracelular mediante transporte activo. Los transportadores de tipo ABC son el grupo más común involucrado en esta fase (Klein *et al.*, 2006; Conte y Lloyd, 2011). Finalmente, la fase IV corresponde a procesos adicionales de degradación en la vacuola o en el espacio extracelular (Yuan *et al.*, 2007).

Cuatro grandes familias de proteínas han sido involucradas en la detoxificación de herbicidas: las citocromo P450s que actúan en la fase I (Werck-Reichhart *et al.*, 2000; Siminsky, 2006), las glutatión-S-transferasas (Dixon *et al.*, 2002; Cummins *et al.*, 2011) y las glicosiltransferasas (Breton *et al.*, 2006; Lairson *et al.*, 2008) en la fase II y los transportadores ABC (Kang *et al.*, 2011) involucrados en la fase III (Yuan *et al.*, 2007). En cuanto a la resistencia a herbicidas encontrada en malezas, los tres primeros sistemas enzimáticos mencionados fueron implicados en mecanismos mediados por metabolismo. A su vez, se han reportado enzimas específicas involucradas en la resistencia a herbicidas, como ser la aril-acilamidasa que cataliza el metabolismo de propanil (De Prado y Franco, 2004; Preston, 2004; Powles y Yu, 2010; Beckie y Tardiff, 2012).

Las citocromo P450s constituyen una de las familias más abundantes en plantas (245 en *Arabidopsis*), siendo la tercera familia génica después de las proteínas con caja F y los receptores tipo kinasas. Al presente, 5100 secuencias de citocromo P450s de plantas han sido anotadas. Estas proteínas tienen una función clave en generar la diversidad química propia de las plantas y resultan un excelente espejo de su evolución y del rol del metabolismo en el desarrollo y la adaptación (Bak *et al.*, 2011; Nelson y Werck-Reichhart, 2011).

Las citocromo P450s se encuentran en la superficie citoplasmática del retículo endoplasmático y catalizan reacciones extremadamente diversas sobre una gran variedad de sustratos. En general, éstas se basan en la activación del oxígeno molecular con la

posterior inserción de uno de sus átomos sobre el sustrato y la reducción del otro átomo de oxígeno para formar agua:



De esta manera se clasifican como monooxigenasas dependientes de NADPH. Los electrones del NADPH son transferidos uno por uno a través de flavoproteínas asociadas denominadas citocromo P450 reductasas (Jensen y Møller, 2010). Las citocromo P450s reducidas pueden unir monóxido de carbono en vez de oxígeno, lo que resulta en el corrimiento del máximo de absorbancia hacia 450 nm (Omura y Sato, 1964) lo que llevó a nombrarlas como P450: "Pigmentos que absorben a 450 nm" (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000; Schuler y Werck-Reichhart, 2003).

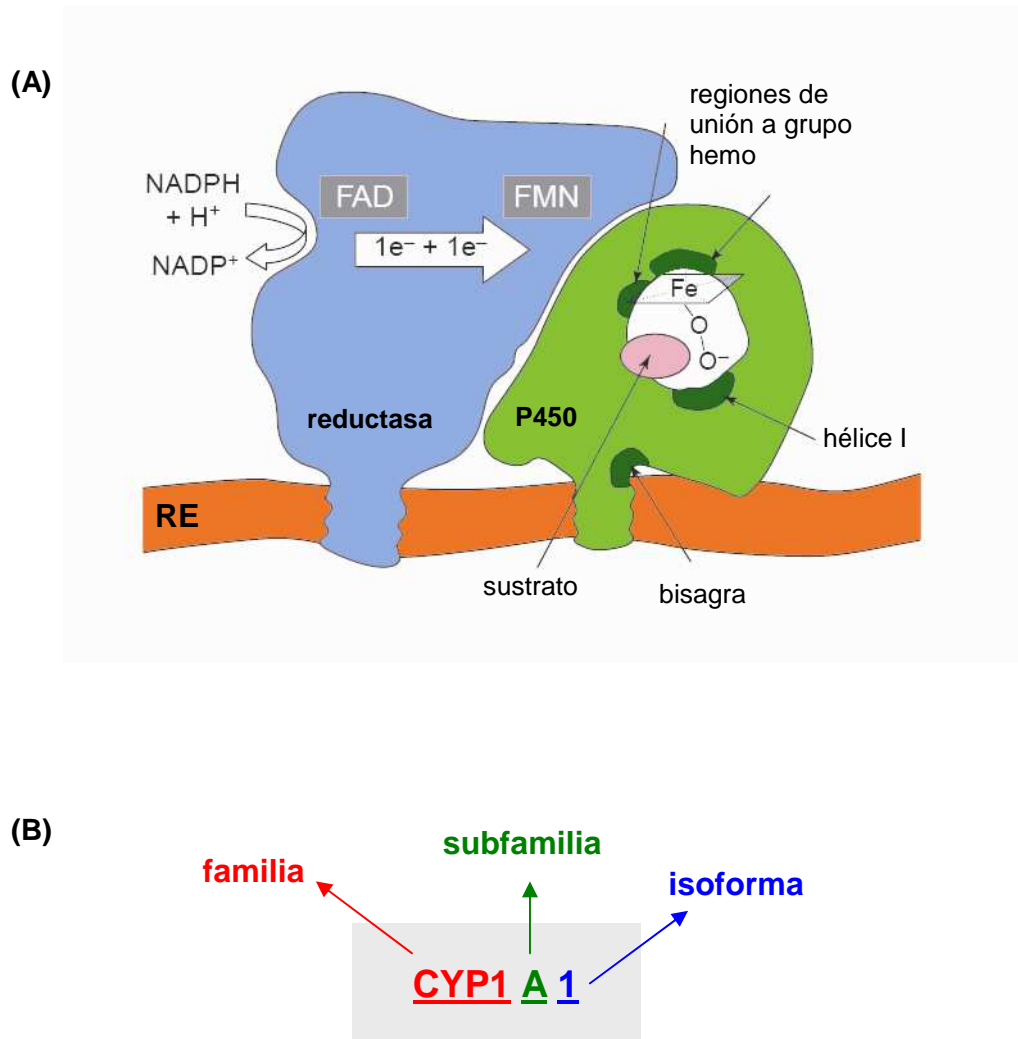
Todas las citocromo P450s poseen un sitio activo en común, con el hierro del grupo hemo coordinado al tiolato de una cisteína conservada. A pesar de la baja identidad a nivel de secuencia primaria, estas proteínas presentan la misma topología y plegamiento tridimensional (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000; Schuler y Werck-Reichhart, 2003). La representación esquemática de estas enzimas y su estructura se muestra en la Figura 3.2A.

Además de las reacciones de hidroxilación anteriormente mencionadas, las citocromo P450s catalizan una gran variedad de transformaciones químicas sobre una miríada de sustratos dentro de las que se incluyen desalquilaciones, isomerizaciones, descarboxilaciones, desaminaciones y desesterificaciones (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000; Schuler y Werck-Reichhart, 2003; Mizutani y Sato, 2011)

El sistema común de nomenclatura para los genes de citocromo P450s de todos los organismos se basa en la identidad de la secuencia aminoacídica (Figura 3.2B). Las secuencias que comparten más del 40% de identidad son agrupadas en la misma familia y designadas como CYP seguido de un número (CYP1, CYP2, etc.). Las secuencias con más de 55% de identidad se dividen en subfamilias nombradas con caracteres alfabéticos (CYP1A, CYP1B, etc.). A su vez, números adicionales son utilizados para designar los *loci* individuales (CYP1A1, CYP1A2, etc.) y las variantes alélicas (v1, v2, etc.) (Schuler y Werck-Reichhart, 2003). Los nombres de P450s de plantas son asignados desde CYP71A a CYP99XY y de CYP701A en adelante (Bak *et al.*, 2011). Cada uno de los genes fue nombrado en orden cronológico por el comité de nomenclatura de P450<sup>1</sup>. Cabe mencionar que las reglas de nomenclatura tienen varias excepciones en plantas debido a los eventos de duplicación génica y reorganización que adicionan dificultad al proceso de anotación. Por

<sup>1</sup> <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>

**Figura 3.2. (A)** Estructura de citocromo P450 monoxigenasas (P450s) de plantas. Las citocromo P450s y las reductasas asociadas se localizan en la membrana del retículo endoplasmático (RE) por anclaje de su extremo N-terminal. Una porción globular también interactúa con la membrana. Los dominios altamente conservados de citocromo P450 se muestran en verde oscuro, dos de los cuales se ven involucrados en la unión al grupo hemo. Las otras regiones conservadas corresponden a una región rica en prolina que conecta la porción globular con la hélice de unión a membrana (bisagra) y una porción de hélice I involucrada en la activación del oxígeno y la transferencia de protones al sitio activo. Unos pocos residuos que interactúan con la reductasa también son conservados. La mayoría de las regiones son altamente variables, especialmente aquellas involucradas en el reconocimiento del sustrato. Existen al menos dos reductasas diferentes en plantas. La función de las mismas es proveer los electrones a la oxigenasa, transfiriéndolos desde NADPH a través de FAD o FMN. **(B)** Nomenclatura de citocromo P450s. Adaptado de Werck-Reichhart *et al.* (2000).



ello, también se considera la organización génica y aspectos filogenéticos para la asignación de familias (Bak *et al.*, 2011; Nelson y Werck-Reichhart, 2011).

Dado que las funciones de las citocromo P450s son extremadamente diversas, éstas pueden hallarse en todo tipo de tejidos y sus patrones de expresión son regulados a través del desarrollo y en respuesta a numerosos tipos de estrés (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). Estudios de expresión en microarreglos de 227 genes de *Arabidopsis*<sup>1</sup> demostraron la expresión tejido-específica de un 43% mientras que 18 genes podrían considerarse de expresión constitutiva (Ehltng *et al.*, 2008). Las P450s participan en una gran variedad de vías metabólicas que incluyen reacciones biosintéticas, catabólicas y de detoxificación. Su rol en el metabolismo anabólico incluye la síntesis de macromoléculas estructurales (como lignina, cutina y suberina), de hormonas (giberelinas, auxina, brasinosteroides), pigmentos como antocianina, compuestos de defensa (isoflavonoides, terpenos, glucósidos cianogénicos, etc.) y protectores UV (flavonoides, cumarinas, etc.) (Ralston y Yu, 2006; Bak *et al.*, 2011). Numerosas reacciones corresponden a procesos generales que median funciones comunes en plantas. En otras ocasiones, existen P450s particulares que catalizan reacciones específicas de ciertas plantas (Schuler y Werck-Reichhart, 2003).

Además de las reacciones biosintéticas anteriormente mencionadas, las citocromo P450s son responsables del catabolismo de un amplio rango de sustratos endógenos así como también de compuestos químicos exógenos como ser herbicidas, insecticidas y otros contaminantes. La variedad de reacciones mediadas resultan en productos que normalmente son más reactivos y más solubles y permiten continuar las etapas siguientes de la detoxificación (Werck-Reichhart *et al.*, 2000; Schuler y Werck-Reichhart, 2003; Siminsky, 2006).

La participación de las citocromo P450s en el metabolismo de las principales clases de herbicidas fue demostrada en numerosos trabajos. La evidencia de ello proviene principalmente de ensayos bioquímicos utilizando microsomas (Zimmerlin y Durst, 1992; Polge y Barret, 1995; Topal *et al.*, 1996; Gläβgen *et al.*, 1999; Deng y Hatzios, 2003). Es importante destacar que la participación de citocromo P450s en el metabolismo de un herbicida no significa necesariamente que existe un mecanismo de resistencia mediado por esta vía. La velocidad y la extensión de la conversión metabólica debe ser la adecuada para proteger a las plantas de la acción del herbicida y de esta manera conferir resistencia o tolerancia (Siminsky, 2006). Por ejemplo, la hidroxilación de imazetapir ocurre tanto en maíz como en soja pero la posterior glucosilación se produce en mayor extensión sólo en plantas

---

<sup>1</sup> <http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/index.html>

de la leguminosa, lo cual explica la diferencia en la tolerancia de estas dos especies (Shaner y Mallipudi, 1991).

Es interesante destacar que el descubrimiento y la comercialización de los inhibidores de AHAS en la década de los '90 fue una de las principales fuerzas impulsoras para la investigación sobre la participación de las citocromo P450s en el metabolismo de herbicidas (Siminsky, 2006). Ello se debe a que la selectividad de varios cultivos a estos herbicidas está mediada por vías que involucran a las citocromo P450s (Teclé *et al.*, 1993; Persans y Schuler, 1995; Polge y Barret, 1995; Frear y Swanson, 1996; Koeppe *et al.*, 2000). A su vez, estas enzimas fueron identificadas como responsables en la tolerancia o resistencia a inhibidores de AHAS en malezas (Preston *et al.*, 1996; Hinz *et al.*, 1997; Veldhuis *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004).

El estudio de la detoxificación de herbicidas mediada por citocromo P450s puede abordarse mediante distintas aproximaciones. La caracterización *in vitro* de las citocromo P450s involucradas en la detoxificación de herbicidas es dificultosa ya que éstas se encuentran en bajas cantidades, están asociadas a membranas y son muy inestables (Werck-Reichhart *et al.*, 2000; Siminsky, 2006). Los métodos mayormente utilizados se basan en la aplicación *in vivo* de inhibidores o inductores de citocromo P450s y el posterior análisis de metabolitos (Veldhuis *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004; Menendez y De Prado, 1996, 1997; Menendez *et al.*, 2006) o la posterior determinación de fitotoxicidad en planta entera (Hidayat y Preston, 2001; Osuna *et al.*, 2002; Yasuor *et al.*, 2008, 2009; Beckie *et al.*, 2012).

La reversión de la resistencia debida a la presencia de inhibidores de citocromo P450s evaluada en planta entera se constituye en una primera aproximación para detectar mecanismos de detoxificación mediados por esta vía. Los principales inhibidores de citocromo P450s utilizados *in vivo* son compuestos químicos como el 1-aminobenzotriazol (ABT) (Burnet *et al.*, 1993a,b; Bravin *et al.*, 2001; Yasuor *et al.*, 2008) y piperonil butóxido (PBO) (Christopher *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1998; Osuna *et al.*, 2002), reguladores de crecimiento como *tetcyclasis* (Christopher *et al.*, 1994; Manechote *et al.*, 1997) e insecticidas organofosforados como malatión (Fischer *et al.*, 2000; Letouzé y Gasquez, 2001; Yu *et al.*, 2004, 2009; Yasuor *et al.*, 2009; Beckie *et al.*, 2012), terbufos (Frazier *et al.*, 1993; Buker *et al.*, 2004), clorpirifós (Mallory Smith *et al.*, 1999) o disulfotón (Yasuor *et al.*, 2008).

Con respecto a la identificación de enzimas involucradas en detoxificación de herbicidas en el género *Helianthus* existen algunos antecedentes. En *Helianthus tuberosus* se ha identificado el gen CYP76B1 con el que se ha transformado tabaco y *A. thaliana*

logrando incrementar la capacidad de metabolizar sulfonilureas (Didierjean *et al.*, 2002). En girasol cultivado recientemente se ha identificado una línea con tolerancia natural a múltiples herbicidas mediada por isoformas de citocromo P450s revertidas por malatión (Kaspar *et al.*, 2011). Una mayor transcripción del gen CYP71A10 de girasol sería responsable de la resistencia a variados herbicidas observada en esta línea (Kaspar *et al.*, 2010). De manera similar, una fuente alternativa de resistencia a imidazolinonas (MUT31), obtenida a partir de un programa de mutagénesis y selección, mostró ser revertida por malatión (León *et al.*, 2012).

Por lo expuesto anteriormente, se propone que uno de los mecanismos que contribuye a la resistencia a imidazolinonas en girasol podría estar relacionado con el metabolismo del herbicida mediado por citocromo P450s. El objetivo de este capítulo fue evaluar la respuesta de plántulas de girasol al tratamiento combinado de herbicida e inhibidores de citocromo P450s.

## MATERIALES Y MÉTODOS

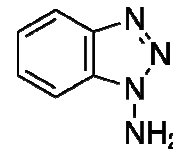
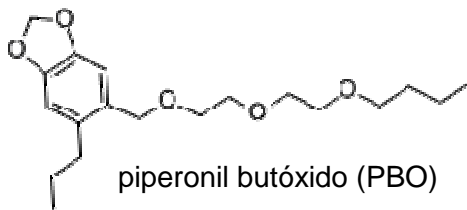
### Material Vegetal

Se utilizaron las líneas endocriadas HA425 y HA89 de genotipos resistente (*Imr1Imr1Imr2Imr2*) y susceptible (*imr1imr1imr2imr2*) respectivamente. El origen y la descripción de las mismas han sido detallados en el Capítulo 1.

La evaluación del efecto de inhibidores de citocromo P450s fue llevada a cabo a nivel de planta completa en plantas jóvenes (estadio V2 -dos hojas verdaderas-). Las plantas fueron obtenidas mediante germinación en el sistema de multimacetas descrito anteriormente.

### Herbicida e inhibidores de citocromo P450s

Se utilizó como herbicida de la familia de las imidazolinonas una formulación comercial cuyo ingrediente activo es el imazapir. Los inhibidores de citocromo P450s utilizados fueron piperonil butóxido (PBO) y 1-aminobenzotriazol (ABT).



1-aminobenzotriazol (ABT)

### Tratamiento combinado de imazapir e inhibidores de citocromo P450s

Se realizaron dos experimentos independientes, uno para cada inhibidor de citocromo P450s. Los tratamientos evaluados fueron:

- ✓ control
- ✓ imazapir 1  $\mu$ M
- ✓ imazapir 10  $\mu$ M
- ✓ imazapir 100  $\mu$ M
- ✓ inhibidor de citocromo P450s
- ✓ inhibidor de citocromo P450s + imazapir 1  $\mu$ M
- ✓ inhibidor de citocromo P450s + imazapir 10  $\mu$ M
- ✓ inhibidor de citocromo P450s + imazapir 100  $\mu$ M

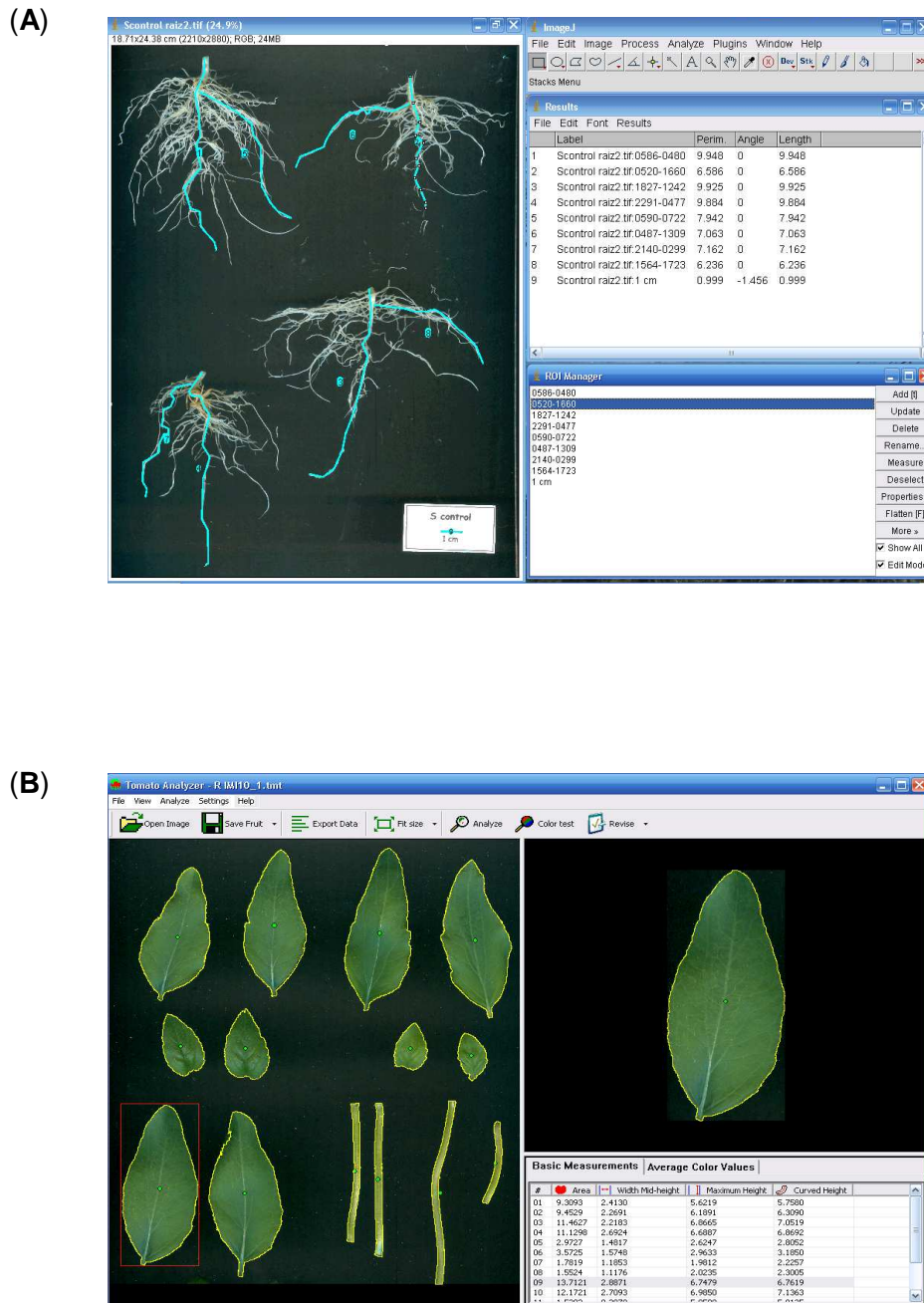
La solución base de riego consistió en una solución nutritiva formulada a base de sales de MS al 25% (Murashige y Skoog, 1962). El riego con agregado de inhibidor de citocromo P450s se realizó en plántulas de 7 días de manera de permitir la absorción del mismo sin la interferencia del herbicida. La aplicación de herbicida a través de la solución de riego se realizó al día siguiente (plántulas de 8 días) y dicho tratamiento continuó hasta el día 15. La incubación de las plántulas se realizó en condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), fotoperíodo (16/8 h luz/oscuridad) e intensidad lumínica ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Se realizaron ensayos preliminares para el ajuste de las concentraciones a utilizar para cada inhibidor y se seleccionó la mayor concentración que no causa efectos fitotóxicos: ABT 70  $\mu\text{M}$  y PBO 50  $\mu\text{M}$ .

Se evaluaron las siguientes variables:

- ✓ área foliar total (AF)
- ✓ longitud del hipocótilo (LH)
- ✓ longitud de la raíz principal (LP)
- ✓ longitud de la raíz lateral más larga (LL)
- ✓ coloración de hojas (*hue*)

La medición de todas las variables se realizó mediante análisis digital de imágenes. Las plántulas fueron seccionadas en parte aérea (hipocótilo y hojas verdaderas) y parte radical. Los restos de perlita fueron cuidadosamente removidos de los tejidos vegetales previo a la toma de imágenes. Las partes aérea y radical fueron escaneadas por separado. Se obtuvieron imágenes digitales para cada tratamiento con una resolución de 300 dpi o superior. El programa *Image J* (Abramoff *et al.*, 2004) fue utilizado para evaluar las variables de parte radical (LP y LL, Figura 3.3 A). Para evaluar las variables de parte aérea (AF, LH, ángulo *hue*) las imágenes fueron analizadas mediante el programa *Tomato Analyzer* (Figura 3.3 B) (Rodríguez *et al.*, 2010). El ángulo *hue* es un descriptor de color que puede utilizarse para cuantificar el cambio en la coloración de las hojas debido a clorosis y/o necrosis producida por el herbicida. Un valor de *hue* de  $90^\circ$  corresponde a color amarillo mientras que  $180^\circ$  representa un color verde azulado (Darrigues *et al.*, 2008).

**Figura 3.3.** Análisis digital de imágenes. **(A)** Interfase del programa *ImageJ* utilizado para la medición de variables de crecimiento radical (longitud de raíz principal y de raíz lateral más larga). **(B)** Interfase del programa *Tomato Analyzer* utilizado para la medición de variables de parte aérea (longitud de hipocótilo, área foliar y coloración de hojas).



### **Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

El diseño experimental fue en bloques completamente aleatorizados con 3 repeticiones para cada combinación de genotipo y tratamiento. Cada repetición consistió en 10 plantas (Ntotal=960).

Los datos se expresaron en base a planta individual. Para cada experimento se efectuaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de variancia previo al Análisis de la Variancia (ANOVA) y se consideraron efectos fijos de herbicida e inhibidor de citocromo P450s y la interacción entre ellos. Se compararon los valores medios de las variables evaluadas para cada genotipo utilizando la prueba de comparación múltiple de Tukey (Sokal y Rohlf, 1969).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa estadístico R (R Development Core Team, 2011).

## RESULTADOS

### Evaluación de la respuesta al tratamiento combinado de imazapir y PBO

Ensayos preliminares permitieron establecer la mayor concentración de piperonil butóxido (PBO) que no afectara el crecimiento normal de las plantas. El Análisis de la Variancia de los datos obtenidos no encontró efecto significativo de PBO ( $p > 0,05$ ) para ninguna de las variables evaluadas (Tabla III.I), lo que demuestra que la concentración utilizada resultó apropiada para la evaluación de la resistencia mediada por citocromo P450s.

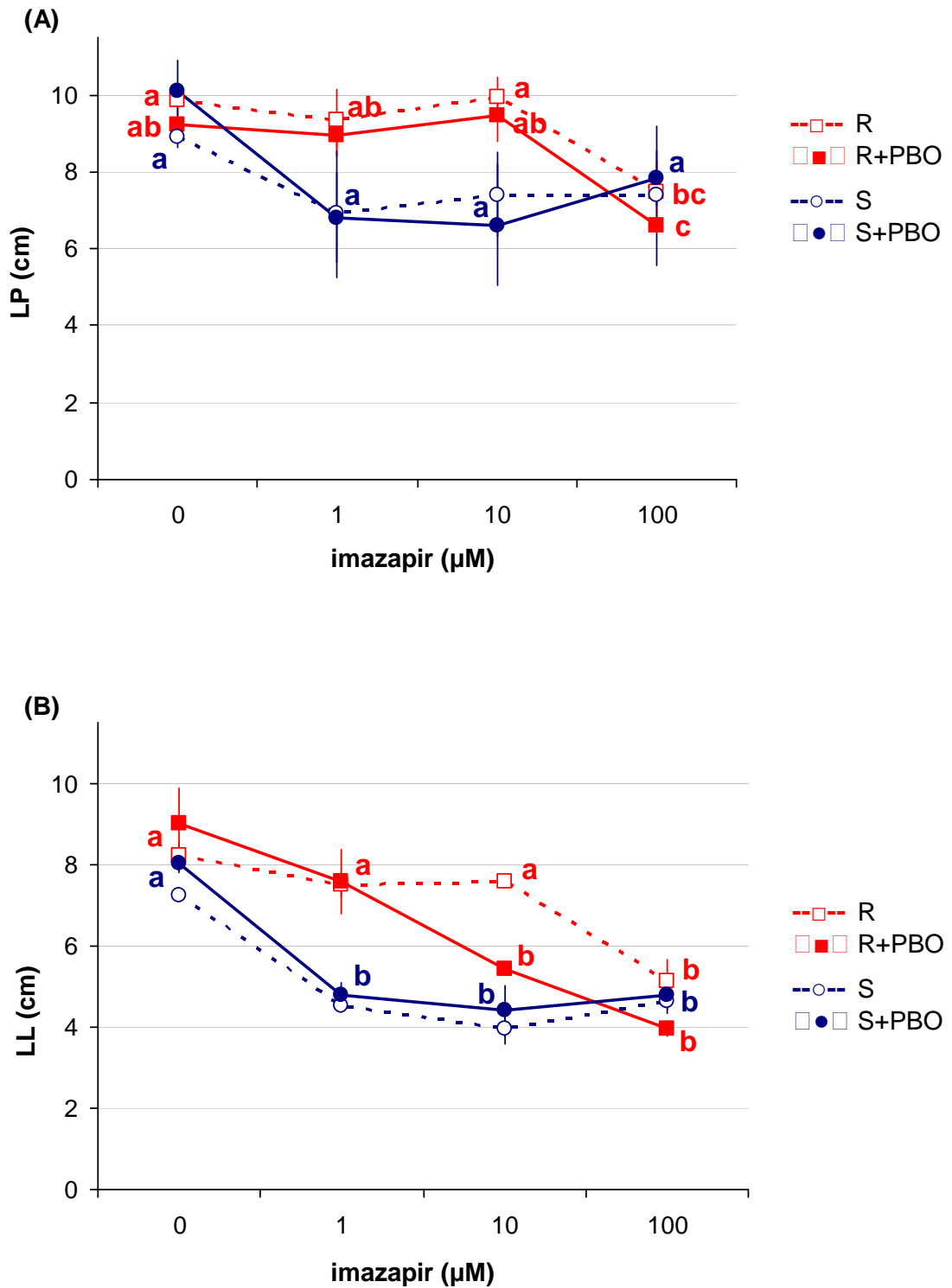
En cuanto al crecimiento radical, se detectó un efecto significativo de tratamiento con imazapir para las dos líneas evaluadas (Tabla III.I). Para la línea susceptible se observó una mayor disminución del crecimiento de raíces en función de concentraciones crecientes de herbicida (Figura 3.4). En el caso de la variable longitud lateral más larga medida en la línea resistente se observó una interacción significativa entre PBO e imazapir (Tabla III.I). La mayor diferencia en el crecimiento de raíces laterales entre ausencia y presencia de inhibidor de citocromo P450s se produjo para la concentración intermedia de herbicida (10  $\mu$ M imazapir) (Figura 3.4).

**Tabla III.I.** Análisis de la Variancia (ANOVA) para las líneas HA425 de genotipo resistente (R) y HA89 de genotipo susceptible (S) considerando efectos de herbicida (IMI) e inhibidor de citocromo P450s (PBO) y la interacción entre ellos (IMI\*PBO). LP: longitud de raíz principal, LL: longitud de raíz lateral más larga, LH: longitud de hipocótilo, AF: área foliar, *Hue*: coloración de hojas.

Línea	Variable	Efecto IMI	Efecto PBO	IMI*PBO
<b>R</b>	LP	$p < 0,001$	ns	ns
	LL	$p < 0,001$	ns	$p < 0,05$
	LH	ns	ns	ns
	AF	$p < 0,001$	ns	$p < 0,05$
	<i>Hue</i>	$p < 0,001$	ns	ns
<b>S</b>	LP	$p < 0,01$	ns	ns
	LL	$p < 0,001$	ns	ns
	LH	$p < 0,05$	ns	ns
	AF	$p < 0,001$	ns	ns
	<i>Hue</i>	$p < 0,001$	ns	ns

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

**Figura 3.4.** Efecto del tratamiento combinado de imazapir y PBO sobre el crecimiento radical de plantas de la línea resistente HA425 (R) y susceptible HA89 (S). **(A)** LP (longitud de raíz principal) **(B)** LL (longitud de raíz lateral más larga). Para cada genotipo, letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios según la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Las barras verticales representan los errores estándar de cada media ( $n=3$ ).

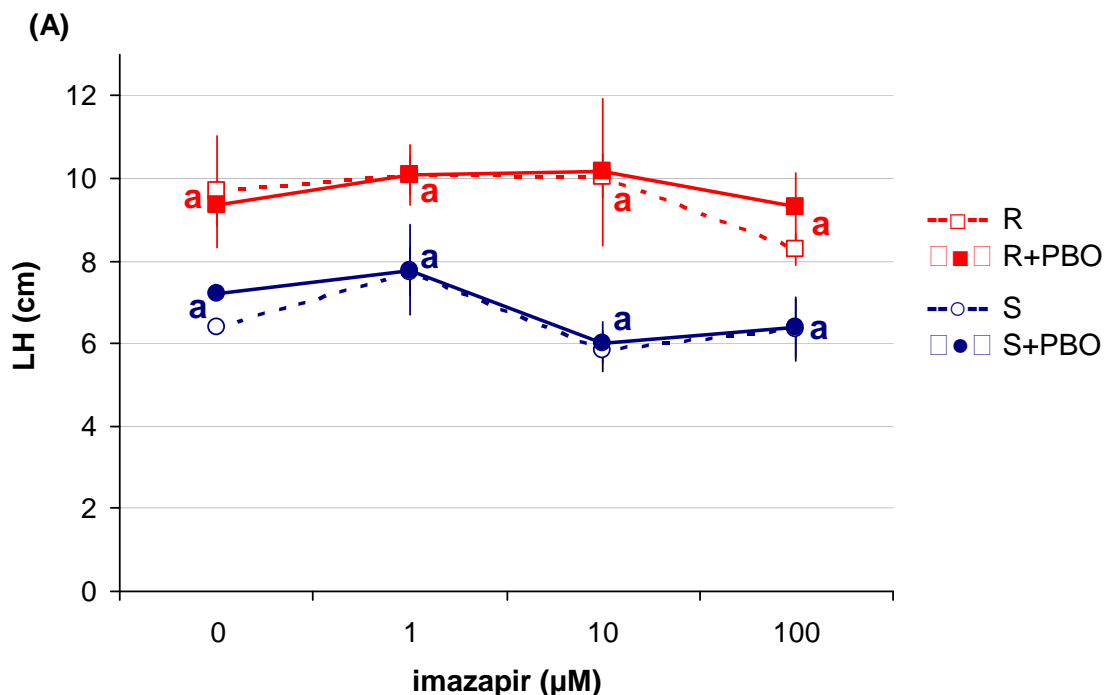


Con respecto al crecimiento aéreo, el Análisis de la Variancia detectó un efecto significativo de tratamiento con imazapir para las variables evaluadas excepto para longitud de hipocótilo en la línea resistente (Tabla III.I). La disminución del área foliar y del ángulo *hue* en función de concentraciones crecientes de herbicida fue más pronunciado para la línea susceptible, la cual disminuyó significativamente respecto al control a partir de la menor concentración de imazapir evaluada (Figuras 3.5 y 3.6).

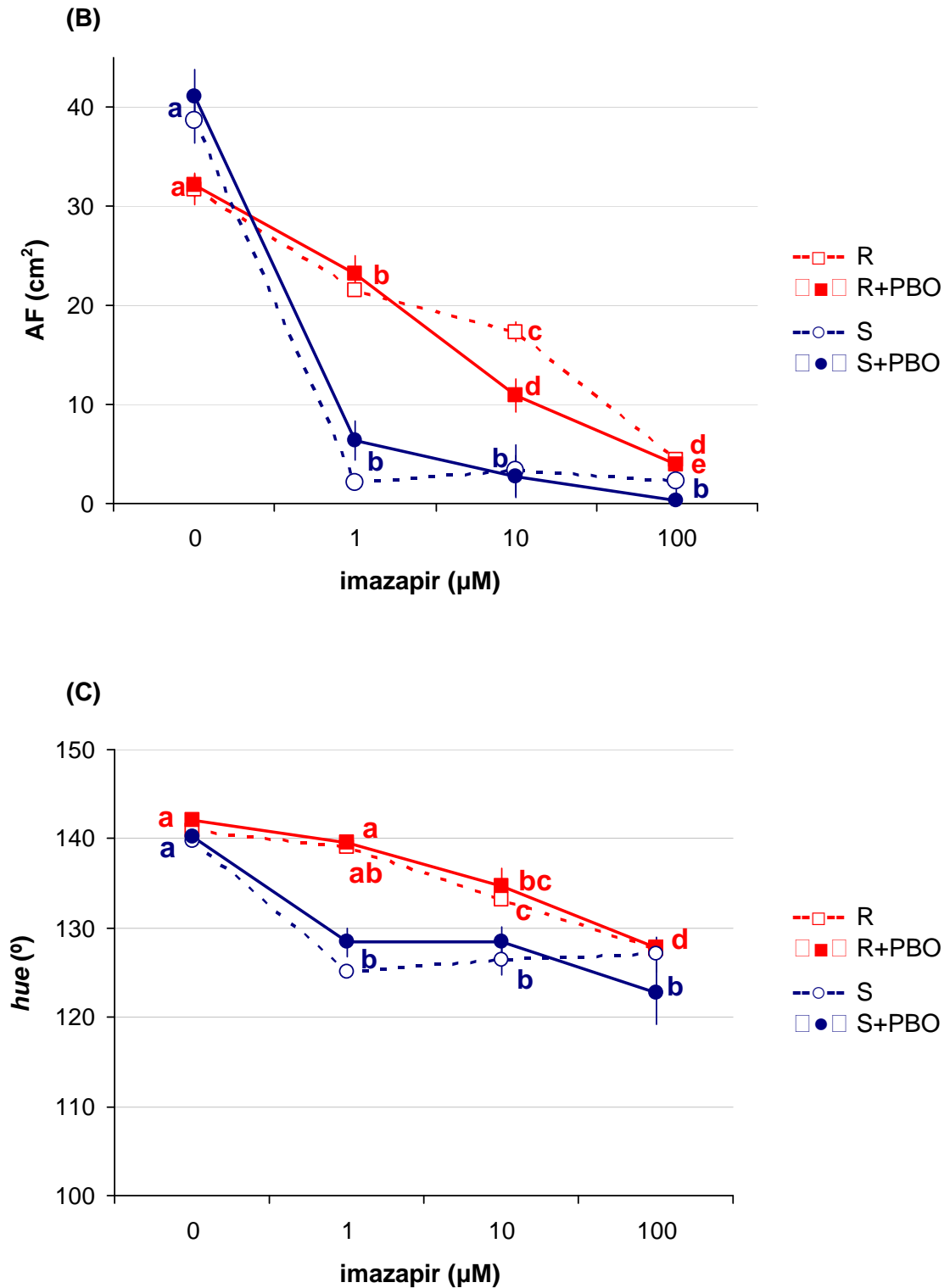
Para la línea resistente se observó una mayor disminución del área foliar en presencia de PBO para la concentración intermedia de herbicida (Figura 3.5), lo que se tradujo en una interacción significativa entre PBO e imazapir (Tabla III.I).

Cabe destacar que la coloración del primer par de hojas verdaderas pudo ser cuantificada mediante el valor del ángulo *hue* promedio por hoja. La disminución del valor *hue* en función de dosis crecientes de herbicida estuvo relacionada con la aparición de síntomas en las hojas tales como clorosis y necrosis (Figura 3.7).

**Figura 3.5.** Efecto del tratamiento combinado de imazapir y PBO sobre variables de parte aérea de plantas de la línea resistente HA425 (R) y susceptible HA89 (S). (A) LH (longitud de hipocótilo). Para cada genotipo, letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios según la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Las barras verticales representan los errores estándar de cada media ( $n=3$ ).



**Figura 3.5** (continuación). Efecto del tratamiento combinado de imazapir y PBO sobre variables de parte aérea de plantas de la línea resistente HA425 (R) y susceptible HA89 (S). **(B)** AF (aérea foliar) y **(C)** *hue* (coloración de hojas). Para cada genotipo, letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios según la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Las barras verticales representan los errores estándar de cada media ( $n=3$ ).

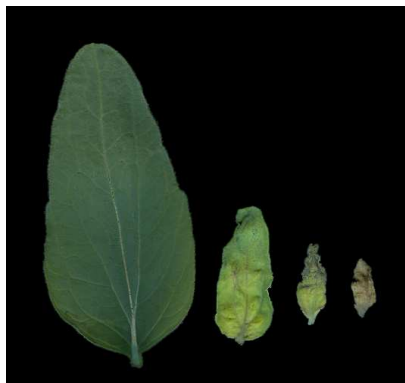


**Figura 3.6.** Plántulas de 15 días de la línea HA89 de genotipo susceptible. Tratamiento control (atrás), imazapir 1  $\mu$ M (adelante, izquierda) y 100  $\mu$ M (adelante, derecha).



**Figura 3.7.** Efecto del herbicida imazapir sobre las hojas de plantas de 15 días de líneas HA425 de genotipo resistente (A) y HA89 de genotipo susceptible (B) tratadas con concentraciones crecientes de herbicida. De izquierda a derecha para cada foto: 0 (control), 1, 10 y 100  $\mu$ M imazapir.

(A) Línea Susceptible



(B) Línea Resistente



### Evaluación de la respuesta al tratamiento combinado de imazapir y ABT

El Análisis de la Variancia de los datos obtenidos no mostró efecto significativo ( $p > 0,05$ ) para el inhibidor 1-aminobenzotriazol (ABT), excepto para la variable longitud de hipocótilo (Tabla III.II). La concentración utilizada resultó apropiada para el estudio de la respuesta al tratamiento combinado de herbicida e inhibidor a través de las variables evaluadas, a excepción de longitud de hipocótilo.

Se encontró un efecto significativo de tratamiento con imazapir para todas las variables evaluadas. Para la línea susceptible se observó una mayor disminución tanto del crecimiento de raíces (Figura 3.8) como de la coloración de las hojas (*hue*) y del área foliar (Figura 3.9) en función de dosis crecientes de herbicida.

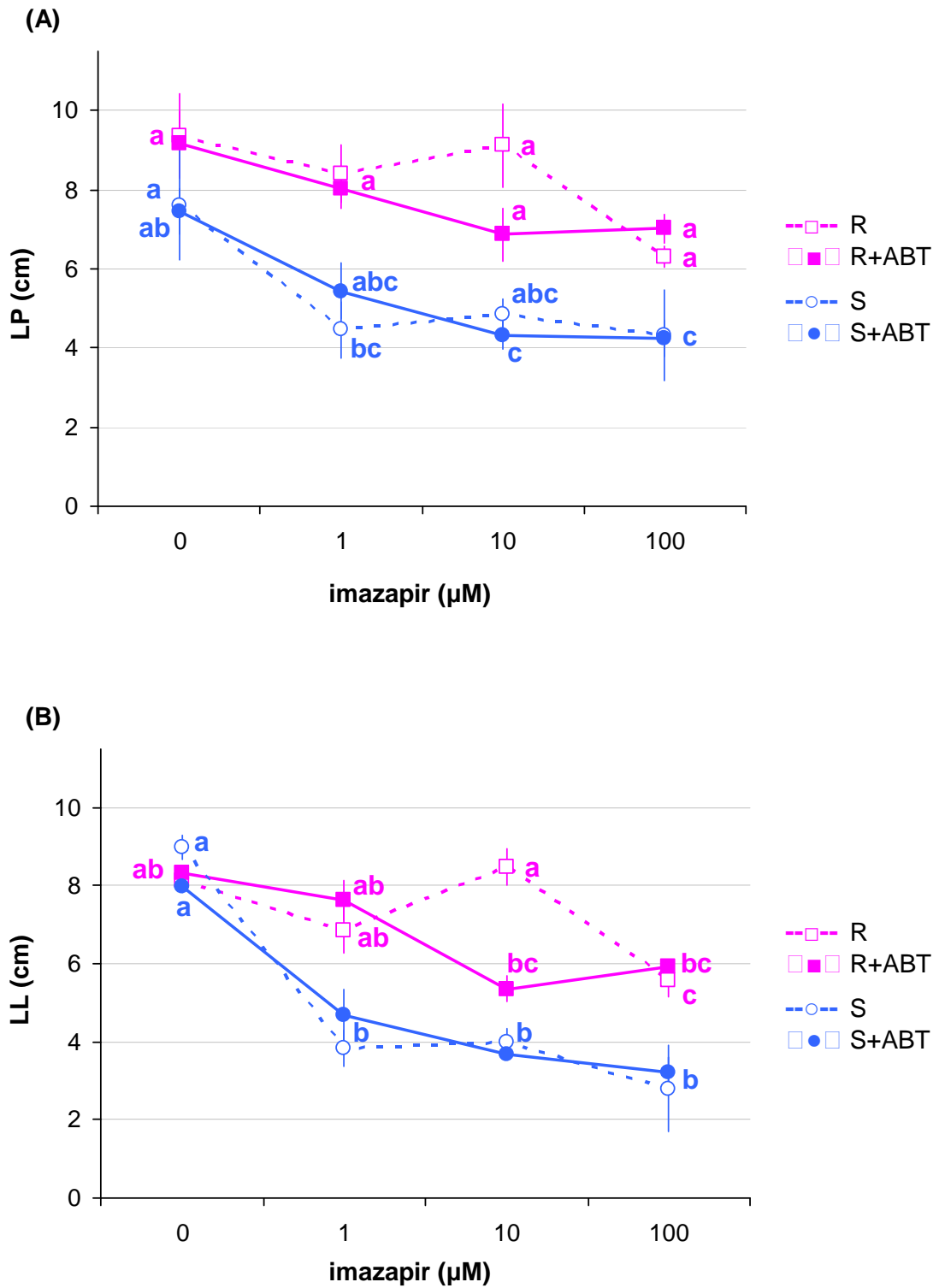
Para la línea resistente, el Análisis de la Variancia encontró una interacción significativa entre herbicida e inhibidor ABT para la variable longitud de raíz lateral más larga (Tabla III.II). La mayor diferencia en el crecimiento de raíces laterales entre ausencia y presencia de ABT se observó para la concentración intermedia de herbicida (Figura 3.8).

**Tabla III.II.** Análisis de la Variancia (ANOVA) para las líneas HA425 de genotipo resistente (R) y HA89 de genotipo susceptible (S) considerando efectos de herbicida (IMI) e inhibidor de citocromo P450s (ABT) y la interacción entre ellos (IMI\*ABT). LP: longitud de raíz principal, LL: longitud de raíz lateral más larga, LH: longitud de hipocótilo, AF: área foliar, *Hue*: coloración de hojas. Los valores de AF para el genotipo susceptible fueron transformados con la función logarítmica.

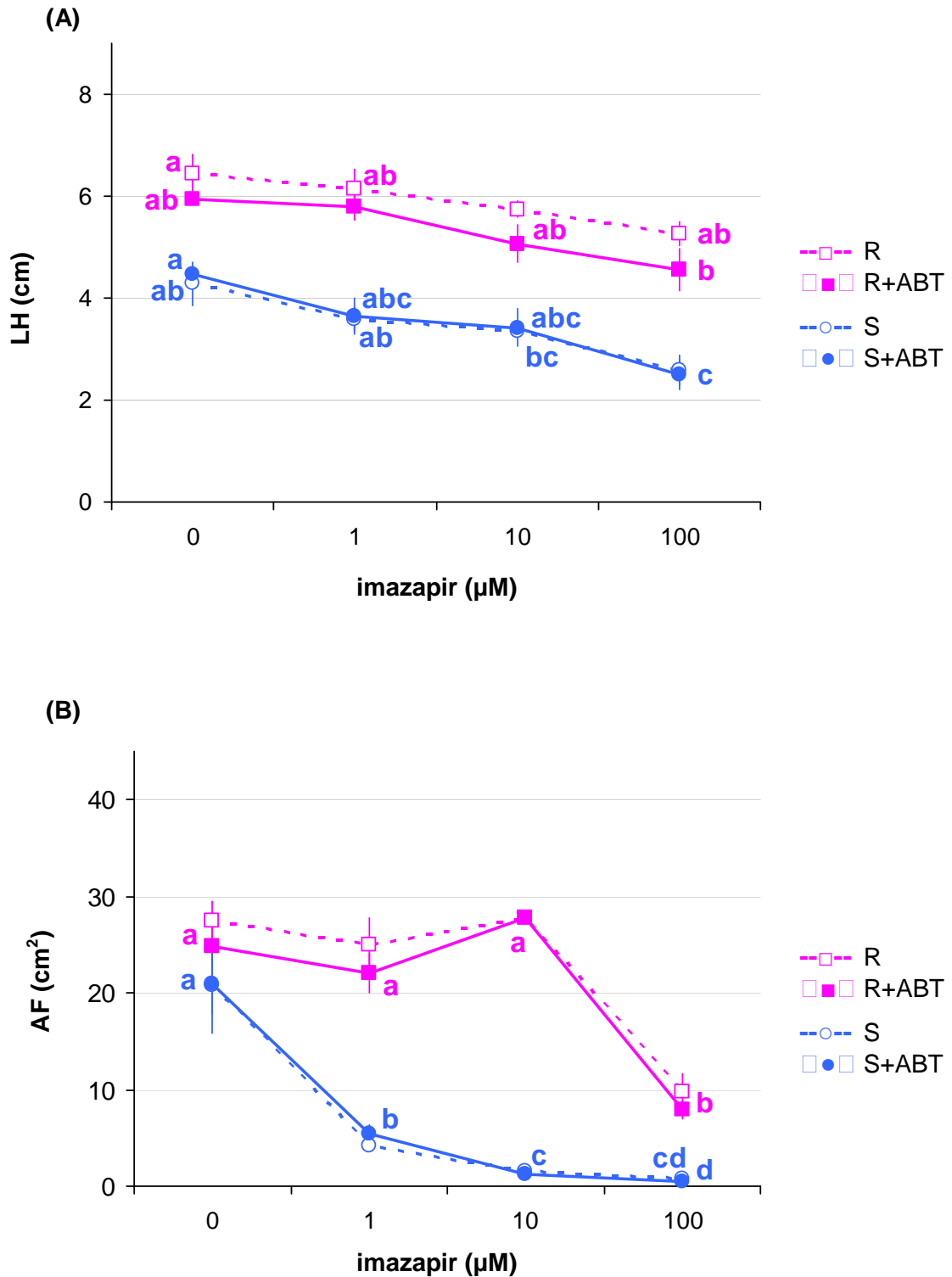
Genotipo	Variable	Efecto IMI	Efecto ABT	IMI*ABT
<b>R</b>	LH	$p < 0,01$	$p < 0,05$	ns
	AF	$p < 0,001$	ns	ns
	<i>Hue</i>	$p < 0,001$	ns	ns
	LP	$p < 0,05$	ns	ns
	LL	$p < 0,001$	ns	$p < 0,001$
<b>S</b>	LH	$p < 0,001$	ns	ns
	AF	$p < 0,001$	ns	ns
	<i>Hue</i>	$p < 0,001$	ns	ns
	LP	$p < 0,005$	ns	ns
	LL	$p < 0,001$	ns	ns

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

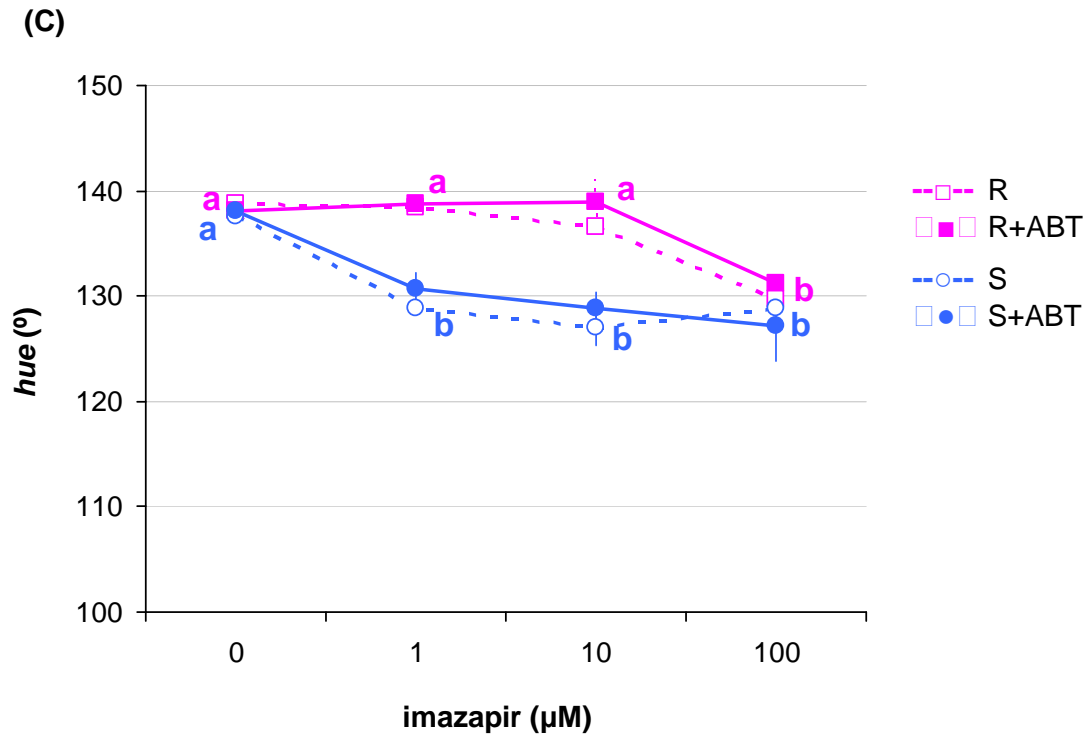
**Figura 3.8.** Efecto del tratamiento combinado de imazapir y ABT sobre el crecimiento radical de plantas de la línea resistente HA425 (R) y susceptible HA89 (S). **(A)** LP (longitud de raíz principal). **(B)** LL (longitud de raíz lateral más larga). Para cada genotipo, letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios según la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Las barras verticales representan los errores estándar de cada media ( $n=3$ ).



**Figura 3.9.** Efecto del tratamiento combinado de imazapir y ABT sobre variables de crecimiento aéreo evaluadas en plantas de la línea resistente HA425 (R) y susceptible HA89 (S). **(A)** LH (longitud de hipocótilo). **(B)** AF (área foliar). Para cada genotipo, letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios según la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Los valores de AF para el genotipo susceptible fueron transformados con la función  $\log_{10}$ : los valores medios están calculados en base a los datos sin transformar y las letras se refieren a las medias de los valores transformados. Las barras verticales representan los errores estándar de cada media (3 repeticiones).



**Figura 3.9** (continuación). Efecto del tratamiento combinado de imazapir y ABT sobre la variable de crecimiento aéreo **(C)** ángulo *hue* (coloración de hojas) evaluada en plantas de las líneas resistente HA425 (R) y susceptible HA89 (S). Para cada genotipo, letras distintas indican diferencias significativas entre los valores medios según la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Las barras verticales representan los errores estándar de cada media (3 repeticiones).



## DISCUSIÓN

Numerosos estudios han demostrado que los efectos de los inhibidores de citocromo P450s evaluados sobre la respuesta a nivel de planta entera se correlacionan con la capacidad a nivel bioquímico de metabolizar el herbicida mediante dichas enzimas (Burnet *et al.*, 1993a,b; Christopher *et al.*, 1994; Preston *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1998). La reducción de la resistencia a inhibidores de AHAS por el tratamiento combinado con el inhibidor PBO ha sido reportada en varias especies, como ser *Kochia scoparia* (Kwon y Penner, 1995), *Echinochloa phyllopogon* (Fischer *et al.*, 2000; Osuna *et al.*, 2002), *Zea mays* y *Glycine max* (Kwon *et al.*, 1995). De manera similar, el inhibidor ABT ha sido utilizado para demostrar la participación de citocromo P450s en el metabolismo de estos herbicidas (Shaner y Mallipudi, 1991).

En el presente trabajo se observó una disminución significativa del área foliar por el tratamiento combinado de imazapir 10  $\mu\text{M}$  y PBO en la línea resistente evaluada. Sin embargo, para el ensayo con ABT no se observó este efecto. El comportamiento diferencial entre ABT y PBO puede explicarse considerando que estos inhibidores presentan especificidad para distintas isoformas de citocromo P450s (Preston *et al.*, 1996). Los patrones de la respuesta a inhibidores de citocromo P450s varían en función del herbicida utilizado y de la especie evaluada. Letouzé y Gasquéz (2003) analizaron el mecanismo de resistencia múltiple en una población de *Alopecurus myosuroides* y encontraron que la resistencia a sulfonilureas era revertida por la aplicación de malatión pero no de ABT y PBO. Sin embargo, PBO y malatión resultaron igualmente eficientes para aumentar la fitotoxicidad de dichos herbicidas en una accesión de *Echinochloa phyllopogon* (Osuna *et al.*, 2002). Por otro lado, la reversión de la resistencia a clorolurón en *Lolium rigidum* pudo ser observada en presencia tanto de PBO como de ABT (Burnet *et al.*, 1993a)

En cuanto al crecimiento del sistema radical, para el genotipo resistente se observó una diferencia significativa en la longitud de raíz lateral más larga entre ausencia y presencia de inhibidor de citocromo P450s para la concentración intermedia de herbicida (10  $\mu\text{M}$  imazapir), tanto para ABT como PBO. Estos resultados indican que, a diferencia de lo encontrado en la parte aérea, las isoformas de citocromo P450s involucradas en la respuesta de raíces serían sensibles a los dos inhibidores utilizados. Esta diferencia entre parte aérea y radical podría sugerir una expresión tejido específica de las distintas isoformas de citocromo P450s que están involucradas en la detoxificación del herbicida. Una respuesta similar fue encontrada en la caracterización de una línea de girasol con resistencia a

herbicidas mediada por citocromo P450s, donde se observó reversión por malatión sólo a nivel aéreo (Kaspar *et al.*, 2011).

Los resultados del presente trabajo sugieren que en la línea resistente evaluada estaría involucrado un mecanismo de detoxificación mediado por isoformas de citocromo P450s revertidas por ABT y PBO. Esta reversión se observó sólo para las variables longitud de raíz lateral más larga y área foliar. Es importante destacar que la reducción en el crecimiento tanto de las hojas como del sistema radicular, en particular de raíces laterales, fueron caracterizados previamente como parámetros sensibles que permiten discriminar los diferentes niveles de resistencia/susceptibilidad al herbicida durante el desarrollo de las plantas de girasol.

La coloración del primer par de hojas verdaderas pudo ser cuantificada mediante el valor del ángulo *hue* promedio por hoja. La disminución del *hue* en función de dosis crecientes de herbicida estuvo relacionada con la aparición de síntomas en las hojas tales como clorosis y necrosis. Una cuidadosa evaluación del color es importante para una correcta descripción de la respuesta de las plantas a diversos tipos de estrés. Normalmente se utilizan escalas cualitativas para dar cuenta del daño en hojas. Esta identificación visual no es una herramienta del todo apropiada y es preferible estimar los parámetros de color a partir de la utilización de un cromámetro o mediante el análisis digital de imágenes. Estos métodos permiten cuantificar de manera precisa el color de diversos órganos vegetales (McGuire, 1992; Kwack *et al.*, 2005; Darrigues *et al.*, 2008). El programa utilizado en el presente trabajo utiliza el espacio de color CIELAB, normalmente usado por los cromámetros, pero con la ventaja de tomar todos los puntos del tejido a evaluar (Rodríguez *et al.*, 2010).

La resistencia a imidazolinonas bajo estudio proviene de girasol maleza y está conferida por un gen principal (*Imr1*) y un segundo con efecto modificador (*Imr2*) (Bruniard y Miller, 2001). Estudios iniciales sobre biotipos de girasol resistente demostraron la existencia de una isoforma insensible de la enzima AHAS y concluyeron que las pequeñas variaciones observadas en la translocación y el metabolismo del herbicida no eran suficientes para explicar la resistencia (Al-Khatib *et al.*, 1998; White *et al.*, 2002). Sin embargo, actualmente se considera que efectos aparentemente menores pueden tener en sumatoria un fuerte impacto sobre la respuesta de la planta a los herbicidas. Estos factores menores suelen ser despreciados por las investigaciones (Gressel, 2009). A su vez, se ha reportado que la tolerancia o resistencia a inhibidores de AHAS en malezas no es función de un solo

mecanismo, sino que una interacción compleja de varios factores son los que determinan el grado de sensibilidad de un biotipo particular a un herbicida (Carey *et al.*, 1997).

El aumento de la fitotoxicidad del herbicida imazapir inducido por la presencia de inhibidores de citocromo P450s sólo fue observado en la línea resistente, por lo que se sugiere que existe un mecanismo de detoxificación mediado por esa vía que contribuye a la resistencia. Este mecanismo estaría relacionado con el gen *Imr2*. Cabe destacar que la reducción en el crecimiento causada por la presencia de inhibidores de citocromo P450s en la línea resistente (*Imr1Imr1Imr2Imr2*) no fue la suficiente como para alcanzar valores similares a los de la línea susceptible (*imr1imr1imr2imr2*) tratada con imazapir. Estos resultados son consistentes con la acción de un gen modificador que afecta parcialmente la resistencia a herbicidas. La línea resistente posee una isoforma insensible de la enzima AHAS (*Imr1*) que explica que los niveles de resistencia sean mayores que la línea susceptible aún en presencia de inhibidores de citocromo P450s.

Los resultados del presente trabajo coinciden en parte con los de un estudio reciente, el cual evaluó la respuesta combinada de imazapir y malatión en líneas de girasol resistente proveniente de la fuente *Imisun* (Sala *et al.*, 2012c). La respuesta medida como peso seco de una de las líneas, IMI-1, mostró diferencias significativas entre ausencia y presencia de malatión, mientras que no se encontraron diferencias para la línea RHA426. Este trabajo también sugiere que además de mecanismos de detoxificación por citocromo P450s existirían otros mecanismos no relacionados con el sitio de acción involucrados en la resistencia a imidazolinonas en girasoles *Imisun*.

La resistencia mediada por metabolismo resulta de naturaleza poligénica en algunos casos (Preston, 2003; Busi *et al.*, 2011; Petit *et al.*, 2010) mientras en otro estaría involucrado un solo gen (Letouzé y Gasquez, 2001). Los estudios de la herencia de la resistencia a imidazolinonas realizados por Bruniard (2001) sugieren la existencia de otros genes menores en girasol. Estos estudios se realizaron con una sola dosis para la identificación de la respuesta de individuos. En general, se sugiere la evaluación de múltiples dosis y análisis de selección recurrente para la correcta determinación del tipo de herencia y los genes involucrados (Gressel, 2009).

El metabolismo de diferentes herbicidas de la familia de las imidazolinonas está mediado por distintas isoformas de citocromo P450s (Tecle *et al.*, 1993). Los compuestos más lipofílicos, como imazapir e imazaquin, son metabolizados por rutas diferentes a la involucrada en los compuestos como el imazetapir, que presentan sustituyentes alquílicos en el esqueleto unido al anillo imidazolinona. La ruta general para estos herbicidas involucra

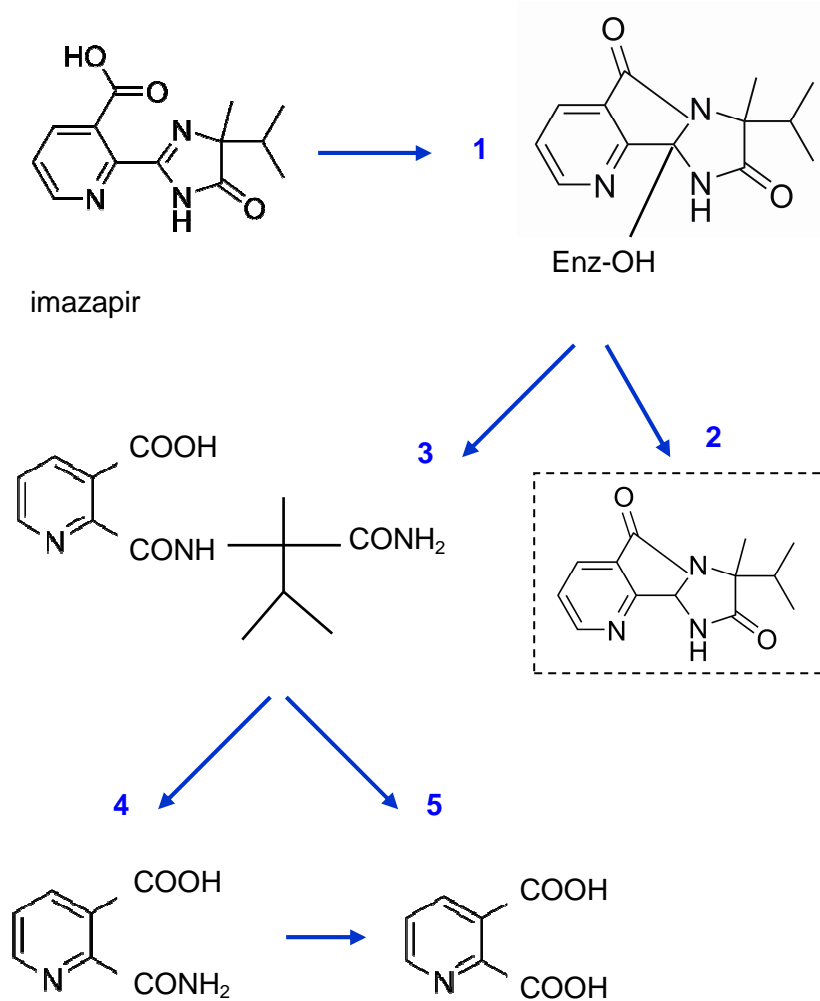
la hidroxilación del sustituyente seguido de la conjugación de glucosa (Lee *et al.*, 1991). La transformación metabólica en el caso de los compuestos sin sustituyentes, como el imazapir, es un proceso lento y complejo que implica reacciones metabólicas poco frecuentes (Teclé *et al.*, 1993). La principal ruta de metabolismo del imazapir en plantas tolerantes involucra la formación de un metabolito cíclico de baja movilidad y por lo tanto menos tóxico (Shaner y Mallipudi, 1991). Este metabolito inmóvil sería resultado de la hidroxilación en un carbono imínico y una posterior ciclación entre un nitrógeno del imidazol y el grupo carboxílico (Figura 3.10). Un metabolito de estas características fue observado en girasol (Díaz Sánchez *et al.*, 2002). Probablemente, la actividad de las isoformas de citocromo P450s involucradas en esta reacción de hidroxilación y ciclación se encuentre incrementada en la línea resistente evaluada en este trabajo. Se ha sugerido que duplicaciones génicas o mutaciones puntuales pueden llevar a la inducción de isoformas de citocromo P450s y conferir resistencia (Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

Dado que el metabolismo de los herbicidas de la familia de las imidazolinonas difiere para los distintos ingredientes activos (Lee *et al.*, 1991), sería interesante llevar a cabo ensayos similares a los realizados en el presente trabajo utilizando otros compuestos de esta familia como ser imazetapir o imazamox. El estudio de los patrones de inhibición por distintos inhibidores de citocromo P450s permitiría ampliar el conocimiento sobre las isoformas involucradas en el metabolismo de los diferentes compuestos de la familia de las imidazolinonas.

Uno de los grandes interrogantes relacionados con el metabolismo mediado por citocromo P450s se refiere al número y la especificidad de la isoenzimas involucradas en la detoxificación del herbicida (Siminsky, 2006). Se sabe que una misma isoforma puede metabolizar distintos miembros de una familia de herbicidas o compuestos químicos no relacionados (Siminsky *et al.*, 1999; Didierjean *et al.*, 2002; Yun *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2006). A su vez, se ha demostrado que la misma enzima que cataliza la conversión de sustratos endógenos participa en la transformación de herbicidas (Helvig *et al.*, 1996).

Los ensayos con microsomas no permiten conocer sobre la identidad o la naturaleza de la enzima P450 implicada en el metabolismo de herbicidas. Debido a las bajas concentraciones de citocromo P450s y las dificultades asociadas a la solubilización y purificación de la enzima no han podido caracterizarse las isoenzimas involucradas en reacciones de interés. Las aproximaciones mediante técnicas de biología molecular permitirían avanzar en el conocimiento de este tema. En este sentido, el estudio de las

**Figura 3.10.** Rutas metabólicas probables del imazapir en plantas. La primera reacción en común involucra la formación del intermediario 1 por hidroxilación y ciclación del imazapir. El metabolito 2 es el principal producto de degradación en plantas tolerantes. Otros metabolitos presentes en muy bajas cantidades (3, 4 y 5) corresponden a los productos de hidrólisis del intermediario. Adaptado de Lee *et al.* (1991), Shaner y Mallipudi (1991) y Teclé *et al.* (1993).



diferencias en las secuencias de ADN entre plantas susceptibles y resistentes o de la expresión diferencial de isoenzimas compartidas permitiría clonar y caracterizar la isoenzima de P450 involucrada (Siminsky, 2006).

Dentro de las estrategias exitosamente utilizadas para aislar genes de citocromo P450s involucrados en el metabolismo de herbicidas pueden mencionarse:

- el estudio de mutantes susceptibles a herbicidas normalmente tolerados por la especie. Por ejemplo, en arroz se identificó el gen CYP81A6 por mapeo fino de la mutación *bel* que otorga susceptibilidad a bentazón y sulfonilureas (Pan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). De manera similar, la sensibilidad a múltiples herbicidas en maíz mapea en la misma región que un gen codificante para citocromo P450 (Norbdy *et al.*, 2008).

- el *screening* al azar de sustratos en sistemas de expresión heterólogos de citocromo P450s. Por ejemplo, se pudo aislar el gen CYP71A10 de amplificaciones al azar de bibliotecas de cDNA de soja y evaluar su capacidad de detoxificación de herbicidas por expresión bajo un promotor fuerte en levadura o tabaco (Siminsky *et al.*, 1999; 2000). De manera similar, el gen CYP71C6v1 de trigo y CYP72A18 de arroz fueron aislados a través de RT-PCR y expresados en levadura (Xiang *et al.*, 2006; Imaishi y Matumoto, 2007).

- el estudio en sistemas heterólogos de citocromo P450s aislados a partir de su inducción por químicos exógenos. Esta estrategia considera la naturaleza inducible de los citocromo P450s. Por ejemplo, dos genes fueron aislados de tubérculos de *Helianthus tuberosus* tratados con  $Mn^{2+}$  y aminopirina (Batard *et al.*, 1998; Cabello Hurtado *et al.*, 1998). La expresión de uno de los genes, CYP76B1, en levadura, tabaco y *Arabidopsis* otorgó resistencia a distintos herbicidas (Robineau *et al.*, 1998; Didierjean *et al.*, 2002). De manera similar, la expresión heteróloga en levadura de dos genes aislados a partir del cultivo de células de tabaco tratadas con 2,4D permitió identificar las reacciones químicas en los que estaban involucradas las isoformas codificadas por dichos genes (Yamada *et al.*, 2000).

Por lo expuesto anteriormente, las futuras investigaciones que pretendan ampliar el conocimiento sobre la detoxificación de herbicidas mediada por citocromo P450s en girasol deberían incluir experimentos de naturaleza molecular. El estudio de transcritos diferencialmente expresados entre las líneas que difieren en el grado de resistencia podría arrojar luz sobre las secuencias relacionadas al *locus lmr2*. Otras estrategias de clonado por RT-PCR y expresión en sistemas heterólogos serían interesantes para ampliar el conocimiento en lo que respecta a las isoformas de citocromo P450s involucradas en el metabolismo de herbicidas en girasol.

## CONCLUSIONES

- La evaluación de la respuesta a imazapir de plantas jóvenes tratadas con ABT o PBO sugiere la presencia de un mecanismo detoxificador de herbicida mediado por citocromo P450s involucrado en la resistencia a imidazolinonas en girasol.
- Las isoformas de citocromo P450s que participan en el metabolismo de imazapir en girasol presentan un comportamiento tejido-específico.
- La vía detoxificadora mediada por citocromo P450s presente en el genotipo resistente estaría relacionada con el segundo locus (*Imr2*) de efecto modificador, que contribuye a la resistencia conferida por la mutación de la enzima AHAS.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES GENERALES

La resistencia a imidazolinonas en girasol pudo ser verificada en etapas tempranas del desarrollo de plántulas mediante bioensayos en condiciones controladas. La línea susceptible fue discriminada del resto de los genotipos a los 4 días desde la siembra a través de un test germinativo en placa. El crecimiento del sistema radical en plántulas de 8 y 15 días, germinadas en un sistema de multimacetas en presencia del herbicida imazapir, presentó una correlación con la constitución genética a nivel de los dos *loci Imr1* e *Imr2* que controlan la resistencia a imidazolinonas en girasoles de la fuente *Imisun*. La expansión del primer par de hojas verdaderas y la actividad AHAS *in vivo* en las mismas permitió distinguir genotipos que difieren a nivel del *locus Imr1*.

La actividad AHAS medida tanto *in vivo* como *in vitro* fue significativamente mayor en hoja que en raíz. La misma tendencia se observó para los niveles de transcritos *ahas*. Estos genes presentan una expresión tejido-específica. La mayor expresión ocurrió para *ahas1* en hoja. En raíces, se encontraron niveles similares para *ahas1* y *ahas2*. Los menores niveles de transcripción fueron observados para *ahas3*. El tratamiento con imidazolinonas produjo respuestas tejido y gen-específicas, por lo que estos genes estarían sujetos a distintos mecanismos de regulación. Dado que los niveles de expresión AHAS en plántulas control no difirió entre los genotipos evaluados, los determinantes génicos adicionales a la mutación en AHAS relacionados a *Imr2* no estarían asociados a mecanismos de sobreexpresión o patrones alterados de expresión AHAS.

El tratamiento combinado de herbicida con inhibidores de citocromo P450s produjo una disminución en la respuesta de las plantas de la línea resistente. Esto sugiere que en la fuente de resistencia evaluada existiría un mecanismo de detoxificación del herbicida imazapir mediado por isoformas de citocromo P450s sensibles a ABT y PBO. Este mecanismo mediado por metabolismo estaría relacionado al *locus Imr2* y completaría a la resistencia conferida por la mutación en AHAS (*Imr1*).

## PERSPECTIVAS

Los bioensayos desarrollados en el presente trabajo podrían extenderse para conocer la respuesta de esta fuente de resistencia a otros ingredientes activos de la familia de las imidazolinonas y otras familias químicas dentro de los herbicidas inhibidores de AHAS. La caracterización de la respuesta frente a otros herbicidas permitiría establecer patrones de resistencia cruzada. A su vez, podrán evaluarse nuevas fuentes de resistencia y materiales diversos, ya sea de girasol cultivado o silvestre. En este último caso, podrían adaptarse las técnicas para monitorear el flujo génico desde los cultivares resistentes hacia las poblaciones silvestres.

Los planes de mejoramiento tradicionales que consideren entre sus objetivos la resistencia a inhibidores de AHAS pueden incorporar estas metodologías no convencionales para asistir los procesos de selección. La aplicación de estos bioensayos permitiría ahorrar tiempo y recursos dentro del programa.

En el presente trabajo pudo ponerse a punto la cuantificación de los transcriptos de los tres genes *ahas* de girasol mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Sería interesante la utilización de esta metodología para la evaluación de otros tejidos y estadios de desarrollo, lo que permitiría conocer los patrones de expresión de estos genes en girasol.

Para ampliar el conocimiento sobre las isoformas de citocromo P450s que participan en el metabolismo de los diferentes compuestos de la familia de las imidazolinonas podría extenderse la investigación iniciada en este trabajo, utilizando otros compuestos de esta familia como ser imazetapir o imazamox. A su vez, la realización de ensayos similares empleando inhibidores de citocromo P450s adicionales (malatión, terbufos, etc.) permitiría establecer los patrones de inhibición y caracterizar las isoformas de citocromo P450s implicadas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff M.D., Magalhaes P.J. & Ram S.J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Internat.* 11: 36-42.
- Adams K.L. & Wendel J.F. (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8: 135-141.
- Aguirrezábal L.A.N., Orioli G.A., Hernández L.F., V.R. P. & Miravé J.P. (2001) Girasol. Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. Unidad Integrada Balcarce. <http://www.asagir.org.ar/asagir2008/Talleres/librogirs.pdf>.
- Al-Khatib K., Baumgartner J.R., Peterson D.J. & Currie R.S. (1998) Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Sci.* 46: 403-407.
- Al-Khatib K. & Miller J.F. (2000) Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidazolinone herbicides. *Crop Sci.* 40: 869-870.
- Alonso Prados J.L., Hernández Sevillano E., Llanos S., Villarroya M. & García Baudín J.M. (2002) Effects of sulfosulfuron soil residues on barley (*Hordeum vulgare*), sunflower (*Helianthus annuus*) and common vetch (*Vicia sativa*). *Crop Prot.* 21: 1061-1066.
- Arregui M.C. & Puricelli E. (2008) Mecanismos y modos de acción de herbicidas (Capítulo 3). En: *Mecanismos de acción de plaguicidas*, pp. 176-183.
- Ashigh J. & Tardif F. (2007) An Ala205Val Substitution in Acetohydroxyacid Synthase of Eastern Black Nightshade (*Solanum ptychanthum*) Reduces Sensitivity to Herbicides and Feedback Inhibition. *Weed Sci.* 55: 558-565.
- Ashigh J. & Tardif F. (2009) An amino acid substitution at position 205 of acetohydroxyacid synthase reduces fitness under optimal light in resistant populations of *Solanum ptychanthum*. *Weed Res.* 49: 479-489.
- Ashigh J., Corbett C.A., Smith P.J., Laplante J. & Tardif F.J. (2009) Characterization and diagnostic tests of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors due to an Asp376Glu substitution in *Amaranthus powellii*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 95: 38-46.
- Bak S., Beisson F., Bishop G., Hamberger B., Höfer R., Paquette S. & Werck-Reichhart D. (2011) Cytochromes P450. En: *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0144>.
- Barak Z. & Chipman D. (2012) Allosteric regulation in Acetohydroxyacid Synthases (AHASs) - Different structures and kinetic behavior in isozymes in the same organisms. *Archives Biochem. Biophys.* 519: 167-174.
- Barrett M. (1989) Reduction of Imazaquin Injury to Corn (*Zea mays*) and Sorghum (*Sorghum bicolor*) with Antidotes. *Weed Sci.* 37: 34-41.
- Batard Y., LeRet M., Schalk M., Robineau T., Durst F. & Werck Reichhart D. (1998) Molecular cloning and functional expression in yeast of CYP76B1, a xenobiotic-inducible 7-ethoxycoumarin O-de-ethylase from *Helianthus tuberosus*. *The Plant J.* 14: 111-120.

- Baumgartner J.R., Al-Khatib K. & Currie R.S. (1999) Cross-resistance of imazethapyr-resistant common sunflower (*Helianthus annuus*) to selected imidazolinone, sulfonyleurea, and triazolopyrimidine herbicides. *Weed Technol.* 13: 489-493.
- Beckie H. & Mc Kercher R. (1989) Soil Residual Properties of DPX-A7881 under Laboratory Conditions. *Weed Sci.* 37: 412-418.
- Beckie H., Heap I.M., Smeda R.J. & Hall L.M. (2000) Screening for Herbicide Resistance in Weeds. *Weed Technol.* 14: 428-445.
- Beckie H. & Tardif F. (2012) Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Prot.* 35: 15-28.
- Beckie H., Warwick S.I. & Sauder C.A. (2012) Basis for Herbicide Resistance in Canadian Populations of Wild Oat (*Avena fatua*). *Weed Sci.* 60: 10-18.
- Ben C., Hewezi T., Jardinaud M.F., Bena F., Ladouce N., Moretti S., Tamborindeguy C., Liboz T., Petitprez M. & Gentzbittel L. (2005) Comparative analysis of early embryonic sunflower cDNA libraries. *Plant Mol. Biol.* 57 255-270.
- Bernasconi P., Woodworth A.R., Rosen B.A., Subramanian M.V. & Siehl D.L. (1995) A Naturally Occurring Point Mutation Confers Broad Range Tolerance to Herbicides That Target Acetolactate Synthase. *J. Biol. Chem.* 270: 17381-17385.
- Binder S., Knill T. & Schuster J. (2007) Branched-chain amino acid metabolism in higher plants. *Physiol. Plant.* 129: 68-78.
- Blair M., Zedaker S., Seiler J., Hipkins P. & Burch P. (2006) Evaluation of Rapid Screening Techniques for Woody Plant Herbicide Development. *Weed Technol.* 20: 971-979.
- 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.
- Blancaver M.E., Kazuyuki I. & Usui K. (2001) Resistance of *Rotala indica* Koehne var. *uliginosa* Koehne to sulfonyleurea herbicides. *Weed Biol. Man.* 1: 209-215.
- Boutsalis P. & Powles S. (1995) Resistance of dicot weeds to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides in Australia. *Weed Res.* 35: 149-155.
- Boutsalis P., Karotam J. & Powles S.B. (1999) Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. *Pest. Sci.* 55: 507-516.
- Bozic D., Saric M., Malidža G., Ritz C. & Vrbnicanin S. (2012) Resistance of sunflower hybrids to imazamox and tribenuron-methyl. *Crop Prot.* 39: 1-10.
- Bravin F., Zanin G. & Preston C. (2001) Resistance to diclofop-methyl in two *Lolium* spp. populations from Italy: studies on the mechanism of resistance. *Weed Res.* 41: 461-473.

- Breccia G., Vega T., Nestares G., Mayor M.L., Zorzoli R. & Picardi L. (2009) Immature embryo culture for early screening of imidazolinone resistance in sunflower. *Internat. J. Plant Breed.* 3: 37-40.
- 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 Breed.* 130: 109-113.
- Breton C., Šnajdrová L., Jeanneau C., Koca J. & Imberty A. (2006) Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16: 29R-37R.
- Brown H.M. (1990) Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.* 29: 263-281.
- Bruniard J.M. (2001) Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of cross-resistance 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: 11-16.
- Brunner A.M., Yakovlev I.A. & Strauss S.H. (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology* 4: 14-20.
- Buker R.S., Rathinasabapathi B., Stall W.M., MacDonald G. & Olson S.M. (2004) Physiological basis for differential tolerance of tomato and pepper to rimsulfuron and halosulfuron: site of action study. *Weed Sci.* 52: 201-205.
- Burke J.M., Knapp S. & Rieseberg L.H. (2005) Genetic Consequences of Selection During the Evolution of Cultivated Sunflower. *Genetics* 171: 1933-1940.
- Burnet M.W., Christopher J.T., Holtum J.A. & Powles S.B. (1994) Identification of Two Mechanisms of Sulfonylurea Resistance within One Population of Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) Using a Selective Germination Medium. *Weed Sci.* 42: 468-473.
- Burnet M.W., Loveys B.R., Holtum J.A. & Powles S.B. (1993a) A mechanism of chlorotoluron resistance in *Lolium rigidum*. *Planta* 190: 182-189.
- Burnet M.W., Loveys B.R., Holtum J.A. & Powles S.B. (1993b) Increased Detoxification Is a Mechanism of Simazine Resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46: 207-218.
- Busi R., Vila-Aiub M.M. & Powles S.B. (2011) Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity* 106: 817-824.
- Cabello-Hurtado F., Batard Y., Salan J.P., Durst F., Pinot F. & Werck-Reichhart D. (1998) Cloning, Expression in Yeast, and Functional Characterization of CYP81B1, a Plant Cytochrome P450 That Catalyzes In-chain Hydroxylation of Fatty Acids. *The J. Biol. Chem.* 273: 7260-7267.

- Caretto S., Giardina M.C., C. & Mariotti D. (1994) Chlorsulfuron resistance in *Daucus carota* cell lines and plants: involvement of gene amplification. *Theor. Appl. Genet.* 88: 520-524.
- Carey J.B., Penner D. & Kells J.J. (1997) Physiological basis for nicosulfuron and primisulfuron selectivity in five plant species. *Weed Science* 45: 22-30.
- Carvalho S.J., Nicolai M., Ferreira R.R., Figueira A.V. & Christoffoleti P.J. (2009) Herbicide selectivity by differential metabolism: considerations for reducing crop damages. *Sci. Agric.* 66: 136-142.
- Carvalho S.J.P., López-Ovejero R.F., Moysés T.C., Chamma H.M.C.P. & Christoffoleti P.J. (2004) Identificação de biótipos de *Bidens* Spp. resistentes aos inibidores da ALS através de teste germinativo. *Planta Daninha, Viçosa-MG* 22: 411-417.
- 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. *Theor. Appl. Genet.* 120: 491-508.
- Cirujeda A., Recasens J. & Taberner A. (2001) A qualitative quick-test for detection of herbicide resistance to tribenuron-methyl in *Papaver rhoeas*. *Weed Res.* 41: 523-534.
- Cole D.J. (1994) Detoxification and Activation of Agrochemicals in Plants. *Pestic. Sci.* 42: 209-222.
- Coleman J., Blake-Kalff M. & Davies T.G. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2: 144-151.
- Conte S.S. & Lloyd A.M. (2011) Exploring multiple drug and herbicide resistance in plants—Spotlight on transporter proteins. *Plant Sci.* 180: 196–203.
- Corbett C.A. & Tardif F.J. (2008) Detection of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors in *Amaranthus* sp. using DNA polymorphisms. *Pestic. Biochem. Physiol.* 92: 48-55.
- Croughan T.P. (1998) Herbicide resistant rice, US Patent 5 773 704.
- Cummins I., Dixon D.P., Freitag-Pohl S., Skipsey M. & Edwards R. (2011) Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab. Rev.* 43: 266-280.
- Currie R.S., Kwon C.S. & Penner D. (1995) Magnitude of Imazethapyr Resistance of Corn (*Zea mays*) Hybrids with Altered Acetolactate Synthase. *Weed Sci.* 43: 578-582.
- Chaleff R.S. & Ray T.B. (1984) Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science* 223: 1148-1151.
- Chaleff R.S. & Mauvais C.J. (1984) Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science* 224: 1443-1445.
- Chang A.K. & Duggleby R.G. (1997) Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochem. J.* 327: 161-169.

- Chang A.K. & Duggleby R.G. (1998) Herbicide-resistant forms of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase: characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. *Biochem. J.* 333: 765-777.
- Chen B. & McManus M.T. (2006) Expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase genes during the development of vegetative tissues in white clover (*Trifolium repens* L.) is regulated by ontological cues. *Plant Mol. Biol.* 60: 451-467.
- Chipman D., Barak Z. & Schloss J.V. (1998) Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochem- Biophys. Acta* 1385: 401-419.
- Chipman D., Duggleby R.G. & Tittmann K. (2005) Mechanisms of acetohydroxyacid synthases. *Current Opin. Chem. Biol.* 9: 475-481.
- Christoffers M.J., Nandula V.K., Howatt K.A. & Wehking T.R. (2006) Target-site resistance to acetolactate synthase inhibitors in wild mustard (*Sinapis arvensis*). *Weed Sci.* 54: 191-197.
- Christoffoleti P.J. (2001) Bioensaio Para Determinação Da Resistência De Plantas Daninhas Aos Herbicidas Inibidores Da Enzima Als. *Bragantia* 60: 261-265.
- Christopher J.T., Preston C. & Powles S.B. (1994) Malathion Antagonizes Metabolism-Based Chlorsulfuron Resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 49: 172-182.
- Darrigues A., Hall J., van der Knaap E., Francis D., Dujmovic N. & Gray S. (2008) Tomato Analyzer-color Test: A New Tool for Efficient Digital Phenotyping. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 579-586.
- Dastgheib F. & Field R. (1998) Acetolactate synthase activity and chlorsulfuron sensitivity of wheat cultivars. *Weed Res.* 38: 63-68.
- De Prado R. & Franco A.R. (2004) Cross-Resistance and Herbicide Metabolism in Grass Weeds in Europe: Biochemical and Physiological Aspects. *Weed Sci.* 52: 441-447.
- Degrande D., Dewaele E. & Rambour S. (2000) The AHAS gene of *Cichorium intybus* is expressed in fast growing and inflorescencial organs. *Physiol. Plant.* 110: 224-231.
- Délye C. & Boucansaud K. (2008) A molecular assay for the proactive detection of target site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. *Weed Res.* 48: 97-101.
- Deng F. & Hatzios K.K. (2003) Characterization of cytochrome P450-mediated bensulfuron-methyl O-demethylation in rice. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74: 102-115.
- Devine M.D. & Shukla A. (2000) Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Prot.* 19: 881-889.
- Devine M.D. (2005) Why are there not more herbicide-tolerant crops? *Pest. Manag. Sci.* 61: 312-317.

- Dewaele E., Forlani G., Degrande D., Nielsen E. & Rambour S. (1997) Biochemical Characterization of Chlorsulfuron Resistance in *Cichorium intybus* L. var. Witloof. *J. Plant Physiol.* 151: 109-114.
- Díaz-Sánchez J., López-Martínez N., López-Granados F., De Prado R. & García-Torres L. (2002) Absorption, translocation, and fate of herbicides in *Orobancha cumana*-sunflower system. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74: 9-15.
- Didierjean L., Gondet L., Perkins R., Lau S.M.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 Physiol.* 130: 179-189.
- Dixon D.P., Laphorn A. & Edwards R. (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3: 3004.3001-3004.3010.
- Duggleby R.G. & Pang S.S. (2000) Acetohydroxyacid Synthase. *J. Biochem. Mol. Biol.* 33: 1-36.
- Duggleby R.G., McCourt J.A. & Guddat L.W. (2008) Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 309-324.
- Duke S.H. (1990) Overview of Herbicide Mechanisms of Action. *Environ. Health Perspectives* 87: 263-271.
- Duke S.H. (2011) Comparing Conventional and Biotechnology-Based Pest Management. *J. Agric. Food Chem.* 59: 5793-5798.
- Durner J., Gailus V. & Boger P. (1991) New Aspects on Inhibition of Plant Acetolactate Synthase by Chlorsulfuron and Imazaquin. *Plant Physiol.* 95: 1144-1149.
- Eberlein C.V., Guttieri M.J., Mallory Smith C.A., Thill D.C. & Baerg R.J. (1997) Altered Acetolactate Synthase Activity in ALS-Inhibitor Resistant Prickly Lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Sci.* 45: 212-217.
- Ehltling J., Sauveplane V., Olry A., Ginglinger J.F., Provart N.J. & Werck-Reichhart D. (2008) An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 8: 47.
- Endo M., Osakabe K., Ono K., Handa H., Shimizu T. & Toki S. (2007) Molecular breeding of a novel herbicide-tolerant rice by gene targeting. *Plant J.* 52: 157-166.
- Epelbaum S., Chipman D.M. & Barak Z. (1990) Determination of Products of Acetohydroxy Acid Synthase by the Colorimetric Method, Revisited. *Anal. Biochem.* 191: 96-99.
- Fang L.Y., Gross P.R., Chen C.H. & Lillis M. (1992) Sequence of two acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*. *Plant Mol Biol* 18: 1185-1187.
- Fayez K.A. & Kristen U. (1996) The influence of herbicides on the growth and proline content of primary roots and on the ultrastructure of root caps. *Environ. Exp. Bot.* 36: 71-81.
- Fernandez P., Di Rienzo J., Moschen S., Dosio G.A., Aguirrezábal L.A., Hopp E., Paniego N. & Heinz R.A. (2011) Comparison of predictive methods and biological validation for

- qPCR reference genes in sunflower leaf senescence transcript analysis. *Plant Cell Rep.* 30: 63–74.
- Figueroa R., Gebauer M., Fischer A.J. & Kogan M. (2008) Resistance to Bensulfuron-Methyl in Water Plantain (*Alisma plantago-aquatica*) Populations from Chilean Paddy Fields. *Weed Technol.* 22: 602-608.
- 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. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68: 156-165.
- Flaburiari A. & Kristen U. (1996) The influence of chlorsulfuron and metsulfuron methyl on root growth and on the ultrastructure of root tips of germinating maize seeds. *Plant & Soil* 180: 19-28.
- Forlani G., Nielsen E., Landi P. & Tuberosa R. (1991) Chlorsulfuron Tolerance and Acetolactate Synthase Activity in Corn (*Zea mays* L.) Inbred Lines. *Weed Sci.* 39: 553-557.
- Frazier T.L., Nissen S.J., Mortensen D.A. & Meinke L.J. (1993) The Influence of Terbufos on Primisulfuron Absorption and Fate in Corn (*Zea mays*). *Weed Sci.* 41: 664-668.
- Frear D.S. & Swanson H.R. (1996) Cytochrome P450-Dependent Hydroxylation of Prosulfuron (CGA152005) by Wheat Seedling Microsomes. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3658-3664.
- Gabard J.M. & Huby J.P. (2004) Sulfonylurea-tolerant sunflower line M7. US Patent, 6,822,146 B2, El du Pont Nemours and Company, Wilmington, DE (US).
- Gaston S., Zabalza A., González E.M., Arrese-Igor C., Aparicio-Tejo P.M. & Royuela M. (2002) Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. *Physiol. Plant.* 114: 524-532.
- Genoplante (2003) Genoplante, a major partnership french program in plant genomics. [www.genoplante.com](http://www.genoplante.com).
- Gerwick B.C., Subramanian M.V., Loney-Gallant V.I. & Chandler D.P. (1990) Mechanism of Action of the 1,2,4-Triazolo[1,5-a] pyrimidines. *Pest. Sci.* 29: 357-364.
- Gerwick B.C., Mireles L.C. & Eilers R.J. (1993) Rapid diagnosis of ALS/AHAS-Resistant weeds. *Weed Technol.* 7: 519-524.
- Gläßgen W.E., Komořa D., Bohnenkämper O., Haas M., Hertkorn N., May R.G., Szymczak W. & Sandermann H. (1999) Metabolism of the Herbicide Isoproturon in Wheat and Soybean Cell Suspension Cultures. *Pestic. Biochem. Physiol.* 63: 97–113.
- Green J.M. & Ulrich J.F. (1993) Response of Corn (*Zea mays* L.) Inbreds and Hybrids to Sulfonylurea Herbicides. *Weed Sci.* 41.
- Gressel J. (2009) Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest. Manag. Sci.* 65: 1164–1173.

- Gula J.W., Hudspeth R.L., Hobbs S.L. & Anderson D.M. (1995) Organization, inheritance and expression of acetohydroxyacid synthase genes in the cotton allotetraploid *Gossypium hirsutum*. *Plant Mol. Biol.* 28: 837-846.
- Günther P., Pestemer W., Rahman A. & Nordmeyer H. (1993) A bioassay technique to study the leaching behaviour of sulfonylurea herbicides in different soils. *Weed Res.* 33: 177-185.
- Hamamura K., Muraoka T., Hashimoto J., Tsuruya A., Takahashi H., Takeshita T. & Noritake K. (2003) Identification of sulfonylurea-resistant biotypes of paddy field weeds using a novel method based on their rooting responses. *Weed Biol. Man.* 3: 242-246.
- Hanson B.D., Park K.W., Mallory Smith C.A. & Thill D.C. (2004) Resistance of *Camelina microcarpa* to acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Weed Res.* 44: 187-194.
- Harms C., Armour S., DiMaio J., Middlesteadt L., Murray D., Negrotto D., Thompson Taylor H., Weymann K., Montoya A., Shillito R. & Jen G. (1992) Herbicide resistance due to amplification of a mutant acetohydroxyacid synthase gene. *Mol. Gen. Genet.* 233: 427-435.
- Hawley R.M. (2005) The Acetohydroxyacid Synthase Gene Family its Role in Herbicide Resistant Sunflowers. Tesis para optar al título de *Master of Science in Genetics*, Oregon State University.
- Heap I. & Knight R. (1986) The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of rigid ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofopmethyl. *Aust. J. Agric. Res.* 37: 149-156.
- Helvig C., Tardif F.J., Seyer A., Powles S.B., Mioskowski C., Durst F. & Salaün J.P. (1996) Selective Inhibition of a Cytochrome P450 Enzyme in Wheat That Oxidizes Both the Natural Substrate Lauric Acid and the Synthetic Herbicide Diclofop. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 54: 161-171.
- Hernández Sevillano E., Villarroya M., Alonso Prados J.L. & García Baudín J.M. (2001) Bioassay to Detect MON-37500 and Triasulfuron Residues in Soils. *Weed Technol.* 15: 447-452.
- Hershey H.P., Schwartz L.J., Gale J.P. & Abell L.M. (1999) Cloning and functional expression of the small subunit of acetolactate synthase from *Nicotiana glauca*. *Plant Mol. Biol.* 40: 795-806.
- Hidayat I. & Preston C. (2001) Cross-Resistance to Imazethapyr in a Fluazifop-P-butyl-Resistant Population of *Digitaria sanguinalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 71: 190-195.
- Hinz J.R. & Owen M.D. (1997) Acetolactate synthase resistance in a common waterhemp (*Amaranthus rudis*) population. *Weed Technol.* 11: 13-18.
- Hinz J.R., Owen M.D. & Barret M. (1997) Nicosulfuron, Primisulfuron, and Bentazon Hydroxylation by Corn (*Zea mays*), Woolly Cupgrass (*Eriochloa villosa*), and Shattercane (*Sorghum bicolor*) Cytochrome P-450. *Weed Sci.* 25: 474-480.

- Holmes P., Farquharson R., Hall P.J. & Rolfe B.G. (2006) Proteomic Analysis of Root Meristems and the Effects of Acetohydroxyacid Synthase-Inhibiting Herbicides in the Root of *Medicago Truncatula*. *J Proteome Res* 5: 2309-231.
- Hwang I.T., Ko Y.K., Kim T.J., Kim D.W. & Cho K.Y. (2000) Structure–Activity Relationships of Acetolactate Synthase Inhibition among New Benzenesulfonylureas in Rice (*Oryza sativa*) and Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* var. *oryzicola*). *Pest. Biochem. Physiol.* 68: 166–172.
- Imaishi H. & Matumoto S. (2007) Isolation and functional characterization in yeast of CYP72A18, a rice cytochrome P450 that catalyzes (w-1)-hydroxylation of the herbicide pelargonic acid. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88: 71-77.
- Intanon S., Perez Jones A., Hulting A.G. & Mallory Smith C.A. (2011) Multiple Pro197 ALS Substitutions Endow Resistance to ALS Inhibitors within and among Mayweed Chamomile Populations. *Weed Sci.* 59: 431-437.
- Iwakami S., Uchino A., Watanabe H., Yamasue Y. & Inamura T. (2012) Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. *Pest. Manag. Sci.* 68: 1098-1106.
- Jackson R.C. & Murray B.G. (1983) Colchicine induced quadrivalent formation in *Helianthus*: evidence of ancient polyploidy. *Theor. Appl. Genet.* 64: 219-222.
- Jensen K. & Møller B.L. (2010) Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochem.* 71: 132-141.
- Jettner R., Walker S., Churchett J., Blamey F.P., Adkins S.W. & Bell K. (1999) Plant sensitivity to atrazine and chlorsulfuron residues in a soil-free system. *Weed Res.* 39: 287-295.
- Jocić S., Malidža G., Cvejić S., Hladni N., Miklič M. & Škorić D. (2011) Development of sunflower hybrids tolerant to tribenuron methyl. *GENETIKA* 43: 175-182.
- Kang J., Park J., Choi H., Burla B., Kretzschmar T., Lee Y. & Martinoia E. (2011) Plant ABC Transporters. En: *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0153>.
- Kaspar M., Grondona M., León A. & Zambelli A. (2010) Identificación de marcadores moleculares asociados a la tolerancia a imazamox mediada por monooxigenasas P450 en girasol. V Congreso Nacional de Girasol, Buenos Aires, Argentina.
- 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 Sci.* 59: 232-237.
- Keeler S.J., Sanders P., Smith J.K. & Mazur B.J. (1993) Regulation of Tobacco Acetolactate Synthase Gene Expression. *Plant Physiol.* 102: 1009-1018.
- 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: 1112–1122.

- Koeppe M.K., Hirata C.M., Brown H.M., Kenyon W.H., O'Keefe D.P., Lau S., Zimmerman W.T. & Green J.M. (2000) Basis of Selectivity of the Herbicide Rimsulfuron in Maize. *Pestic. Biochem. Physiol.* 66: 170-181.
- 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 sulfonyleurea herbicides in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1147-1159.
- Kotoula-Syka E., Eleftherohorinos I.G., Gagianas A. & Sficas A.G. (1993) Phytotoxicity and persistence of chlorsulfuron, metsulfuron-methyl, triasulfuron and tribenuron-methyl in three soils. *Weed Res.* 33: 355-367.
- Kozik A., Michelmore R., Knapp S., Matvienko M., Rieseberg L., Lin H., van Damme M., Lavelle D., Chevalier P., Ziegler J., Ellison P., Kolkman J., Slabaugh M., Livingston K., Zhou L., Church S., Edberg S., Jackson L., Kesseli R. & Bradford K. (2002) Sunflower and lettuce ESTs from the compositae genome project.
- Kreuz K., Tommasini R. & Martinoia E. (1996) Old Enzymes for a New Job - Herbicide Detoxification in Plants. *Plant Physiol.* 111: 349-353.
- Kuk Y.I., Kwon O.D., Jung H.I., Burgos N.R. & Guh J.O. (2002) Cross-resistance pattern and alternative herbicides for *Rotala indica* resistant to imazosulfuron in Korea. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74: 129-138.
- Kuk Y.I., Jung H.I., Kwon O.D., Lee D.J., Burgos N.R. & Guh J.O. (2003a) Rapid diagnosis of resistance to sulfonyleurea herbicides in monochoria (*Monochoria vaginalis*). *Weed Sci.* 51: 305-311.
- Kuk Y.I., Jung H.I., Kwon O.D., Lee D.J., Burgos N.R. & Guh J.O. (2003b) Sulfonyleurea herbicide-resistant *Monochoria vaginalis* in Korean rice culture. *Pest Manag. Sci.* 59: 949-961.
- Kuk Y.I., Kim K.H., Kwon O.D., Lee D.J., Burgos N.R., Jung S. & Guh J.O. (2004) Cross-resistance pattern and alternative herbicides for *Cyperus difformis* resistant to sulfonyleurea herbicides in Korea. *Pest Manag. Sci.* 60: 85-94.
- Kuk Y.I., Burgos N.R. & Shivrain V.K. (2008) Natural Tolerance to Imazethapyr in Red Rice (*Oryza sativa*). *Weed Sci.* 56: 1-11.
- Kvesitadze G., Khatisashvili G., Sadunishvili T. & Ramsden J.J. (2006) The fate of organic contaminants in the plant cell. En: *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants*, pp. 103-133. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kwack M.S., Kim E.N., Lee H., Kim J.W., Chun S.C. & Kim K.D. (2005) Digital image analysis to measure lesion area of cucumber anthracnose by *Colletotrichum orbiculare*. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 418-421.
- Kwon C.S. & Penner D. (1995) Response of a Chlorsulfuron-Resistant Biotype of *Kochia scoparia* to ALS Inhibiting Herbicides and Piperonyl Butoxide. *Weed Sci.* 43: 561-565.

- Kwon C.S., Kells J.J. & Penner D. (1995) Combined Effects of Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides with Terbufos and Piperonyl Butoxide on Corn (*Zea mays*) and Soybean (*Glycine max*). *Weed Technol.* 9: 696-702.
- Lairson L.L., Henrissat B., Davies G.J. & S.G. Withers (2008) Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 521-555.
- Lamego F.P., Charlson D., Delatorre C.A., Burgos N.R. & Vidal R.A. (2009) Molecular Basis of Resistance to ALS-Inhibitor Herbicides in Greater Beggarticks. *Weed Sci.* 57: 474-481.
- Lancien M., Azevedo R. & Lea P. (2007) Amino Acid Synthesis in Plastids. En: *The Structure and Function of Plastids* (eds R. Wise & J. Hooper), pp. 355–385. Springer.
- Landi P., Vicari A. & Catizone P. (1989) Response of maize (*Zea mays* L.) inbred lines and hybrids to chlorsulfuron. *Weed Res.* 29: 265-271.
- 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.
- Lee H., Rustgi S., Kumar N., Burke I., Yenish J.P., Gill K.S., von Wettstein D. & Ullrich S.E. (2011) Single nucleotide mutation in the barley acetohydroxy acid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 8909–8913.
- Lee J.M. & Owen M.D.K. (2000) Comparison of acetolactate synthase enzyme inhibition among resistant and susceptible *Xanthium strumarium* biotypes. *Weed Sci.* 48: 286-290.
- Lee K.Y., Townsend J., Tepperman J., Black M., Chui C.F., Mazur B., Dunsmuir P. & Bedbrook J. (1988) The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* 7: 1241-1248.
- Lee Y.T. & Duggleby R.G. (2001) Identification of the Regulatory Subunit of Arabidopsis thaliana Acetohydroxyacid Synthase and Reconstitution with Its Catalytic Subunit. *Biochem.* 40: 6836-6844.
- Lee Y.T. & Duggleby R.G. (2002) Regulatory interactions in Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase. *FEBS Lett.* 512: 180-184.
- León A., Morata M. & Zambelli A. (2012) Herbicide-resistant sunflower plants and methods of use. US Patent, 2012/0023601 A1, Advanta Seeds B.V., AJ Kapelle (NL); BASF Agrochemical Products B.V., CA Arnhem (NL).
- Letouzé A. & Gasquez J. (2001) Inheritance of fenoxaprop-P-ethyl resistance in a blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) population. *Theor. Appl. Genet.* 103: 288–296.
- 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.

- Li Y.Z. & Wang C.Y. (2005) 2-Aminobutyric Acid as a Chemical Marker for the Detection of Sulfonylurea Herbicides. *Weed Technol.* 19: 176-182.
- Little D. & Shaner D. (1991) Absorption and translocation of the imidazolinone herbicides. En: *The imidazolinone herbicides* (eds D. Shaner & S. O'Connor), pp. 53-69. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Loper B., Cobb W.A. & Anderson K.M. (2002) Chemical Marker for ALS-Inhibitor Herbicides: 2-Aminobutyric Acid Proportional in Sub-Lethal Applications. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2601-2606.
- Lovell S.T., Wax L.M., Simpson D.M. & McGlamery M. (1996a) Using the In Vivo Acetolactate Synthase (ALS) Assay for Identifying Herbicide-Resistant Weeds. *Weed Technol.* 10: 936-942.
- Lovell S.T., Wax L.M., Horak M.J. & Peterson D.E. (1996b) Imidazolinone and Sulfonylurea Resistance in a Biotype of Common Waterhemp (*Amaranthus rudis*). *Weed Sci.* 44: 789-794.
- Mallory Smith C.A., Hendrickson P. & Mueller Warrant G. (1999) Cross-resistance of primisulfuron-resistant *Bromus tectorum* L. (downy brome) to sulfosulfuron. *Weed Sci.* 47: 256-257.
- Manabe Y., Tinker N., Colville A. & Miki B. (2007) CSR1, the Sole Target of Imidazolinone Herbicide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 48: 1340-1358.
- Maneechote C., Preston C. & Powles S.B. (1997) A Diclofop-methyl-Resistant *Avena sterilis* Biotype with a Herbicide-Resistant Acetyl-coenzyme A Carboxylase and Enhanced Metabolism of Diclofop-methyl. *Pest. Sci.* 49: 105-114.
- Mazur B.J., Chui C.-F. & Smith J.K. (1987) Isolation and Characterization of Plant Genes Coding for Acetolactate Synthase, the Target Enzyme for Two Classes of Herbicides. *Plant Physiol.* 85: 1110-1117.
- Mazur B.J. & Falco S.C. (1989) The development of herbicide resistant crops. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 441-470.
- McCourt J.A., Pang S.S., Guddat L.W. & Duggleby R.G. (2005) Elucidating the Specificity of Binding of Sulfonylurea Herbicides to Acetohydroxyacid Synthase. *Biochem.* 44: 2330-2338.
- McCourt J.A. & Duggleby R.G. (2006) Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids* 31: 173-210.
- McCourt J.A., Pang S.S., King Scott J., Guddat L.W. & Duggleby R.G. (2006) Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 569-573.
- McGuire R. (1992) Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience* 27: 1254-1255.
- McNaughton K.E., Letarte J., Lee E.A. & Tardif F.J. (2005) Mutations in ALS Confer Herbicide Resistance in Redroot Pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell Amaranth (*Amaranthus powellii*). *Weed Sci.* 53: 17-22.

- Menendez J. & De Prado R. (1996) Diclofop-methyl Cross-Resistance in a Chlorotoluron-Resistant Biotype of *Alopecurus myosuroides*. *Pest. Biochem. Physiol.* 56: 123–133.
- Menendez J. & De Prado R. (1997) Detoxification of chlorotoluron in a chlorotoluron-resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. Comparison between cell cultures and whole plants. *Physiol. Plant.* 99: 97-104.
- Menendez J., Bastida F. & De Prado R. (2006) Resistance to chlortoluron in a downy brome (*Bromus tectorum*) biotype. *Weed Sci.* 54: 237-245.
- Michelmore R.W., Knapp S., Rieseberg L., Bradford K., Kesseli R., Boore J., Kozik A., Matvienko M., Lavelle D. & Lai Z. (2006) Sunflower (*Helianthus annuus*) ESTs (set 2) from the *Compositae* Genome Project <http://compgenomics.ucdavis.edu/>.
- Miflin B.J. (1974) The Location of Nitrite Reductase and Other Enzymes Related to Amino Acid Biosynthesis in the Plastids of Root and Leaves. *Plant Physiol.* 54: 550-555.
- Miki D., Itoh R. & Shimamoto K. (2005) RNA Silencing of Single and Multiple Members in a Gene Family of Rice. *Plant Physiol.* 138: 1903-1913.
- 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 Sci.* 42: 988-989.
- Miller J.F. & Al-Khatib K. (2004) Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES-1 and SURES-2, resistant to tribenuron herbicide. *Crop Sci.* 44: 1037-1038.
- Miller J.F. & Zollinger R. (2004) Utilization of Cross-Resistance to Create Herbicide-Resistant Sunflower Hybrids. Sunflower Research Workshop, pp. 123-130, Fargo, ND, USA.
- Miller J.F., Gulya T.J. & Vick B.A. (2006) Registration of Imidazolinone Herbicide-Resistant Maintainer (HA 442) and Fertility Restorer (RHA 443) Oilseed Sunflower Germplasms. *Crop Sci.* 46: 483-484.
- Mizutani M. & Sato F. (2011) Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Arch Biochem Biophys* 507:194-203.
- Muhitch M.J., Shaner D.L. & Stidham M.A. (1987) Imidazolinones and Acetohydroxyacid Synthase from Higher Plants. *Plant Physiol.* 83: 451-456.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nelson D. & Werck-Reichhart D. (2011) A P450-centric view of plant evolution. *The Plant J.* 66: 194-211.
- Newhouse K., Singh B., Shaner D. & Stidham M. (1991a) Mutations in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides. *Theor. Appl. Genet.* 83: 65-70.
- Newhouse K., Wang T. & Anderson P. (1991b) Imidazolinone-tolerant crops. En: *The Imidazolinone Herbicides* (eds D.L. Shaner & S.L. O'Connor), pp. 139-150. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Newhouse K.E., Smith W.A., Starrett M.A., Schaefer T.J. & Singh B.K. (1992) Tolerance to Imidazolinone Herbicides in Wheat. *Plant Physiol.* 100: 882-886.
- Nordby J.N., Williams M.M., Pataky J.K., Riechers D.E. & Lutz J.D. (2008) A Common Genetic Basis in Sweet Corn Inbred Cr1 for Cross Sensitivity to Multiple Cytochrome P450-Metabolized Herbicides. *Weed Sci.* 56: 376-382.
- Odell J., Caimi P., Yadav N. & Mauvais C. (1990) Comparison of Increased Expression of Wild-Type and Herbicide-Resistant Acetolactate Synthase Genes in Transgenic Plants, and Indication of Posttranscriptional Limitation on Enzyme Activity. *Plant Physiol.* 94: 1647-1654.
- Ohsako T. & Tominaga T. (2007) Nucleotide substitutions in the acetolactate synthase genes of sulfonylurea-resistant biotypes of *Monochoria vaginalis* (Pontederiaceae). *Genes Genet. Syst.* 82: 207-215.
- Omura T. & Sato R. (1964) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. *The J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
- Oracz K., El-Maarouf-Bouteau H., Bogatek R., Corbineau F. & Bailly C. (2008) Release of sunflower seed dormancy by cyanide: cross-talk with ethylene signalling pathway. *J. Exp. Bot.* 59: 2241-2251.
- Oracz K., El-Maarouf-Bouteau H., Kranner I., Bogatek R., Corbineau F. & Bailly C. (2009) The Mechanisms Involved in Seed Dormancy Alleviation by Hydrogen Cyanide Unravel the Role of Reactive Oxygen Species as Key Factors of Cellular Signaling during Germination. *Plant Physiol.* 150: 494-505.
- Osuna M.D., Vidotto F., Fischer A.J., Bayer D.E., De Prado R. & Ferrero A. (2002) Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 73: 9-17.
- Ouellet T., Rutledge R. & Miki B. (1992) Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of *Brassica napus* have divergent patterns of expression. *The Plant J.* 2: 321-330.
- 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. *Plan Mol Bio* 61: 933-943.
- Pang S.S., Duggleby R.G. & Guddat L.W. (2002) Crystal Structure of Yeast Acetohydroxyacid Synthase: A Target for Herbicidal Inhibitors. *J. Mol. Biol.* 317: 249-262.
- Pang S.S., Guddat L.W. & Duggleby R.G. (2003) Molecular Basis of Sulfonylurea Herbicide Inhibition of Acetohydroxyacid Synthase. *J. Biol. Chem.* 278: 7639-7644.
- Pang S.S., Guddat L.W. & Duggleby R.G. (2004) Crystallization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase in complex with the sulfonylurea herbicide chlorimuron ethyl. *Acta Crystal. (Section D)* 60: 153-155.

- Paniego N., Heinz R., Fernández P., Lia V. & Fusari C. (2010) Bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (eds G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginski), pp. 173. Ediciones INTA.
- Park K.W., Fandrich L. & Mallory-Smith C.A. (2004) Absorption, translocation, and metabolism of propoxycarbazone-sodium in ALS-inhibitor resistant *Bromus tectorum* biotypes. *Pest. Biochem. Physiol.* 79: 18–24.
- Persans M.W. & Schuler M.A. (1995) Differential Induction of Cytochrome P450-Mediated Triasulfuron Metabolism by Naphthalic Anhydride and Triasulfuron. *Plant Physiol.* 109: 1483-1490.
- Petit C., Duhieu B., Boucansaud K. & C. Délye (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 Sci.* 178: 501-509.
- Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C. & Neuvians T. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26: 509-515.
- Polge N. & Barret M. (1995) Characterization of cytochrome P450-mediated chlorimuron ethyl hydroxylation in maize microsomes. *Pest. Biochem. Physiol.* 53: 193-204.
- Powles S.B. & Yu Q. (2010) Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 317–347.
- Powles S.B. & Holtum J.A., eds (1994) *Herbicides Resistance in Plants. Biology and Biochemistry*. Lewis Publisher, Boca Raton.
- Pozniak C.J. & Hucl P.J. (2004) Genetic Analysis of Imidazolinone Resistance in Mutation-Derived Lines of Common Wheat. *Crop Sci.* 44: 23–30.
- Pozniak C.J., Birk I.T., O'Donoghue L.S., Ménard C., Hucl P.J. & Singh B.K. (2004) Physiological and Molecular Characterization of Mutation-Derived Imidazolinone Resistance in Spring Wheat. *Crop Sci.* 44: 1434-1443.
- 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. *Pest. Biochem. Physiol.* 54: 123-134.
- Preston C. (2003) Inheritance and linkage of metabolism-based herbicide cross-resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Sci.* 51:4-12.
- Preston C. (2004) Herbicide resistance in weeds endowed by enhanced detoxification: complications for management. *Weed Sci.* 52: 448-453.
- Preston C., Stone L.M., Rieger M.A. & Baker J. (2006) Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 84: 227-235.
- Priya P., Raghothama K.G. & Sahi S.V. (2008) Molecular characterization of phosphorus-responsive genes in sunflower (*Helianthus annuus*). Western Kentucky University.

- Qian H., Hu H., Mao Y., Ma J., Zhang A., Liu W. & Fu Z. (2009) Enantioselective phytotoxicity of the herbicide imazethapyr in rice. *Chemosphere* 76: 885–892.
- R Development Core Team (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rainbolt C.R., Thill D.C., Zemetra R.S. & Shaner D.L. (2005) Imidazolinone-Resistant Wheat Acetolactate Synthase in vivo Response to Imazamox. *Weed Technol.* 19: 539-548.
- Ralston L. & Yu O. (2006) Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochem. Rev.* 5: 459-472.
- Ray T.B. (1984) Site of action of Chlorsulfuron. Inhibition of of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiol.* 75: 827-831.
- Regier N. & Frey B. (2010) Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Mol. Biol.* 11: 57-64.
- Richter J. & Powles S.B. (1993) Pollen Expression of Herbicide Target Site Resistance Genes in Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*). *Plant Physiol.* 102: 1037-1041.
- Ritz C. & Streibig J.C. (2005) Bioassay Analysis using R. *J. Stat. Softw.* 12: 1-22.
- 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 Physiol.* 118: 1049–1056.
- Rodríguez G., Moyseenko J., Robbins M., Huarachi Morejón N., Francis D. & van der Knaap E. (2010) Tomato Analyzer: A Useful Software Application to Collect Accurate and Detailed Morphological and Colorimetric Data from Two-dimensional Objects. *JoVE* 37.
- Rost T. & Reynolds T. (1985) Reversal of Chlorsulfuron-Induced Inhibition of Mitotic Entry by Isoleucine and Valine. *Plant Physiol.* 77: 481-482.
- Royuela M., Arrese-Igor C., Muñoz-Rueda A. & González Murua C. (1991) *In vitro* and *in vivo* Effects of Chlorsulfuron in Sensitive and Tolerant plants. *J. Plant Physiol.* 139: 235 - 239.
- 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.
- Rubin B. & Casida J.E. (1985) R-25788 Effects on Chlorsulfuron Injury and Acetohydroxyacid Synthase Activity. *Weed Sci.* 33: 462-468.
- Rutledge R., Ouellet T., Hattori J. & Miki B. (1991) Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family. *Mol. Gen. Genet.* 229: 31-40.
- Saari L.L., Cotterman J.C. & Thill 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.

- Sala C.A., Bulos M., Echarte M., Whitt S.R. & Ascenzi R. (2008a) Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 118: 105-112.
- Sala C.A., Bulos M. & Echarte M. (2008b) Genetic Analysis of an Induced Mutation Conferring Imidazolinone Resistance in Sunflower. *Crop Sci.* 48: 1817-1822.
- Sala C.A. & Weston B. (2010) Nuevas tecnologías en tolerancia a herbicidas. Actas del V Congreso Nacional de Girasol, pp. 129-145, Buenos Aires, Argentina.
- Sala C.A. & Bulos M. (2012a) Inheritance and molecular characterization of broad range tolerance to herbicides targeting acetohydroxyacid synthase in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 124: 355-364.
- Sala C.A. & Bulos M. (2012b) Use of imidazolinone tolerance to produce male-sterile testers in sunflower breeding programs. Proceedings 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata & Balcarce, Argentina.
- Sala C.A., Bulos M., Altieri E. & Ramos M.L. (2012a) Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. Proceedings 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata & Balcarce, Argentina.
- Sala C.A., Bulos M., Altieri E. & Weston B. (2012b) Response to imazapyr and dominance relationships of two imidazolinone-tolerant alleles at the *Ahas1* locus of sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 124: 385-396.
- Sala C.A., Bulos M., Altieri E. & Ramos M.L. (2012c) Imisun tolerance is the result of the interaction between target and non-target tolerance mechanisms. Proceedings 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata & Balcarce, Argentina.
- Sander K.W. & Barrett M. (1989) Differential Imazaquin Tolerance and Behavior in Selected Corn (*Zea mays*) Hybrids. *Weed Sci.* 37: 290-295.
- Sandermann H. (2004) Molecular ecotoxicology of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 406-413.
- Sandín España P., Loureiro I., Escorial C., Chueca C. & Santín-Montanyá I. (2011) The Bioassay Technique in the Study of the Herbicide Effects. En: *Herbicides, Theory and Applications* (ed M. Larramendy). InTech Publisher, <http://www.intechopen.com/books/herbicides-theory-and-applications/the-bioassay-technique-in-the-study-of-the-herbicide-effects>.
- Santín-Montanyá I., Alonso-Prados J.L., Villarroya M. & García-Baudín J.M. (2006) Bioassay for Determining Sensitivity to Sulfosulfuron on Seven Plant Species. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 41: 781-793.
- Sathasivan K., Haughn G.W. & Mura N. (1990) Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. *Nucleic Acids Res.* 18: 2188.
- Scarabel L., Locascio A., Furini A., Sattina M. & Varotto S. (2010) Characterisation of ALS genes in the polyploidy species *Schoenoplectus mucronatus* and implications for resistance management. *Pest Manag Sci* 66:337-344.

- Scheffe J., Lehmann K., Buschmann I., Unger T. & Funke-Kaiser H. (2006) Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's  $C_T$  difference" formula. *J. Mol. Med.* 84: 901-910.
- Schloss J.V., Ciskanik L.M. & Van Dyk D.E. (1988) Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. *Nature* 331: 360-362.
- Schmitt G. & Singh B. (1990) Tissue distribution of acetohydroxyacid synthase activity at various developmental stages of lima bean. *Pest. Sci.* 30: 418-419.
- Schneiter A.A. & Miller J.F. (1981) Description of Sunflower Growth Stages. *Crop Sci.* 21: 901-903.
- Schuler M. & Werck-Reichhart D. (2003) Functional Genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 629-667.
- Seefeldt S.S., Jensen J.E. & Fuerst P. (1995) Log-Logistic Analysis of Herbicide Dose-Response Relationship. *Weed Technol.* 9: 218-227.
- Shaner D.L. & Mallipudi N. (1991) Mechanisms of selectivity of the imidazolinones. En: *The imidazolinone herbicides* (eds D. Shaner & S. O'Connor), pp. 91-102. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Shaner D.L. & O'Connor S.L. (1991) *The imidazolinone herbicides*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Shaner D.L., Anderson J.A. & Stidham M.A. (1984) Imidazolinones. Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.* 76: 545-546.
- Shaner D.L., Stidham M., Singh B. & Tan S. (2012) Imidazolinones herbicides. En: *Modern Crop Protection Compounds* (eds W. Krämer, U. Schirmer, P. Jeschke & M. Witschel), pp. 88-98. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Shim S.I., Lee B.M., Ryu E.I. & Kang B.H. (2003) Response of leaf acetolactate synthase from different leaf positions and seedling ages to sulfonylurea herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 75: 39-46.
- Siminszky B., Corbin F.T., Ward E.R., Fleischmann T.J. & Dewey R.E. (1999) Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1750-1755.
- Siminszky B., Sheldon B.S., Corbin F.T. & Dewey R.E. (2000) A cytochrome P450 monooxygenase cDNA (CYP71A10) confers resistance to linuron in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Weed Science* 48: 291-295.
- Siminszky B. (2006) Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochem. Rev.* 5: 445-458.
- Simon P. (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 19: 1439-1440.
- Simpson D.M., Stoller E.W. & Wax L.M. (1995) An *in vivo* Acetolactate Synthase Assay. *Weed Technol.* 9: 17-22.

- Simpson D.M. & Stoller E.W. (1996) Thifensulfuron and Imazethapyr Interaction at the ALS Enzyme in Sulfonylurea-Tolerant Soybean (*Glycine max*). *Weed Sci.* 44: 763-768.
- Singh B.K., Stidham M.A. & Shaner D.L. (1988) Assay of Acetohydroxyacid Synthase. *Anal.Biochem.* 171: 173-179.
- Singh B.K. & Shaner D.L. (1995) Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field. *Plant Cell* 7: 935-944.
- 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.
- Sixto H., Silvela L., Escorial C., García Baudín J.M. & Chueca M.C. (1995) On the inheritance of tolerance to chlorotoluron application in wheat using a very efficient score test. *Weed Res.* 35: 7-13.
- Sokal R.R. & Rohlf F.S. (1969) *Biometry*. WH, Freeman & Co., San Francisco.
- Spackman V. & Cobb A. (1999) Cell cycle inhibition of potato root tips treated with Imazethapyr. *Annals Applied Biol.* 135: 585-587.
- Sprague C.L., Stoller E.W. & Wax L.M. (1997a) Common cocklebur (*Xanthium strumarium*) resistance to selected ALS-inhibiting herbicides. *Weed Technol.* 11: 241-247.
- Sprague C.L., Stoller E.W., Wax L.M. & Horak M.J. (1997b) Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistance to selected ALS-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 45: 192-197.
- Stidham M.A. & Singh B.K. (1991) Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. En: *The imidazolinone herbicides* (eds D. Shaner & S. O'Connor), pp. 71-90. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Stidham M.A. & Shaner D.L. (1990) Imidazolinone inhibition of acetohydroxyacid synthase *in vitro* and *in vivo*. *Pestic. Sci.* 29: 335-340.
- Stork P. & Hannah M.C. (1996) A bioassay method for formulation testing and residue studies of sulfonylurea and sulfonamide herbicides. *Weed Res.* 36: 271-281.
- Streibig J.C., Rudemo M. & Jensen J.E. (1993) Dose-Response Curves and Statistical Models. En: *Herbicide Bioassays* (eds J.C. Streibig & P. Kudsk), pp. 29-55. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Streit L.G. (2012) DuPont™ ExpressSun™ Herbicide Technology in Sunflower. Proceedings 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata & Balcarce, Argentina.
- Sunderland S., Santelmann P. & Baughman T. (1991) A Rapid, Sensitive Soil Bioassay for Sulfonylurea Herbicides. *Weed Sci.* 39: 296-298.
- Swanson E., Herrgesell M., Arnoldo M., Sippel D. & Wong R. (1989) Microspores mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to imidazolinones. *Theor. Appl. Genet.* 78: 525-530.

- Tan S., Evans R., Dahmer M.L., Singh B.K. & Shaner D.L. (2005) Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest. Manag. Sci.* 61: 246-257.
- Tan S., Evans R. & Singh B.K. (2006) Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 30: 195-204.
- Teclé B., Da Cunha A. & Shaner D. (1993) Differential routes of metabolism of imidazolinones: basis for soybean (*Glycine max*) selectivity. *Pest. Biochem. Physiol.* 46: 120-130.
- Topal A., Adams N., Hodgson E. & Kelly S.L. (1996) In vitro metabolism of atrazine by tulip cytochrome P450. *Chemosphere* 32: 1445-1451.
- Tranel P.J. & Wright T.R. (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci.* 50: 700-712.
- Tuesca D. & Nisensohn L. (2004) Inhibidores de la síntesis de aminoácidos. En: *Herbicidas: características y fundamentos de su actividad* (ed J. Vitta), pp. 51-58. UNR Editora, Rosario.
- Uchino A., Watanabe H., Wang G.-X. & Itoh K. (1999) Light requirement in rapid diagnosis of sulfonylurea-resistant weeds of *Lindernia* spp. (Scrophulariaceae). *Weed Technol.* 13: 680-684.
- Uchino A. & Watanabe H. (2002) Mutations in the acetolactate synthase genes of sulfonylurea-resistant biotypes of *Lindernia* spp. *Weed Biol. Man.* 2: 104-109.
- Uchino A., Ogata S., Kohara H. & Yoshida S. (2007) Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*. *Weed Biol. Man.* 7: 89-96.
- Van Eerd L.L., Hoagland R.E., Zablotowicz R.M. & Hall J.C. (2003) Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci.* 51: 472-495.
- Vega T. (2009) La expresión *in vitro* de la resistencia a imidazolinonas en distintos genotipos de girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.). Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR).
- Vega T., Breccia G., Nestares G., Mayor María L., Zorzoli R. & Picardi L. (2009) Soil-less bioassays for early screening for resistance to imazapyr in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pest. Manag. Sci.* 65: 991-995.
- 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. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2986-2990.
- Villarroya M., Escorial M.C., García Baudín J.M. & Chueca C. (2000) Inheritance of tolerance to metribuzin in durum wheat. *Weed Res.* 40: 293-300.
- Vinje M.A., Willis D.K., Duke S.H. & Henson C.A. (2011) Differential expression of two  $\alpha$ -amylase genes (*Bmy1* and *Bmy2*) in developing and mature barley grain. *Planta* 233: 1001-1010.

- Volenberg D.S., Stoltenberg D.E. & Boerboom C.M. (2000) *Solanum ptycanthum* resistance to acetolactate synthase inhibitors. *Weed Sci.* 48: 399-401.
- Volenberg D.S., Stoltenberg D.E. & Boerboom C.M. (2001) Biochemical mechanism and inheritance of cross-resistance to acetolactate synthase inhibitors in giant foxtail. *Weed Sci.* 49: 635-641.
- Vrbničanin S., Božić D., Malidža G., Dušanić N., Pavlović D. & Barac M. (2008) Tolerance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to imazathapyr. *Helia* 31: 85-94.
- Warwick S.I., Sauder C.A. & Beckie H.J. (2010) Acetolactate Synthase (ALS) Target-Site Mutations in ALS Inhibitor-Resistant Russian Thistle (*Salsola tragus*). *Weed Sci.* 58: 244-251.
- Werck-Reichhart D., Hehn A. & Didierjean L. (2000) Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci.* 5: 116-123.
- Werck Reichhart D. & Feyereisen R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1: 3003.3001–3003.3009.
- 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. *Toxicol. Ind. 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 Sci.* 50: 432-437.
- White A.D., Graham M.A. & Owen M.D.K. (2003) Isolation of acetolactate synthase homologs in common sunflower. *Weed Sci.* 51: 845-853.
- Woodworth A., Bernasconi P., Subramanian M. & Rosen B. (1996) A second naturally occurring point mutation confers broad-based tolerance to acetolactate synthase inhibitors. *Plant Physiol.* 111: S105.
- WSSA (1998) Technology Notes. *Weed Technol.* 12: 789.
- Xiang W., Wang X. & Ren T. (2006) Expression of a wheat cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast catalyzes the metabolism of sulfonylurea herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: 1-6.
- Yamada T., Kambara Y., Imaishi H. & Ohkawa H. (2000) Molecular Cloning of Novel Cytochrome P450 Species Induced by Chemical Treatments in Cultured Tobacco Cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68: 11–25.
- Yasuor H., TenBrook P., Tjeerdema R. & Fischer A.J. (2008) Responses to clomazone and 5-ketoclomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice fields. *Pest Manag. Sci.* 64: 1031–1039.
- Yasuor H., Osuna M.D., Ortiz A., Saldain N., Eckert J. & Fischer A.J. (2009) Mechanism of Resistance to Penoxsulam in Late Watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss.]. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3653-3660.

- Yim K.O. & Bayer D.E. (1996) Root growth inhibition of rice by bensulfuron. *Weed Res.* 16: 49-54.
- Yu Q., Zhang X.Q., Hashem A., Walsh M.J. & Powles S.B. (2003) ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Sci.* 51: 831–838.
- 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. *Pestic. Biochem. Physiol.* 78 21-30.
- Yu Q., Abdallah I., Han H., Owen M. & Powles S. (2009) Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta* 230: 713-723.
- Yu Q., Han H., Vila-Aiub M. & Powles S.B. (2010) AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *J. Exp. Bot.* 61: 3925–3934.
- Yuan J.S., Tranel P.J. & Stewart C.N. (2007) Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci.* 12: 6-13.
- Yun M.S., Shim S. & Usui K. (2001) Involvement of cytochrome P-450 enzyme activity in the selectivity and safening action of pyrazosulfuron-ethyl. *Pest. Manag. Sci.* 57: 283-288.
- Yun M.S., Yogo Y., Miura R., Yamasue Y. & Fischer A.J. (2005) Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 83: 107-114.
- Zabalza A., Orcaray L., Gaston S. & Royuela M. (2004) Carbohydrate Accumulation in Leaves of Plants Treated with the Herbicide Chlorsulfuron or Imazethapyr Is Due to a Decrease in Sink Strength. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7601-7606.
- Zabalza A., González E.M., Arrese-Igor C. & Royuela M. (2005) Fermentative Metabolism Is Induced by Inhibiting Different Enzymes of the Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis Pathway in Pea Plants. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7486-7493.
- Zabalza A., Orcaray L., Igal M., Schauer N., Fernie A., Geigenberger P., van Dongen J. & Royuela M. (2011) Unraveling the role of fermentation in the mode of action of acetolactate synthase inhibitors by metabolic profiling. *J. Plant Physiol.* 168: 1568-1575.
- Zelaya I.A. & Owen M.D.K. (2004) Evolved resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in common sunflower (*Helianthus annuus*), giant ragweed (*Ambrosia trifida*), and shattercane (*Sorghum bicolor*) in Iowa. *Weed Sci.* 52: 538-548.
- Zhang F., Jin Z., Naeem M., Ahmed Z., Gong H., Lub L., Ye Q. & Zhou W. (2009) Spatial and temporal changes in acetolactate synthase activity as affected by new herbicide ZJ0273 in rapeseed, barley and water chickweed. *Pest. Biochem. Physiol.* 95: 63-71.
- 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 sulfonylurea herbicide resistance gene, *Bel*, in rice. *Mol. Breeding* 19: 59–68.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. & Miller W. (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7: 203-214.
- Zhou Q., Liu W., Zhang Y. & Liu K. (2007) Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 89: 89-96.
- Zhou Q., Xu C., Zhang Y. & Liu W. (2009) Enantioselectivity in the Phytotoxicity of Herbicide Imazethapyr. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1624-1631.
- Zhou Q., Zhang N., Zhang C., Huan L., Niu Y., Zhang Y. & Liu W. (2010) Molecular Mechanism of Enantioselective Inhibition of Acetolactate Synthase by Imazethapyr Enantiomers. *J. Agric. Food Chem.* 58: 4202-4206.
- Zimmerlin A. & Durst F. (1992) Aryl Hydroxylation of the Herbicide Diclofop by a Wheat Cytochrome P-450 Monooxygenase. *Plant Physiol.* 100: 874-881.
- Zollinger R. (2004) Advances in sunflower weed control in the USA. Proceedings 16th International Sunflower Conference, pp. 435-439, Fargo, North Dakota, USA.