

***Validación de una herramienta bioquímica para la
identificación de malezas resistentes a inhibidores de
la enzima ALS en el arroz***

Manuel Diez Vignola

Orientadores

Victoria Bonnacarrère

Néstor Saldain

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad de la Republica.



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
U R U G U A Y



FACULTAD DE
CIENCIAS

Índice

RESUMEN.....	p.3
INTRODUCCION.....	p.4
OBJETIVO Y ESTRATEGIAS.....	p.19
MATERIALES Y METODOS.....	p.20
RESULTADOS y DISCUSION.....	p. 24
CONCLUSION Y PERSPECTIVAS.....	p. 31
BIBLIOGRAFIA.....	p 32
ANEXO.....	p.34

Resumen

La cadena arroceras es netamente exportadora en Uruguay, requiriendo de una producción competitiva y de alta calidad. Un 35% del área sembrada con arroz presentó al menos una planta ha⁻¹ de arroz rojo en el año 2005-06. El sistema de Producción de arroz Clearfield® fue una respuesta comercial para resolver este problema. Ésta tecnología se basa en la producción de semillas de variedades de arroz no transgénicas resistentes a los herbicidas de la familia de las Imidazolinonas (IMI). Las IMI actúan inhibiendo a la enzima ALS que participa en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, por lo que su inhibición provoca detención del crecimiento y posteriormente la muerte de las especies susceptibles.

En 1998 se generó el primer arroz Clearfield®, mediante mutagénesis con metanosulfonato de etilo. En los años siguientes se han desarrollado variedades e híbridos Clearfield® en Estados Unidos, Brasil y Argentina, utilizados en los campos arroceros del Mercosur.

Los herbicidas inhibidores de la ALS cuando son aplicados de manera frecuente favorecen la evolución de biotipos resistentes de la maleza. En Uruguay han sido aplicados metsulfuron, bispiribac, penoxulam, imazapir + imazapic, por lo que las poblaciones de malezas han sido sometidas a una fuerte selección en contra de los individuos susceptibles a estos herbicidas.

La finalidad de este trabajo es contar en el país con una herramienta que permita detectar rápidamente biotipos resistentes a los inhibidores de ALS de manera de definir un plan de manejo racional de las malezas en el arrozal.

La herramienta a ser utilizada es la cuantificación de la actividad in vitro de la enzima ALS y como los diferentes herbicidas la inhiben. Con este fin se utiliza el modelo de arroz Clearfield® cuyas mutaciones son conocidas, para ajustar y validar la determinación de la actividad enzimática y hacerlas extensivos a otras especies de malezas.

Introducción

Producción de arroz en el Uruguay

El cultivo de arroz en Uruguay se basa en un sistema de producción de baja intensidad, en rotaciones con pasturas e integrado con la producción ganadera (ACA-INIA, 2004). El 60% del cultivo se realiza sobre campos con distintos largos de retorno (cuantos años continuos sin cultivar arroz) y sólo el 40% se siembra sobre rastrojos de arroz del año anterior. Este sistema de producción, sumado a una alta calidad de semilla utilizada por los productores, le otorga al cultivo de arroz una alta sustentabilidad, con un bajo uso de fertilizantes. (ACA, 2012). Esta realidad productiva, prácticamente única en el mundo, es quizá una de las mayores fortalezas del sistema de producción uruguayo, frente a un escenario mundial que asigna creciente importancia a la conservación del ambiente y a la seguridad alimentaria. Luego de obtener tempranamente el autoabastecimiento, la producción nacional se volcó rápidamente hacia la exportación (Aguerre, 2008). El cultivo de arroz ocupa el 1% de la superficie del país y es el quinto rubro de exportación, representando casi el 10 % de las exportaciones totales del Uruguay, generando 10 mil puestos de trabajo directa o indirectamente (ACA-INIA, 2004).

Malezas asociadas al cultivo

Uno de los factores que atenta contra la productividad y la calidad de la producción es la aparición de malezas asociadas al cultivo del arroz. La maleza que tiene mayor presencia en la actualidad es el capin (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv) (Saldain, 2006), aunque también están presentes, el arroz rojo o arroz maleza (*Oryza sativa*), *Panicum ditochomiflorum*, *Digitaria sanguinalis*, *Luziola sp.*, *Leersia sp.* , y otras de hoja ancha de menor importancia (Fig.1). El control de estas malezas se realiza a partir de metodologías de manejo agronómico y aplicación de productos químicos disponibles.



Figura 1 = a) Capin , b) Arroz rojo , c) Digitaria sanguinalis , d) Panicum ditochomiflorum

El capin es una maleza anual, cosmopolita que habita preferentemente en suelos húmedos y ricos en nutrientes (Holm et al, 1977). Tiene un aspecto robusto, con raíces fibrosas, hoja sin lígula, vaina aplanada en estado de plántula y reproducción por cariopses. La inflorescencia formada por un racimo de 2-10 cm y presenta varias espigas bien definidas (Fig.2). Las espiguillas tienen entre 2,8-3,5 mm, son comprimidas, pueden ser aristadas o no. La gluma inferior tiene 1/2-1/3 de la longitud de la espiguilla y es mucho menor que la gluma superior, la que presenta cortos cilias.

El éxito de esta maleza se puede atribuir a la producción de un gran número de semillas por planta, presentar un desarrollo rápido y tener la habilidad de floración bajo un rango amplio de fotoperiodos. Las semillas poseen dormancia, lo que permite mantener la viabilidad por

muchos años, facilitando su persistencia como maleza en los subsecuentes ciclos de cultivo.

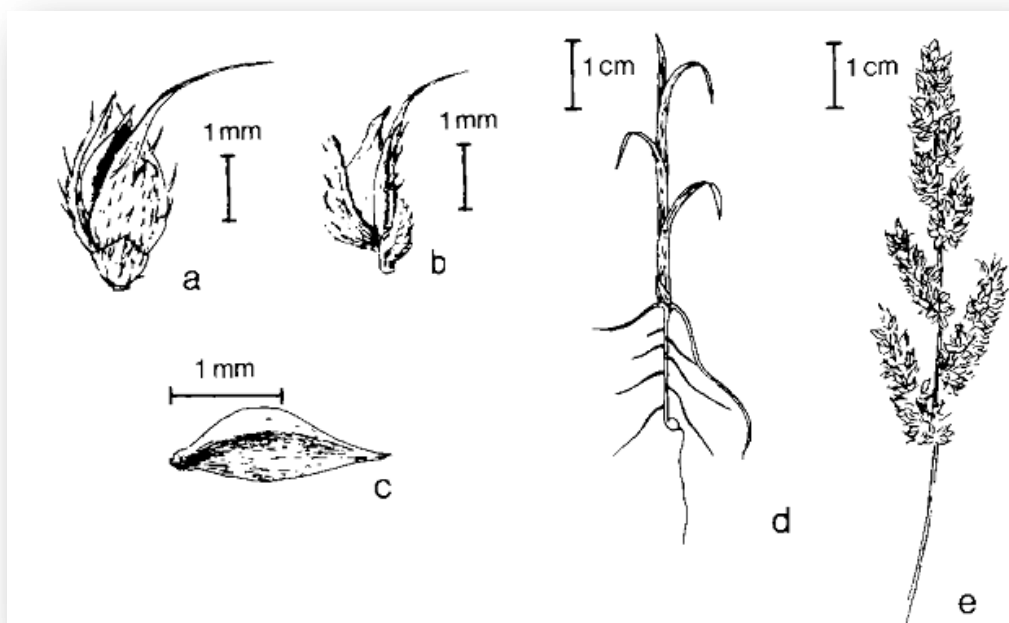


Figura 2 = a –b) espiguilla, c) cariopsis , d)plántula , e) panoja (conjunto de espigas ramificadas) (Maun y Barrett, 1986)

Estudios experimentales indican que una fuerte presencia de capin puede remover entre 60 y 80 % del nitrógeno del suelo (Holm et al. 1977). En presencia de una fuerte competencia, el macollaje del arroz se reduce en un 50%, hay una drástica reducción del número de panojas, altura de la planta, peso del grano y número de granos por planta. Para su control, se han utilizados localmente herbicidas con los principios activos propanil, quinclorac, clomazone, glifosato, bispiribac y penoxulam. Sin embargo, ninguno de estos herbicidas elimina esta maleza de forma absoluta. De hecho, existen estudios que demostraron que en su estado maduro, posee una alta resistencia a los herbicidas (Maun y Barrett , 1986).

El Arroz Rojo (AR) es la segunda maleza de importancia en el cultivo de arroz. Se lo ha definido como todo individuo *Oryza* capaz de crecer dentro y cerca de cultivos de arroz o subsiguientes, pero no cultivado intencionalmente (Smith y Dilday, 2002). Por su similitud fenotípica y filogenética con el arroz cultivado, es muy difícil combatir esta maleza. Su control por medios

químicos no selectivos requiere un manejo de alta dedicación y frecuentes intervenciones que comprometen la competitividad (Fischer y Ramírez, 1993).

Los orígenes de los AR son múltiples. En zonas donde existen arrozales silvestres o salvajes como Asia y África, los eventos de hibridación natural entre éstos y el arroz cultivado, y la posterior selección en las condiciones de cultivo, habrían dado lugar a diferentes momentos de origen (Delouche *et al.*, 2007). A su vez, el AR llegó a las regiones donde, como en nuestro país, no hay especies del mismo género capaces de hibridarse con el arroz cultivado, propagándose en partidas de semilla contaminada, habituales con anterioridad al siglo XX. Allí los procesos de selección y re-hibridación dieron y continúan dando lugar a los diferentes biotipos que se encuentran actualmente.

El AR es generalmente un competidor superior a los cultivares comerciales, debido a su vigor temprano, mayor macollamiento, mayor tamaño de plantas y capacidad de desgrane. Las semillas pueden presentar dormancia y mantener su viabilidad por muchos años (Ortega y Alvarado, 2005). En las primeras etapas de crecimiento las plántulas de arroz rojo son muy similares a las del cultivo. Después de la formación de panojas (panículas) el reconocimiento se facilita por la distinta pigmentación de las aristas y el pericarpio (desde negro y rojo oscuro, hasta blanco), así como la mayor dehiscencia de sus granos. La alta elasticidad del proceso de germinación de semillas de arroz rojo, caracterizada por su habilidad para germinar antes del cultivo y escaparse a los tratamientos para su control, favorece su capacidad competitiva.

Smith (1988) reportó que una competencia temprana de infestaciones relativamente bajas (10 - 20 plantas/m² de arroz rojo puede ocasionar pérdidas en producción del 50%. En Latinoamérica se ha estimado que 24 plantas/ m² pueden causar pérdidas de rendimiento del 75% (Fisher y Ramírez 1993).

A nivel local, la principal estrategia de control del AR ha sido el uso de semilla certificada. Ésta es producida en suelos sin historia arrocera o con descansos prolongados, y se descarta cualquier lote en el que se detecte la presencia de AR. Actualmente en Uruguay más del 80% del área de cultivo se siembra con semilla certificada (Zorrilla de San Martín, 2007). La rotación de cultivos, especialmente la rotación arroz-pasturas, ha sido otra estrategia ampliamente

adoptada lo que ayuda a combatir la maleza y a mejorar las condiciones físicas y químicas del suelo (Agostinetto *et al.*, 2001; Deambrosi, 2009). El hecho de que el arroz cultivado y el AR sean de la misma especie (*Oryza sativa*) dificulta el control químico por herbicidas selectivos. Sin embargo, pequeñas diferencias entre sus ciclos y la altura de la planta hacen posible mitigar la presencia de AR mediante la aplicación de herbicidas no selectivos en momentos específicos y a través del control posicional en combinación con un determinado manejo agronómico.

Una alternativa para el control de esta maleza, es el uso de variedades de arroz resistentes a herbicidas de acción total, lo que posibilita el control selectivo y eficiente de AR. Una estrategia para la generación de arroz resistente a herbicidas ha sido la transgénesis. Por ejemplo, Monsanto presentó su variedad Roundup Ready, resistente a glifosato, y Bayer la variedad LibertyLink, resistente a glufosinato (Williams *et al.*, 2010). Ambas propuestas no se han adoptado en el Mercosur por la utilización de transgénesis en su desarrollo.

Alternativamente, se han generado variedades de arroz resistente a imidazolinonas (IMI) utilizando técnicas de mutagénesis en lugar de transgénesis. Estas variedades forman parte el paquete tecnológico conocido comercialmente como Sistema de Producción de Arroz Clearfield®.

Tecnología Clearfield

En 1998 se patentó una línea de arroz resistente a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) generada mediante mutagénesis con metanosulfonato de etilo (MSE) y seleccionada por aplicación de herbicida IMI (Croughan, 1998) (Fig.3). Tras ello se generaron las variedades de arroz resistente a IMI CL121 y CL141, liberadas comercialmente en EEUU en 2001. Las líneas mutagenizadas obtenidas por MSE derivadas del cultivar Cypress fueron la base para la creación de las variedades CL161 (mutación en S₆₅₃D) y XL8, puestas en el mercado a partir de 2003 (Tan *et al.*, 2005). Brasil desarrolló sus propias variedades resistentes, por introgresión del gen de ALS mutado a cultivares adaptados a la región, en el

caso de IRGA 422-CL (mutación en S₆₅₄E) y los híbridos Avaxí CL, Inov CL y Sator CL (Lopes *et al.*, 2004). Por su parte Argentina generó por mutagénesis sobre variedades locales, un cultivar CL denominado Puitá INTA CL (mutación en A₁₂₂T) (Livore *et al.*, 2007).

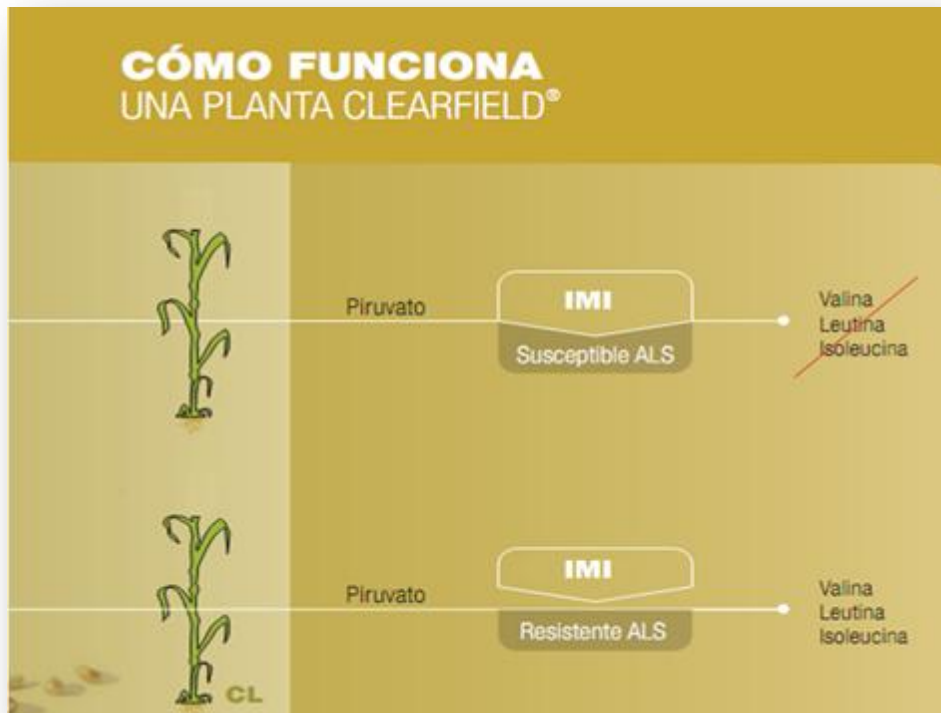


Figura 3. Funcionamiento de la tecnología Clearfield® (BASF, 2010)

Actualmente en Uruguay se utiliza la variedad Puitá INTA CL, Gurí INTA CL y el híbrido INOV CL y anteriormente se plantaba CL 161 y el híbrido Avaxi CL. El sistema de producción de arroz Clearfield® que se ofrece en Uruguay implica dos aplicaciones secuenciales de herbicida IMI denominado KiFix® (imazapic 17.50%, imazapir 52.50%) de 140 g/há, la primera en pre-emergencia, y la segunda dos a tres semanas después (post-emergencia temprana). El paquete se complementa con una serie de recomendaciones comunes a otras estrategias para minimizar la presencia de malezas: el uso exclusivo de semilla certificada, la extracción manual de plantas de AM durante la floración y la destrucción luego de la cosecha de las malezas presentes en el rastrojo.

El uso persistente de esta tecnología ha provocado la evolución de biotipos de AM y posiblemente también biotipos de capín resistente, lo que está de acuerdo con la tendencia mundial de incremento de biotipos resistentes a herbicidas inhibidores de ALS (Fig.4). Estudios recientes demostraron que los biotipos resistentes de AM surgen a partir de un flujo de genes de resistencia desde las variedades Clearfield[®] hacia el AM (Rosas, 2011), encontrándose un gran número de individuos con resistencia en sectores donde se utilizaron variedades Clearfield[®]. En el caso del capín este mecanismo no es viable, siendo posible que los biotipos resistentes se generen a partir mutaciones al azar previamente existentes con una frecuencia muy baja en la enzima que son seleccionadas al aplicar persistentemente el herbicida IMI. Es necesario realizar estudios moleculares y bioquímicos para fundamentar dicha hipótesis.

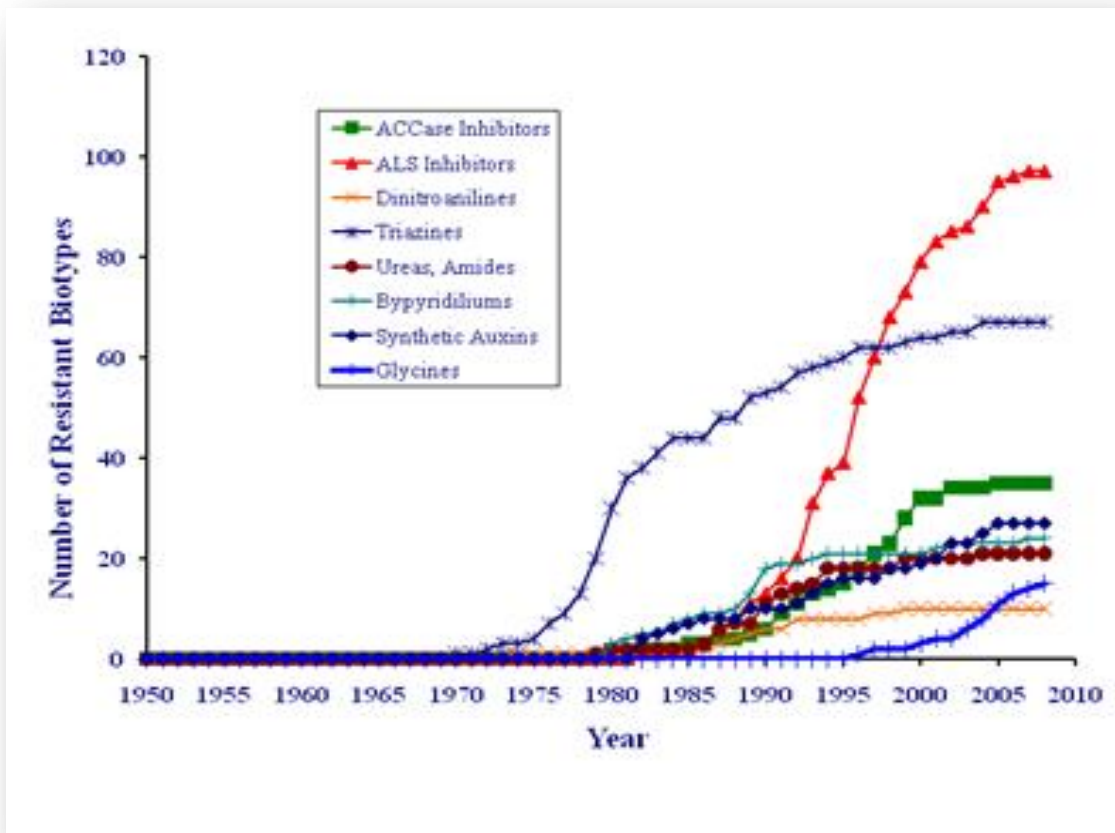


Figura 4. Biotipos resistentes detectados clasificados por familia de herbicidas, en rojo se muestran los biotipos resistentes a inhibidores de la ALS (Heap, 2012)

. Imidazolinonas y su sitio de acción

Las IMI presentan una estructura molecular común: un anillo imidazólico adyacente a un anillo aromático variable. Los seis miembros de este grupo disponibles comercialmente son: imazapir, imazapic, imazetapir, imazaquin, imazamox y metil-imazametabenz (Fig.5) (Roberts, 1998). Las IMI son absorbidas por la planta por vía foliar y radicular, traslocadas por xilema y floema, almacenándose en los puntos de crecimiento; en los cloroplastos interactúan con su blanco, la enzima ALS. Esta enzima cataliza el primer paso de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (valina, isoleucina y leucina), por lo que su inhibición provoca detención del crecimiento, amarillamiento de hojas y posteriormente la muerte. En las malezas, se han descrito diversas mutaciones que disminuyen la afinidad de la interacción ALS:herbicida por medio de una sustitución aminoacídica, sin provocar la pérdida de actividad catalítica. De esa forma evitan la inhibición de la enzima por parte del herbicida, por lo que se las denomina mutaciones de resistencia.

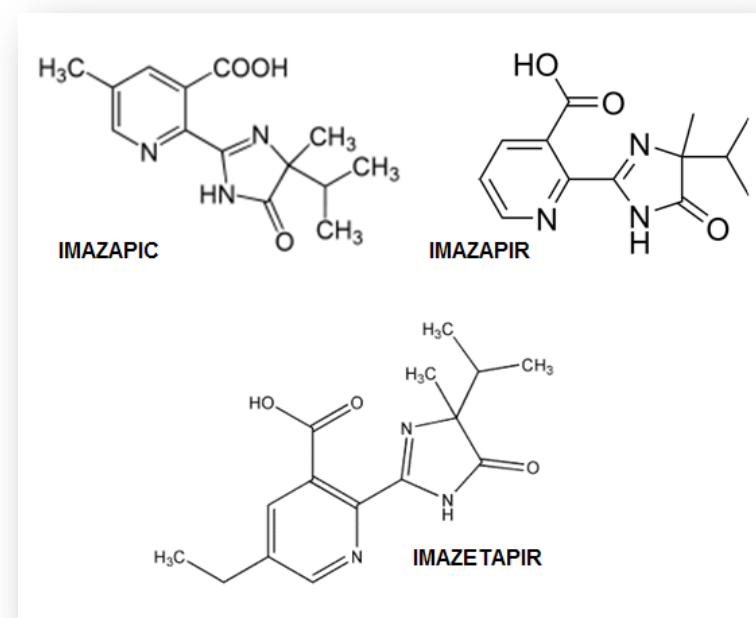


Figura 5. Estructura química de las imidazolinonas más relevantes a nivel regional imazapic, imazapir e imazetapir

Pueden provocar resistencia cruzada, cuando la modificación estructural producto de la sustitución aminoacídica impide la inhibición por miembros de distintas familias de herbicidas cuyo blanco es la ALS; o específica, cuando ésta se restringe a una sola familia o miembro de una familia (Rao, 2000).

La *ALS vegetal* está compuesta por una cuatro subunidades idénticas, cada una de ellas compuestas por tres dominios (α , β y γ) y una cola C – terminal (Fig.6). Su actividad requiere de los cofactores tiamina pirofosfato (TPP), ion Mg^{2+} y flavín adenín dinucleótido (FAD). Las IMI inhiben la ALS al unirse y bloquear el canal de acceso del sustrato. En base a mutagénesis dirigida, se han identificado cinco sitios de reconocimiento herbicida:ALS cuyas secuencias aminoacídicas son conservadas: A, C y D en el dominio α , el sitio B en γ , y el E y en el extremo C-terminal (Shivrain 2010). Otros inhibidores de la ALS como sulfonilureas (como el orthosulfamuron), triazolopirimidinas y pirimidiniltiobenzoatos tienen sitios de unión que se solapan parcialmente con el de las IMI (Tranel *et al.*, 2002).

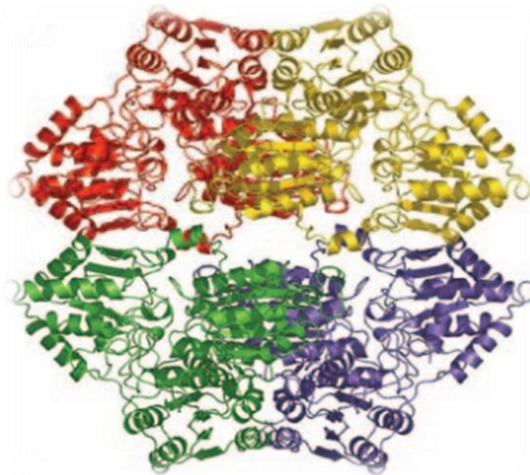


Figura 6. Estructura tridimensional de la ALS vegetal, las cuatro subunidades se muestran en distintos colores

La ALS cataliza dos reacciones diferentes, condensación de dos moléculas de piruvato para dar acetolactato y la condensación de α -cetobutirato y piruvato para formar acetohidroxibutirato. Ambas reacciones son el punto de partida de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada

(Fig. 7), esencial para la supervivencia de la planta. El acetolactato obtenido en la reacción es difícilmente detectable, la conversión de este a acetoína en medio ácido es la base del método para cuantificar su actividad *in vitro*.

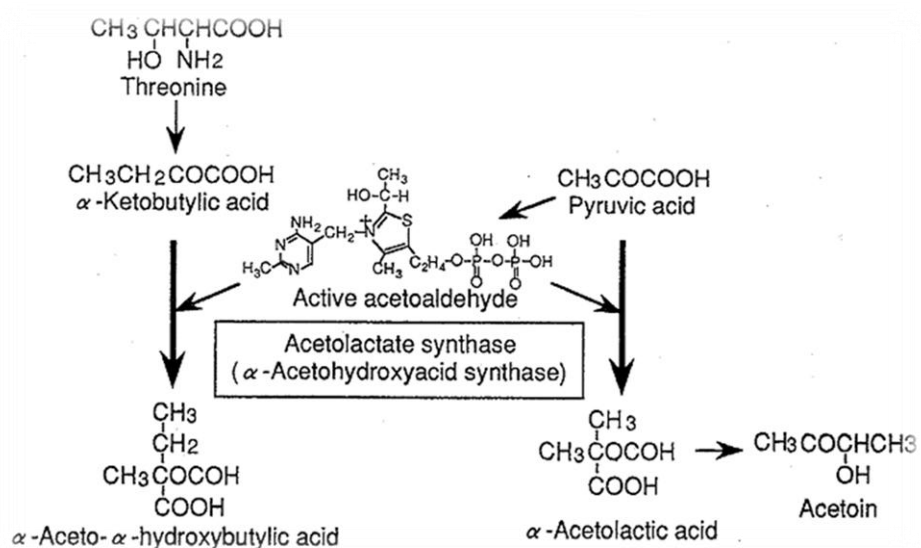


Figura 7. Reacciones catalizadas por la ALS y la reacción secundaria de conversión de acetolactato en acetoína

Métodos de detección de resistencia a imidazolinonas.

Existen tres metodologías de laboratorio utilizadas para detectar resistencias a herbicidas: bioensayos tradicionales, bioensayos enzimáticos y técnicas moleculares basadas en ADN. Los bioensayos tradicionales se basan en ensayos dosis respuesta utilizando plántulas (Fig. 8) a las que se le aplican concentraciones crecientes de herbicida en un número grande de individuos. La potencia y la eficacia del herbicida se evalúa cotejando el peso seco o húmedo obtenido para cada concentración aplicada. El grado de resistencia de la muestra problema se determina basándose en un biotipo sensible. Las técnicas moleculares basadas en ADN se basan en la detección de las mutaciones puntuales o polimorfismos de un nucleótido (SNP, del inglés single nucleotide polymorphism) en el ADN que dan origen a las sustituciones

aminoacídias en la enzima ALS. Existen diferentes métodos para la detección de SNPs. La determinación de la secuencia completa o de algunos dominios del gen es la técnica de referencia para la identificación de una nueva mutación. Otros métodos requieren un conocimiento previo del polimorfismo ya que se basan en el reconocimiento diferencial de las secuencias de alelos de resistencia y tolerancia por parte de enzimas de restricción u oligonucleótidos diseñados específicamente (Castroagudín y Livore , 2007).



Figura 8. Ensayo dosis respuesta tradicional con dosis crecientes de Kifix de 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 y 8 X (izquierda a derecha) 1X = 140 g ha⁻¹ de Kifix (Saldain 2012).

Por último, los bioensayos enzimáticos pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*. Los primeros requieren la extracción de ALS conservando su conformación y función fisiológicas, para medir su actividad en presencia del herbicida en estudio. Ésta se realiza cuantificando espectrofotométricamente a 525 nm la acetoína, producto inmediato de la acción de la ALS sobre el piruvato. La cuantificación relativa de su actividad en ausencia de inhibidores permite la detección de resistencia por sobreproducción de enzima blanco (Osuna *et al.*, 2003). Los

métodos enzimáticos *in vivo* consisten en incubar en medio de cultivo un fragmento foliar de la planta en estudio, agregando además del herbicida, un inhibidor de la cetoácido reductoisomerasa (KARI), enzima que sigue a ALS en la vía biosintética y cuyo sustrato es la acetoína. Se homogeneiza el tejido y se determina la concentración de acetoína, que será directamente proporcional a la actividad de ALS (Corbett y Tardif, 2006). En ambos casos se intenta hallar la concentración de herbicida que reduce la actividad enzimática en un 50% (I_{50}), parámetro indicador de la capacidad de inhibición de un herbicida contra un determinado material vegetal. Para indagar el grado de resistencia a un herbicida que presenta una variedad (RR), se realiza una comparación con una variedad susceptible conocida (SS), a partir del cálculo del factor de resistencia $RF = I_{50}RR / I_{50}SS$ (Yasour *et al* 2009).

Relación dosis respuesta

En general, las relaciones dosis-respuesta no son de carácter lineal, lo que hace necesario explorar otro tipo de análisis. Los ajustes no lineales otorgan un análisis mucho más satisfactorio a la hora de obtener parámetros de significado biológico. Las curvas dosis respuesta son de la forma sigmoidea (Streibig, 1988) (Fig. 9a) y existe un gran número de ajustes no lineales creados para obtener parámetros biológicos (Ritz, 2010). Las cuatro clases más comunes de modelos dosis-respuesta sigmoideos con asíntota horizontal son: log logísticos, log normales, Weibull 1 y Weibull 2.

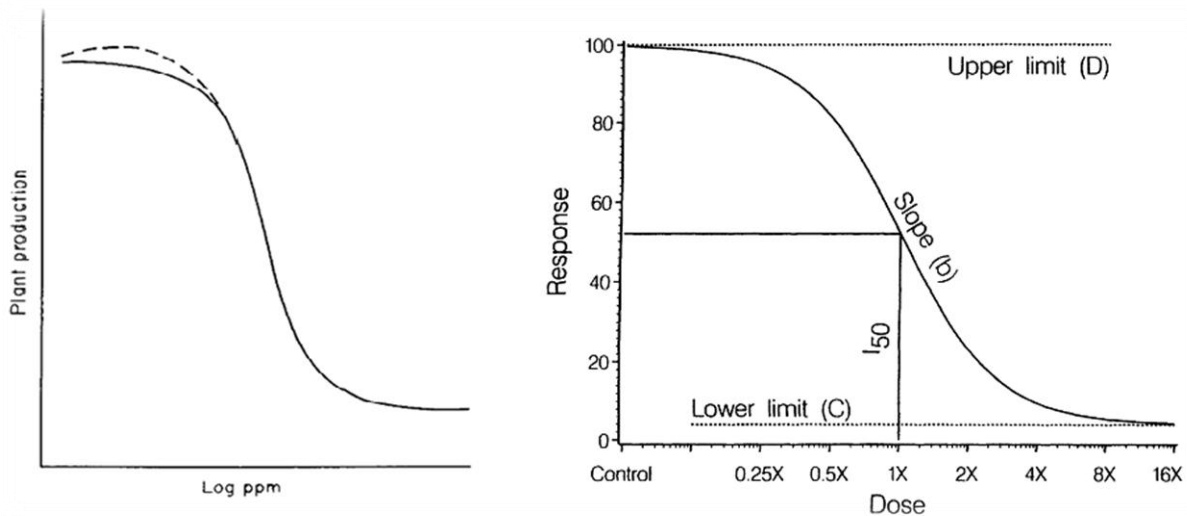


Figura 9. a) Curva hipotética dosis – respuesta b) modelo log logístico

Los modelos log logísticos y log normales son simétricos utilizando la dosis con transformación logarítmica, los modelos Weibull 1 y 2 son asimétricos utilizando la dosis en escala normal.

Los modelos log logísticos de cuatro parámetros (Fig.10) son los más utilizados, se presentan en variedades de parametrizaciones, simplificaciones y casos especiales. (Ej = Michaelis Menten)

$$f(x; b, c, d, e) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))} = c + \frac{d - c}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b}$$

Figura 10. Modelo Log Logístico de cuatro parámetros

El parámetro e equivale a la dosis que reduce en un 50% la respuesta (LD_{50} , ID_{50} , ED_{50}), el parámetro b es la pendiente en el punto de inflexión, el parámetro c y d son los límites inferior y superior respectivamente. Cuando uno de estos dos parámetros es fijo por ejemplo $c = 0$, el modelo se transforma en uno log logístico de 3 parámetros. (Fig.11), reescribiendo esta fórmula se obtiene la ecuación de Hill:

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

Figura 11. Modelo Log Logístico de tres parámetros

Los modelos log normales (Fig. 12) introducen una función de distribución acumulativa (Φ). Este modelo no es muy utilizado en su forma general ya que no hay software estadísticos que lo utilicen, sin embargo la simplificación de este modelo, fijando $c = 0$ y $d = 1$, se obtiene el modelo *probit*, usado ampliamente en ensayos dosis respuesta en toxicología (Finney, 1971).

$$f(x; b, c, d, e) = c + (d - c)\Phi(b(\log(x) - \log(e)))$$

Figura 12 = Modelo Log Normal

Los modelos Weibull 1 y Weibull 2 (Fig. 13) son modelos asimétricos muy similares, la diferencia radica en la ubicación de la asimetría. El modelo Weibull 1, se utiliza cuando hay especial interés en valores altos de inhibición, en la parte baja del gráfico, donde se genera una diferencia significativa entre el modelo log logístico y el Weibull 1. Por lo contrario, el modelo Weibull 2, se utiliza cuando hay interés en valores bajos de inhibición en la parte superior del gráfico, donde se diferencia claramente del modelo log logístico y el Weibull 2 (Fig 13) (Ritz 2010).

Para llevar a cabo el ajuste de los datos, se necesita un software estadístico. Son muchas las opciones comerciales disponibles para realizar esta tarea (SAS, SPSS, Graphpad Prism, Origin Pro, etc). La ventaja de estos software estadísticos radica en la facilidad de la interface “user friendly” y la rapidez en el aprendizaje del programa. Por otra parte, tiene la desventaja de no ser específico para el trabajo a evaluar, y tiene un costo operativo elevado (licencias de uso). La alternativa a estas opciones comerciales es el proyecto R. R es un lenguaje de programación desarrollado en una plataforma de software libre, con un poderoso paquete estadístico. (R Development Core Team, 2004). R permite que investigadores desarrollen

paquetes a la medida del trabajo que realizan. El paquete *drc* (Ritz y Streibig , 2005) se desarrolló especialmente para bioensayos dosis respuesta, permite ajustar los datos experimentales a un gran número de modelos no lineales, pudiendo calcular fácilmente parámetros de interés biológico. La desventaja del uso de R es su interfaz poco amigable, y el lento aprendizaje del programa, debido a que es necesario saber programar.

A

$$f(x; b, c, d, e) = c + (d - c) \exp(-\exp(b(\log(x) - \log(e))))$$

$$f(x; b, c, d, e) = c + (d - c)(1 - \exp(-\exp(b(\log(x) - \log(e))))))$$

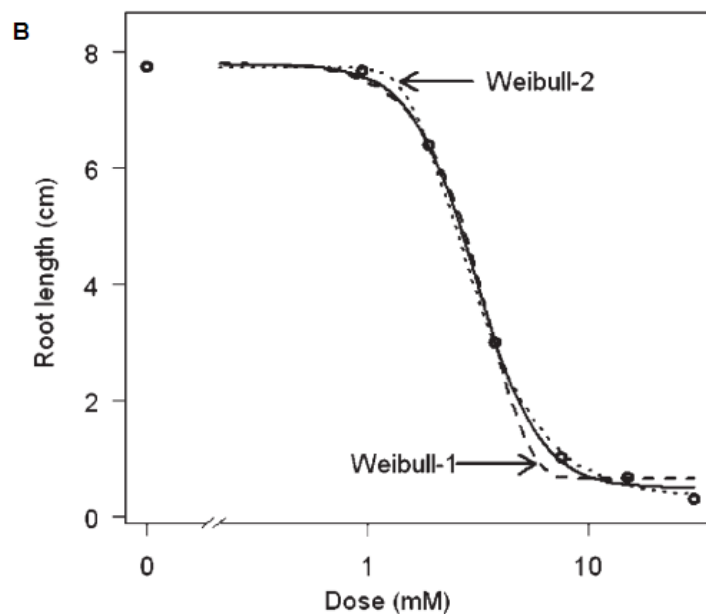


Figura 13. a) modelos Weibull 1 y Weibull 2 , b) comparación entre los modelos log logístico (línea continua), Weibull 1 (punteado largo) y Weibull 2 (punteado corto)

Objetivo y Estrategia

El objetivo general de este trabajo es desarrollar una herramienta que permita detectar rápidamente biotipos resistentes a los inhibidores de ALS de manera de definir un plan de manejo racional de las malezas en el arrozal.

Objetivos específicos

- 1) Ajustar la metodología de determinación de actividad de la enzima ALS en arroces Clearfield®
- 2) Determinar las curvas de dosis respuesta para cada combinación herbicida inhibidores de ALS/variedad de arroz Clearfield®
- 3) Ajustar los modelos no lineales correspondientes utilizando el paquete R
- 4) Ajustar la metodología de determinación de actividad de la enzima ALS en capín con diferente presión de selección por herbicidas IMI.
- 5) Determinar las curvas de dosis respuesta y ajuste de modelos no lineales para capín/IMI

Estrategia

Para cumplir los objetivos planteados se evaluaron tres cultivares de arroz CL homocigotos para las distintas mutaciones del gen ALS (S_{653D} , S_{654E} , A_{122T}) y tres híbridos CL heterocigotos. Como testigo susceptible se evaluó un cultivar y un híbrido sin mutación. Se evaluaron dos biotipos de capín, uno susceptible y uno resistente al herbicida Kifix según quedó establecido en el ensayo – dosis respuesta tradicional realizado previamente (Saldain y Sosa, 2012). Para realizar las curvas dosis – respuesta se utilizaron cuatro herbicidas, tres imidazolinonas (imazapic, imazapir, imazetapir) y una sulfonilurea (orthosulfamuron) como testigo. Se utilizó R como el programa principal de análisis de datos, pero se evaluó como opción secundaria la versión de prueba del Graphpad Prism 5.0.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Oryza sativa L. (Arroz)

Se analizaron los cultivares homocigotos Puitá INTA CL, IRGA 422 CL, CL 146 e INIA Olimar (sin mutación) provistos por INIA y los híbridos heterocigotos Avaxi CL , INOV CL , APSA CL e INOV ST (sin mutación), cuyas semillas fueron donadas por Ricetec (atención del Ing. Agr. Roberto Lima). Las semillas fueron plantadas en invernaderos de Treinta y Tres y Las Brujas.

Las semillas fueron pregerminadas en papel de germinación inmerso en H₂O destilada o en placas de petri con gasas mojadas en H₂O destilada y selladas con parafilm. En ambos casos se dejaron pregerminar en invernadero.

La semilla germinada se trasplantó a macetas cuadradas de 344 cm³ y se colocaron en una bandeja con agua. En el estadio de 1-2 hojas se fertilizó con 2 o 3 bolitas de urea. En el estadio de 3-4 hojas se utilizaron para la cuantificación enzimática.

Echinochloa crus-galli (Capin)

Las semillas del biotipo sensible a Kifix (E0cl) se obtuvieron de una chacra donde no se había utilizado previamente la tecnología Clearfield® (sin aplicación de imidazolinonas, ni variedades genéticamente modificadas). Las semillas del biotipo resistente a Kifix (E3cl) (Factor de resistencia = 12) se colectaron de sectores de una chacra con distintas historias de aplicación de Kifix y utilización de arroces Clearfield, ubicada en Noblía, Cerro Largo (Saldain y Sosa. 2012). Para germinar las semillas del biotipo sensible y el biotipo resistente, se tuvo que pasar por un paso previo para poder romper la *dormancia*. Para ello se evaluaron tres tratamientos en las semillas: a) ácido sulfúrico concentrado por 8 min, b) congelado en húmedo y en seco , c) nitrato de potasio (2% -0,2%) y secado a 40 °C .

Luego de germinar la semilla se procedió a su crecimiento en invernadero como previamente fue descrito para el arroz.

Herbicidas

Los experimentos se realizaron con estándares analíticos de imazapic, imazetapir e imazapir los que fueron provistos por BASF-Solaris y con el estándar analítico de orthosulfamuron provisto por Lage & Cia.

Para cada herbicida se evaluaron las siguientes concentraciones; orthosulfamuron 0; 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM ; 25 μM ; 100 μM y 1000 μM ; y para los restantes herbicidas: 0; 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM ; 100 μM ; 1000 μM y 3000 μM . Se utilizó DMSO para las disoluciones de imazetapir, y acetona para los otros tres herbicidas. Estas concentraciones fueron seleccionadas para facilitar la obtención la curva dosis-respuesta.

Actividad ALS

La actividad enzimática se estimó mediante la cuantificación del producto acetolactato, luego de su conversión a acetoína por descarboxilación en medio ácido de acuerdo a Ray (1984). En el estadio de 3-4 hojas se cosecharon 10 gramos de material vegetal por cada variedad utilizada, y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

Extracción de la enzima

El proceso de extracción se realizó en hielo. El tejido se maceró en nitrógeno líquido y se le agregó tampón de extracción (fosfato potásico 0,1M pH 7.5, piruvato de sodio 1mM, cloruro de magnesio 0,5mM, tiaminapirufosfato 0.5mM, flavina adenina dinucleotido 10uM, DL-Dithiothreitol 12mM y glicerol 100ml/L) en una proporción de 1:3; posteriormente se agregó Polyvinylpolypyrrolidona (PVPP) 60g/L. La mezcla se homogenizó por 3-5 min y luego se centrifugó a 7000g por 10 min. La mezcla resultante se filtró con gasas estériles y el filtrado se centrifugó a 10000g por 20 min

El sobrenadante se llevó a un 50 % de saturación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), se estabilizó la solución por 5 min con agitador magnético, y se centrifugó a 7000g por 10 min. El precipitado obtenido se resuspendió con tampón de extracción y se desaló utilizando una columna PD10 previamente equilibrada con tampón de elusión (fosfato de potasio 0.1M pH 7.0, piruvato de sodio 20 mM, cloruro de magnesio 0.5 mM). Finalmente, se colectaron los primeros 8 ml salientes de la columna en 4 fracciones: 0-2ml, 2-4ml, 4-6ml y 6-8ml. Se evaluó la actividad en las distintas fracciones. Las fracciones con mayor actividad se utilizaron para todos los ensayos de actividad consiguientes.

Ensayo de actividad enzimática.

Se cuantificó la actividad ALS en todos los biotipos de arroz y capín descritos, con el agregado de herbicida o sin el agregado del mismo. Se realizaron 3 repeticiones para cada ensayo por biotipo con las concentraciones descritas anteriormente. Las mezclas de ensayo (270 µL) contenían: 150 µL tampón de ensayo (fosfato de potasio 0.1M pH 7.0, piruvato de sodio 20 mM, cloruro de magnesio 0.5 mM, tiamina pirofosfato 0.5 mM, flavin adenin dinucleotido 10 µM), 100 µL de extracto y 20 µL de herbicida. La mezcla se incubó a 37 °C por 60 min, y la reacción se detuvo con la adición de 50 µL de ácido sulfúrico 6N. Para facilitar la descarboxilación se incubaron a 60 °C por 15 min. Para detectar la acetoína, se realizó el ensayo de Westerfeld (Westerfeld. 1945) (250 µl de α-naftol 50g/L en hidróxido de sodio 2.5N y 250 µL de creatina monohidrato 5g/L en agua), la mezcla se incubó a 60 °C por 15 min, dando un complejo coloreado. La diferencia de color se midió por espectrofotometría a 525 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

Se realizó un blanco de reacción, adicionando a la mezcla ácido sulfúrico 6N previo a la inclusión del extracto. Los valores de absorbancia se transformaron en valores de concentración de acetoína a partir de su coeficiente de extinción molar (7.06×10^{-3} µmol/cm).

Determinación de la concentración de proteína total

La concentración de proteínas total en el extracto se determinó por el método de Bradford (Bradford. 1976). Un ml del reactivo de Bradford (etanol 4.7% (m/v), ácido fosfórico 8.5% (m/v), Coomassie Brilliant Blue G-250 0.01% (m/v)) se mezcló con 20 μ L del extracto. Se realizaron medidas de absorbancia a 595 nm, transformándose en cantidad de proteína utilizando el coeficiente de extinción molar obtenido a partir de la curva de calibración realizada con seroalbúmina bovina (rango utilizado 0-60 μ g).

Análisis de datos

Los datos obtenidos en los ensayos de actividad se ajustaron a un modelo log logístico de cuatro variables y al modelo Weibull 1 de cuatro variables, específicos para ensayos dosis respuesta con herbicidas. Este ajuste se realizó por medio del paquete *drc* del programa estadístico R (R Development Core Team, 2004). (Ver anexo).

De esta manera se obtuvieron las curvas de dosis respuesta características y los valores de I_{50} para cada variedad contra cada herbicida. Se halló el factor de resistencia, utilizando a INIA Olimar como variedad susceptible conocida.

Resultados y discusión

Ensayos dosis- respuesta en variedades de arroz

En primer lugar se puso a punto la técnica de extracción y cuantificación de actividad enzimática. En este punto se determinó cual de las fracciones obtenidas de la columna de desalado tenía la mayor actividad enzimática (Tabla 1).

Fracción obtenida de la columna	A. Especifica ($\mu\text{mol/h.mg prot.}$)
0-2 ml	40,2 (± 0.9)
2-4 ml	74,0 (± 1.6)
4-6 ml	4,1 (± 0.5)
6-8 ml	0,5 (± 0.1)

En las fracciones 0-2 ml y 2-4 ml se detectó la mayor actividad específica, teniendo en cuenta la cantidad extracto necesario para realizar bioensayos, se optó por usar ambas fracciones mezcladas.

Los resultados obtenidos de la actividad *in vitro* de la ALS en ensayos dosis respuesta en las ocho variedades de arroz se muestran en las figuras 14 a 17, los parámetros obtenidos a través del ajuste no lineal se muestran en la tabla 2.

Como se puede ver en los gráficos de la figura 14, las variedades INOV ST e INIA Olimar (que no portan mutación ALS) sufrieron fuerte inhibición por parte de los herbicidas utilizados, obteniéndose valores de I_{50} en el rango de 0.2 – 10 μM (Tabla 2).

En un punto intermedio se ubicaron los híbridos CL: INOV CL (heterocigoto S_{653D}), APSA CL (heterocigoto A_{122T})(Figura 16) y Avaxi CL (heterocigoto S_{653D})(Figura 15), con valores de I_{50} en el rango de 180-300 μM frente a la acción de las tres IMI.

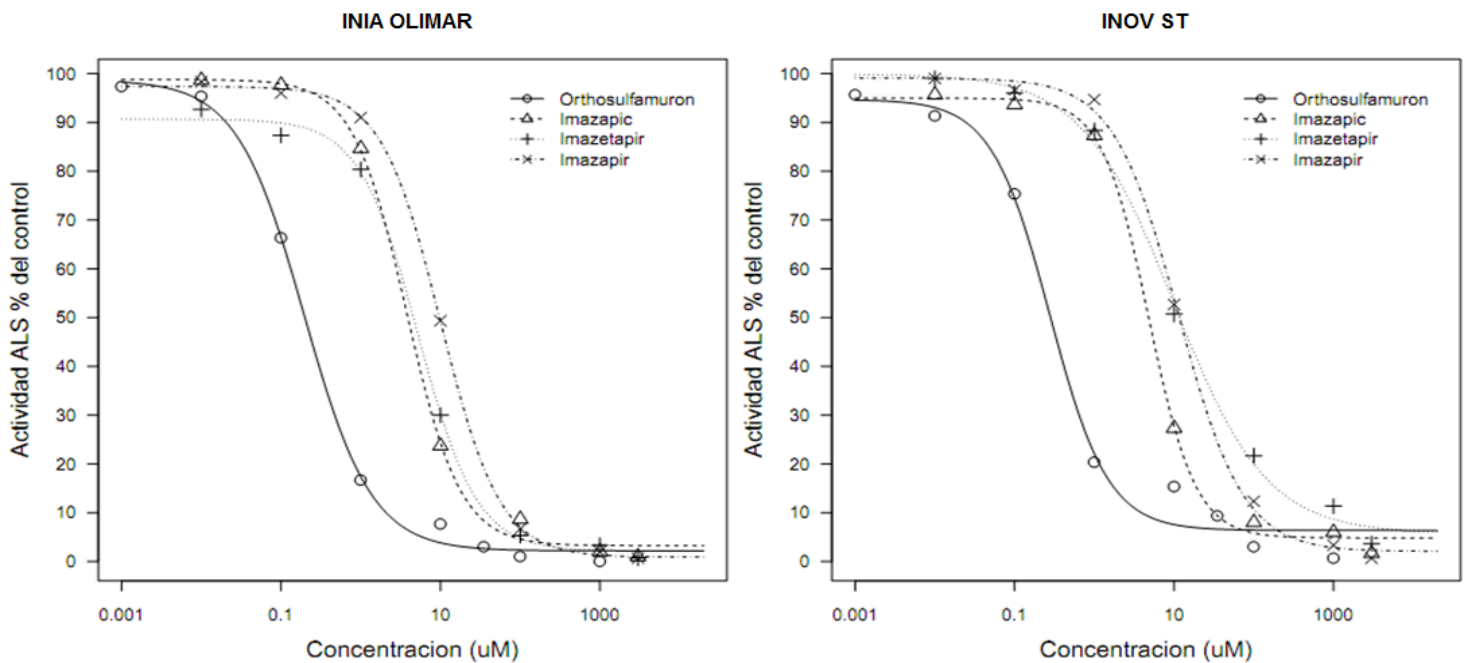


Figura 14. Curvas dosis-respuesta para el cultivar INIA Olimar y para el híbrido INOV ST (susceptibles), la actividad ALS esta expresada como porcentaje del control sin herbicida.

Las variedades de arroz que mostraron mayor actividad de la enzima ALS frente a la acción de los herbicidas utilizados, fueron las variedades homocigotas para la mutación ALS, Puitá INTA CL (homocigoto A₁₂₂T) y CL 146 (homocigoto S₆₅₄E) (Figura 17). Ambos cultivares se mostraron efectivos frente a la acción de las tres IMI, con valores de I₅₀ en el rango de 500-700 μ M y factores de resistencia elevados 80 – 160 (Tabla 2). Resultados similares se encuentran en la literatura (Ávila, 2005).

El cultivar IRGA 422 CL (homocigoto S₆₅₄E) (Figura 15) mostró un comportamiento muy inferior a las otras variedades CL frente a la inhibición por IMI, los valores de I₅₀ (25-35 μ M) son cercanos a los obtenidos en las variedades sin mutación ALS. Este comportamiento es concordante con bioensayos tradicionales realizados con imzetapir (Mariot y Menezes, 2010), donde IRGA 422 CL mostró muy disminuida su productividad frente a la acción del herbicida.

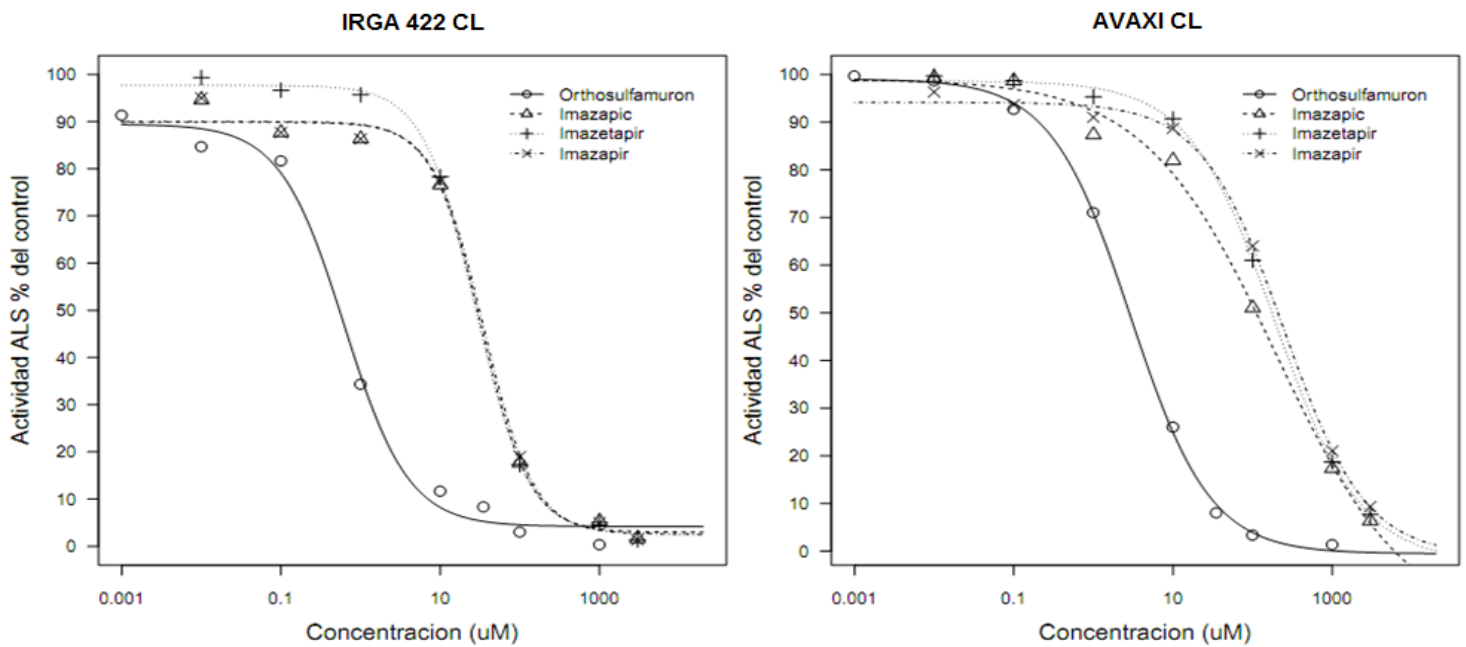


Figura 15. Curvas dosis-respuesta para el cultivar IRGA 422 CL y para el híbrido AVAXI CL, la actividad ALS esta expresada como porcentaje del control sin herbicida.

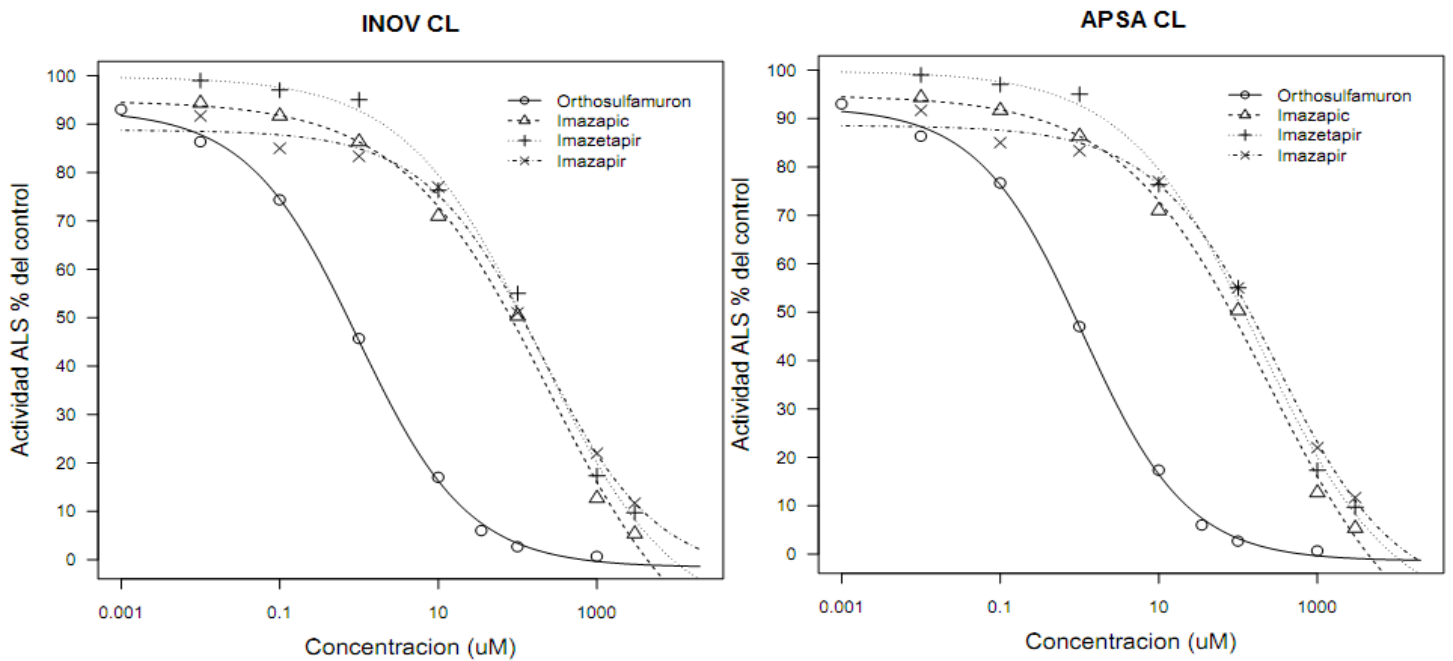


Figura 16. Curvas dosis-respuesta para los híbridos INOV CL y APSA CL, La actividad ALS esta expresada como porcentaje del control sin herbicida.

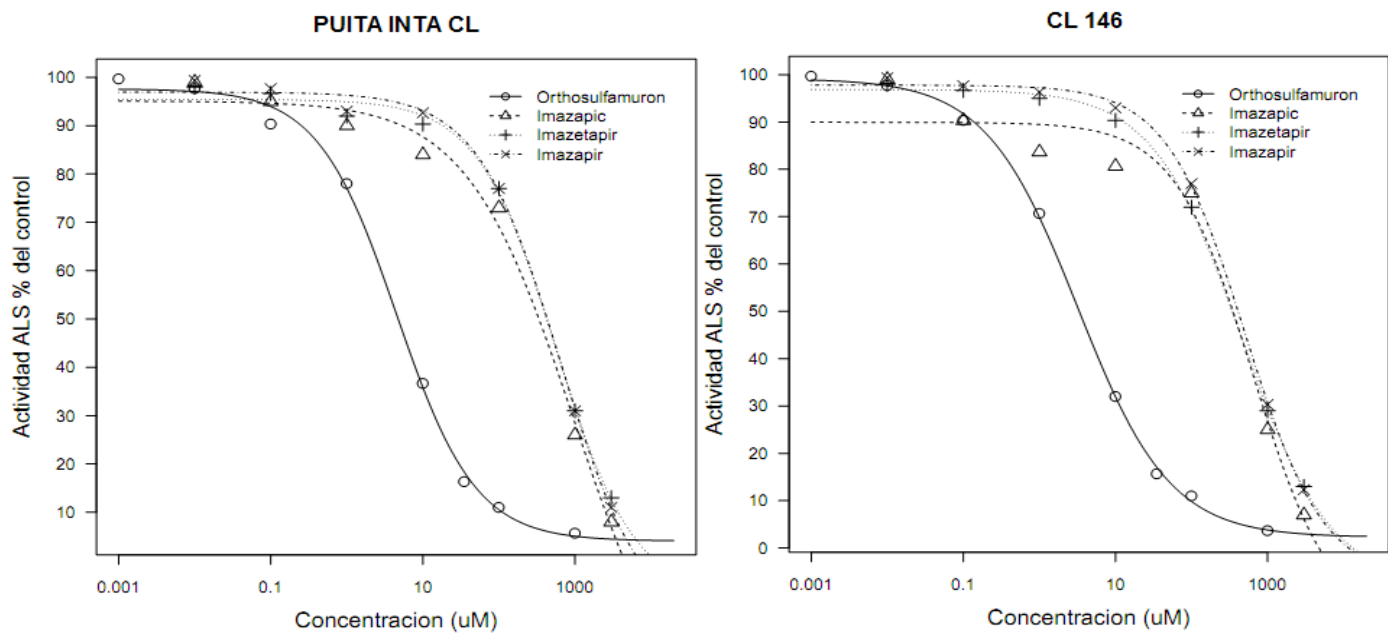


Figura 17. Curvas dosis-respuesta para los cultivares CL 146 y PUITA INTA CL. La actividad ALS esta expresada como porcentaje del control sin herbicida.

Las tres imidazolinonas se comportaron de forma muy similar con respecto a su poder inhibitorio *in vitro*. Se constató que la sulfonilurea utilizada como control, orthosulfamuron, tuvo un poder inhibitorio superior al de las imidazolinonas en todas las variedades de arroz (Tabla 2).

La forma de la curva dosis respuesta obtenida, también aporta información (Ávila, 2005). Como se explicó anteriormente, la representación gráfica del modelo log logístico, tiene forma sigmoidea. Las curvas obtenidas para las variedades INIA Olimar, IRGA 422 CL e INOV ST, mantienen la clásica forma de “S” sigmoidea. Al analizar la forma de la curva obtenida para los híbridos CL, se puede ver que esa forma de “S” se empieza a perder en los ensayos con IMIs. En los cultivares PUITA y CL 146 se aprecia un cambio más drástico en la forma de la curva. Las curvas obtenidas en los bioensayos con orthosulfamuron mantuvieron la forma sigmoidea en todas las variedades de arroz utilizadas.

Tabla 2. Parámetros obtenidos del ajuste al modelo log – logístico de cuatro parámetros, RF = Factor de resistencia (I_{50R}/I_{50S})

<u>Variedad</u>	<u>Herbicida</u>	<u>I_{50} (μM)</u>	<u>Error Std</u>	<u>t-valor (DF =71)</u>	<u>p-valor</u>	<u>RF</u>
I OLIMAR	Orthosulfamuron	0.19554	0.0095	22.503	0	-
I OLIMAR	Imazapic	3.77082	0.1755	24.227	0	-
I OLIMAR	Imazetapir	5.25043	0.2633	19.27	0	-
I OLIMAR	Imazapir	7.6533	0.4062	16.806	0	-
INOV ST	Orthosulfamuron	0.27621	0.0226	10.067046	0	1.41
INOV ST	Imazapic	4.88235	0.3839	14.906944	0	1.29
INOV ST	Imazetapir	10.02029	1.0822	16.317096	0	1.90
INOV ST	Imazapir	11.33011	0.8416	14.832712	0	1.48
IRGA 422 CL	Orthosulfamuron	0.62258	0.0476	10.067046	0	3.18
IRGA 422 CL	Imazapic	32.94666	2.5728	14.906944	0	8.73
IRGA 422 CL	Imazetapir	27.99525	2.0274	16.317096	0	5.33
IRGA 422 CL	Imazapir	35.19886	2.7240	14.832712	0	4.60
AVAXI CL	Orthosulfamuron	1.9344	0.1571	27.485328	0	9.9
AVAXI CL	Imazapic	196.2129	40.8430	13.574107	0	52.1
AVAXI CL	Imazetapir	190.7850	20.1954	15.232086	0	36.3
AVAXI CL	Imazapir	245.9328	29.0037	14.141255	0	32.1
INOV CL	Orthosulfamuron	0.96606	0.0891	18.688692	0	4.94
INOV CL	Imazapic	248.48427	79.5860	11.224669	0	65.9
INOV CL	Imazetapir	185.45219	42.2739	13.085450	0	35.3
INOV CL	Imazapir	193.74839	49.3455	9.575818	0	25,3
APSA CL	Orthosulfamuron	1.1003	0.0969	18.571626	0	5.62
APSA CL	Imazapic	244.4188	75.6318	11.455373	0	64.8
APSA CL	Imazetapir	186.5456	43.0735	12.974657	0	35.3
APSA CL	Imazapir	298.1482	93.1527	9.187698	0	39.0
CL 146	Orthosulfamuron	3.1995	0.3452	14.857490	0	16.4
CL 146	Imazapic	602.6854	176.0744	5.620891	0	159.7
CL 146	Imazetapir	494.4704	131.7380	8.369751	0	94.2
CL 146	Imazapir	544.2103	119.9582	9.006727	0	71.1
PUITA	Orthosulfamuron	4.5287	0.3618	17.510089	0	23.2
PUITA	Imazapic	678.5766	201.9057	7.832102	0	179.2
PUITA	Imazetapir	599.6226	120.2194	9.824807	0	114.1
PUITA	Imazapir	638.6084	152.9289	10.162315	0	83.44

Ensayos dosis - respuesta en capín

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos dosis respuesta en variedades de arroz, se aplicó la misma técnica extracción y cuantificación de actividad enzimática en presencia de herbicidas (imazapic e imazapir) a dos biotipos de capín (E0cl y E3cl). De esta manera se evaluó la aplicabilidad de la técnica a especies de malezas.

Los resultados obtenidos de la actividad *in vitro* de la ALS en los ensayos de dosis respuesta para los biotipos E0cl y E3cl de capín se muestran en la figura 18. En general, se aprecia que el biotipo resistente mostró más actividad a una misma dosis del herbicida tanto para el imazapir como para el imazapic.

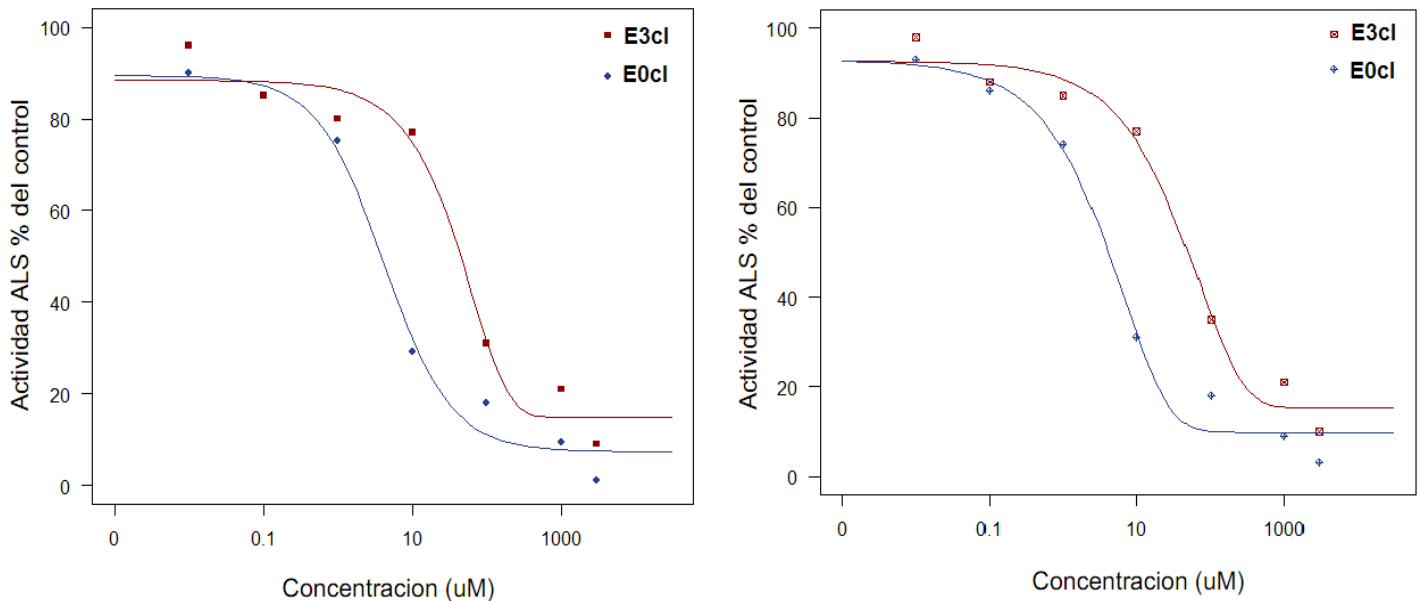


Figura 18 = Curva dosis-respuesta obtenida con el modelo Weibull.1 de cuatro parámetros, la actividad de la ALS esta expresada como porcentaje del control. Izquierda: curva de concentración respuesta utilizando imazapic. Derecha: curva concentración respuesta utilizando imazapir. Se representa en azul el biotipo susceptible y en rojo el biotipo resistente.

A partir de los modelos ajustados, se obtuvieron las concentraciones que inhiben a la mitad de la actividad de la enzima entre el testigo y la tangente al eje de las abscisas (I_{50}) para cada

biotipo contra cada herbicida (Tabla 3). Se calculó el cociente entre las I_{50} del biotipo resistente sobre aquella del biotipo susceptible para obtener el factor de resistencia (FR) y su significación estadística

Tabla 3. Resultados obtenidos de los modelos no lineales Weibull1 con cuatro parámetros ajustados.

Biotipo	I_{50} imazapic (uM)	I_{50} imazapir (uM)
Ecl0 Sensible	4.4 ± 2.5	3.6 ± 1.8
Ecl3 Resistente	41.3 ± 6.3	40.7 ± 8.0
I_{50R}/ I_{50S}	9.4	11.3
Prob.	0.012	0.009

De acuerdo con Heap (2005) para declarar un biotipo con un alto nivel de resistencia se debe obtener un cociente R/S de 10 o superior en los ensayos realizados. Los resultados demuestran que el biotipo que se denominó resistente efectivamente demuestra resistencia a imazapir. Por otro lado en el caso de imazapic está en el límite de los parámetros establecidos, debiéndose realizar nuevos ensayos para demostrar o no la resistencia. El hecho de que en ninguna de las corridas la actividad de la enzima fuera cero, podría sugerir un mecanismo de resistencia de nivel bajo combinado con una mutación en la enzima ALS.

Conclusiones y perspectivas

En vista de los resultados obtenidos, se pudo ajustar exitosamente la metodología de determinación de la actividad de la enzima ALS *in vitro* en arroz y en capín. Esto permitió determinar las curvas dosis respuesta características para cada combinación variedad-herbicida.

Esta metodología, sensible a los cambios genéticos de la enzima ALS, va a permitir monitorear y detectar la adquisición de resistencia en biotipos que afectan la productividad de la producción arrocerá.

Con respecto a los biotipos de capín, se percibe que los bioensayos *in vitro* concuerdan con los hallazgos en los bioensayos tradicionales en plántulas, confirmando el bioensayo *in vitro* ser una herramienta rápida y simple (tiempo estimado del ensayo 3 horas) de monitoreo en tiempo real para facilitar el control de esta maleza.

Complementando esta metodología con análisis tradicionales y moleculares, se puede dilucidar los mecanismos de resistencia que operan en cada caso.

Como perspectiva al futuro, con intención de obtener un mayor conocimiento del mecanismo de resistencia en el biotipo E3cl, se va a secuenciar el gen ALS para determinar si existen mutaciones que expliquen la diferencia de actividad enzimática obtenida con respecto al biotipo E0cl.

Para complementar el desarrollo de la metodología *in vitro*, se estudiará el desarrollo de una metodología *in vivo* de cuantificación de la actividad ALS.

Bibliografía

Aguerre T. (2008) Uruguay, País Arrocerero. En: *Coyuntura Agropecuaria: publicación del IICA* [en línea, marzo 2010], 55. http://www.iica.org.uy/online/coyuntura_55_doc.asp

ACA (2012), La producción en Uruguay [en línea agosto 2012] <http://www.aca.com.uy>

ACA, Gremial de Molinos Arroceros, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (2004) "El arroz en el Uruguay"

Christoffoleti PJ (2008). Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas

Croughan TP (1998). Herbicide resistant rice, US patent 5773704: <http://www.uspto.gov/patft/index.html>

Finney DJ (1971). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University, London, UK.

Fischer, A.J. and A. Ramirez. (1993). Red rice (*Oryza sativa*): competition studies for management decisions. *Int'l. J. Pest Management* 39(2):133-138.

Heap I. (2005) Criteria for Confirmation of Herbicide-Resistant Weeds, *Weed Science*

Holm LG, Plucknett DL, Pancho, JL, Herberger JP (1977) .The world's worst weeds - distribution and biology. University Press of Hawaii, Honolulu, Hawaii. 609 pp

Maun NA y Bennett SCH (1986). The biology of Canadian weeds 77 . *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. *Can. J. Plant Sci.* 66:'739-'759.

Mariot CA y Menezes VG (2010). Comportamento de cultivares de arroz irrigado em funcao da aspersao tardía do herbicida imazamox. IRGA

Livore AB, Prina AR, Birk I, Singh BK (2007a). Rice Plants Having Increased Tolerance to Imidazolinone Herbicides. US Patent Application 10/569, 576, 2004-2007/0028318. Publication date: Feb. 1, 2007.

Lopes MCB, Rosso AF, Lopes SIG, Carmona PS, Leites A, Ulbrich A, Louzano LC (2004). IRGA 422CL A Cultivar Desenvolvida para o Sistema de Produção Clearfield® Arroz. *Lavoura Arrozeira*, 42: 33 - 38.

Ortega YM y Alvarado RA (2005). Efectos de dos sistemas de labranza sobre poblaciones de arroz rojo (*Oryza sativa* L.) en un agrosistema arrocerero inundado, *Agronomía mesoamericana* 16(1): 63-75. 2005

R Development Core Team (2004) R: A Language and Environment for Statistical Computing.

R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-00-3, URL <http://www.R-project.org/>

//www.R-project.org.

Ray T B (1984). Site of action of chlorsulfuron. *Plant Physiol.* 75, 827–831.

Ritz C (2010). Toward a Unified Approach to dose–response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 29, No. 1, pp. 220–229.

Ritz C y Streibig JC (2005). Bioassay analysis using R. *Journal of Statistical Software, Volume 12, Issue 5*

Rao VS (2000) *Principles of Weed Science*. New Hampshire: Science Publishers Inc.

Roberts T (1998) Imidazolinones. En: *Methabolic pathways of agrochemicals: Herbicides and plant growth regulators*. Cambridge: Royal Society of Chemistry p.351-372.

Rosas J (2011). Estudio de la Resistencia a Imidazolinonas en Arroz Maleza utilizando Marcadores Moleculares. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias.

Saldain NE (2006). Impacto ambiental de la adopción del arroz resistente a las imidazolinonas en sistemas productivos contrastantes de América Latina. *Proyecto de investigación en ejecución financiado por FONTAGRO*. Disponible en <http://www.fontagro.org>

Saldain N y Sosa B (2012). Susceptibilidad de los biotipos de capín colectados a los herbicidas usados en arroz en la zona Este del Uruguay. *SAD 686*. INIA Treinta y Tres.

Shivrain VK, Burgos NR, Sales MA, Kuk YI (2010) Polymorphisms in the *ALS* gene of weedy rice (*Oryza sativa* L.) accessions with differential tolerance to imazethapyr. *Crop Protection*, 29:336-341.

Smith CW y Dilday R.H. (2002) *Rice: Origin, History, Technology, and Production*, Wiley Series in Crop Science.

Smith RJ 1988. Weed thresholds in southern US rice (*Oryza sativa*). *Weed Technology*. 2:232-241.

Streibig JC (1988). Herbicide Bioassay. *Weed Research*. Vol.28.p.477-484

Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL (2005) Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science*, 61:246-257.

Tranel PJ y Wright TR (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science*, 50:700–712.

Westerfeld WW (1945). A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.* 495-502.

Williams Bill, Ron Strahan, and Eric P. Webster(2002). "Weed Management Systems for Clearfield Rice." Louisiana Agriculture. www.LSUAgcenter.com

Anexo = Ajuste de datos en R

(rojo = entradas, azul = salidas)

Al iniciar R, el programa carga por defecto los paquetes básicos de trabajo. Para realizar los ajustes no lineales, se utilizó un paquete extra, llamado *drc*. Por lo tanto es necesario cargarlo cada vez que se quiera utilizar, a través de la función *library()*

```
> library(drc)
```

'drc' has been loaded.

Please cite R and 'drc' if used for a publication, for references type 'citation()' and 'citation('drc')'.

Attaching package: 'drc'

Ya con el paquete activo, lo siguiente es cargar los datos obtenidos en los bioensayos. Esto se puede hacer construyendo uno por uno los vectores de la base de datos con mucho tiempo y cuidado, o se puede optar por una opción más rápida y práctica, la obtención de datos desde un archivo csv o txt. En este caso se describe la obtención de datos a partir de un archivo csv.

```
> Olimar = read.csv ("INIAOLIMAR.csv",header=T,sep = ";")
```

Para confirmar que efectivamente se construyó una base de datos, se utiliza la función *class()*

```
> class(Olimar)
```

```
[1] "data.frame"
```

El objeto "Olimar", contiene los datos de todos los bioensayos donde se utilizó INIA Olimar, identificado por Herbicida, por lo tanto esta base de datos tiene 3 columnas (Dosis, Respuesta y Herbicida) y 87 filas.

Luego de cargar los datos, se realiza el ajuste a modelos no lineales disponibles. En este caso se ajusta un modelo log-logístico de cuatro parámetros (LL.4).

```
> ajuste= drm (Respuesta ~ Dosis,Herbicida, data=Olimar,fct=LL.4())
```

El objeto "ajuste" contiene los datos de los cuatro parámetros obtenidos por el programa, para acceder a ellos, se utiliza la función *summary()*

```
> summary(ajuste)
```

```
Model fitted: Log-logistic (ED50 as parameter) (4 parms)
```

```
Parameter estimates:
```

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
b:Orthosulfamuron	1.0277e+00	4.5669e-02	2.2503e+01	0.0000
b:Imazapic	1.2930e+00	5.3369e-02	2.4227e+01	0.0000
b:Imazetapir	1.1847e+00	6.1466e-02	1.9274e+01	0.0000
b:Imazapir	1.1651e+00	6.9326e-02	1.6806e+01	0.0000
c:Orthosulfamuron	2.1632e+00	5.5984e-01	3.8639e+00	0.0002
c:Imazapic	3.2249e+00	6.1925e-01	5.2077e+00	0.0000
c:Imazetapir	2.1185e+00	6.4283e-01	3.2955e+00	0.0015
c:Imazapir	8.7001e-01	7.2257e-01	1.2040e+00	0.2326
d:Orthosulfamuron	9.8656e+01	8.7801e-01	1.1236e+02	0.0000
d:Imazapic	9.8771e+01	7.6244e-01	1.2955e+02	0.0000
d:Imazetapir	9.0655e+01	7.7870e-01	1.1642e+02	0.0000
d:Imazapir	9.7340e+01	7.1913e-01	1.3536e+02	0.0000
e:Orthosulfamuron	1.9544e-01	9.4615e-03	2.0657e+01	0.0000
e:Imazapic	3.7708e+00	1.7545e-01	2.1492e+01	0.0000
e:Imazetapir	5.2503e+00	2.6325e-01	1.9944e+01	0.0000
e:Imazapir	1.0030e+01	4.0620e-01	2.4691e+01	0.0000

Residual standard error:

1.746455 (71 degrees of freedom)

De esta manera, se muestran los cuatro parámetros del modelo, para los cuatro herbicidas utilizados.

Para tener una validación del ajuste realizado, se utiliza la función *modelFit ()*, que realiza una comparación con el modelo ANOVA (análisis de varianza). Este test indica si existe una diferencia significativa en la utilización del modelo ajustado.

```
> modelFit(ajuste)
```

Lack-of-fit test

```
ModelDf  RSS Df F value p value
```

```
ANOVA    58 21.333
```

```
DRC model 71 216.557 13 40.828 0.000
```

El p valor obtenido es 0, por lo tanto es significativa la utilización del modelo no lineal.

Ya con el modelo ajustado, se puede obtener el valor de I_{50} , y en el caso que fuera de interés I_{25} , I_{75} , I_{90} , etc.

En este caso, se obtiene I_{50} con su respectivo error estándar.

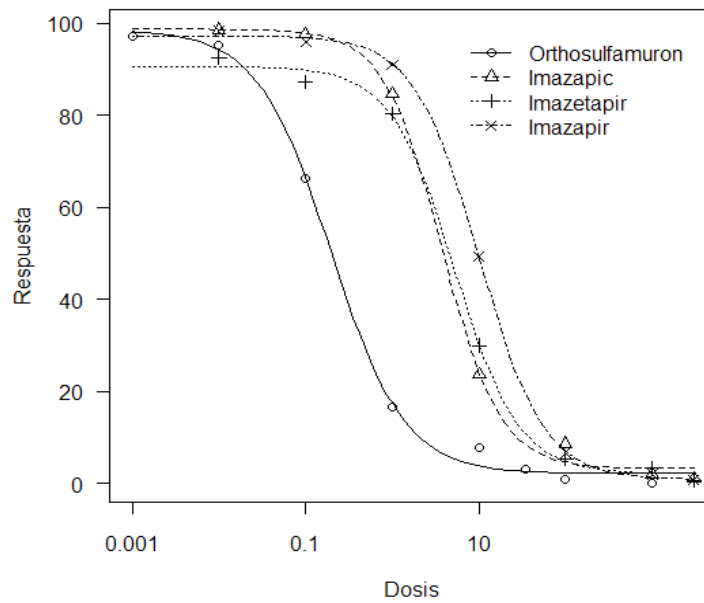
```
> ED (ajuste, c(50),ci = "delta")
```

Estimated effective doses

	Estimate	Std. Error
Imazapic:50	3.77082	0.1755
Imazapir:50	8.02951	0.4062
Imazetapir:50	5.25034	0.2633
Orthosulfamuron:50	0.19544	0.0095

El paso final es obtener el gráfico a partir de la función `plot ()`. Si se desea se pueden modificar parámetros como color, tamaño de punto, escala de ejes, etc, añadiendo los argumentos correspondientes.

```
> plot (ajuste)
```



> pdf ("Olimar.pdf")

> dev.off()

De esta manera se guarda el grafico en un archivo *pdf* para su posterior uso.