

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**RESPUESTA A QUINCLORAC DE BIOTIPOS DE CAPÍN (*Echinochloa  
crus-galli* (L.) Beauv) AISLADOS EN ARROZALES DE URUGUAY**

**por**

**Manuel Santiago DIEZ VIGNOLA**

**TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de *Magister* en Ciencias  
Agrarias opción Ciencias  
Vegetales**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
JUNIO 2018**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dr.Grisel Fernandez, Msc Luis Viega y Dr. Mariana Sotelo, el 26 de junio de 2018. Autor: Lic. Manuel Diez Vignola.  
Directores: Dr. Pedro Díaz Gadea, Dr. Victoria Bonnacarrère.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores Pedro Díaz y Victoria Bonnacarrère por su apoyo en la realización y corrección del trabajo.

A Néstor Saldain y Claudia Marchesi por proponer el proyecto de tesis, y su continua colaboración en el proyecto.

A Facundo Ibañez por su valiosa contribución en la determinación de etileno.

A mis compañeros de Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía, por sus valiosos consejos y ayuda en el trabajo de mesada.

A INIA y a la ANII por el financiamiento del proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN .....	VIII
SUMMARY .....	IX
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. CULTIVO DE ARROZ EN URUGUAY.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. MALEZAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE ARROZ.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1. <u>Capín</u>.....</b>	<b>2</b>
1.2.1.1. Biología y ciclo de vida.....	3
1.2.1.2. Competencia con los cultivos.....	4
1.2.1.3. Resistencia a herbicidas.....	5
<b>1.3. HERBICIDAS AUXINÍCOS.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. QUINCLORAC.....</b>	<b>8</b>
1.4.1. <u>Propiedades fisicoquímicas</u> .....	9
1.4.2. <u>Absorción, traslocación y metabolismo</u> .....	10
1.4.3. <u>Modo de acción</u> .....	11
1.4.3.1. Actividad como auxina.....	11
1.4.3.2. Actividad en dicotiledóneas.....	12
1.4.3.3. Actividad en monocotiledóneas.....	14
<b>1.5. BIOLOGÍA DE AUXINAS.....</b>	<b>17</b>
1.5.1 <u>Síntesis y conjugación</u> .....	17
1.5.2. <u>Percepción y señalización</u> .....	18
1.5.3. <u>Receptores</u> .....	20
<b>1.6. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO.....</b>	<b>22</b>
1.6.1. <u>Daños producidos en biomoléculas</u> .....	23
1.6.2. <u>Enzimas antioxidantes</u> .....	24

1.7. POSIBLES MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINCLORAC.....	25
1.8. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
1.8.1. <u>Hipótesis</u> .....	28
1.8.2. <u>Objetivo general</u> .....	28
1.8.3. <u>Objetivos específicos</u> .....	28
<b><u>2. LA INDUCCIÓN LIMITADA DE LA SÍNTESIS DE ETILENO Y</u></b>	
<b><u>    CIANURO ESTARÍAN INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA A</u></b>	
<b><u>    QUINCLORAC EN UN BIOTIPO DE CAPÍN ENCONTRADO EN</u></b>	
<b><u>    URUGUAY</u></b> .....	<b>29</b>
2.1. RESUMEN.....	29
2.2. SUMMARY.....	30
2.3. INTRODUCCIÓN.....	31
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.4.1. <u>Material vegetal</u> .....	33
2.4.2. <u>Herbicida</u> .....	33
2.4.3. <u>Crecimiento de plantas</u> .....	33
2.4.3.1. Escarificación de semillas.....	33
2.4.3.2. Germinación.....	34
2.4.3.3. Crecimiento en placas de Petri.....	34
2.4.3.4. Crecimiento en macetas.....	34
2.4.3.5. Crecimiento en hidroponia.....	34
2.4.4. <u>Ensayos dosis-respuesta</u> .....	35
2.4.4.1. Ensayos en planta entera.....	35
2.4.4.2. Ensayos en placa de Petri.....	35
2.4.4.3. Análisis estadístico.....	35
2.4.5. <u>Determinación de la producción de etileno y cianuro</u> ...	36
2.4.6. <u>Determinación de la actividad <math>\beta</math>CAS</u> .....	36
2.4.7 <u>Determinación de la actividad <math>\beta</math>CAS en gel</u> .....	36

2.4.8. <u>Determinación de TBARS, proteínas y clorofilas</u> .....	36
2.4.9 <u>Actividad de enzimas antioxidantes: SOD, CAT</u> <u>y APX</u> .....	37
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
2.5.1. <u>Caracterización de la resistencia a quinclorac</u> .....	37
2.5.2. <u>Producción de etileno y HCN en los biotipos A33P2</u> <u>y E7</u> .....	39
2.5.3. <u>Efecto de ACC y KCN en el crecimiento de raíz y</u> <u>parte aérea</u> .....	44
2.5.4. <u>Acumulación de HCN y su desintoxicación</u> .....	45
2.5.5. <u>Estrés oxidativo generado por quinclorac y su</u> <u>relación con la resistencia</u> .....	48
2.6. CONCLUSIONES.....	52
2.7. BIBLIOGRAFÍA.....	53
<u>3. CONCLUSIÓN</u> .....	58
<u>4. BIBLIOGRAFÍA</u> .....	60

## RESUMEN

*Echinochloa crus-galli* es una de las malezas más nocivas en los arrozales uruguayos y ha desarrollado resistencia a los herbicidas quinclorac e imazapyr + imazapic. Quinclorac es un herbicida selectivo utilizado para controlar gramíneas anuales, y se ha usado exhaustivamente para el control de *E. crus-galli*. Varios biotipos de *E. crus-galli* resistentes a quinclorac fueron hallados recientemente en Uruguay. Estos biotipos fueron evaluados por INIA Treinta y Tres utilizando ensayos dosis-respuesta tradicionales. El objetivo de este trabajo fue contribuir al conocimiento de los mecanismos de resistencia a quinclorac de biotipos de capín. En primera instancia se re-evaluaron los biotipos mediante ensayos dosis-respuesta *in vitro*, obteniéndose un factor de resistencia de 52 entre los biotipos E7 (resistente) y A33P2 (susceptible) en ensayos *in vitro* de dosis-respuesta. Luego se comparó la inducción de la biosíntesis de etileno y cianuro, la actividad de la  $\beta$ -cianoalanina sintasa ( $\beta$ CAS) en biotipos susceptibles y resistentes inducidas por quinclorac. Además, se estudió la contribución del estrés oxidativo en respuesta a quinclorac. Quinclorac estimuló la formación de etileno y cianuro en plantas susceptibles, pero solo marginalmente en plantas resistentes. La actividad de la  $\beta$ CAS se estimuló en el biotipo susceptible; mientras tanto, en el resistente, no se detectó estimulación. El estrés oxidativo generado por quinclorac se observó solo en el biotipo susceptible. En base a los resultados obtenidos, la resistencia a quinclorac en E7 puede ser causada por la insensibilidad en la vía de transducción de la señal de auxina, que da como resultado una síntesis reducida de etileno y cianuro. La vía de la enzima  $\beta$ CAS y el estrés oxidativo observado (un efecto secundario tardío en la respuesta al quinclorac) no estaría involucrado en la resistencia al quinclorac en E7. Es necesario profundizar en el conocimiento de la transducción de señales provocada por el herbicida, de manera de identificar donde radica la diferencia de respuesta entre los biotipos con respuesta contrastante a quinclorac.

**Palabras clave:** quinclorac, capín, herbicida, cianuro, etileno

## SUMMARY

*Echinochloa crus-galli* is one of the most noxious weeds in Uruguayan rice fields and has developed resistance to the quinclorac and imazapyr + imazapic herbicides. Quinclorac is a selective herbicide used to control annual grasses, and has been used extensively for the control of *E. crus-galli*. Several biotypes of *E. crus-galli* resistant to quinclorac were recently found in Uruguay. These biotypes were evaluated by INIA Treinta y Tres using traditional dose-response assays. The objective of this work was to contribute to the knowledge of the mechanisms of resistance to quinclorac of these biotypes. First, the biotypes were re-evaluated using *in vitro* dose-response assays, obtaining a resistance factor of 52 between the biotypes E7 (resistant) and A33P2 (susceptible) in *in vitro* dose-response assays. Then, we compared the induction of ethylene and cyanide biosynthesis, the activity of  $\beta$ -cyano-alanine synthase ( $\beta$ CAS) in susceptible and resistant biotypes induced by quinclorac. In addition, the contribution of oxidative stress in response to quinclorac was studied. Quinclorac stimulated the formation of ethylene and cyanide in susceptible plants, but only marginally in resistant plants. The activity of  $\beta$ CAS was stimulated in the susceptible biotype; meanwhile, in the resistant, no stimulation was detected. The oxidative stress generated by quinclorac was observed only in the susceptible biotype. Based on the results, resistance to quinclorac in E7 could be caused by insensitivity in the transduction pathway of the auxin signal, which results in a reduced synthesis of ethylene and cyanide. The  $\beta$ CAS enzyme pathway and observed oxidative stress (a late side effect in the response to quinclorac) would not be involved in quinclorac resistance in E7. It is necessary to deepen the knowledge of the signal transduction caused by the herbicide, in order to identify where the difference in response between the biotypes with contrasting response to quinclorac lies.

**Keywords:** Quinclorac, barnyard grass, herbicide, cyanide, ethylene

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 CULTIVO DE ARROZ EN URUGUAY**

El arroz es uno de los principales cultivos comerciales en Uruguay, con un promedio de 172.794 hectáreas plantadas por año entre 2004 y 2014 y rendimientos cercanos a las 8 toneladas por hectárea (ACA, 2015a). Uruguay es el primer exportador de arroz de Latinoamérica y el octavo en el mundo (ACA, 2015b). Este posicionamiento en el mercado internacional se ha logrado, fundamentalmente, en base a la calidad del producto y procesos (Hareau et al., 2006) dado por los controles aplicados a la producción de la semilla, el uso de tecnología de última generación para los procesos de sembrado, cosecha, secado y de molinería, la calidad varietal y los cuidados relativos al transporte y comercialización.

El rendimiento comercial en el cultivo de arroz se ha incrementado a una tasa de 1.88% anual en los primeros 15 años del período 1994-2014 (Pérez de Vida, 2010). El cultivo de arroz se basa en un sistema de producción en rotaciones con pasturas y cultivos alternativos, integrado con la producción ganadera, buscando asegurar la sustentabilidad productiva, económica y ambiental (ACA, 2013). Aproximadamente el 60% de la superficie total del cultivo se siembra en campos que no han tenido arroz en la zafra anterior, mientras que aproximadamente el 10% del área corresponde a arroz sembrado sobre rastrojo en forma continua durante tres o más años. El sistema de producción de arroz utilizado en Uruguay se puede considerar de baja intensidad e impacto ambiental, dado que se siembra solo un cultivo por año, se siembra en seco y se realiza una inundación del terreno 30-40 días después de la emergencia (ACA, 2013). En el 85% del área se utiliza semilla certificada (Hareau et al., 2006), lo que reduce el riesgo de aparición de arroz rojo. La frecuencia de uso de agroquímicos es baja en comparación con otros países productores de arroz, viabilizada por la rotación.

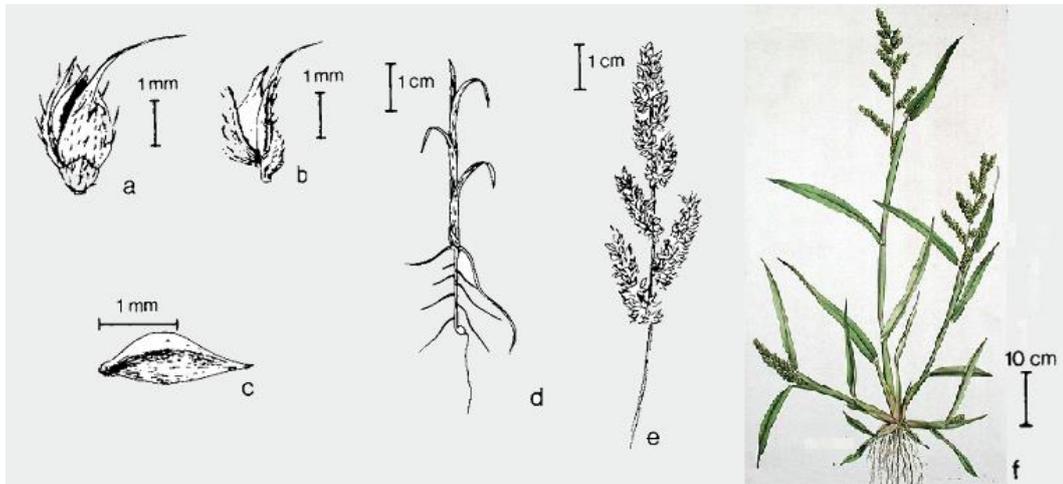
## 1.2 MALEZAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE ARROZ

Uno de los principales factores que pueden disminuir la cantidad y calidad de la producción arroceras es la presencia de malezas. Las malezas no solo provocan una disminución de la producción neta de grano, sino que aumentan los costos de la producción (Ampong-Nyarko y De Datta, 1991). Se estima que solo el control de malezas (incluyendo herbicidas, procesos mecánicos y culturales) provoca la pérdida de aproximadamente un 5% de las ganancias obtenidas.

Las malezas de mayor presencia en el Uruguay son el capín (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv) y el arroz rojo (Zorrilla de San Martín, 1992). También están presentes especies de los géneros *Brachiaria*, *Cyperus*, *Sesbania*, *Ipomoea* y *Xanthium*, compartidas con cultivos de secano, y las malezas acuáticas y semiacuáticas *Leptochloa* sp, *Ammanniacoccinea*, *Heteranthera* sp. Estas especies pueden ser controladas efectivamente mediante una combinación de metodologías de manejo agronómico, cultural y químicos (Ampong-Nyarko y Datta, 1991).

### 1.2.1 Capín

El capín (Fig.1) es una de las malezas más perjudiciales en la agricultura moderna (Leeson et al., 2005). Posee las características necesarias para sobrevivir y competir en una gran variedad de zonas geográficas y condiciones climáticas (Marambe y Amarsinghe, 2002). Esta maleza originaria de Europa, rápidamente se dispersó por todos los demás continentes. Las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que posee le permiten competir fuertemente con el arroz y otros cultivos (Maun y Barret, 1986). El capín puede producir un gran número de semillas, que a su vez poseen dormancia, asegurando su propagación y la generación de un reservorio de semillas en el perfil del suelo



**Figura 1.** Estados de desarrollo de *Echinochloa cruz galli*: a) espícula, b) espícula abierta, c) cariopsis, d) plántula, e) panícula, f) planta adulta (adaptado de Maun y Barret, 1986).

(Gibson et al., 2002; Clay et al., 2005). En una situación de fuerte competencia puede reducir el rendimiento del arroz un 50% (Maun y Barret, 1986).

### 1.2.1.1 Biología y ciclo de vida

El capín es una planta herbácea, cosmopolita, de aspecto robusto, hoja sin lígula, vaina aplanada en estado de plántula, raíces fibrosas y reproducción por cariósides (Maun y Barret, 1986). La inflorescencia está formada por un racimo de 2-10 cm y presenta varias espigas bien definidas (Fig. 1e). Las espiguillas tienen entre 2.8 y 3.5 mm, son comprimidas, pueden ser aristadas o no. La gluma inferior tiene entre un medio y un tercio de la longitud de la espiguilla y es mucho menor que la gluma superior, que presenta cilias cortas. Si bien es una planta tropical, está adaptada a un gran rango de fotoperiodos. Un fotoperiodo de entre 9-13 horas produce un adelantamiento de la etapa reproductiva en comparación a lo que ocurre en un fotoperiodo largo de 16 horas. Prolifera en sitios con abundancia de agua, promoviendo el florecimiento prematuro. La propagación ocurre exclusivamente vía semillas y no se ha observado propagación vegetativa. La germinación tiene lugar en suelos con un pH entre 4 y 8, siendo 7 el pH óptimo (Chauhan y Johnson, 2009). La producción de semillas es muy variable, dependiendo de las condiciones climáticas. Se

estima que la producción promedio es de entre 2.000 y 4.000 semillas por planta; bajo condiciones ideales podría llegar a producir 40.000 semillas por planta (Holm et al., 1977). Existe una correlación entre el número de semillas producidas y la acumulación de materia seca en plantas de capín (Ciuberkis et al., 2007). Las semillas producidas son dormantes, con un porcentaje de germinación entre 0,3% y 1,4%. Las semillas pueden quedar en estado de dormición por 8 o 9 años (Chin, 2001).

### **1.2.1.2 Competencia con los cultivos**

El capín es una importante maleza en diferentes cultivos, incluyendo el arroz (Chauhan y Johnson, 2011). Crece bien en suelos húmedos, continúa el crecimiento bajo suelos parcialmente inundados (Chauhan y Johnson, 2009) y tiene la habilidad de germinar en condiciones de baja concentración de oxígeno (Kennedy et al., 1980). El capín es morfológicamente similar al arroz durante periodos tempranos del desarrollo (Barret, 1983), permitiendo que algunos individuos escapen al control de malezas. El reconocimiento tardío de la presencia del capín en el campo de arroz provoca grandes pérdidas de rendimiento. En el mundo la pérdida de rendimiento en el arroz por competencia con el capín se estima en un 35% (Oerkey y Dhene, 2004). Una competencia constante provoca pérdidas en el rendimiento cercanas al 70% (Ottis y Talbert, 2007). Además, el capín sincroniza los requerimientos de crecimiento con los del arroz, reduciendo el crecimiento de varios componentes del arroz (Fischer et al., 1997). El capín es una planta tipo C4, por lo tanto cuando existe una temperatura elevada, 28–30 °C, la acumulación de materia seca es superior a la del arroz, que es una planta C3. Esto se revierte cuando las temperaturas son menores a 25 °C.

### **1.2.1.3 Resistencia a herbicidas**

El uso de herbicidas ha jugado un papel importante en el control del capín. El control químico ofrece un manejo sustentable de esta maleza, reduciendo significativamente la producción de semillas comparadas a otros métodos tales como estrategias culturales, control manual y control biológico (Perron y Legere, 2000). El control del capín mediante herbicidas ha surgido como una opción más económica debido al aumento de los salarios de los operarios y la escases de mano de obra en el campo (Beltran et al., 2012). Diferentes herbicidas con distintos modos de acción han sido usados efectivamente para controlar al capín a lo largo del mundo. En Uruguay el control de capín se realiza mayoritariamente con los herbicidas clomazone, bispiribac-sodio, quinclorac, propanil, imazapir + imazapic y penoxulam (Saldain y Sosa, 2012). Herbicidas como elimazamox, penoxsulam, enoxaprop, bensulfuron, butachlor, thiobencarb, atrazina y molinate han sido exitosos en el control del capín en otros países (Bajwa et al., 2015).

Sin embargo, se han reportado biotipos de capín resistentes a diversos herbicidas. A finales de la década del 70 se reportó en Estados Unidos y Francia los primeros biotipos de capín resistentes al herbicida atrazina (López-Martínez et al., 1997). La resistencia del capín al herbicida propanil fue de las primeras reportadas (Giannopolitis y Vassiliou, 1989); este herbicida se ha utilizado exhaustivamente para controlar malezas en el cultivo de arroz en diversos países por más de 40 años. Luego de la evolución de la resistencia a propanil, el segundo herbicida introducido para combatir masivamente al capín en campos arroceros fue la auxina sintética quinclorac. A finales de la década de los noventa, en España se detectaron por primera vez biotipos resistentes a quinclorac (López-Martínez et al., 1997). En Uruguay se ha confirmado resistencia a quinclorac en escapes de capín a las medidas de control en chacras distribuidas en la cuenca de la Laguna Merín (Saldain y Sosa, 2012). Además, se

sabe que existen chacras puntuales donde la población de capín que prevalece es resistente al quinclorac prescindiendo de ese herbicida cuando se vuelve a plantar arroz.

Un estudio realizado recientemente en Estados Unidos (Norsworthy et al., 2014) mostró que biotipos de capín han desarrollado resistencia a tres herbicidas inhibidores de la actividad de la enzima acetolactato sintasa (ALS): imazetapir, bispiribac-sodio y penoxulam. En varios casos la aplicación de mezclas de herbicidas mejora el control de poblaciones de capín con resistencia a herbicidas. La aplicación de clomazone en pre-emergencia, seguido por varias aplicaciones de imazetapir controló el 90% de una población que había generado resistencia a clomazone en campos de arroz (Wilson et al., 2014). El uso de clomazone como pre-emergente seguido de quinclorac o quinclorac + imazetapir controla efectivamente al capín en campos de arroz (Meier et al., 2008).

### **1.3 HERBICIDAS AUXINICOS**

Las auxinas son hormonas vegetales de gran importancia, siendo el ácido indol 3 acético (AIA) la más relevante. Además del AIA, las plantas sintetizan otras tres auxinas: ácido 4-cloro-indol-3-acético, ácido indol 3 butírico, y ácido fenilacético, sin embargo sus roles no han sido explicados satisfactoriamente (Simon y Petrášek, 2011). Las auxinas regulan la elongación y la división celular, y diversos procesos del desarrollo incluyendo diferenciación del tejido vascular y el meristemo floral, iniciación de hojas, senescencia, dominancia apical y formación de raíces.

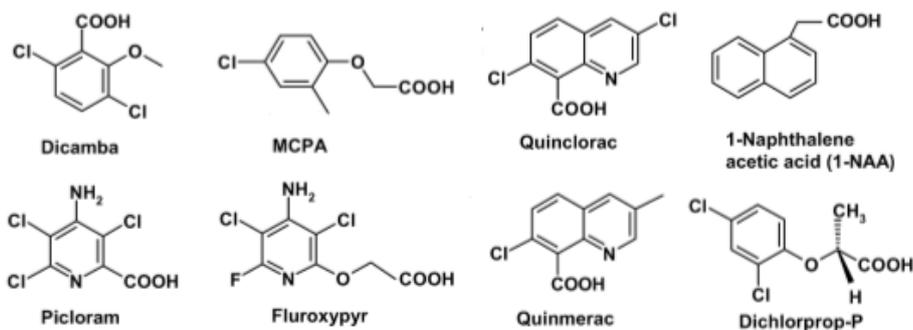
El AIA influencia virtualmente todos los aspectos relacionados al crecimiento de la planta, actuando como factor principal en una compleja red de interacciones con otras hormonas (Ross et al., 2002).

En los años 40, los laboratorios industriales comenzaron a trabajar en derivados del AIA, incluyendo el 1-ácidonaftalenacético (1-ANA) y los ácidos fenoxicarboxílicos, ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2,4D) y el ácido 2-metil-4-

clorofenoxiacético (MCPA) (Cobb, 1992). Estos compuestos desencadenan el mismo tipo de respuestas en la planta que el AIA, pero con una mayor duración e intensidad. Estos derivados de AIA tienen una estabilidad particularmente alta, a diferencia de lo que ocurre con las auxinas naturales. Los compuestos como el AIA son rápidamente inactivados por medio de conjugación o degradación, lo que permite controlar la homeostasis de estos compuestos. Esto es importante ya que los efectos de las auxinas son bifásicos. Dependiendo de la concentración en el tejido y la distribución (desarrollo de gradientes) en la planta, se observan efectos opuestos (Davies, 1995). Cuando las auxinas se encuentran en bajas concentraciones en las células, estimulan el crecimiento y la elongación celular; sin embargo, cuando están presentes en altas concentraciones, ocurren distorsiones en el crecimiento de la planta: se induce epinastia, proliferación del tejido del tallo, formación de raíces adventicias e inhibición del crecimiento de raíces y brotes (Sterling y Hall, 1997). Estos descubrimientos incrementaron el interés en la investigación sobre auxinas sintéticas, no solo enfocándose en las auxinas como promotoras del crecimiento en horticultura (Gianfagna, 1995) y micropropagación de plantas (Krikorian et al., 1987) sino como herbicidas para el control de malezas (Grossmann, 2003). Los primeros herbicidas auxínicos lanzados fueron MCPA y 2,4D, catalogados inicialmente como “reguladores de crecimiento”. A través de los años, varios tipos de herbicidas auxínicos fueron introducidos, con diferentes espectros de acción y tipos de selectividad. Actualmente existen cinco clases de herbicidas auxínicos: ácidos benzoicos (dicamba), ácidos quinolinona carboxílicos (quinclorac, quinmerac), ácidos fenoxicarboxílicos (2,4D), ácidos piridin carboxílicos (picloram) y derivados carboximetil aromáticos (benazolin) (Fig.2).

Un requerimiento estructural esencial para la actividad tipo auxina es la presencia de una fuerte carga negativa en un grupo carboxilo en el estado disociado de la molécula, la cual debe estar separada de una carga positiva débil del anillo aromático (Farrimond et al., 1978). Cuando son aplicados, los

herbicidas auxínicos actúan imitando los efectos de distorsión en el crecimiento, causados por una alta concentración de AIA en los tejidos (Cobb, 1992); los mismos efectos son observados en mutantes que sobre-producen AIA (Romano et al, 1993). Este fenómeno se describe como una sobredosis de auxina o como el resultado de una concentración supra-óptima de auxina que produce un desbalance en la homeostasis auxínica y en la interacción con las demás hormonas en el tejido. Una estimulación constante del metabolismo de la planta provoca una desregulación del crecimiento a través de una distorsión de la expansión y división



**Figura 2.** Estructura de distintas auxinas sintéticas (Tomado de Grossmann, 2009).

celular, generando un colapso general de las estructuras de crecimiento de la planta (Grossmann, 2000).

#### 1.4 QUINCLORAC

El herbicida quinclorac (ácido 3,7-dicloro-8-quinolina carboxílico) fue desarrollado en 1985 por BASF Aktiengesellschaft para el control del capín en el cultivo de arroz (Wuetzer et al., 1985). Junto al quinmerac (ácido 7-cloro-3-metil-8-quinolina carboxílico) son los dos herbicidas del tipo ácido quinolina carboxílicos substituidos registrados en la actualidad. Estos compuestos están relacionados estructuralmente a los ácidos quinolina carboxílicos naturales que se identificaron en suelos y en plantas como el arroz, maíz (Matsushima et al., 1973) y especies de *Ephedra* (Starratt y Caveney, 1996). El herbicida quinmerac

controla efectivamente malezas dicotiledóneas como *Galium asparine* en cultivos de remolacha azucarera y canola (Walter, et al, 1994). Por su parte, el herbicida quinclorac es usado como herbicida pre y post emergente en cultivos de arroz trasplantado y también en siembra directa. Además del arroz, otros cultivos como canola y trigo son tolerantes a quinclorac (Wuetzer y Berghaus, 1985). En cambio, cultivos como el tomate y zanahoria son susceptibles. A principios de la década de 1990, quinclorac fue lanzado al mercado bajo el nombre de Facet® en Asia, América del Sur, América del Norte y Europa. Este herbicida controla especies dicotiledóneas (*Aeschynomene* spp., *Cassia* spp., *Ipomoea* spp., *Monochoria* spp., *Oenanthe javanica*, *Sesbania* spp) y monocotiledóneas (*Setaria* spp., *Digitaria* spp.) con una excelente seguridad para las especies cultivadas.

#### **1.4.1 Propiedades fisicoquímicas**

Quinclorac es un compuesto cristalino incoloro cuya fórmula molecular es  $C_{10}H_5Cl_2NO_2$ . Su peso molecular es 242,06 gramos por mol. Posee una baja presión de vapor,  $1,1 \times 10^{-7}$  mm Hg a 25 °C (Monaco et al., 2002), por lo tanto, la pérdida por evaporación es muy reducida. Es relativamente estable frente al calor y la luz en un rango de pH entre 3,0 y 9,0. Es soluble en agua (0,62 mg/L), acetona (0,25 mg/L) y en cloruro de metileno (13,4 mg/L).

Su solubilidad en agua genera la posibilidad de pérdida por lixiviación, sin embargo, estudios de simulación realizados con lisímetros demostraron que existe poca probabilidad de que el quinclorac contamine las aguas subterráneas (Kyung et al., 1997). El quinclorac es un ácido débil con un pKa de 4,34 a 20 °C, por lo que su coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ) incrementa con el pH, teniendo un valor de -1,16 a pH 7 (Grossmann, 2000). Este herbicida es poco absorbido por los coloides del suelo; su movilidad depende del tipo del suelo, pH y la presencia de materia orgánica. Por ejemplo, en un suelo compuesto por arcilla, limo y arena con 2% de materia orgánica, quinclorac es disipado en un 50% a través de descomposición microbiana en 48 semanas (Hill et al., 1998). La

persistencia del herbicida está influenciada directamente por el contenido hídrico del suelo. Bajo irrigación, cultivos sensibles plantados un año después de la aplicación del herbicida no sufren daños. Sin embargo, cuando el contenido hídrico del suelo es bajo el quinclorac persiste y daña a los cultivos susceptibles. El uso de quinclorac fue prohibido en Corea del Sur (Kyung et al., 1997) y España (Gómez de Barreda et al., 1991) en ciertas zonas, debido al daño provocado en cultivos de papa y tomate irrigados con aguas contaminadas con quinclorac.

#### **1.4.2 Absorción, traslocación y metabolismo**

Quinclorac es fácilmente absorbido por semillas en germinación, raíces y hojas. Estudios realizados en biotipos de capín muestran que el herbicida se absorbe de forma más eficiente por las raíces (Concenço et al., 2009). La absorción radicular ocurre a través del mecanismo de trampa iónica de ácidos débiles (Briggs et al., 1987). Alta humedad relativa, alta temperatura y alta intensidad lumínica aceleran la absorción, mejorando así la actividad del herbicida. El quinclorac acumulado en las raíces se trasloca de forma acropeta hasta el tallo, donde las hojas jóvenes y el tejido meristemático son los principales destinos del mismo. Luego, el herbicida es traslocado nuevamente hacia las raíces de forma basipeta, donde ocurre la exudación radicular (Chism et al., 1991; Lamourex y Rusness, 1995). Esto indica que existe movilidad por xilema y floema.

Berghaus y Wuerzer (1989) observaron que después de aplicar quinclorac al capín vía foliar, aproximadamente el 75% del herbicida era absorbido en 8 horas. Sin embargo, en el arroz la absorción fue más lenta alcanzándose porcentajes similares de absorción después de 24 horas de la aplicación. Estos autores observaron además que las plantas de arroz traslocaron y exudaron por vía radicular mayor cantidad de quinclorac que las plantas de capín (Berghaus y Wuerzer, 1989). En general, las especies susceptibles traslocan menos cantidad de herbicida que las especies tolerantes; sin embargo, la rápida acción citotóxica observada en especies susceptibles puede explicar la baja tasa de translocación.

(Chism et al., 1991). Estas diferencias en translocación y exudación radicular no se correlacionan con la fitotoxicidad observada.

En general, el metabolismo de quinclorac en la mayoría de las especies es muy limitado con la excepción de *Euphorbiaésula*. En arroz y en capín, solo entre el 5% y 10% del quinclorac absorbido resulta metabolizado en 24 horas después de la aplicación. No se observaron diferencias significativas en el metabolismo en tejidos de la raíz y el tallo (Berghaus y Wuerzer, 1989; Grossmann y Scheltrup, 1997). En estudios realizados en *Euphorbiaésula* se detectó una tasa de metabolización del quinclorac absorbido del 46% (Lamourex y Rusness, 1995). En esta especie el quinclorac es metabolizado a un conjugado con glucosa, que luego es convertido en un éster de pentosil glucosa y en un éster de manolil glucosa. Sin embargo, el rol del metabolismo en la desintoxicación de quinclorac en *Euphorbia ésulano* no está claro, ya que la estabilidad de los metabolitos secundarios no es conocida (Lamourex y Rusness, 1995). Estudios realizados por Grossmann y Kwiatkowski (2000) con biotipos de *E. crus galli*, *E.hispidula*, *Brachiaria platyphylla*, *E. colonum*, *D. sanguinalis* y *O. sativa* demostraron que no existe diferencia entre la absorción, traslocación y metabolismo entre especies susceptibles y tolerantes. A su vez, se estudiaron biotipos sensibles y resistentes de *E. hispidula* y *E.crusgalli*. En este caso tampoco se encontraron diferencias en la absorción, traslocación y metabolismo entre biotipos susceptibles y resistentes. Estos resultados sugieren que en el caso de quinclorac el mecanismo de selectividad está relacionado al sitio de acción (Grossmann y Kwiatkowski, 2000; Grossmann, 1998).

### **1.4.3 Modo de acción**

#### **1.4.3.1 Actividad como auxina**

El sitio de acción de quinclorac no se conoce, se considera un herbicida auxínico con acción sobre monocotiledóneas (Grossmann, 1998). La característica principal de un herbicida auxínico es la capacidad de imitar los

efectos de la auxina natural AIA. A bajas concentraciones, son promotores del crecimiento, y a altas concentraciones provocan distorsión en el crecimiento. En diversos experimentos se ha constatado que quinclorac actúa como un análogo de AIA. Una dosis de quinclorac 100  $\mu$ M incrementó la longitud de los coleoptilos en trigo (Berghaus y Wuerzer, 1987); similares efectos se observaron a menores concentraciones de AIA y 2,4D. Bajas concentraciones de quinclorac promovieron el crecimiento de frutos en tomate y citrus (Schott et al., 1989). Quinclorac y 2,4D provocaron una respuesta similar en raíces de pepino, en relación a la inhibición del crecimiento y la morfología de las raíces (Berghaus y Wuerzer, 1987). Quinmerac y quinclorac provocan respuestas fisiológicas y bioquímicas típicas de una sobredosis de AIA (Coupland, 1994; Sterling y Hall, 1997): a) reducción de la apertura estomática y asimilación de CO<sub>2</sub> (Grossmann et al., 1996 ; Grossmann, 1997), b) incremento en la respiración (Grossmann, 1997), c) estimulación de la síntesis de etileno y cianuro a través de la estimulación de la enzima 1-ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) sintasa (Grossmann y Kwiatkowski, 1995), d) acumulación de ácido abscísico (ABA) y formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Grossmann et al., 2001). Si bien las auxinas sintéticas poseen similitudes estructurales, como el grupo ácido carboxílico, también poseen diferencias que provocan distintos efectos en la planta. Por ejemplo, quinclorac no produce el bombeo transmembrana de protones, una respuesta típica en compuestos auxínicos como el 2,4D (Mito et al., 1991; López-Martínez, 1997). A diferencia que 2,4D y AIA, quinclorac no se une a proteínas de unión a auxina (ABP) en maíz (Mito et al., 1991; Sunohara y Matsumoto, 1997). Sin embargo, esto no significa que quinclorac no tenga actividad auxínica, sino que es probable que interaccione con otro tipo de proteínas. Como conclusión, quinclorac y quinmerac poseen actividad auxina, pero sus efectos y la transducción de señales dentro de la planta son distintos a las de otras auxinas como 1-ANA y 2,4D.

#### **1.4.3.2 Actividad en dicotiledóneas**

En especies dicotiledóneas sensibles a quinclorac induce los mismos efectos que otras auxinas o herbicidas auxínicos: epinastia, engrosamiento de tallo, inhibición del crecimiento de tallo y brotes y efectos fitotóxicos, tales como desecación, clorosis y necrosis en parte aérea (Berghaus y Wuerzer, 1987; Grossmann y Kwiatkowski, 1993; Grossmann y Schmiilling, 1995; Scheltrup y Grossmann, 1995). La respuesta a quinclorac se puede dividir en tres etapas: a) estimulación, b) inhibición y c) decaimiento (Grossmann, 2009). En *Galium aparine* la etapa de estimulación ocurre en las primeras horas luego de la aplicación del herbicida. En esta fase se estimulan procesos metabólicos como la síntesis de etileno a través de la inducción de la enzima ACC sintasa en el tejido del tallo, seguido de síntomas asociados a un crecimiento distorsionado como epinastia, engrosamiento del tallo y encorvamiento de hojas. Luego de 5–8 horas, se da un aumento de ABA en el tejido del tallo. La etapa de inhibición comienza aproximadamente 24 horas luego de aplicación del herbicida. Se caracteriza por la inhibición del crecimiento de raíces y tallo, reducción de la elongación internodal y una intensificación de la pigmentación verde de las hojas (Grossmann, 2009). Luego se produce el cierre de los estomas, con la consecuente reducción de la transpiración y la asimilación de CO<sub>2</sub> (Cornic, 2000). La reducción en la asimilación de CO<sub>2</sub> provoca la acumulación de EROs, como peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), originados por un incremento en la pérdida de electrones a través de la membrana tilacoidal de los cloroplastos, siendo aceptados por O<sub>2</sub> (Dat et al., 2000). A las 72 horas, luego de la aplicación del herbicida, ocurre la etapa de decaimiento, caracterizada por una acelerada senescencia y degradación tisular. Se observan daños en cloroplastos, clorosis progresiva y destrucción del sistema vascular y de membranas, provocando necrosis, marchitez y finalmente la muerte de la planta. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juega un papel doble en las plantas: a bajas concentraciones actúa como molécula señal involucrada en las reacciones de aclimatación a diversos estreses bióticos y abióticos, mientras que a altas concentraciones provoca daño oxidativo como la peroxidación de lípidos y en última instancia conduce a la muerte celular

programada (Quan et al., 2008). Se ha demostrado que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa también en diversos procesos fisiológicos como senescencia, fotorrespiración, fotosíntesis, movimiento estomático, ciclo celular, desarrollo y crecimiento (Gill y Tuteja, 2010). La acción del ABA contribuye a los efectos tardíos inducidos por quinclorac en dicotiledóneas, especialmente la inducción del decaimiento de tejidos y muerte celular (Grossmann, 2000). Se ha demostrado que los niveles de ABA aumentan debido al clivaje de 9-*cis*-violaxantina y/o 9-*cis*-neoxantina en xantoxal, un paso clave en la biosíntesis de ABA, catalizado por la enzima 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) (Finkelstein, 2013). La abundancia de NCED es regulada positivamente por AIA y otros compuestos auxínicos (Hansen y Grossmann, 2000; Gleason et al., 2011). Se especula que el etileno producido por la activación de la vía auxínica, induce la actividad de NCED provocando el aumento de la biosíntesis de ABA. Esto ocurre posiblemente por la inducción de la transcripción de *NCED* (Grossmann y Hansen, 2000; Grossmann, 2003). La acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la posibilidad de la formación del radical hidroxilo a través de reacciones de tipo Fenton (Bartosz 1997; Foyer y Noctor, 2000).

#### **1.4.3.3 Actividad en monocotiledóneas**

A diferencia de los demás herbicidas auxínicos, quinclorac tiene actividad sobre importantes especies herbáceas asociadas al cultivo del arroz como *Echinochloa spp*, *Setaria spp* y *Brachiaria spp* (Grossmann, 1998; Grossmann, 2003). En plantas de capín, los principales síntomas producidos por quinclorac son: rápida inhibición del crecimiento del tallo, clorosis en hojas jóvenes y posteriormente necrosis y marchitamiento de la parte aérea (Grossmann, 2003). Dicamba y picloram provocan epinastia y engrosamiento del tallo en plantas de capín, en cambio esto no se observa con el tratamiento con quinclorac (Grossmann 1998), sugiriendo que quinclorac tiene un modo de acción adicional además de su actividad auxina. Koo et al. (1996) propusieron que quinclorac actuaba como inhibidor de la biosíntesis de la pared celular, inhibiendo la

incorporación de glucosa a las moléculas de celulosa y provocando por tanto la pérdida de la integridad de la membrana y daño en la raíz. Sin embargo, se piensa que esto es un efecto secundario del herbicida y no su modo de acción principal (Grossmann, 1998). Por otra parte, la inducción de la síntesis de ABA y  $H_2O_2$  producida por quinclorac, no son suficientes para explicar los efectos provocados por quinclorac en capín (Grossmann, 2000; 2003). Sus efectos fitotóxicos son causados por la acumulación de cianuro de hidrógeno (HCN) en la parte aérea de la planta (Grossmann, 2003). Muchas especies de plantas han demostrado la capacidad de sintetizar HCN (Miller y Conn, 1980). En la mayoría de estas especies el mecanismo principal de producción de HCN es la degradación de glucósidos cianogénicos. La cianogenesis es muy común en especies herbáceas (arroz, cebada, trigo) y en especies dicotiledóneas (leguminosas) (Grossmann, 2009). El HCN también es formado como co-producto de la síntesis de etileno en la oxidación de ACC, catalizada por la enzima ACC oxidasa (Yip y Yang, 1988). Mientras que el etileno es una importante fitohormona que participa en la regulación de diversos procesos del desarrollo de la planta como crecimiento, senescencia y la maduración de frutos, HCN es un agente fitotóxico (Grossmann, 2009). Es un inhibidor de importantes enzimas como citocromo c oxidasa, RuBisCO, nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa, catalasa (CAT), Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (Grossmann, 1996). La concentración de HCN endógeno requerido para inhibir un 50% la actividad de estas enzimas está en el rango de 5-10  $\mu$ M. La enzima ACC oxidasa es exclusivamente citosólica, sin asociación con membranas (Reinhardt et al., 1994), por lo tanto el HCN y el etileno producidos por su reacción son liberados en el citoplasma. El mecanismo principal de desintoxicación de HCN en las plantas, es la actividad de la enzima  $\beta$ -cianoalanina sintasa ( $\beta$ CAS) (EC 4.4.1.9) (Liang, 2003). Esta enzima exclusivamente mitocondrial es dependiente de piridoxal fosfato y cataliza la reacción de formación de  $\beta$ -cianoalanina a partir de HCN y el aminoácido cisteína (Blumenthal et al., 1968). La diferente compartimentación entre la liberación de HCN (citoplasma) y la enzima que

cataliza su desintoxicación (mitocondria) podría ser la causa de la elevada concentración de cianuro encontrada en ciertos compartimientos celulares, como citoplasma, cloroplastos y peroxisomas. En estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* (Machingura y Ebbs, 2014), *Nicotiana tabacum* (Liang y Li, 2001), *Xanthium pennsylvanicum* (Maruyama et al., 1998) y *Solanum tuberosum* (Maruyama et al., 2000) se demostró la presencia de una enzima citosólica capaz de catalizar la desintoxicación de cianuro. Esta enzima es la cisteína sintasa (EC 4.2.99.8), que normalmente cataliza la formación de cisteína a partir de *O*-acetil-L-serina y sulfuro de hidrógeno, posee una alta similitud en su secuencia aminoacídica con respecto a  $\beta$ CAS (Maruyama et al., 1998). Sin embargo, todavía no se ha estudiado la posible influencia de esta enzima en la respuesta a herbicidas auxínicos. La desintoxicación del HCN en mitocondria protege específicamente a la enzima citocromo c oxidasa y previene la formación de EROs (Vahala et al., 2003). Otras enzimas sensibles localizadas en organelos como NR y Cu-ZnSOD en el citoplasma, RuBisCO en cloroplastos y CAT en peroxisomas, están más expuestas a la inhibición por HCN, ya que el HCN tiene mucha movilidad dentro de la célula (Grossmann, 2009). El pKa del HCN en solución es de 9,2 a 25 °C. El pH intracelular está cercano a 7, por lo tanto, la mayor parte del HCN liberado durante la oxidación del ACC, está en su estado sin disociar. Esta forma es más lipofílica y puede atravesar las membranas y acceder a los organelos celulares con mayor facilidad (Yip y Yang, 1988).

Si bien la fitotoxicidad de quinclorac es más aparente en los tejidos de la parte aérea, el sitio principal de acción es en la raíz. La unión del herbicida a receptores auxínicos específicos dan inicio a la transducción de señales que dan como resultado el aumento de la expresión de los genes de ACC sintasa. Esto produce un aumento de ACC y en menor medida de HCN y etileno en el tejido radicular. El ACC acumulado es transportado hacia la parte aérea donde se convierte en HCN y etileno por la enzima ACC oxidasa. Este proceso se auto amplifica ya que ACC y HCN inducen la actividad de ACC sintasa en el tallo. Esto

se comprobó en ensayos con tallos aislados, en los cuales se aplicó ACC o cianuro de potasio (KCN) por vía vascular y se observó un aumento de la actividad ACC sintasa. El tratamiento con ACC 1mM sobre tallos aislados de capín aumentó la actividad de la enzima ACC sintasa cinco veces con respecto al control 6 horas después de la aplicación (Grossmann y Scheltrup, 1997). El tratamiento con ACC también incrementó la producción de cianuro y etileno (Grossmann y Kwiatkowski, 1995; Grossmann y Scheltrup, 1997). El tratamiento vía radicular con KCN en plantas de capín imita exactamente los efectos fitotóxicos provocados por quinclorac, con concentraciones endógenas de HCN similares (Grossmann y Kwiatkowski, 1995). La concentración endógena de HCN se incrementa por tres y por nueve en capin y *Digitaria sanguinalis*, respectivamente, alcanzando un máximo de entre 30µM y 50µM, 96 horas después de la aplicación de quinclorac (Grossmann y Kwiatkowski, 1995; Grossmann 2003). El pre-tratamiento con el inhibidor de ACC sintasa, aminoetoxyvinilglicina (AVG), produjo una reducción en la fitotoxicidad de quinclorac y la producción de etileno (Grossmann y Kwiatkowski, 1995). Si bien se cree que la principal causa de los efectos citotóxicos de quinclorac en monocotiledóneas están relacionadas con la acumulación de cianuro derivado de la síntesis de etileno, estudios realizados en *Zea mays* (Sunohara y Matsumoto, 2008), *Digitaria adscendens* (Sunohara y Shinjiro, 2010) y *Eleusine indica* (Sunohara et al., 2011) indicaron que es posible que, de forma adicional, quinclorac provoque daño oxidativo, evidenciado por la formación de EROs y la consecuente peroxidación de lípidos y clorosis.

## **1.5 BIOLOGÍA DE AUXINAS**

### **1.5.1 Síntesis y conjugación**

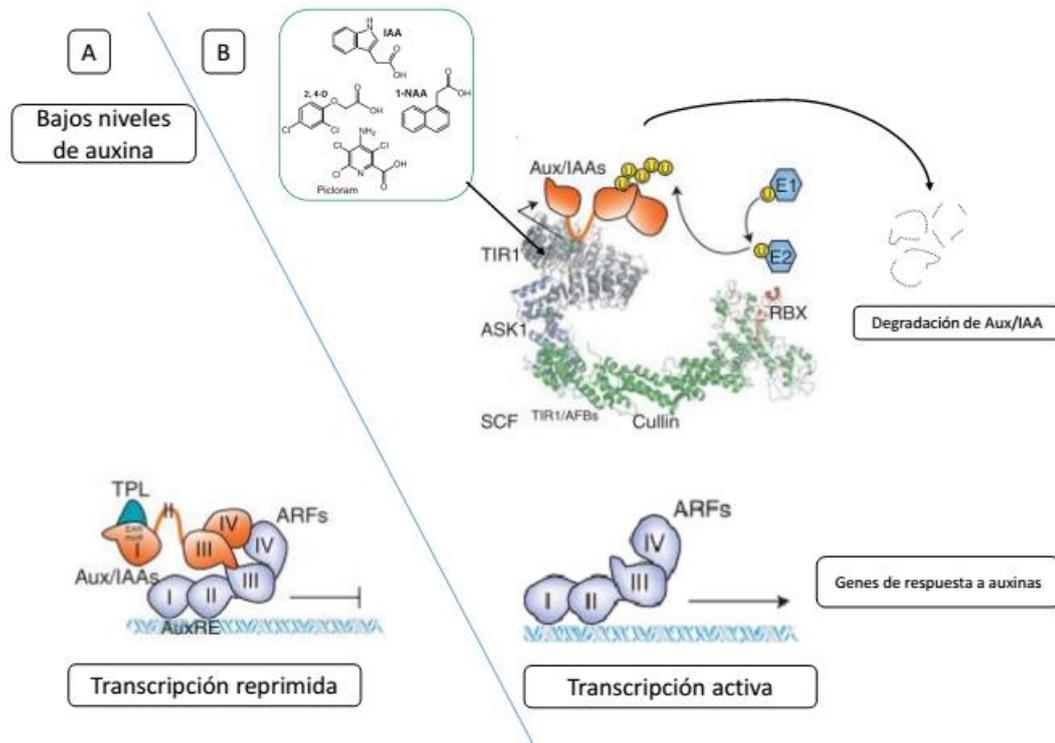
Los niveles endógenos de auxinas son controladas estrictamente durante el desarrollo de la planta. La biosíntesis de AIA ocurre por vías dependientes e

independientes de triptófano (Woodward y Bartel, 2005). AIA se encuentra mayoritariamente en forma inactiva formando conjugados éster con glúcidos o conjugados amida con péptidos o aminoácidos (Ljung, 2013). Estas formas inactivas pueden servir de reservorio de AIA, que rápidamente pueden ser hidrolizadas para liberar el AIA activo o ser el primer paso de su degradación. *A. thaliana* mantiene aproximadamente 90% del AIA como conjugado amida, 10% como conjugado éster y menos de 1% como AIA libre (Woodward y Bartel, 2005). Los principales conjugados amida de AIA son con los aminoácidos alanina, leucina, aspartato y glutamato (Woodward y Bartel, 2005). Los conjugados de alanina y leucina sirven de reserva de AIA; cuando son aplicados exógenamente son hidrolizados y provocan síntomas similares a los del AIA (LeClere et al., 2002). Los conjugados de aspartato y glutamato no son sustratos para la hidrólisis; en cambio se ha detectado oxidación del conjugado AIA-aspartato (Östin et al., 1998) indicando que la conjugación de AIA con aspartato o glutamato puede estar relacionado con la inactivación del AIA.

Existen seis enzimas que conjugan aminoácidos con AIA *in vitro* (Staswick et al., 2005). En *A. thaliana* estas enzimas son codificadas por genes pertenecientes a la familia de genes GH3 (Gretchen Hagen 3). Esta familia de enzimas originalmente descubierta en *Glycine max* (Wright et al., 1987) son inducibles por AIA y por auxinas sintéticas como el 2,4-D o dicamba (Staswick et al., 2005), sugiriendo que estas enzimas cumplen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, eliminando el exceso de AIA (Kelley y Riechers, 2007). Los sustratos de esta clase de enzimas son las auxinas naturales y la auxina sintética 1-ANA, sin embargo, el triptófano, la auxina natural 4-Cl-IAA y los herbicidas auxínicos dicamba y 2,4D no lo son (Staswick et al., 2005). Como resultado, estos herbicidas no son inactivados por esta vía, pudiendo ser una de las causas por la cual provocan una respuesta auxínica descontrolada (Kelley y Riechers, 2007).

### **1.5.2 Percepción y señalización**

Las auxinas controlan la fisiología de las respuestas en células específicas de forma transcripcional y no transcripcional (Hayashi, 2012). Transcripcionalmente, la maquinaria proteosomal SCF<sup>TIR1/AFB</sup> (*Skp-Cullin-F-box*) cumple un rol central en la regulación de la transcripción que desencadenan las respuestas del tipo auxínico (Chapman y Estelle, 2009) (Fig.3). En este proceso, las auxinas promueven la degradación de los represores transcripcionales Aux/IAA a través de la vía proteosomal, aumentando la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA. Las proteínas Aux/IAAs son reconocidas como sustrato del complejo SCF<sup>TIR1/AFB</sup> E3 ubiquitin ligasa, y con la unión de la molécula de auxina, se promueve la degradación del represor (Kepinski, 2007). Los represores Aux/IAA heterodimerizan con los factores de transcripción (factores de respuesta a auxina (ARF)) para bloquear la transcripción de genes de respuesta a auxinas. Cuando ocurre la degradación de los represores promovido por la unión de una molécula de auxina a un receptor específico TIR1/AFB, se produce la activación de los ARF permitiendo la expresión de los genes de respuesta rápida a auxinas. La proteína de unión a auxina 1 (ABP1) es uno de los receptores que podrían estar



**Figura 3.** Modelo de señalización de la vía auxínica. A) Con bajos niveles de auxina, los genes de respuesta a auxinas están reprimidos por el represor Aux/IAA y el corepresor TPL. b) Al aumentar la concentración de herbicidas auxínicos o AIA, la unión al receptor específico TIR/AFB provoca la degradación de Aux/IAA y se activa la expresión de genes de respuesta temprana a auxinas como ACC sintasa, GH3 y NCED (Adaptado de Calderón-Villalobos et al., 2010).

involucrados en la respuesta no transcripcional de auxinas.

### 1.5.3 Receptores

El genoma de *Arabidopsis* contiene 6 genes que codifican proteínas del tipo caja F TIR1/AFB (TIR 1, AFB1-5), se ha demostrado que los seis miembros de la familia funcionan como receptores de auxinas (Dharmasiri et al., 2005; Parry et al., 2009; Greenham et al., 2011). Además del dominio caja F, estas proteínas poseen un dominio con 18 repeticiones ricas en leucina (LRR). TIR1 (*transportinhibitor response 1*) fue una de las primeras proteínas caja F descubiertas. A través de este dominio se produce la interacción con proteínas adaptadoras como SKP1 (*S-phasekinase-associated protein 1*), mientras que sus

otros diversos dominios de interacción se unen a los sustratos (Zheng et al., 2002). Los receptores AFB (*auxin signaling f-box*) muestran diverso grado de similitud en su cadena polipeptídica con respecto a TIR1. AFB1 posee una homología con TIR1 del 70%, AFB2 y AFB3 poseen una homología entre ambas de un 80% y 60% con respecto a TIR1 (Dharmasiri et al., 2005; Parry et al., 2009). AFB4 y AFB5 son distintas al resto de la familia, poseen 76% de homología entre ellas y 50% con respecto a TIR1. Contienen una extensión N-terminal, que no está presente en TIR1 y AFB1-3 (Salehin et al., 2015), con función desconocida. Los receptores TIR1 y AFB1–AFB5 regulan las respuestas auxínicas dependiente de SCF<sup>TIR1/AFB</sup>. Una mutación de pérdida de función simple mostró un comportamiento normal frente a la aplicación exógena de AIA, exceptuando la mutación *tir1* (Parry et al., 2009; Greenham et al., 2011). Análisis fenotípicos de múltiples mutantes *tir1 afb*, demostraron que TIR1 y AFB2 juegan un rol principal en las respuestas a auxina. Mutaciones en *AFB1* o *AFB3* no alteraron el fenotipo de *tir1*, sugiriendo que una contribución menor de estos dos receptores en la percepción de AIA en *A. thaliana*. Los mutantes triples *tir1 afb1 afb2* y *tir1 afb1 afb3* fueron capaces de crecer hasta el estado de plántula. Sin embargo, el mutante *tir1 afb2 afb3* mostró un fenotipo más severo, con un gran porcentaje de semillas sin germinar y de individuos sin raíz. El mutante cuádruple *tir1 afb1 afb2 afb3* mostró un fenotipo similar al mutante triple *tir1 afb2 afb3* (Parry et al., 2009). Los estudios realizados en los receptores AFB 4 y AFB5, muestran que podrían tener una función distinta que resto de la familia (Walsh et al., 2006; Gleason et al., 2011). La mutación en el receptor *AFB5* provoca resistencia a los herbicida picloram y dicamba, pero no a AIA, 1-ANA y a 2,4D. En cambio el mutante *tir1* mostró ser resistente a 2,4D y a dicamba. El doble mutante *tir1 afb* fue más resistente a dicamba que los mutantes *tir1* y *afb*, demostrando que ambos receptores median las respuestas de este herbicida (Gleason et al., 2011). El bolsillo de unión de TIR1 permite la unión de alta afinidad con AIA; mientras que el herbicida 2,4D también puede unirse a TIR1 pero con menor afinidad. La diferencia de afinidad entre AIA y las auxinas sintéticas radica en el tamaño de la

estructura de su anillo aromático. 2,4D posee un anillo aromático más pequeño que AIA, permitiendo una unión no óptima (Tan et al., 2007). El hecho de que los mutantes *tir1* sean parcialmente resistentes a dicamba, sugiere que este herbicida puede interactuar con el bolsillo de unión de TIR1. Estudios realizados utilizando la técnica resonancia por plasmones superficiales (SPR) demostraron que los herbicidas quinclorac, picloram, fluoroxyppyry DAS534 se unen fuertemente y con alta eficiencia al receptor AFB5; la estructura de pares de iones no compartidos presentes en quinclorac y fluoroxyppyry explicarían la especificidad por AFB5 (Lee et al., 2014). En cambio 1-ANA, y los herbicidas 2,4D, 2,5D, 2,5TP, diclorprop se unen preferentemente a TIR1. Picloram, fluoroxyppyry y DAS534 también se unen con TIR1 pero con menor especificidad, en cambio quinclorac no mostró unión a TIR1 (Lee et al., 2014, ver material complementario). Teniendo en cuenta estos datos, es posible que la selectividad y la potencia de los herbicidas auxínicos pudieran estar influenciadas en parte por los componentes de la maquinaria del complejo SCF E3 ubiquitin ligasa. Estos hallazgos apoyan la teoría de que si bien AIA es la forma más importante de auxina endógena, podrían existir otras auxinas naturales que cumplan roles en procesos de desarrollo, siendo las proteínas AFB su sitio de unión (Parry et al., 2009).

## **1.6 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO**

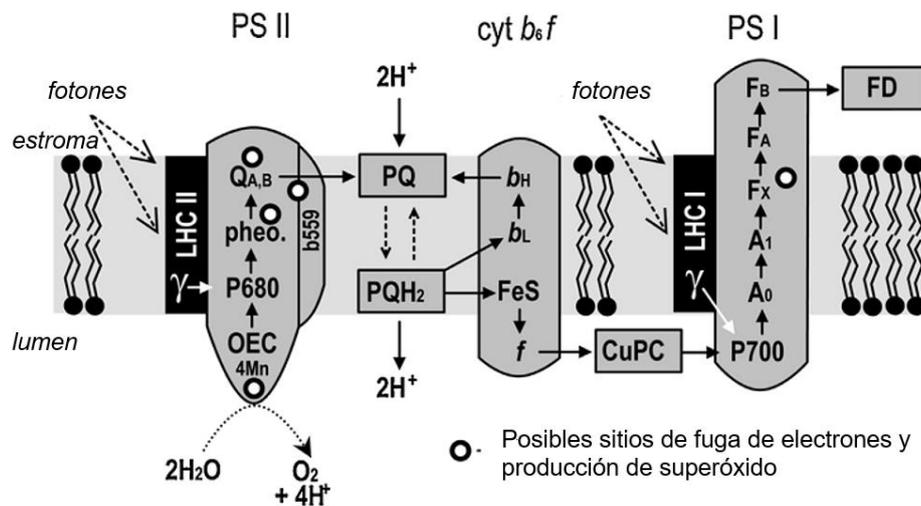
El estrés oxidativo es un fenómeno fisiológicamente complejo que acompaña virtualmente a todos los estreses abióticos y bióticos en plantas. Este fenómeno se desarrolla como resultado de la sobreproducción y acumulación de EROs (Demidchik, 2015). El término EROs incluye a las moléculas que contienen uno o más átomos de oxígenos activados, pero no necesariamente son radicales libres. Los radicales libres son especies químicas que contienen por lo menos un electrón desapareado. Algunos radicales libres no poseen átomos de oxígeno, como por ejemplo los metales de transición.

Las EROs y los radicales libres provocan estrés oxidativo a través de la oxidación de componentes celulares. En la mayoría de los casos, el estrés oxidativo comienza a partir de la activación del oxígeno triplete ( $O_2$ ). Las EROs se forman continuamente en los cloroplastos durante la fotosíntesis (Fig.4). La molécula de  $O_2$  puede aceptar electrones que pasan a través de los fotosistemas, formando radicales superóxido ( $O_2^-$ ), y a partir de este derivan otras especies como el  $H_2O_2$  y el radical hidroxilo. La molécula de  $O_2$  posee dos electrones desapareados con el mismo número de spin cuántico, haciendo que el  $O_2$  acepte un electrón a la vez, fomentando así la formación de EROs (Gill y Tuteja, 2010). Las EROs son muy tóxicas para las plantas; estas pueden modificar las propiedades de membrana y causar daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, haciéndolos no funcionales (Sies y Cadenas, 1985; Møller et al., 2007; Farmer y Mueller, 2013).

Ya que las EROs se producen continuamente en diversos compartimientos celulares (mitocondria, cloroplasto, peroxisoma), las plantas poseen diversos mecanismos para eliminar las EROs (Foyer y Noctor, 2005). La acumulación de EROs inducida por estrés es contrarrestada por sistemas antioxidantes enzimáticos como SOD, ascorbato peroxidasa (APX), guaiacol peroxidasa (GPX), glutatión S-transferasa (GST) y CAT y por metabolitos de bajo peso molecular como ascorbato, glutatión,  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides y flavonoides (Mittler et al., 2004).

### **1.6.1 Daños producidos en biomoléculas**

El estrés oxidativo causa modificaciones reversibles o irreversibles en biomoléculas. La oxidación de lípidos (peroxidación de lípidos) es una de las modificaciones más peligrosas y dañinas que pueden ocurrir en los organismos, ya



**Figura 4.** Posibles sitios de generación del radical superóxido en los fotosistemas I y II (adaptado de Demidchik, 2015).

que propaga radicales libres a través de reacciones en cadena. Una severa peroxidación de lípidos produce daños en membrana celular y membranas de organelos, perdiendo la función de barrera, seguido de la desintegración de organelos, oxidación y disfunción de proteínas, ADN y ARN (Halliwell y Gutteridge, 1999; Farmer y Mueller, 2013). Los productos terminales de la peroxidación de lípidos son sustancias “agresivas” como malondialdehído, 4-hidroxi-2-nonenal, 4-hidroxi-2-hexenal y acroleína. (Farmer y Mueller, 2013). Estos compuestos se pueden cuantificar utilizando el ensayo del ácido tiobarbiturico para la determinación de malondialdehído (Hodges et al., 1999) o utilizando espectrometría de masas.

Las EROs también pueden oxidar aminoácidos (Halliwell y Gutteridge, 1999; Møller et al., 2007; Avery, 2011). La modificación de elementos esenciales como los aminoácidos producen la pérdida de funciones metabólicas, estructurales, regulatorias y de transporte relacionadas con proteínas. La oxidación de proteínas produce además, agregados proteicos tóxicos, que inducen la muerte celular programada (Demidchik et al., 2010; Avery, 2011).

El radical hidroxilo es la forma más reactiva y causa daño a todos los componentes de la molécula de ADN, dañando las bases de purina y pirimidina, y también el esqueleto de desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge, 1999). El oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) ataca principalmente a la guanina, mientras que  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$  no reaccionan con el ADN (Wiseman y Halliwell, 1996).

### **1.6.2 Enzimas antioxidantes**

Para protegerse de las EROs, las plantas emplean un sistema de defensa compuesto por enzimas antioxidantes y metabolitos. La metaloenzima SOD es la enzima antioxidante intracelular más efectiva, está presente en todos los organismos aeróbicos y en los organelos que son afectados por el estrés oxidativo. SOD elimina el  $\text{O}_2^-$  catalizando su dismutación, un  $\text{O}_2^-$  se reduce para dar  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el otro se oxida para dar  $\text{O}_2$ . Al remover  $\text{O}_2^-$ , esta enzima elimina la posibilidad de la formación del radical hidroxilo. Existen tres tipos de SOD según su cofactor metálico: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD; cada una de estas enzimas está localizada en diferentes compartimientos celulares (Mittler, 2002). La Fe-SOD está presente únicamente en cloroplastos, mientras que la Mn-SOD lo hace en mitocondrias y peroxisomas. La Cu/Zn-SOD se localiza en citosol y cloroplastos.

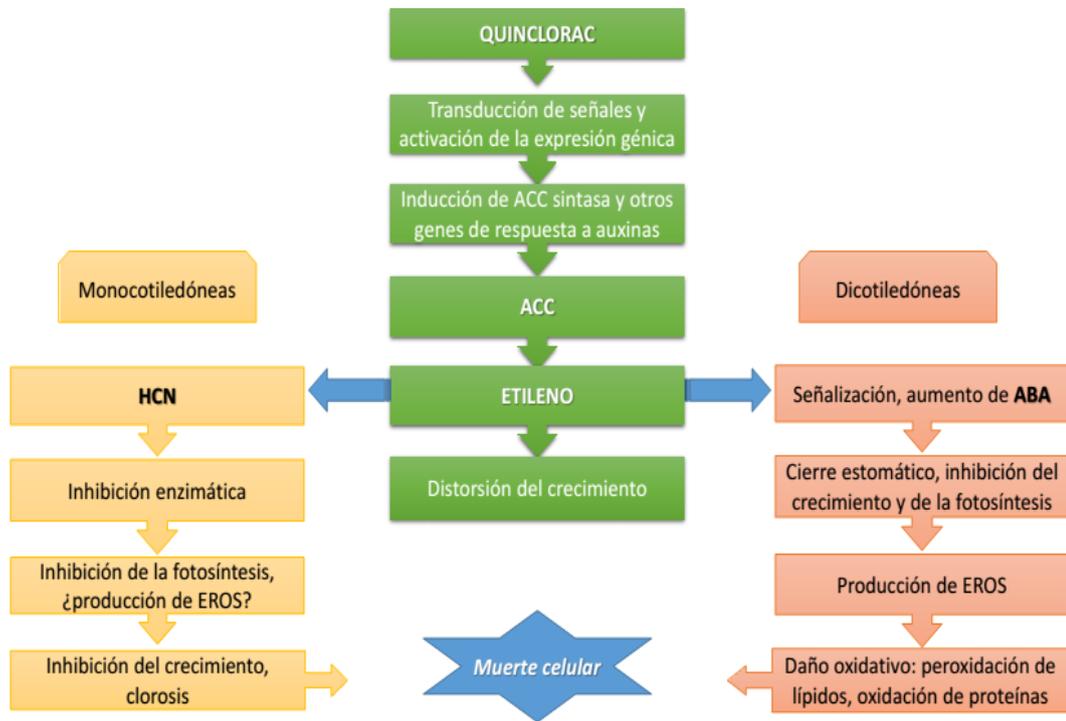
CAT cataliza la dismutación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ , y es indispensable para la desintoxicación de EROs durante condiciones de estrés (Garg y Manchada, 2009). La enzima CAT tiene una de las tasas de descomposición más altas, convirtiendo 6 millones de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  por minuto. CAT es importante en la remoción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en peroxisomas generado por oxidasas en los procesos  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, fotorespiración y catabolismo de purinas. APX remueve eficientemente  $\text{H}_2\text{O}_2$  en cloroplastos, peroxisomas y mitocondria. Esta enzima usa ascorbato como donador de electrones para la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a agua (Asada, 1992). APX tiene una mayor afinidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (rango  $\mu\text{M}$ ) que CAT y peroxidasas (rango mM). Se ha sugerido que la sobreproducción de APX incrementa la actividad peroxidasa, reforzando el sistema de desintoxicación

de EROs y provocando tolerancia a estrés oxidativo (Sarowar et al., 2005). La sobreexpresión de APX en plantas transgénicas otorga tolerancia al estrés abiótico (Yan et al., 2003; Xu et al., 2008).

### **1.7 POSIBLES MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINCLORAC**

A lo largo de los últimos 30 años se han realizado diversos trabajos relacionadas a quinclorac. Sin embargo, todavía existen dudas sobre cuál es el mecanismo y el sitio de acción del herbicida (Fig.5). En monocotiledóneas, varios estudios apuntan a que la causa principal de la toxicidad de quinclorac es la activación de la enzima ACC sintasa, y el aumento de la síntesis de etileno y cianuro (Grossmann y Kwiatkoswki, 1995; López-Martínez et al., 1998; Abdallah et al., 2006; Yasuor et al., 2012). También se ha discutido sobre la posible inhibición de la biosíntesis de la pared celular (Koo et al., 1996; Koo et al., 1997), como también el daño oxidativo provocado por EROs (Sunohara y Matsumoto, 2008; Sunohara et al., 2011). En dicotiledóneas hay evidencias claras que apuntan a una actividad tipo auxina, provocando la biosíntesis de etileno, ABA y EROs (Hansen y Grossmann, 2000; Van Eerd et al., 2005; Grossmann, 2010). Debido a la diversidad y complejidad de las respuestas descritas existen varios mecanismos de resistencia posibles. Desde absorción, traslocación y metabolismo diferencial, alteración en la vía de transducción de señales auxínica (transporte, modificación en receptores auxínicos, metabolismo), hasta aumento en la actividad de enzimas capaces de eliminar el exceso de EROs y HCN. La teoría basada en una alteración en la transducción de señales auxínica, que provocaría una síntesis disminuida de etileno, cianuro y ABA, ha sido propuesta por varios autores (Grossmann, 2000; Abdallah et al., 2006; Grossmann, 2010; Yasuor et al., 2012). En este caso, la actividad de la enzima ACC sintasa, la cantidad acumulada de ACC, etileno y HCN se verían disminuidas en los biotipos resistentes con respecto a los biotipos sensibles. Si bien no se ha estudiado en profundidad la transducción de señales provocada por quinclorac, se demostró

que quinclorac puede unirse al receptor auxínico específico AFB5 en *A. thaliana* (Lee et al., 2014), por lo tanto una mutación en este receptor podría provocar resistencia, como ocurre en otros herbicidas auxínicos (Walsh, et al., 2006; Gleason et al., 2011). Se ha propuesto como mecanismo secundario de resistencia la diferencia en la actividad basal de la enzima  $\beta$ CAS. Esta enzima, capaz de eliminar excesos de cianuro, tendría una actividad varias veces superior en biotipos resistentes con respecto a los susceptibles (Abdallah et al., 2006; Yasuor et al., 2012). Sumado al hecho de que los biotipos resistentes producirían menos cianuro, una capacidad aumentada de desintoxicarlo, sería la explicación de la respuesta diferencial a quinclorac. También se ha propuesto que la resistencia a quinclorac estaría basada en un aumento de la capacidad antioxidante de los biotipos resistentes (Sunohara y Matsumoto, 2004). En este caso una actividad basal superior o la capacidad de síntesis *de novo* de enzimas antioxidantes sería la causa entre los biotipos sensibles y resistentes. En un estudio reciente realizado por Li et al. (2016), se describió por primera vez un gen *GH3* en capín. Luego de realizar un análisis de expresión, se detectaron diferencias de expresión entre un biotipo sensible y uno resistente luego de la aplicación de quinclorac, siendo superior la expresión en el biotipo resistente. Si bien no se conoce si quinclorac es sustrato para la enzima GH3, podría ser un indicio sobre un mecanismo de resistencia relacionado con metabolismo diferencial.



**Figura 5.** Hipótesis considerada actualmente sobre el mecanismo de acción de Quinlorac.

## **1.8 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **1.8.1 Hipótesis**

- a) Los biotipos resistentes producen menos etileno y cianuro que los biotipos sensibles.
- b) Los biotipos resistentes poseen una mayor actividad basal de la enzima  $\beta$ CAS.
- c) Los biotipos resistentes tienen una mayor capacidad de defensa antioxidante que los biotipos sensibles.

### **1.8.2 Objetivo general**

Contribuir al conocimiento de los mecanismos de resistencia a quinclorac de biotipos de capín aislados en chacras de Uruguay.

### **1.8.3 Objetivos específicos**

Para los biotipos contrastantes en la respuesta a quinclorac:

- a) Determinar qué relación existe entre la producción de etileno y la resistencia a quinclorac.
- b) Evaluar la capacidad de desintoxicación de cianuro
- c) Analizar si el estrés oxidativo y las defensas antioxidantes están involucradas en la respuesta a quinclorac.

## **2. LA INDUCCIÓN LIMITADA DE LA SÍNTESIS DE ETILENO Y CIANURO ESTARÍAN INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA A QUINCLORAC EN UN BIOTIPO DE CAPÍN ENCONTRADO EN URUGUAY<sup>b</sup>**

Diez Vignola, Manuel<sup>1</sup>; Saldain, Nestor<sup>2</sup>; Marchesi, Claudia<sup>3</sup>; Bonnacarrère, Victoria<sup>4</sup>; Diaz Gadea, Pedro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Av. Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>INIA Treinta y Tres, Ruta 8, Km 282, Treinta y Tres, Uruguay

<sup>3</sup>INIA Tacuarembó, Ruta 5, Km 386, Tacuarembó, Uruguay

<sup>4</sup>INIA Las Brujas, Ruta 48, Km 10, Canelones, Uruguay

### **2.1 RESUMEN**

El capín (*Echinochloa crus galli*) es una maleza importante asociada al cultivo de arroz. Su control es una de las principales preocupaciones de productores e investigadores. El herbicida quinclorac, una auxina sintética, se ha usado eficientemente para controlar esta maleza. Sin embargo, se ha reportado la ocurrencia de varios biotipos resistentes a quinclorac en la cuenca de la Laguna Merín. El Factor de resistencia de estos biotipos estuvo dentro del rango de 38-52, siendo el de valor más alto el biotipo E7(R). Utilizando este biotipo como resistente y el biotipo A33P2(S) como susceptible, se estudió su respuesta a quinclorac. Quinclorac indujo la síntesis de etileno y cianuro únicamente en el biotipo-S. Ambos biotipos respondieron igual frente a la aplicación de dosis crecientes de ACC y KCN, y su crecimiento fue inhibido fuertemente en dosis altas. Se evaluó la actividad  $\beta$ CAS en ambos biotipos, sin observarse diferencias significativas en su actividad basal. Quinclorac indujo significativamente la actividad  $\beta$ CAS en el biotipo-S, concomitantemente con el aumento de la síntesis de etileno y cianuro. Se evaluaron parámetros bioquímicos y fisiológicos asociados al estrés oxidativo. Quinclorac provocó peroxidación lipídica y aumento de la actividad de enzimas

<sup>b</sup> Artículo a publicar en: Agrociencia Uruguay

antioxidantes únicamente en el biotipo-S. Basados en estos resultados, podemos decir que la resistencia a quinclorac en el biotipo-R podría estar relacionada a una insensibilidad en la activación de la vía de transducción de señales de auxinas, reduciéndose la producción de etileno y cianuro. La actividad  $\beta$ CAS y las defensas antioxidantes no estarían involucrados en la resistencia a quinclorac.

## 2.2 SUMMARY

### **THE LIMITED INDUCTION OF ETHYLENE AND CYANIDE SYNTHESIS WOULD BE INVOLVED IN THE RESISTANCE TO QUINCLORAC IN A BARNYARD GRASS BIOTYPE FOUND IN URUGUAY**

Barnyard grass (*Echinochloa crus galli*) is an important weed associated with rice cultivation. Its control is one of the main concerns of producers and researchers. The herbicide quinclorac, a synthetic auxin, has been used effectively for more than two decades to control this weed. However, the occurrence of several quinclorac resistant biotypes has been reported in the Laguna Merín basin. The resistance factor of these biotypes was within the range of 38-52, with the highest value being the E7 (R) biotype. Using this biotype as resistant and the biotype A33P2 (S) as susceptible, their response to quinclorac was studied. Quinclorac induced the synthesis of ethylene and cyanide only in the S-biotype. Both biotypes responded equally to the application of increasing doses of ACC and KCN and their growth was strongly inhibited with high doses. The  $\beta$ CAS activity was evaluated in both biotypes, and no significant difference was observed in the basal activity. Quinclorac significantly induced  $\beta$ CAS activity in the S-biotype, concomitantly with the increased synthesis of ethylene and cyanide. Also, biochemical and physiological parameters associated with oxidative stress were evaluated. Quinclorac caused lipid peroxidation and increased the activity of antioxidant enzymes only in the S-biotype. Based on the

results, the resistance to quinclorac in the R-biotype could be related to an insensitivity in the activation of the auxin signal transduction pathway, reducing the production of ethylene and cyanide.  $\beta$ CAS activity and antioxidant defenses would not be involved in the resistance to quinclorac.

### 2.3 INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los principales cultivos comerciales en Uruguay. La interferencia causada por malezas es una importante limitante para alcanzar niveles altos de productividad (Oerke, 2006). El capín (*Echinochloa crus-galli*) es una de las malezas más perjudiciales en la agricultura moderna (Leeson et al., 2005). Diferentes herbicidas con distintos modos de acción han sido usados exitosamente para controlar al capín. Sin embargo, se han detectado varios biotipos resistentes a quinclorac (López-Martínez, Marshall y De Prado, 1997; Concenço, Silva y Ferreira, 2009; Saldain y Sosa, 2012).

Quinclorac es un herbicida auxínico de alta selectividad utilizado para controlar malezas herbáceas y de hoja ancha en cultivos de arroz (Grossmann y Kwiatkowski, 2000). Aunque todavía no existe un conocimiento completo del modo y sitio de acción de este herbicida, se sabe que induce la síntesis *de novo* de la enzima 1-ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) sintasa (EC 4.4.1.14) en la raíz, resultando en el incremento de ACC en especies susceptibles (Grossmann, 1998). El exceso de ACC es traslocado hacia la parte aérea donde es convertido a etileno y cianuro de hidrógeno (HCN) por la enzima ACC oxidasa (EC 1.14.17.4; ACO). Este proceso se auto-amplifica ya que ACC y HCN inducen la actividad de ACC sintasa en la parte aérea.

El mecanismo principal de desintoxicación de HCN en las plantas es la actividad de la enzima  $\beta$ -cianoalanina sintasa ( $\beta$ CAS; EC 4.4.1.9). Esta enzima, exclusivamente mitocondrial, es dependiente de piridoxal fosfato y cataliza la reacción de formación de  $\beta$ -cianoalanina a partir de HCN y cisteína (Blumenthal, Hendrickson y Conn, 1968).

Si bien se cree que la principal causa de los efectos citotóxicos de quinclorac en monocotiledóneas está relacionada con la acumulación de cianuro, es posible que provoque daño oxidativo, evidenciado por la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y la consecuente peroxidación lipídica y clorosis (Sunohara y Shinjiro, 2010).

Debido a la diversidad y complejidad de las respuestas descritas, existen varios mecanismos de resistencia posibles. Desde absorción, traslocación y metabolismo diferencial, alteración en la vía de transducción de señales auxínica, hasta aumento en la actividad de enzimas capaces de eliminar el exceso de EROs y HCN. Si bien una absorción y traslocación diferencial pueden provocar resistencia a herbicidas en varias especies, no se han hallado evidencias que muestren una influencia de estas características en la resistencia a quinclorac en los biotipos de capín comunicados en estudios anteriores (López-Martínez, Marshall y De Prado, 1997; Grossmann y Kwiatkowski, 2000; Lovelace et al., 2007). Otro factor que puede determinar la resistencia a herbicidas es el metabolismo diferencial. En general, el metabolismo de quinclorac en monocotiledóneas es bajo y no parece influir en la resistencia (Lovelace et al., 2007).

La teoría basada en una alteración en la transducción de señales auxínica, que provocaría una síntesis disminuida de etileno, cianuro y ABA, ha sido propuesta por varios autores (Grossmann, 2000; Abdallah et al., 2006; Grossmann, 2009; Yasuor et al., 2012). En este caso, la actividad de la enzima ACC sintasa, la acumulación de ACC, etileno y HCN se verían disminuidas en los biotipos resistentes con respecto a los biotipos sensibles.

Se ha propuesto como mecanismo secundario de resistencia una diferencia en la actividad basal de la enzima  $\beta$ CAS. Esta enzima, capaz de eliminar el exceso de cianuro, tendría una actividad varias veces superior en biotipos resistentes con respecto a los susceptibles (Abdallah et al., 2006; Yasuor et al., 2012). Sumado al hecho de que los biotipos resistentes producirían menos cianuro, una capacidad

aumentada de desintoxicarlo, sería la explicación de la respuesta diferencial a quinclorac. También se ha propuesto que la resistencia al herbicida estaría basada en un aumento de la capacidad antioxidante de los biotipos resistentes (Sunohara y Matsumoto, 2004). En este caso, una actividad basal superior o la capacidad de síntesis *de novo* de enzimas antioxidantes sería la causa de la respuesta diferencial entre los biotipos sensibles y resistentes.

El objetivo principal de este trabajo fue comparar la inducción de la síntesis de etileno y cianuro por parte del quinclorac y la actividad de la enzima  $\beta$ CAS en biotipos de capín susceptibles y resistentes a quinclorac. Además, se estudió la contribución del estrés oxidativo en la respuesta a quinclorac.

## **2.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.4.1 Material vegetal**

Se utilizaron semillas de capín suministradas por INIA Treinta y Tres. Para la evaluación primaria se utilizaron tres biotipos sensibles a quinclorac: 33P2, Srg44 y Cebo41 y tres biotipos con sospecha de resistencia: Zapata1, E7 y CAS282. En base a los resultados de ensayos dosis respuesta, se utilizaron para los ensayos fisiológicos y bioquímicos los biotipos 33P2 y E7.

### **2.4.2 Herbicida**

Se utilizó un estándar analítico de quinclorac 95%, suministrado por la empresa Cibeles. Para realizar las soluciones de trabajo se diluyó la cantidad necesaria de quinclorac en una mezcla 1:10 dimetilsulfóxido/metanol.

### **2.4.3 Crecimiento de plantas**

#### **2.4.3.1 Escarificación de semillas**

Las semillas fueron escarificadas con ácido sulfúrico 18 M. Después de 8 minutos de incubación se retiró el ácido y se realizaron tres lavados consecutivos con agua estéril a 4 °C.

#### **2.4.3.2 Germinación**

Las semillas escarificadas se colocaron en placas de Petri con agar 1% (p/v) y se colocaron en cámara de crecimiento con fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad) y 30/25 °C por 2-3 días hasta obtener plántulas de 5 mm de longitud.

#### **2.4.3.3 Crecimiento en placas de Petri**

El crecimiento de las plántulas se realizó en placas de Petri (5 plántulas por placas) conteniendo 100 mL de solución nutritiva Hornum (Handberg y Stougaard, 1992) con agar 1% (p/v) y el volumen necesario de quinclorac, HCN, ACC para conseguir la concentración deseada. Las placas se incubaron en cámara de crecimiento con las condiciones descritas en 2.4.3.2 por 7 días. Pasado ese tiempo, se realizó un registro fotográfico.

#### **2.4.3.4 Crecimiento en macetas**

Las plántulas se sembraron en macetas de 300 cm<sup>3</sup> a razón de 5 plántulas por maceta. Como sustrato se utilizó una mezcla de arena-vermiculita (1:1). Las macetas se colocaron en cámara de crecimiento con las condiciones descritas en 2.4.3.2. Para el riego se utilizó solución Hornum descrita anteriormente.

#### **2.4.3.5 Crecimiento en hidroponia**

Para determinar la producción de etileno se utilizaron dispositivos de hidroponia. Se construyeron flotadores de espuma aislante y se realizaron doce perforaciones en cada flotador para permitir el posicionamiento de las plántulas. Para mantener un grado inicial de esterilidad alto, la siembra se realizó en una cámara de flujo laminar. Las plántulas se colocaron en frascos estériles de 1,05 L

de capacidad conteniendo 450 mL de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). Los frascos se colocaron en cámara de crecimiento con las condiciones descritas en 2.4.3.2 hasta el estadio de 2-3 hojas.

#### **2.4.4 Ensayos dosis-respuesta**

Se realizaron ensayos dosis-respuesta para cuantificar el grado de resistencia de los biotipos Zapata1, CASBR282 y E7. Se utilizó el biotipo A33P2 como control susceptible.

##### **2.4.4.1 Ensayos en planta entera**

Los experimentos se realizaron en macetas (según 2.4.3.4) utilizando un diseño completamente aleatorio con cuatro repeticiones por dosis. En el estadio de 2-3 hojas, se aplicó quinclorac y tres semanas después se removió el follaje de las plantas a la altura del suelo, determinándose el peso fresco y seco. El efecto de cada dosis se calculó como el porcentaje del peso fresco obtenido con respecto al peso fresco del control sin herbicida.

##### **2.4.4.2 Ensayos en placa de Petri**

Las plántulas se transfirieron a placas de Petri con 100 mL de solución Hornum, agar 1% (p/v) y el volumen necesario de un *stock* de quinclorac 50 mM para conseguir la concentración adecuada, a razón de 5 plántulas por placa. Se utilizaron dosis crecientes de quinclorac más un testigo sin herbicida. A los 7 días, se realizó un registro fotográfico de cada grupo. Se utilizaron dos repeticiones por tratamiento y el experimento se realizó dos veces. Se midió la longitud final de la parte aérea y radicular con el software Image Pro-Plus.

##### **2.4.4.3 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo de regresión no lineal de cuatro parámetros utilizando el programa estadístico R (Knezevic, Streibig y Ritz 2007; R development core team, 2010; Ritz, 2010; Ritz et al., 2015).

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

Donde **d** representa el límite superior, **c** representa el límite inferior, **b** representa la pendiente alrededor del punto de inflexión y **e** es la dosis de herbicida que produce una reducción en la respuesta de un 50% (GR<sub>50</sub>).

#### **2.4.5 Determinación de la producción de etileno y cianuro**

Se determinó el efecto de la adición de quinclorac en la producción de etileno utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 Plus equipado con un detector de ionización de llama. La concentración de etileno se expresó como los nmoles producidos por mg de peso fresco.

La extracción de cianuro fue realizada según Abdallah et al. (2006). El cianuro extraído fue cuantificado por el método de Lambert (Lambert, Ramasamy y Paukstelis, 1975) con modificaciones de Yip y Yang (1988).

#### **2.4.6 Determinación de la actividad βCAS**

La cuantificación de la actividad βCAS se realizó por el método del azul de metileno, según Liang y Li (2001), con modificaciones de Yasuor et al. (2012).

#### **2.4.7 Determinación de la actividad βCAS en gel**

La electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturizantes se realizó en geles de poliacrilamida, según Sambrook et al., 1989. La determinación de la actividad βCAS en gel se realizó según Maruyama et al.(1998).

#### **2.4.8 Determinación de TBARS, proteínas y clorofilas**

Los lípidos peroxidados se determinaron a través de las sustancia reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), según Minotti y Aust (1987). La cuantificación de clorofilas se realizó según Wellburn (1994). Las proteínas se determinaron según Bradford (1976).

#### **2.4.9 Actividad de enzimas antioxidantes: SOD, CAT y APX**

La determinación de la actividad de las enzimas CAT, SOD y APX se realizó según Beers y Sizer (1952), Dhindsa y Matowe (1981) y Chen y Asada (1989), respectivamente.

### **2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El surgimiento de varios biotipos de capín resistente a quinclorac en Uruguay ha puesto en duda la eficacia de este herbicida y la continuidad de su uso. Quinclorac es uno de los tres herbicidas principales en el control integrado de malezas asociados al arroz. Por tanto, no contar con este herbicida significaría la pérdida de una herramienta importante para el control del capín. Teniendo en cuenta esta situación, se iniciaron estudios para caracterizar biotipos con sospecha de resistencia. Inicialmente se realizaron ensayos dosis respuesta para determinar el grado de resistencia de estos biotipos, utilizando un biotipo susceptible como control. Se determinó la relación entre la producción de etileno/cianuro y la resistencia a quinclorac, investigándose también la capacidad de los biotipos de desintoxicar el cianuro. Finalmente se estudió la participación de las defensas antioxidantes en la resistencia a quinclorac.

#### **2.5.1 Caracterización de la resistencia a quinclorac**

Los ensayos dosis respuesta realizados en planta entera y en placa de Petri mostraron que los biotipos E7, Zapata1 y CASBR282 son resistentes a quinclorac (Tabla 1).

**Tabla 1.** Dosis de quinclorac requerida para reducir un 50% el crecimiento ( $GR_{50}$ ) y el factor de resistencia  $GR_{50R}/GR_{50S}$ . A) Ensayo en planta entera, utilizando como parámetro de crecimiento el peso fresco de la parte aérea. B) Ensayo en placa de Petri, utilizando como parámetro, la longitud de la parte radicular.

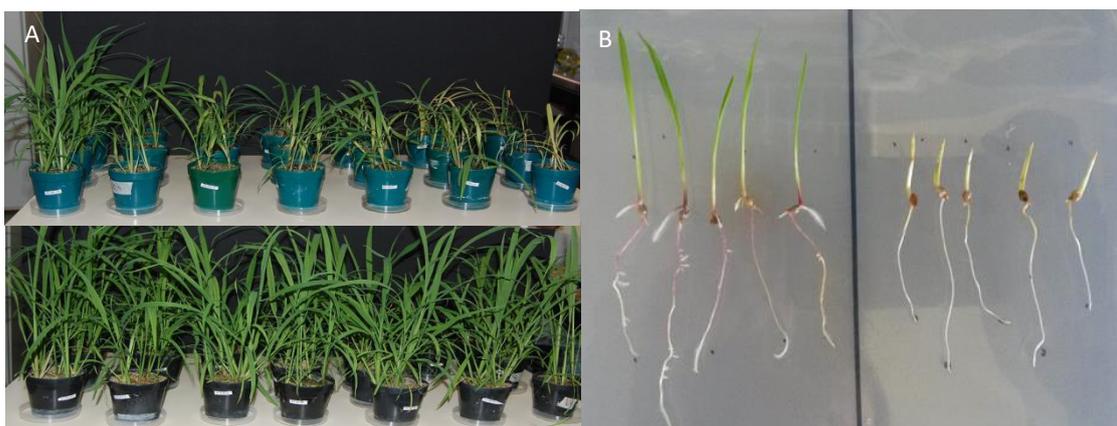
A	Biotipo	$GR_{50}$ ( $\mu M$ )	$GR_{50R}/GR_{50S}$
	A33P2	4,23 $\pm$ 0,55	NC
	Zapata 1	80>	--
	E7	80>	--
	CASRB282	80>	--

B	Biotipo	$GR_{50}$ ( $\mu M$ )	$GR_{50R}/GR_{50S}$
	<b>A33P2</b>	1,07 $\pm$ 0,18	NC
	Zapata 1	40,8 $\pm$ 13,7	38,1
	<b>E7</b>	56,5 $\pm$ 12,2	52,8
	CASRB282	38,7 $\pm$ 10,2	36,1

En los ensayos realizados en planta entera la dosis requerida para reducir el crecimiento de la parte aérea en un 50% ( $GR_{50}$ ) para el biotipo 33P2 fue 4,3  $\mu M$ , mientras que en los biotipos declarados resistentes no se pudo calcular, debido a la insignificante reducción en el crecimiento de la parte aérea provocada por el herbicida, estimándose en un valor mayor a 80  $\mu M$  (Fig. 1A). En los ensayos realizados en placa de Petri (Fig. 1B) se estudiaron diversos factores de crecimiento (peso fresco, peso seco, longitud de parte aérea, longitud de parte radicular), siendo la longitud radicular la más indicada para obtener una relación de resistencia entre los biotipos resistentes y el susceptible. Los resultados obtenidos en los otros parámetros no fueron satisfactorios para realizar el ajuste no lineal. Como ocurrió en el caso del ensayo en planta entera, las medidas de la

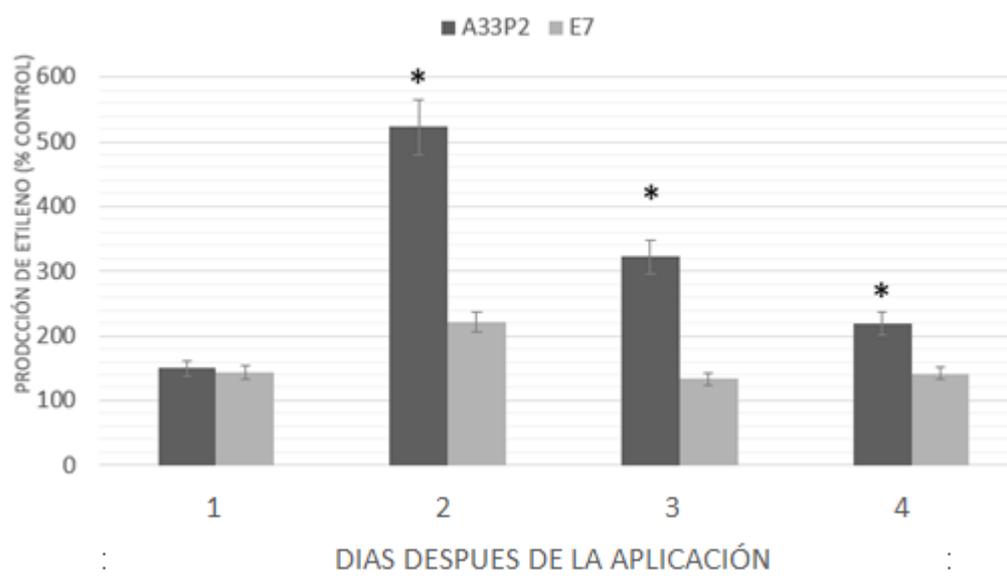
disminución del crecimiento de la parte aérea en el biotipo resistente no fueron adecuadas para ser incluidos en el ajuste no lineal, que permitía determinar la dosis de herbicida en la cual el crecimiento se reduce a la mitad. En el caso del peso fresco y peso seco de la plántula, la variabilidad obtenida en los resultados fue muy alta, por lo que no se pudo realizar un ajuste aceptable al modelo no lineal. El  $GR_{50}$  para el biotipo 33P2 fue de 1,1  $\mu\text{M}$ , mientras que para los biotipos E7, Zapata1 y CASBR282 fueron 38.7  $\mu\text{M}$ , 40.8  $\mu\text{M}$  y 50.6  $\mu\text{M}$  respectivamente. El factor de resistencia obtenido para estos biotipos ( $GR_{50R}/GR_{50S}$ ) se encontró entre los valores de 35 a 46 (Tabla 1B). El resultado obtenido utilizando éste método rápido es comparable a los obtenidos con metodologías más complejas, que utilizan condiciones de crecimiento similares a las reales (aplicación por aspersión, inundación del terreno post aplicación) (Saldain y Sosa, 2012). El desarrollo de métodos rápidos para la detección de malezas resistentes a herbicidas es importante ya que permite el manejo en condiciones controladas reduciendo el espacio, tiempo y costo en comparación a los ensayos tradicionales en invernaderos (Koger et al., 2005).



**Figura 1.** Ensayos dosis-respuesta. A) Ensayo en maceta utilizando concentraciones crecientes de quinclorac (0 - 80 $\mu\text{M}$ ): arriba; biotipo A33P2, abajo biotipo E7. B) Ensayo en placa de Petri utilizando quinclorac 40 $\mu\text{M}$ , derecha; biotipo E7, izquierda; biotipo A33P2.

### 2.5.2 Producción de etileno y HCN en los biotipos A33P2 y E7

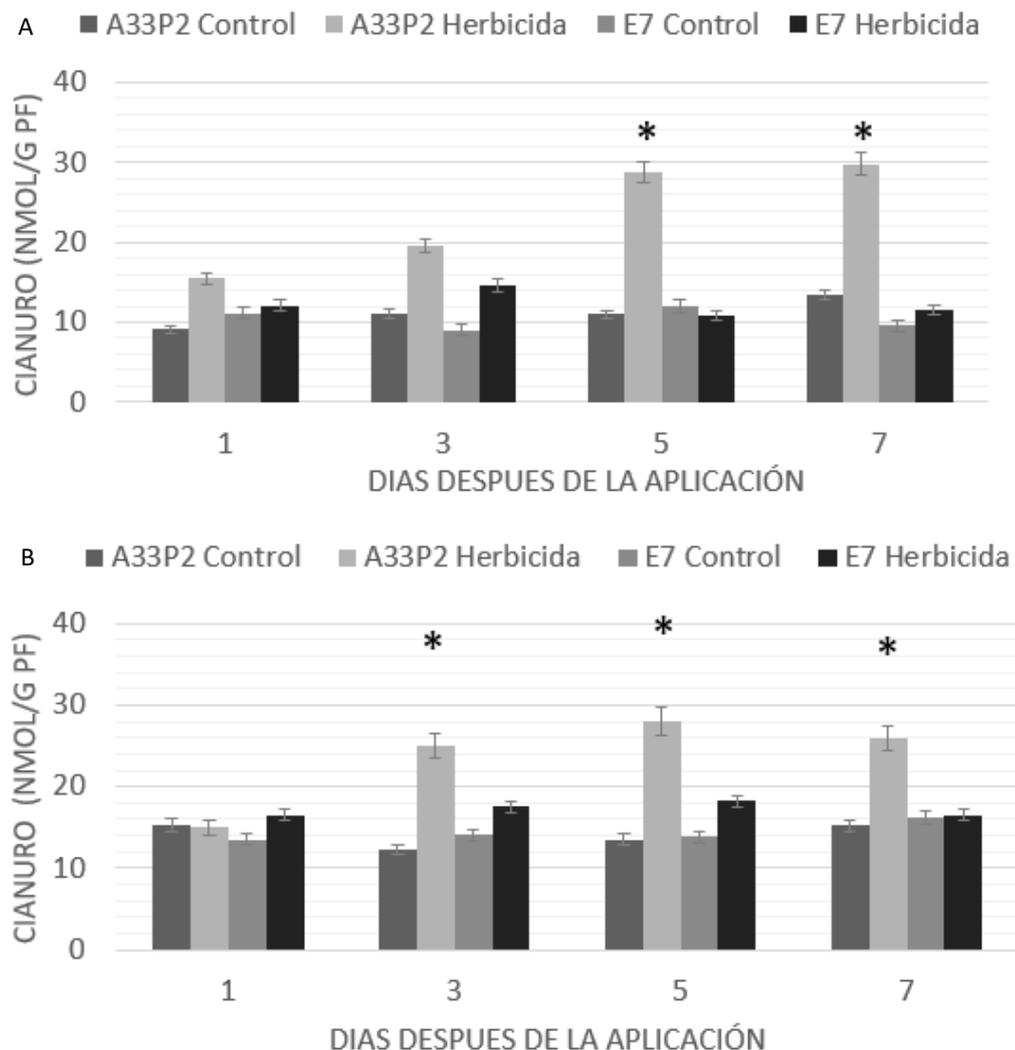
La acción principal de quinclorac en especies sensibles involucra la inducción de la enzima ACC sintasa, la estimulación de la producción de etileno y cianuro (Grossmann, 2010). Estudios utilizando el inhibidor de la enzima ACC sintasa, aminoetoxivinilglicina (AVG) demostraron la relación entre la producción de etileno y la fitotoxicidad de quinclorac (López-Martínez, Shimabukuro y De Prado, 1998; Abdallah et al. 2006). En los ensayos realizados en este trabajo, se detectó que la producción de etileno en el biotipo sensible A33P2, aumentó a los dos días luego de la aplicación de quinclorac, obteniéndose una producción de 500% con respecto al control. En los días siguientes la producción de etileno comenzó a descender llegando a valores de 300% y 200% con respecto al control, debido a un decaimiento general de la planta (Fig.2). En cambio, en el biotipo E7 se detectó una leve acumulación, siendo posteriormente los valores de producción de etileno luego de la aplicación de quinclorac, muy cercanos al control.



**Figura 2.** Producción de etileno en planta entera de biotipos A33P2 y E7 luego de la aplicación de quinclorac, concentración final 10 $\mu$ M. Los datos se expresaron como porcentaje con respecto al promedio de los controles. Las barras verticales representan los errores estándar del promedio de las mediciones. Los \* indican Este pico de diferencias significativas ( $p > 0,01$ ). 100% = 0,05 nmol/g Pf

Además de la hidrólisis de glicósidos cianogénicos, la oxidación de ACC por parte de la enzima ACC oxidasa para producir etileno resulta en la producción de HCN como subproducto (Machingura et. al 2013). Este proceso es la principal fuente de HCN en los tejidos de varias plantas (Goudey et al. 1989).

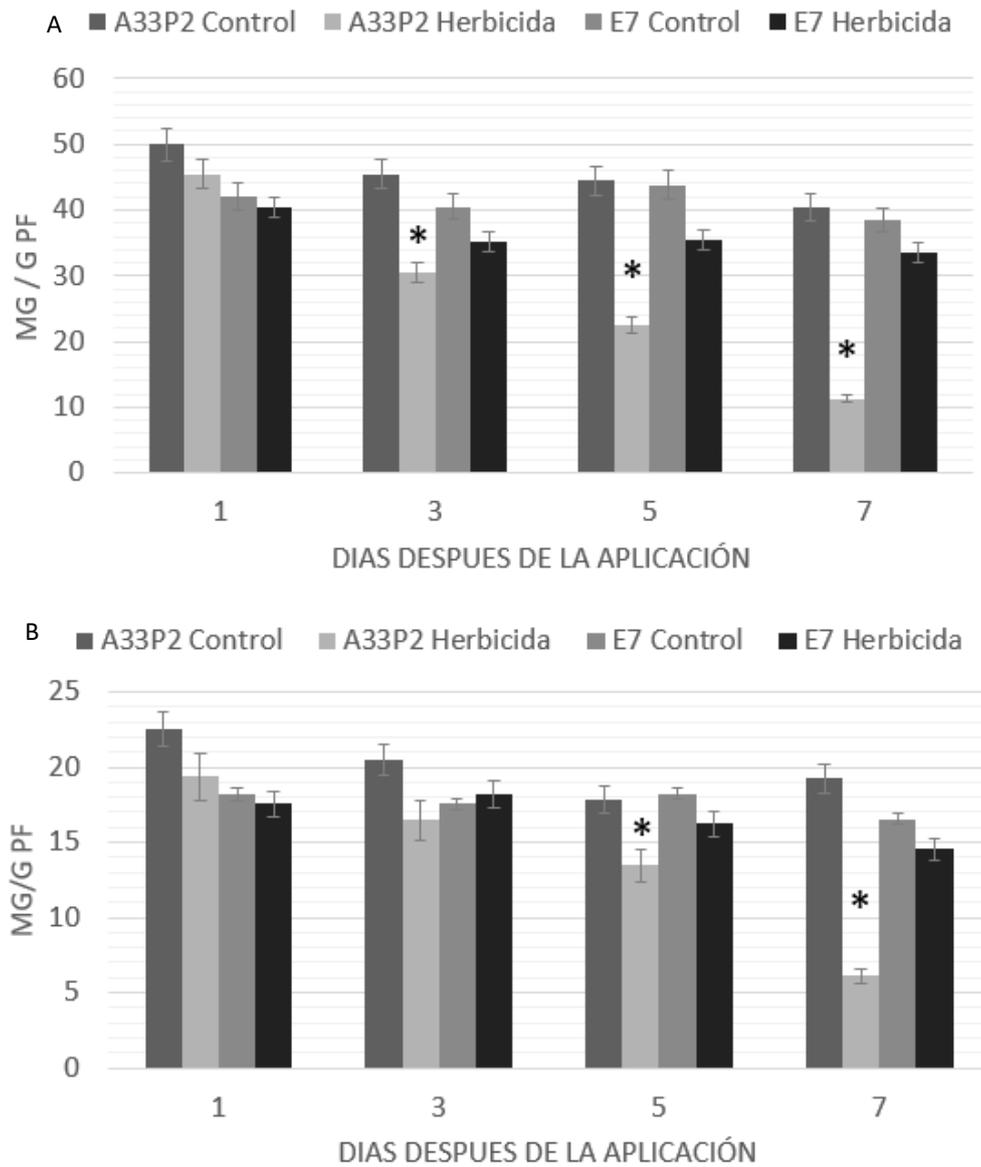
En el biotipo A33P2 se detectó un aumento en el contenido de HCN en la parte aérea y radicular a partir del tercer día luego de la aplicación de quinclorac, en cambio en el biotipo E7, solo se observó un leve incremento (Fig. 3).



**Figura 3.** Acumulación de HCN en los biotipos A33P2 y E7 luego de la aplicación de quinclorac. A) parte aérea; B) parte radicular. Las barras verticales representan los errores estándar del promedio de las mediciones. Los \* indican diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

Estos resultados coinciden con otros estudios sobre especies resistentes a quinclorac, donde no se hallaron cambios importantes en la actividad de la enzima ACC sintasa, la producción de etileno y acumulación de HCN luego de la aplicación de quinclorac (López-Martínez, Marshall y De Prado, 1997; Grossmann, 2000; Abdallah et al, 2006; Yasuor et al. 2012). Quinclorac induce la actividad de la enzima ACC sintasa en las raíces de especies sensibles como el capín (Grossmann, 1995; Grossmann 1997). Posiblemente, el ACC acumulado es transportado acrópetamente hacia los tallos, donde actúa como señal, estimulando a ACC sintasa y provocando finalmente la liberación de etileno y HCN. Debido a que el etileno es una molécula gaseosa, puede difundir fácilmente entre las distintas células, provocando respuestas locales, mientras que la presencia de aerénquima permiten el transporte de etileno hacia distintos órganos (Van de Poel y Van Der Staeten, 2014). En situaciones de estrés (hídrico, mecánico), es posible el transporte de ACC desde las raíces hacia la parte aérea (McManus, 2012), siendo posible también el transporte intercelular entre células de un mismo tejido. En raíces de tomate expuestas a estrés mecánico o por anegamiento, se produce ACC en exceso, una parte es convertida a etileno, mientras que otra fracción no se convierte a etileno por falta de oxígeno (sustrato de la enzima ACO). El exceso de ACC generado en las raíces se transporta a la parte aérea a través de xilema (Bradford y Yang, 1980). Cuando llega a la parte aérea, se convierte en etileno y HCN por la acción de ACO presente en las hojas (English et al., 1995). Una situación similar podría estar ocurriendo en las raíces de capín. Siendo la acción principal de quinclorac sobre el tejido de la raíz, los efectos se observan con el aumento de los niveles de ACC, HCN en el tejido de la parte aérea (Grossmann, 1997; Grossmann y Scheltrup, 1997). Por lo tanto la parte aérea de plantas de capín tratadas con quinclorac serían más susceptibles al daño que el tejido de la raíz (Grossmann y Kwiatkowski, 1993). Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, donde el daño y el decaimiento tisular fue más evidente en el tejido foliar. El efecto principal de quinclorac en el tejido de las raíces fue supresión del

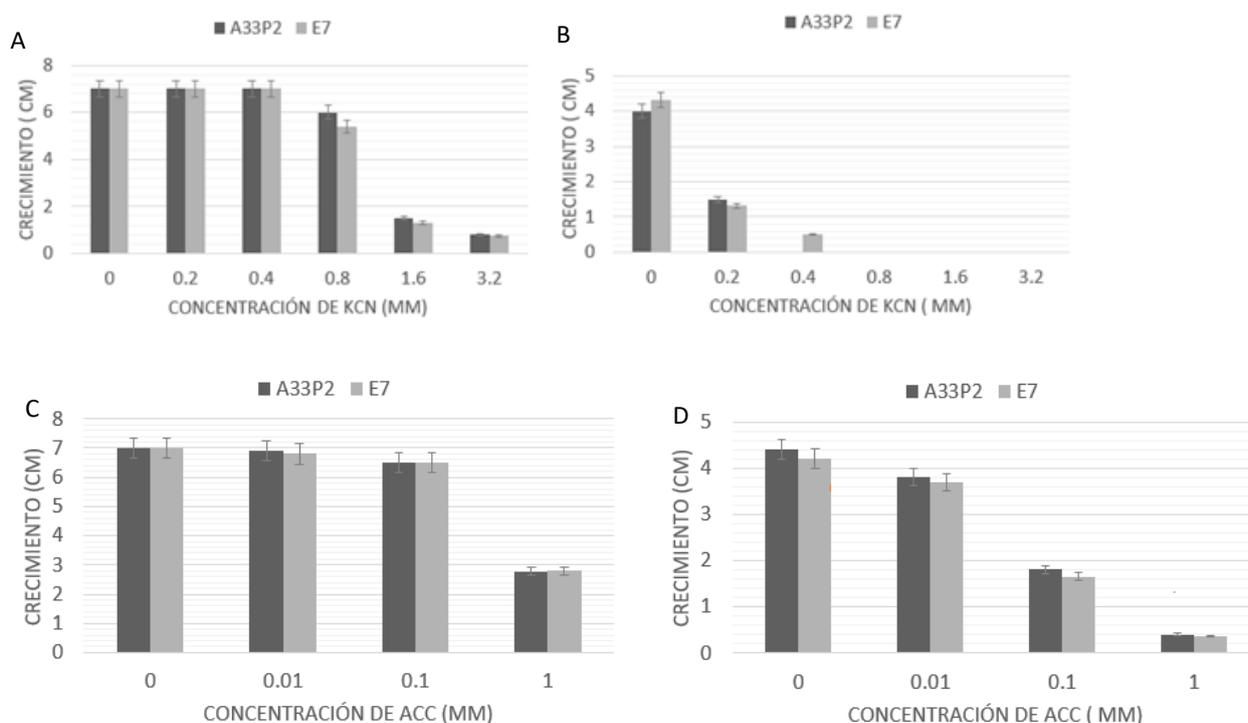
crecimiento, sin embargo, no se evidenciaron daños visuales evidentes; en cambio en la parte aérea se detectaron zonas amarillentas, con pérdida de clorofila y reducción del crecimiento (Fig 1B, Fig 4).



**Figura 4.** Concentración de clorofila *a* (A) y clorofila *b* (B) en la parte aérea de los biotipos A33P2 y E7 luego de la aplicación de quinclorac (10  $\mu$ M). Las barras verticales representan los errores estándar del promedio de las mediciones. Los \* indican diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

### 2.5.3 Efecto de ACC y KCN en el crecimiento de raíz y parte aérea

La fitotoxicidad de quinclorac en varias especies herbáceas ha sido atribuida a la acumulación de cianuro, dependiente de la acumulación de ACC (Grossmann y Kwiatkowski, 1995; Abdallah et al., 2006). Se evaluó el efecto de la aplicación de ACC y KCN en el crecimiento radicular y parte aérea, para investigar la relación entre la producción de etileno y cianuro con su citotoxicidad en los biotipos A33P2 y E7. El agregado de ACC y KCN en el medio de crecimiento en ensayos en placa redujo significativamente el crecimiento de la parte aérea y radicular de los biotipos A33P2 y E7 (Fig.5), siendo esta reducción de igual magnitud en ambos biotipos. Como ocurrió en los ensayos con quinclorac, el ACC y KCN provocaron una mayor reducción del crecimiento en el tejido radicular, pero sin provocar muerte celular o necrosis, en cambio en el tejido de la parte aérea se detectó una pérdida de clorofila y áreas necróticas en las concentraciones más elevadas (datos no mostrados).



**Figura 5.** Efecto de la adición de ACC y KCN al medio de crecimiento de plántulas de los biotipos A33P2 y E7: A y C, en parte aérea; B y D, en parte radicular. Las barras verticales representan los errores estándar del promedio de las mediciones.

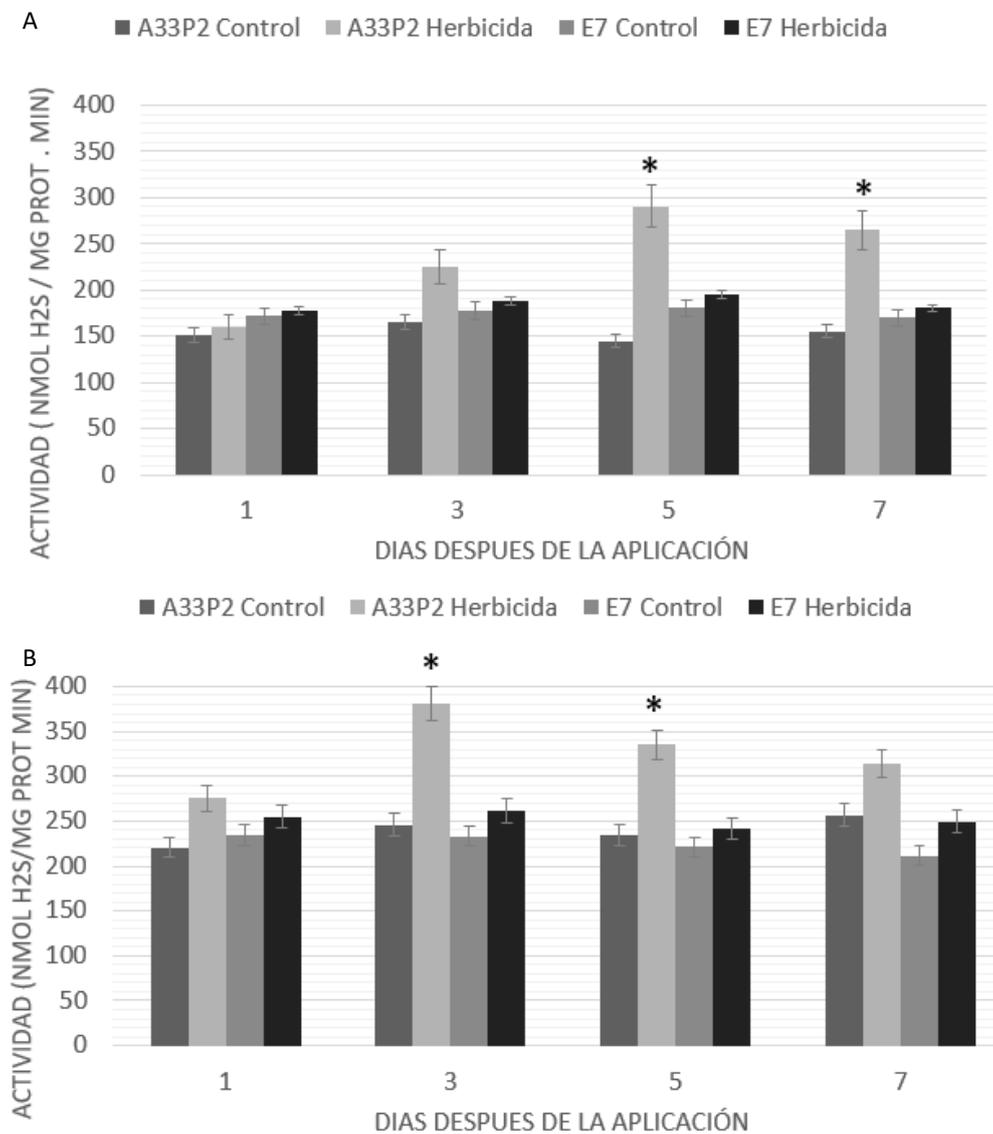
Un aumento de la concentración de ACC en el medio de crecimiento sería comparable con las etapas iniciales de una respuesta a quinclorac, en este caso la concentración de ACC en los tejidos de la raíz se vería incrementado, permitiendo su translocación hasta la parte aérea, para su conversión en etileno y HCN. Una adición de KCN en el medio de cultivo sería comparable a etapas tardías de la respuesta a quinclorac, ambos biotipos tuvieron el mismo nivel de crecimiento frente a concentraciones elevadas de KCN, estos resultados indicarían que el mecanismo de desintoxicación diferencial que se está proponiendo no parece ser el que funciona dentro de la planta, y es posible que la resistencia observada en el biotipo E7 pudiera estar provocada por una disminución en la activación de la vía de percepción-transducción de señales de auxinas, causando una baja estimulación de ACC sintasa y síntesis de etileno (Abdalah et al., 2006 ; Yasuor et al., 2012).

#### **2.5.4 Acumulación de HCN y su desintoxicación**

HCN es un agente citotóxico que inhibe diversas enzimas involucradas en diferentes procesos metabólicos (Miller y Conn, 1980). Las plantas han desarrollado mecanismos para metabolizar el HCN producido, previniendo la acumulación en niveles citotóxicos (Grossmann, 1996). El mecanismo clave para desintoxicar el HCN endógeno es la actividad de la enzima mitocondrial  $\beta$ CAS, que cataliza la conjugación entre HCN y cisteína para formar sulfuro de hidrógeno y  $\beta$ -cianoalanina (Gupta, Balomajumder y Agarwal, 2010), esta última es posteriormente metabolizada a asparagina (Goudey, Tittle y Spencer, 1989).

En estudios realizados en *A. thaliana* (Machingura y Ebbs, 2014), *N.tabaccum* (Liang y Li, 2001), *X.pennsylvanicum* (Maruyama et al., 1998) y *S. tuberosum* (Maruyama, Ishizawa y Takagi, 2000) se demostró la presencia de una enzima

citoplasmática capaz de catalizar la desintoxicación de cianuro. Esta enzima es la cisteína sintasa (CS) (EC 4.2.99.8), que normalmente cataliza la formación de cisteína a partir de O-acetil-L-serina y sulfuro de hidrógeno, además posee una alta similitud en su secuencia aminoacídica con respecto a  $\beta$ CAS (Maruyama et al., 1998). En el presente trabajo, la actividad *tipo*- $\beta$ CAS (que incluye la actividad CS) en el biotipo A33P2 se vio incrementada a partir del tercer día luego de la aplicación de quinclorac 10 $\mu$ M en el tejido radicular, y a partir del quinto día en la parte aérea (Fig. 6).



**Figura 6.** Actividad tipo- $\beta$ CAS en los biotipos A33P2 y E7 luego de la aplicación de quinclorac: A) parte aérea; B) parte radicular. Las barras verticales representan los errores estándar del promedio de las mediciones. Los \* indican diferencias significativas ( $p > 0,01$ ).

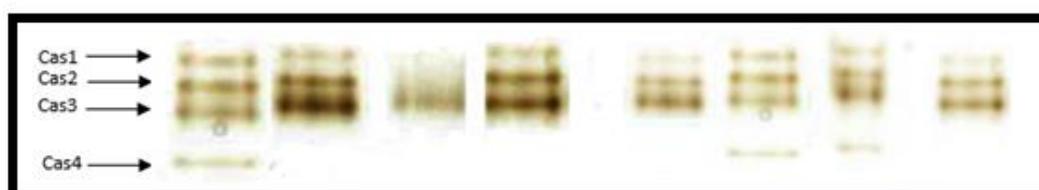
En cambio, en el biotipo E7 no se observó estimulación de esta enzima. A diferencia de otros estudios (Abdalah et al, 2006, Yasuor et al, 2012), no se detectó una diferencia en la actividad *tipo*- $\beta$ CAS basal entre los dos biotipos. Esto concuerda con el resultado obtenido en la respuesta de estos dos biotipos a KCN (Fig.5), una misma actividad *tipo*- $\beta$ CAS basal, les otorgó la misma capacidad de desintoxicación frente a la adición de KCN.

Como se observa en la actividad *tipo*- $\beta$ CAS en gel (Fig.7), se detectaron varias bandas con actividad *tipo*- $\beta$ CAS. Esto puede ser causado por la detección de varias isoformas de la enzima  $\beta$ CAS o la presencia de actividad *tipo*- $\beta$ CAS de la enzima CS. Se indagó sobre este tema, realizando enriquecimiento de fracciones subcelulares (cloroplástica, mitocondrial, citosólica) detectándose actividad *tipo*- $\beta$ CAS en fracciones citosólicas y mitocondriales (datos no mostrados); la mayor actividad se encontró en la fracción mitocondrial, concordante con la ubicación  $\beta$ CAS, mientras que una actividad residual se halló en la fracción citosólica, presumiblemente adjudicada a la enzima CS (Liang y Li, 2001), En la fracción cloroplástica no se detectó actividad  $\beta$ CAS.

En el gel de actividad se puede apreciar que el quinclorac estimuló la actividad *tipo*- $\beta$ CAS en raíces y hojas del biotipo A33P2, mientras que en el biotipo E7 la

**A**    1        2        3        4        **B**    1        2        3        4

intensidad de las bandas permaneció igual que en el control sin herbicida.



**Figura 7.** Actividad *tipo*- $\beta$ CAS en gel de poliacrilamida en los biotipos A33P2 y E7, cinco días luego de la aplicación de quinclorac. A) A33P2: control sin herbicida parte radicular (1), con herbicida parte radicular (2)

, control sin herbicida parte aérea (3), con herbicida parte aérea (4) ; B) E7: control sin herbicida parte radicular (1) , con herbicida parte radicular (2) , control sin herbicida parte aérea (3), con herbicida parte aérea (4). Las flechas indican las distintas isoformas con actividad *tipo-βCAS*.

Estos resultados apoyan los obtenidos anteriormente, sobre la producción de etileno y acumulación de cianuro. La baja producción de etileno y acumulación de cianuro por parte del biotipo E7 luego de la aplicación de quinclorac, provocan que la actividad tipo  $\beta$ CAS se mantenga en valores similares al control sin herbicida. A diferencia de los resultados obtenidos por otros autores (Abdalah et al., 2006; Yasuor et al., 2012), la actividad basal  $\beta$ CAS no fue significativamente diferente en ambos biotipos. Para estos autores, una mayor actividad  $\beta$ CAS basal en el biotipo resistente podría otorgarle una mayor tolerancia a quinclorac que un biotipo sensible con menor actividad  $\beta$ CAS basal. Teniendo en cuenta estos resultados, es probable que este mecanismo no sea el que está involucrado en la resistencia a quinclorac en el biotipo E7.

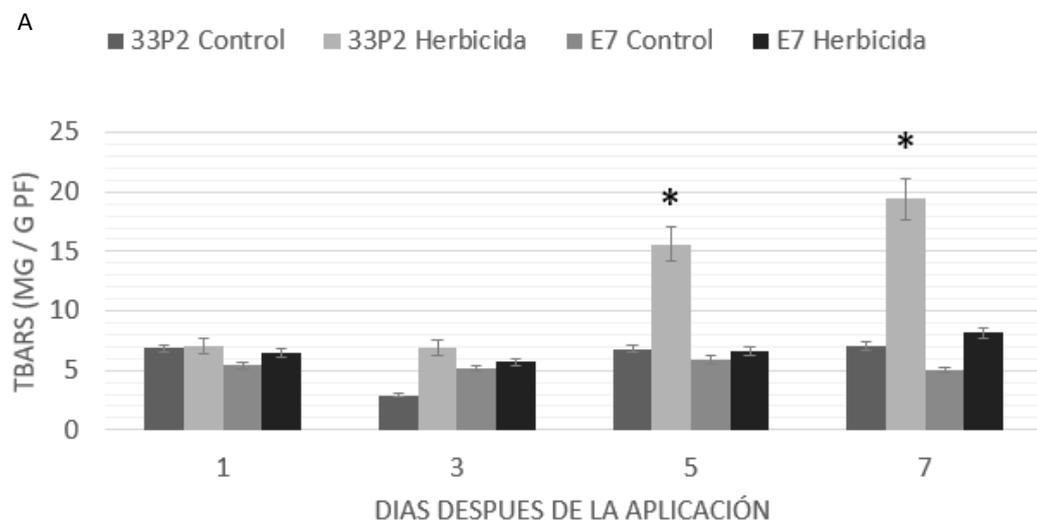
#### **2.5.5 Estrés oxidativo generado por quinclorac y su relación con la resistencia**

Quinclorac induce estrés oxidativo en varias especies herbáceas sensibles como *E. oryzicola* Vasing. (Sunohara y Matsumoto, 2004), *Z. mays* (Sunohara y Matsumoto, 2008), *D. adscendens* (Sunohara et al., 2010), y *E.indica* (Sunohara et al., 2011). Quinclorac induciría la producción de EROS, provocando la distorsión del metabolismo normal a través de daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Imlay y Linn, 1988). Este estrés oxidativo estaría provocado por un incremento de la concentración de ácido abscísico (ABA) inducido por etileno (Grossmann et al., 1996; Hansen y Grossmann, 2000). Luego de un incremento de ABA, este se distribuye en la planta causando inhibición del crecimiento, cierre estomático, reducción en la asimilación de carbono, producción de EROs y consecuentemente pérdida de biomasa (Scheltrup y Grossmann, 1995; Grossmann et al., 1996; Grossmann, 2000; Hansen y Grossmann, 2000). Teniendo en cuenta esto, la capacidad antioxidante diferencial de algunos biotipos podría ser un factor que determine su resistencia

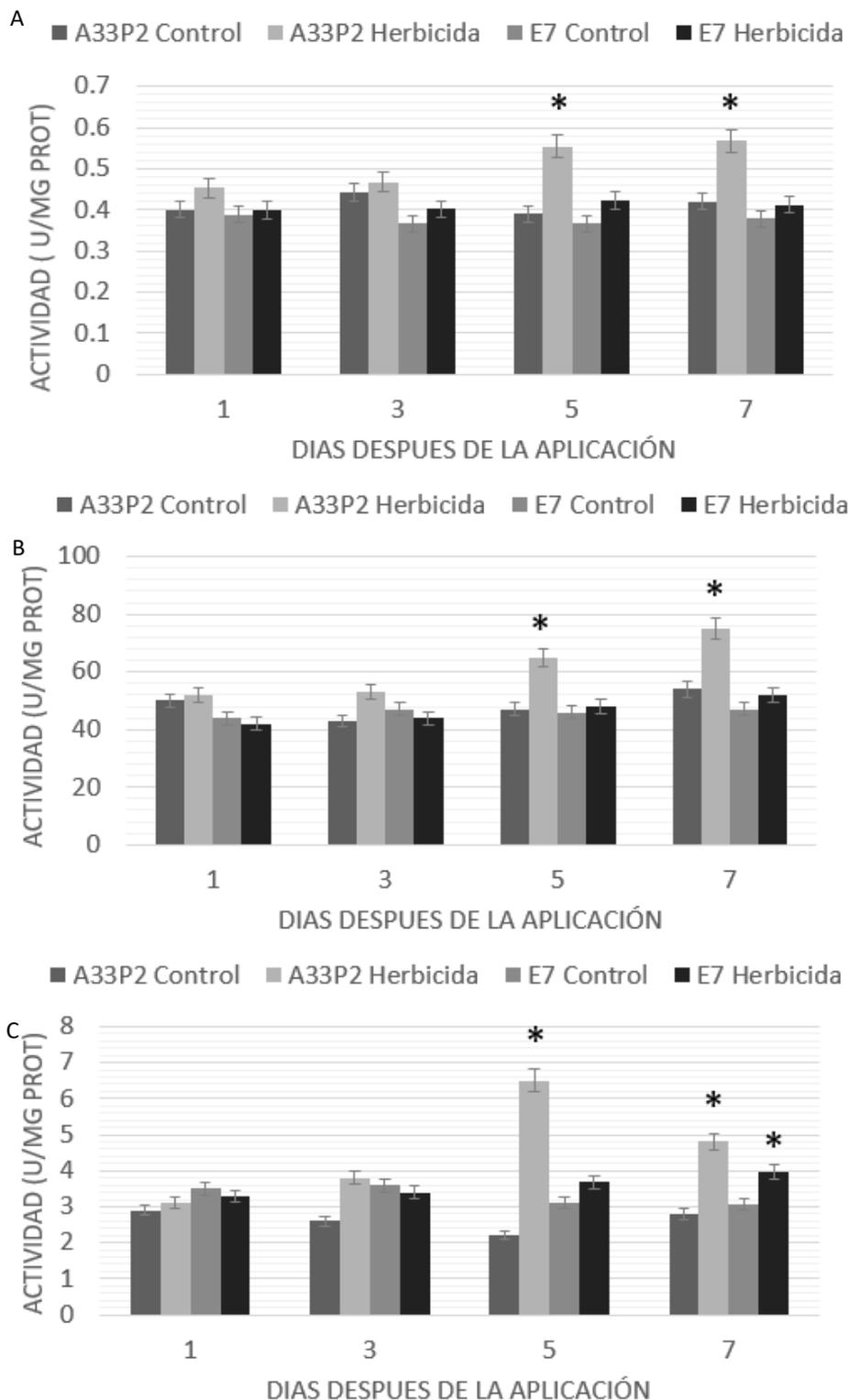
a quinclorac (Sunohara et al., 2011). Para determinar si el estrés oxidativo provocado por quinclorac se relaciona con la resistencia observada en el biotipo E7, se evaluaron en ambos biotipos parámetros bioquímicos asociados a dicho estrés como; TBARS y enzimas antioxidantes. Las actividades de las enzimas antioxidantes CAT, APX y SOD fueron comparadas en los dos biotipos con y sin la aplicación de quinclorac (Fig.9). Quinclorac (10  $\mu$ M) indujo la actividad de CAT en el biotipo A33P2, cinco días después de la aplicación, mientras que en el biotipo E7 no se produjo aumento en dicha actividad. CAT cataliza desprotonación de  $H_2O_2$  para dar agua y oxígeno y es una de las enzimas principales en la metabolización de  $H_2O_2$  en las células de las plantas (Scandalios, 1997). El aumento de la actividad CAT pudo estar causado por una producción de  $H_2O_2$  inducida por quinclorac. Otra enzima importante en la metabolización de  $H_2O_2$ , en condiciones de estrés, es la APX. Al igual que lo sucedido con la CAT, quinclorac (10  $\mu$ M) indujo la actividad de APX en el biotipo A33P2, cinco días después de la aplicación, mientras que en el biotipo E7 no se produjo aumento. El  $H_2O_2$  es producido por la dismutación del radical superóxido, esta reacción la cataliza la enzima SOD (Foyer et al., 1997). Quinclorac (10  $\mu$ M) indujo la actividad SOD en el biotipo A33P2, cinco días después de la aplicación. A diferencia de lo ocurrido con las otras enzimas, quinclorac (10  $\mu$ M) produjo una inducción de la actividad SOD en el biotipo E7, siete días después de la aplicación. No se obtuvieron diferencias significativas entre los dos biotipos con respecto a la actividad basal de estas enzimas, descartando la posibilidad de que una mayor capacidad de desintoxicación de EROS estuviera involucrada en la resistencia del biotipo E7 a quinclorac.

TBARS es un ensayo comúnmente usado para monitorear la peroxidación lipídica (Ladikos y Lougovois, 1999); y se basa en la detección espectrofotométrica de malodialdehído, un producto de la peroxidación lipídica. Quinclorac (10 $\mu$ M) produjo un aumento de tres veces el contenido de TBARS en el biotipo A33P2, cinco días después de la aplicación del herbicida, mientras en el biotipo E7, no se

observó un cambio significativo en el contenido de TBARS (Fig. 8A). Teniendo en cuenta estos resultados, el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes en el biotipo A33P2 luego de la aplicación, no fue suficiente para eliminar el estrés oxidativo generado, ya que se determinó un aumento significativo de peroxidación de lípidos. En cambio, en el biotipo E7 solo se registró ascenso de la actividad SOD, no detectándose peroxidación de lípidos.



**Figura 8.** A) TBARS en los biotipos A33P2 y E7 luego de la aplicación de quinclorac. Las barras verticales representan los errores estándar del promedio de las mediciones. Los \* indican diferencias significativas ( $p > 0.01$ ).



**Figura 9.** Actividad de enzimas antioxidantes en los biotipos A33P2 y E7 luego de la aplicación de quinclorac. A) APX, B) CAT, C) SOD. Las barras verticales representan los errores estándar del promedio de las mediciones. Los \* indican diferencias significativas ( $p > 0.01$ ).

Los resultados obtenidos en TBARS y enzimas antioxidantes indican que en el biotipo sensible 33P2, quinclorac indujo estrés oxidativo, mientras que no se observó respuesta significativa en el biotipo E7. El aumento en estos parámetros se observó a partir del quinto día después de la aplicación de quinclorac, siendo posterior a los aumentos de etileno y cianuro. Considerando esto, se puede proponer que el estrés oxidativo provocado por quinclorac sería una respuesta tardía del herbicida, descartando así la posibilidad de que la maquinaria antioxidante estuviera relacionada en la resistencia del biotipo E7 a quinclorac.

## **2.6 CONCLUSIONES**

En este trabajo se determinó que el biotipo E7 es resistente a quinclorac. La resistencia observada en el biotipo E7 estaría provocada por una inducción limitada en la síntesis de etileno y HCN. La actividad de la enzima  $\beta$ CAS no estaría relacionada con la resistencia a quinclorac. El estrés oxidativo provocado por quinclorac en biotipos sensibles, es una respuesta tardía, desencadenada por la citotoxicidad del cianuro. Una actividad aumentada de las enzimas antioxidantes no estaría relacionada con la resistencia del biotipo E7 a quinclorac.

## **2.7 BIBLIOGRAFÍA**

- Abdallah, I., Fischer, A.J., Elmore, C.L., Saltveit, M.E., Zaki, M. (2006). Mechanism of resistance to quinclorac in smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(1), 38–48.
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85, 235-241.
- Beers, R.F., Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133-140.
- Blumenthal, S.G., Hendrickson, H.R., Conn, E.E. (1968). Cyanide Metabolism in Higher Plants: III. The biosynthesis of  $\beta$  cyanoalanine. *Journal of Biological Chemistry*, 25, 5302–5307.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bradford, K.J., Yang, S.F. (1980). Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. *Plant Physiology*, 65, 322–3269.
- Chen, G.X., Asada, K. (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiology*, 30, 897-998.
- Concenço, G., Silva, A., Ferreira, E. (2009). Effect of dose and application site on quinclorac absorption by barnyard grass biotypes. *Planta Daninha*, 27(3), 541–548.
- Dhindsa, R.S., Matowe, W. (1981). Drought tolerance in two mosses: correlated with defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 32, 79-91.
- Foyer, C.H., López-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. (1997). Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum*, 100, 241–254.
- English, P.J., Lycett, G.W., Roberts, J.A., Jackson, M.B. (1995). Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. *Plant Physiology* 109, 1435–1440.
- Giannopolitis, C., Vassiliou, G. (1989). Propanil tolerance in *Echinochloa crus-galli*(L.) Beauv. *Tropical Pest Management*, 35(1), 6-7.

- Goudey, J.S., Tittle, F.L., Spencer, M.S. (1989). A role for ethylene in the metabolism of cyanide by higher plants. *Plant Physiology*, 89, 1306–1310.
- Grossmann, K. (2009). Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, 66, 113–120.
- Grossmann, K. (2000). Mode of action of auxin herbicides: A new ending to a long, drawn out story. *Trends in Plant Science*, 5, 506–508.
- Grossmann, K., Kwiatkowski, J. (2000). The Mechanism of Quinclorac Selectivity in Grasses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66(2), 83–91.
- Grossmann, K. (1998). Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides. *Weed Science*, 46(6), 707-716.
- Grossmann, K. (1996). A role for cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the development of stress symptoms. *Physiologia Plantarum*, 97(4), 772–775.
- Grossmann, K., Kwiatkowski, J. (1995). Evidence for a causative role of cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the herbicidal mode of action of quinclorac in barnyard grass. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51(2), 150–160.
- Grossmann, K., Kwiatkowski, J. (1993). Selective induction of ethylene and cyanide biosynthesis appears to be involved in the selectivity of the herbicide quinclorac between rice and barnyardgrass. *Journal of Plant Physiology*, 142(4), 457–466.
- Gupta, N., Balomajumder, C., Agarwal, V.K. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: a review. *Journal of Hazard Materials*, 176(1-3), 1-13.
- Knezevic SZ, Streibig JC, Ritz C. (2007). Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology*, 21, 840–848.
- Koger, C.H., Shaner, D.L., Henry, W.B., Nadler-Hassar, T., Thomas, W.E., Wilcut, J.W. (2005). Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*, 53, 438–445.
- Ladikos, D., Lougovois, V. (1999). Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chemistry*, 35, 295–314.
- Lambert, J.L., Ramasamy, J., Paukstelis, J.V. (1975). Stable reagents for the colorimetric determination of cyanide by modified König reactions. *Analytical Chemistry*, 47, 916–918.
- Leeson, J.Y., Thomas, A.G., Hall, L.M., Brenzil, C.A., Andrews, T., Brown, K.R., Van Acker, R.C. (2005). Prairie Weed Surveys of Cereal, Oilseed and Pulse Crops

from the 1970s to the 2000s. En: Weed Survey Series Publication 05-1. Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon Research Centre, Saskatoon, Saskatchewan.

Liang, W.S., Li, D.B. (2001). The two  $\beta$ -cyanoalanine synthase isozymes of tobacco showed different antioxidative abilities. *Plant Science*, 161(6), 1171–1177.

López-Martínez, N., Shimabukuro, R.H., De Prado, R. (1998). Effect of quinclorac on auxin-induced growth, transmembrane proton gradient and ethylene biosynthesis in *Echinochloa* spp. *Australian Journal Plant Physiology*, 25, 851-857.

López-Martínez, N., Marshall, G., De Prado, R. (1997). Resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to atrazine and quinclorac. *Pesticide Science*, 51, 171-175.

Lovelace, M. L., Talbert, R. E. Hoagland, R.E, Scherder, E.F. (2007). Quinclorac absorption and translocation characteristics in quinclorac and propanil-resistant and susceptible barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) biotypes. *Weed Technology*, 21, 683–687.

Machingura, M., Ebbs, S.D. (2014). Functional Redundancies in Cyanide Tolerance Provided by  $\beta$ -Cyanoalanine Pathway Genes in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Sciences*, 175(3), 346–358.

Machingura, M., Sidibe, A., Wood, A.J., Ebbs, S.D. (2013). The  $\beta$ -cyanoalanine pathway is involved in the response to water deficit in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63:159–169.

Maruyama, A., Ishizawa, K., Takagi, T. (2000). Purification and characterization of beta-cyanoalanine synthase and cysteine synthases from potato tubers: are beta-cyanoalanine synthase and mitochondrial cysteine synthase same enzyme? *Plant & Cell Physiology*, 41(2), 200–208.

Maruyama, A., Ishizawa, K., Takagi, T., Esashi, Y. (1998) .Cytosolic  $\beta$ -cyanoalanine synthase activity attributed to cysteine synthases in cocklebur seeds: purification and characterization of cytosolic cysteine synthases. *Plant Cell Physiology*, 39, 671–680.

McManus M.T. (2012). The Plant Hormone Ethylene – Annual Plant Reviews. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Miller J.M., Conn E.E. (1980). Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant Physiology*, 65(6), 1199–202.

Minotti, G., Aust, S.D. (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44 (2-4), 191-208.

- Handberg, K., Stougaard, J. (1992). Lotus japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant Journal*, 2, 487–49.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950). The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. *California Agricultural Experiment Station, Circular-347*.
- Imlay, J.A., Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240(4857), 1302-1309.
- Oerke, E.C., Dehne, H.W. (2004). Safe guarding production losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 3, 275-285.
- R Development Core Team, (2010) R: a Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* 10(12), e0146021.
- Ritz, C. (2010). Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 220-229.
- Saldain, N.E., Sosa, B. Susceptibilidad de los biotipos de capín colectados a los herbicidas usados en arroz en la zona Este del Uruguay. En: Olga Alvares (Eds.) SAD 686 ARROZ Resultados Experimentales 2011-2012 (Capítulo 5, p9-18). Treinta y Tres: INIA Treinta y Tres.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scandalios, J.G. (1997). Molecular Genetics of Superoxide Dismutases in Plants.. En: J.G. Scandalios (Eds.), Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidative Defenses (1(1):527–568). New York: Cold Spring Harbor.
- Sunohara, Y. Shirai, S., Yamazaki, H., Matsumoto, H. (2011). Involvement of antioxidant capacity in quinclorac tolerance in Eleusine indica. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 74–81.
- Sunohara, Y., Shirai, S. (2010). Sensitivity and physiological responses of Eleusine indica and Digitaria adscendens to herbicide quinclorac and 2, 4-D. *Environmental and Experimental Botany*, 68(2), 157–164.
- Sunohara, Y., Matsumoto, H. (2008). Quinclorac-induced cell death is accompanied by generation of reactive oxygen species in maize root tissue. *Phytochemistry*, 69, 2312–2319.
- Sunohara, Y., Matsumoto, H. (2004). Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on Echinochloa oryzicola Vasing. and the involvement of antioxidative ability in its highly selective action. *Plant Science*, 167(3), 597–606.

Van de Poel, B., Van Der Staeten, D. (2014). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene!. *Frontiers in Plant Science*, 5: 640.

Wellburn, A.R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313.

Yasuor, H., Milan, M., Eckert, J.W., Fischer, A.J. (2012). Quinclorac resistance: a concerted hormonal and enzymatic effort in *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Management Science*, 68(1), 108–115.

Yip, W.K., Yang, S. (1988). Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. *Plant Physiology*, 88(2) ,473–476.

### **3. CONCLUSIÓN**

Considerando los resultados presentados anteriormente, se puede decir que la resistencia del biotipo E7 estaría relacionada con una alteración en la vía de transducción de la señal auxínica, causando una menor estimulación de la enzima ACC sintasa, luego del tratamiento con quinclorac. Las auxinas naturales (AIA) y las sintéticas como 2-4D, dicamba y quinclorac, estimulan la inducción de genes de respuesta temprana a auxinas (*ACC sintasa*, *GH3* y *NCED*). Presumiblemente, esto es lo que ocurre en los biotipos sensibles como el A33P2. La inducción del gen de ACC sintasa, provoca un aumento en la producción de la enzima, resultando en la síntesis de etileno y cianuro. La inducción del gen NCED y un aumento en la síntesis de etileno promueven la activación de la vía del ABA, resultando en cierre estomático y producción de EROs. Mecanismos alternativos de resistencia como una mayor capacidad de desintoxicación de cianuro por parte de la enzima  $\beta$ CAS, o mayor actividad de enzimas antioxidantes no estarían involucrados en la resistencia de E7 a quinclorac. Estos hallazgos abren una nueva oportunidad para la investigación del modo de acción de quinclorac y las causas de la resistencia observada en biotipos de capín. Es necesario investigar los mecanismos moleculares que desencadenan la respuesta de quinclorac en biotipos sensibles, para poder avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia. El reciente avance en el estudio de la biología molecular de auxinas, nos otorgan una mejor comprensión de cómo pueden actuar los herbicidas auxínicos. Estudios recientes, que relacionan mutaciones en los receptores auxínicos TIR y AFB en *A.thaliana* con la resistencia a herbicidas auxínicos, pueden servir de ejemplo, para elucidar el modo de acción y mecanismos de resistencia de quinclorac en malezas de interés agronómico. El estudio de expresión de genes de respuesta temprana a auxina, en biotipos resistentes y sensibles puede también otorgar información de interés. Los resultados obtenidos en esta tesis, indican que la diferencia en la respuesta a

quinclorac en los dos biotipos evaluados, se encuentra previo a la síntesis de etileno. Por lo tanto, un mejor conocimiento de la respuesta temprana a quinclorac, incluyendo una posible mutación en receptores auxínicos o expresión diferencial de genes de respuesta a auxinas, es la pieza faltante en el rompecabezas (Fig.6). Si bien la actividad de la enzima  $\beta$ CAS no parece estar involucrada en la resistencia del biotipo E7, sería interesante ahondar en el rol fisiológico que tiene esta enzima en la eliminación de HCN y la posible relación con la enzima CS.



**Figura 6.** Hipótesis sobre la acción diferencial de quinclorac en los dos biotipos estudiados.

#### **4. BIBLIOGRAFÍA**

Abdallah I, Fischer AJ, Elmore CL, Saltveit ME, Zaki M. 2006. Mechanism of resistance to quinclorac in smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(1):38–48.

ACA (Asociación de cultivadores de arroz). 2015a. Gráfico de evolución del cultivo [En línea] 31 de octubre de 2016. <http://www.aca.com.uy/wp-content/uploads/2014/08/grafica-de-evolucion-de-cultivo-feb-2015.pdf>

ACA (Asociación de cultivadores de arroz). 2015b. Principales exportadores de arroz [En línea] 31 de octubre de 2016. <http://www.aca.com.uy/wp-content/uploads/2014/08/Principales-exportadores-feb-15.pdf>

ACA (Asociación de cultivadores de arroz). 2013. Guía de buenas prácticas en el cultivo de arroz en Uruguay [En línea] 31 de octubre de 2016. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/4927/1/Guia-de-Buenas-Practicas-Arroz-Uruguay-ACA.pdf>

Ampong-Nyarko K, De Datta SK. 1991. Significance of weeds in rice farming. En: A handbook for weed control in rice. International Rice Research Institute (SBN 971-22-0020-5). 1-4

Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235-241

Avery SV. 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochemistry Journal*. 434, 201–210

Bartosz G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19:47–64

Bajwa AA, Jabran K, Shahid M, Ali HH, Chauhan BS, Ehsanullah. 2015. Eco-biology and management of *Echinochloa crus-galli*. *Crop Protection* 75: 151-162

Barret SCH. 1983. Crop mimicry in weeds. *Economy botany* 37 (3): 255-282

Beers RF, Sizer IW. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*. 195(1):133-140.

Beltran JC, Pannell DJ, Doole GJ. 2012. Economic implications of herbicide resistance and high labour costs for management of annual barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) in Philippine rice farming systems. *Crop Protection* 31: 31-39

Berghaus B, Wuerzer B. 1989. Uptake, translocation and metabolism of quinclorac (BAS 514 H) in rice and barnyard grass, Proc. 12th Asian Pacific Weed Science Society Conference. 1, 133.

Berghaus R, Wuerzer B. 1987. The mode of action of the new experimental herbicide quinclorac (BAS 514 H). Proc. 11th Asian-Pacific Weed Science Society Conference 1: 81–87

Blumenthal SG, Hendrickson HR, Conn, EE .1968. Cyanide Metabolism in Higher Plants : III . The biosynthesis of  $\beta$  cyanoalanine. Journal of Biological Chemistry, 25:5302–5307.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Bradford KJ, Yang SF. 1980. Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. Plant Physiology 65 322–326

Briggs GG, Rigitano RLO, Bromilow RH. 1987. Physico-chemical factors affecting uptake by roots and translocation to shoots of weak acids in barley. Pest Management Science 19 (2): 101-112

Calderón-Villalobos LI, Tan X, Zheng N, Estelle M. 2010. Auxin Perception--Structural Insights, Cold Springs Harbor perspectives in biology 2:a005546

Chapman EJ, Estelle M. 2009. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. Annual Review of Genetics 43: 265–285.

Chauhan BS, Johnson DE. 2009. Seed germination ecology of junglerice (*Echinochloa colona*): a major weed of rice. Weed Science. 57: 235-240

Chauhan BS, Johnson DE. 2011. Ecological studies on *Echinochloa crus-galli* and the implications for weed management in direct-seeded rice. Crop Protection 30: 1385-1391

Chen GX, Asada K. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiology 30:897-998

Chin DV. 2001. Biology and management of barnyardgrass, red sprangletop and weedy rice. Weed Biology Management 1: 37-41

Chism WJ, Bingham SW, Shaver RL. 1991. Uptake , Translocation , and Metabolism of Quinclorac in Two Grass Species. Weed Technology, 5: 771–775.

Ciuberkis S, Bernotas S, Raudonius S, Felix J. 2007. Effect of weed emergence time and intervals of weed and crop competition on potato yield. Weed Technology. 21: 213-218

- Clay SA, Kleinjan J, Clay DE, Forcella F, Batchelor W. 2005. Growth and fecundity of several weed species in corn and soybean. *Agronomy Journal*. 97: 294-302.
- Cobb A. 1992. Auxin-type herbicides. En: Cobb A, ed. *Herbicides and plant physiology*. London: Chapman & Hall, 82–106.
- Concenço G, Silva A, Ferreira E. 2009. Effect of dose and application site on quinclorac absorption by barnyardgrass biotypes. *Planta Daninha*, 27(3), 541–548.
- Cornic G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5: 187–188
- Coupland D. 1994. Resistance to the auxin analog herbicides. En: Powles SB, Hornum JAM, *Herbicide Resistance in Plants*. London: Lewis. 171– 214
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell and Molecular Life Science*. 57(5):779-795.
- Davies PJ. 1995. *Plant Hormones—Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- De Prado R, Romera E, Menendez J. 1995. Atrazine detoxification in *Panicum dichotomiflorum* and target site *Polygonum lapathifolium*. *Pesticide Biochemistry Physiology* 52 (1): 1-11
- Demidchik V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109: 212-228
- Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D. 2010. Arabidopsis root K<sup>+</sup> efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science* 123, 1468–1479
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. 2005. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435(7041): 446–451.
- Dhindsa RS, Matowe W. 1981. Drought tolerance in two mosses: correlated with defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*. 32:79-91
- English PJ, Lycett GW, Roberts JA, Jackson MB. 1995. Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. *Plant Physiology* 109:1435–1440
- Farmer EE, Mueller MJ. 2013. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Reviews of Plant Biology* 64:429-50

- Farrimond JA, Elliott MC, Clack DW. 1978. Charge separation as a component of the structural requirements for hormone activity. *Nature* 274: 401–402
- Finkelstein R. 2013. Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arabidopsis Book*. 2013; 11: 01-66.
- Fischer AJ, Ramirez HV, Lozano J. 1997. Suppression of jungle rice [*Echinochloa colona* (L.) by irrigated rice cultivars in Latin America, *Agronomy Journal* 89: 516-552.
- Foyer CH, Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 28(8):1056-1071
- Foyer CH, Noctor G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signaling. *New Phytologist* 146:359-388
- Foyer CH, López-Delgado H, Dat JF, Scott IM. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum* 100:241–254.
- Gao Y, Zhang Y, Zhang D, Dai X, Estelle M, Zhao Y. 2015. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development. *PNAS* 112:2275–2280
- Garg N, Manchanda G. 2009. ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems*, 143(1):81-96.
- Gianfagna T. 1995. *Natural and Synthetic Growth Regulators and Their Use in Horticultural and Agronomic Crops*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers
- Giannopolitis C, Vassiliou G. 1989. Propanil tolerance in *Echinochloa crus-galli*(L.) Beauv. *Tropical Pest Management* 35(1): 6-7.
- Gibson KD, Fischer AJ, Foin TC, Hill JE. 2002. Implications of delayed *Echinochloa* spp. germination and duration of competition for integrated weed management in water-seeded rice. *Weed Research*. 42: 351-358.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930
- Gleason C, Foley RC, Singh KB. 2011. Mutant analysis in Arabidopsis provides insight into the molecular mode of action of the auxinic herbicide dicamba. *PLoS ONE*, 6(3): e17245

- Gómez de Barreda D, Lorenzo E, Gamós M, Monteagudo E, Saez A, Cuadra JD, Busto A, Ramos C, Carbonell EA. 1991. Survey of herbicide residues in soil and wells in three citrus orchards in Valencia, Spain, *Weed Research*. 31, 143.
- Goudey JS, Tittle FL, Spencer MS. 1989. A role for ethylene in the metabolism of cyanide by higher plants. *Plant Physiology* 89:1306– 1310
- Greenham K, Santner A, Castillejo C, Mooney S, Sairanen I, Ljung K, Estelle M. 2011. The AFB4 auxin receptor is a negative regulator of auxin signaling in seedlings. *Current Biology*. 21: 520–525
- Grossmann, K. 2009. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, 66, 113–120.
- Grossmann K. 2003. News from old compounds: the mode of action of auxin herbicides. En: *Chemistry of Crop Protection: Progress and Prospects in Science and Regulation*, 131-142
- Grossmann K, Caspar G, Kwiatkowski J, Bowe SJ. 2002. On the mechanism of selectivity of the corn herbicide BAS 662H: a combination of the novel auxin transport inhibitor diflufenzopyr and the auxin herbicide dicamba. *Pest Management Science*, 58(10): 1002–14.
- Grossmann K, Kwiatkowski J, Tresch S. 2001. Auxin herbicides induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *Journal of Experimental Botany*, 52(362): 1811–1816.
- Grossmann K, Kwiatkowski J. 2000. The Mechanism of Quinclorac Selectivity in Grasses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66(2): 83–91.
- Grossmann K. 2000. Mode of action of auxin herbicides: A new ending to a long, drawn out story. *Trends in Plant Science*, 5: 506–508.
- Grossmann K. 1998. Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides. *Weed Science* 46(6):707-716
- Grossmann K, Scheltrup F. 1997. Selective Induction of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid (ACC) Synthase Activity Is Involved in the Selectivity of the Auxin Herbicide Quinclorac between Barnyard Grass and Rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 58: 145–153.
- Grossmann K, Scheltrup F, Kwiatkowski J, Caspar G. 1996. Induction of abscisic acid is a common effect of auxin herbicides in susceptible plants. *Journal of Plant Physiology*, 149: 475–478.
- Grossmann K. 1996. A role for cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the development of stress symptoms. *Physiologia Plantarum*, 97(4): 772–775.

- Grossmann K, Kwiatkowski J. 1995. Evidence for a causative role of cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the herbicidal mode of action of quinclorac in barnyard grass. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51(2): 150–160
- Grossmann K, Schmiilling T. 1995. The effects of the herbicide quinclorac on shoot growth in tomato is alleviated by inhibitors of ethylene biosynthesis and by the presence of an antisense construct to the 1-aminocyclopropane-l-carboxylic acid (ACG) synthase gene in transgenic plants. *Plant Growth Regulation*. 16: 183-188.
- Grossmann K, Kwiatkowski J. 1993. Selective induction of ethylene and cyanide biosynthesis appears to be involved in the selectivity of the herbicide quinclorac between rice and barnyardgrass. *Journal of Plant Physiology*, 142(4): 457–466.
- Gupta N, Balomajumder C, Agarwal VK. 2010. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: a review. *Journal of Hazard Mater*. 176(1-3):1-13.
- Habets MEJ, Offringa R. 2015. Auxin Binding Protein 1: a red herring after all? *Molecular Plant*. 8:1131–1134.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999 *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford.
- Hansen H, Grossmann K. 2000. Auxin-Induced Ethylene Triggers Abscisic Acid Biosynthesis and Growth Inhibition 1. *Plant Physiology*, 124:1437–1448.
- Hayashi KI. 2012. The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant and Cell Physiology*, 53(6):965–975.
- Hill BD, Moyer JR, Inaba DJ, Doram R. 1998 Effect of moisture on quinclorac dissipation in Lethbridge soil. *Canadian Journal of Plant Science* 78:697–702
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604–611.
- Kelley KB, Riechers DE .2007. Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(1):1–11.
- Kennedy RA, Barrett SCH, van der Zee D, Rumpho ME. 1980. Germination and seedling growth under anaerobic conditions in *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass). *Plant, Cell & Environment*, 3: 243–248.

- Kepinski S. The anatomy of auxin perception. 2007. *Bioessays* 29(10):953-956.
- Knezevic SZ, Streibig JC, Ritz C. 2007. Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology* 21:840–848.
- Koger CH, Shaner DL, Henry WB, Nadler-Hassar T, Thomas WET, Wilcut JW. 2005. Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* 53: 438–445.
- Koo SJ, Neal JC, DiTomaso JM. 1997. Mechanism of Action and Selectivity of Quinclorac in Grass Roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 57(1): 44-53
- Koo SJ, Neal JC, DiTomaso JM. 1996. 3,7-dichloroquinolinecarboxylic acid inhibits cell-wall biosynthesis in maize roots. *Plant Physiology* 112:1383–1389
- Krikorian AD, Kelly K, Smith DL. 1987. Hormones in tissue culture and micropropagation. En: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, P.J. Smith, ed (Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff), 593-613
- Kyung KS, Suh YT , Lee JK. 1997. Behavior of the herbicide quinclorac in a rice plant-grow lysimeter. *International Journal Environmentan Analytical Chemistry* 68:187–198
- Ladikos D, Lougovois V, 1999. Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chemistry* 35, 295–314.
- Lambert JL, Ramasamy J, Paukstelis JV. 1975. Stable reagents for the colorimetric determination of cyanide by modified König reactions. *Analitical Chemistry* 47:916–918.
- Lamourex GL, Rusness DG. 1995. Quinclorac Absorption , Traslocation, Metabolism, and Toxicity in Leafy Spurge (*Euphorbia esula*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 53: 210–226.
- LeClere S, Tellez R, Rampey RA, Matsuda SPT, Bartel B. 2002. Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 277:20446–20452
- Lee S, Sundaram S, Armitage L, Evans JP, Hawkes T, Kepinski S, Ferro N, Napier RM. 2014. Defining binding efficiency and specificity of auxins for SCF(TIR1/AFB)-Aux/IAA co-receptor complex formation. *ACS Chemical Biology* 9: 673–682
- Leeson, JY, Thomas, AG, Hall, LM, Brenzil, CA, Andrews, T, Brown, KR, Van Acker, RC. 2005. Prairie Weed Surveys of Cereal, Oilseed and Pulse Crops from the 1970s to the 2000s. En: *Weed Survey Series Publication 05-1*. Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon Research Centre, Saskatoon, Saskatchewan.

- Li G, Xu F, Chen P, Cai LM, Bai LY, Wu X. 2016. A novel EcGH3 gene with a different expression pattern in quinclorac-resistant and susceptible Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Plant Gene*. 5: 65-70.
- Liang WS. 2003. Drought stress increases both cyanogenesis and  $\beta$ -cyanoalanine synthase activity in tobacco. *Plant Science*, 165 (5): 1109-1115
- Liang WS, Li DB. 2001. The two  $\beta$ -cyanoalanine synthase isozymes of tobacco showed different antioxidative abilities. *Plant Science*, 161(6): 1171–1177.
- Ljung K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140: 943-950
- López-Martínez N, Shimabukuro RH, De Prado R. 1998. Effect of quinclorac on auxin-induced growth, transmembrane proton gradient and ethylene biosynthesis in *Echinochloa* spp. *Australian Journal of Plant Physiology* 25:851-857
- López-Martínez N, Marshall G, De Prado R. 1997. Resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to atrazine and quinclorac. *Pesticide Science* 51: 171-175.
- Lovelace, M. L., R. E. Talbert, R. E. Hoagland, and E. F. Scherder. 2007. Quinclorac absorption and translocation characteristics in quinclorac and propanil-resistant and susceptible barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) biotypes. *Weed Technology* 21:683–687
- Handberg K, Stougaard J .1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant Journal* 2: 487–49
- Hareau GG, Mills BF, Norton GW. 2006. The potential benefits of herbicide-resistant transgenic rice in Uruguay: Lessons for small developing countries. *Food Policy* 31: 162–179
- Hoagland DR, Arnon DI .1950. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agricultural Experiment Station, Circular-347.
- Holm LG, Plucknett DL, Pancho JV, Herberger JP. 1977. The world's worst weeds – distribution and biology. University Press of Hawaii, Honolulu, Hawaii. 609.
- Imlay JA, Linn S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. 240(4857):1302-1309
- Machingura M, Ebbs SD. 2014. Functional Redundancies in Cyanide Tolerance Provided by  $\beta$ -Cyanoalanine Pathway Genes in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Plant Sciences*, 175(3): 346–358.

- Machingura M, Sidibe A, Wood AJ, Ebbs SD. 2013. The  $\beta$ -cyanoalanine pathway is involved in the response to water deficit in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 159–69.
- Marambe B, Amarasinghe L. 2002. Propanil-resistant barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* L.) in Sri Lanka: seedling growth under different temperatures and control. *Weed Biology Management* 2: 194-199.
- Maruyama A, Ishizawa K, Takagi T. 2000. Purification and characterization of beta-cyanoalanine synthase and cysteine synthases from potato tubers: are beta-cyanoalanine synthase and mitochondrial cysteine synthase same enzyme? *Plant & Cell Physiology*, 41(2): 200–208.
- Maruyama A, Ishizawa K, Takagi T, Esashi Y. 1998. Cytosolic  $\beta$ -cyanoalanine synthase activity attributed to cysteine synthases in cocklebur seeds: purification and characterization of cytosolic cysteine synthases. *Plant Cell Physiology* 39: 671–680
- Matsushima H, Fakumi H, ARIMA K, 1973. Isolation of zeanic acid, a natural plant growth-regulator from corn steep liquor and its chemical structure. *Agricultural and Biology Chemistry*. 37, 1865-1871
- Maun M, Barrett S. 1986. THE BIOLOGY OF CANADIAN WEEDS.: 77. *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. *Canadian Journal of Plant Science*, 66: 739–759.
- McManus MT. 2012. *The Plant Hormone Ethylene – Annual Plant Reviews*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell
- Meier JR, Smith KL, Scott RC, Norsworthy JK, 2008. Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control with various herbicide combinations in Clearfield rice (*Oryza sativa*). En: Wells, B.R. , *Rice Research Studies*, Arkansas Agriculture Experiment Station Research Service, 571, 154-159.
- Miller JM, Conn EE. 1980. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant Physiology*, 65(6), 1199–1202.
- Minotti G, Aust SD. 1987. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* 44 (2-4):191-208
- Mito N, Sori I, Miyakado M, Tanaka S. 1991 Competition by auxin-type herbicides for NAA binding to maize auxin binding protein: comparison with in vivo auxin activity. *Journal of Pesticide Science* 16: 435-439
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. The reactive oxygen gene network in plants. *Trends in Plant Science* 9: 490–498

- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405–410.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007 Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58:459–481.
- Monaco, TJ, Weller SC, Ashton FM. 2002. *Weed Science: Principles and Practices*. New York: John Wiley & Sons
- Norsworthy JK, Wilson MJ, Scott RC, Gbur EE, 2014. Herbicidal activity on acetolactate synthase-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas, USA. *Weed Biology Management* 14, 50-58.
- Oerke EC, Dehne HW. 2004. Safe guarding production losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* 3, 275-285
- Östin A, Kowalyczk M, Bhalerao R, Sandberg G. 1998. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 118:285–296
- Ottis BV, Talbert RE. 2007. Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*L.) control and rice density effects on rice yield components. *Weed Technology* 21: 110-118
- Parry G, Calderón-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Gray WM, Bennett M, Estelle M. 2009. Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *PNAS* 106: 22540–22545.
- Pérez de Vida F. 2010. Aspectos de la ecofisiología del cultivo de arroz en Uruguay: I Análisis de la productividad en los últimos 15 años. En: *Arroz Resultados Experimentales 2009- 10. Actividades de Difusión* 611. INIA Treinta y Tres.
- Perron F, Legere A. 2000. Effects of crop management practices on *Echinochloa crus-galli* and *Chenopodium album* seed production in a maize/soybean rotation. *Weed Research* 40: 535-547
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network *Journal of Integrative Plant Biology* 50:2-18
- R Development Core Team, R: a Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2010.
- Reinhardt D, Kende H, Boiler T. 1994. Subcellular localization of 1 - aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in tomato cells. *Planta* 195: 142-146.
- Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* 10(12): e0146021

- Ritz C. 2010. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29:220-229
- Romano CP, Cooper ML, Klee HJ. 1993. Uncoupling auxin and ethylene effects in transgenic tobacco and Arabidopsis plants. *Plant Cell* 5: 181-189
- Ross JJ, O'Neill DP, Wolbang CM, Symons GM, Reid JB .2002. Auxin-gibberellin interactions and their role in plant growth. *Journal of Plant Growth Regulation* 20, 346–353.
- Saldain N, Sosa B. 2012. Susceptibilidad de los biotipos de capín colectados a los herbicidas usados en arroz en la Zona Este de Uruguay. En: *Arroz Resultados Experimentales 2011-2012*. Actividades de Difusión 686. INIA Treinta y Tres.
- Salehin M, Bagchi R, Estelle M. 2015. SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell* 27: 9–19.
- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarowar S, Kim YJ, Kim EN, Kim KD, Hwang BK, Islam R, Shin JS. 2005. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports* 24:216–224.
- Scandalios JG. 1997. Molecular Genetics of Superoxide Dismutases in Plants. 1(1):527–568. En: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidative Defenses*. (J.G. Scandalios, eds) pp. Plainview, Cold Spring Harbor.
- Scheltrup F, Grossmann K. 1995. Abscisic Acid is a Causative Factor in the Mode of Action of the Auxinic Herbicide Quinmerac in Cleaver (*Galium aparine* L.). *Journal of Plant Physiology*, 147(1): 118–126
- Schott PE, Will H, Schluter A, Meumann H, Rademacher W, Schelberger K. 1989. Influence of two new auxin analogues on fruit set and quality of tomatoes, *Acta Horticulturae*. 239: 391
- Sies H, Cadenas E. 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 311(1152):617-31.
- Simon S, Petrášek J. 2011. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science* 180: 454–460
- Staswick PE, Serban B, Rowe M , Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W. 2005 Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17:616–627

- Starratt AN, Caveney S. 1995. Four cyclopropane amino acids from Ephedra. *Phytochemistry* 40: 479-481
- Sterling TM, Hall JC. 1997. Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. En: Roe RM, Burton JD, Kuhr RJ, eds. *Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology*. Amsterdam: IOS Press, 111-141.
- Sunohara Y, Shirai S, Yamazaki H, Matsumoto, H. 2011. Involvement of antioxidant capacity in quinclorac tolerance in *Eleusine indica*. *Environmental and Experimental Botany*, 74:74-81.
- Sunohara Y, Shirai S. 2010. Sensitivity and physiological responses of *Eleusine indica* and *Digitaria adscendens* to herbicide quinclorac and 2, 4-D. *Environmental and Experimental Botany* 68(2):157-164.
- Sunohara Y, Matsumoto H. 2008. Quinclorac-induced cell death is accompanied by generation of reactive oxygen species in maize root tissue. *Phytochemistry*, 69:2312-2319.
- Sunohara Y, Matsumoto H. 2004. Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on *Echinochloa oryzicola* Vasing. and the involvement of antioxidative ability in its highly selective action. *Plant Science* 167(3):597-606.
- Sunohara Y, Matsumoto H. 1997. Comparative physiological effects of quinclorac and auxins, and light involvement in quinclorac-induced chlorosis in corn leaves. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 58(2) :125-132.
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N. 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446(7136):640-645
- Vahala J, Ruonala R, Keinanen M, Tuominen H, Kangasjarvi J. 2003. Ethylene insensitivity modulates ozone-induced cell death in birch. *Plant Physiology* 132:185-195.
- Van de Poel B, Van Der Staeten D. 2014. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene!. *Frontiers in Plant Science*. 5:640
- Van Eerd LL, Stephenson G, Kwiatkowski J, Grossmann K., Hall J. 2005. Physiological and biochemical characterization of quinclorac resistance in a false cleavers (*Galium spurium* L.) biotype. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53:1144-1151.
- Walsh T, Neal R, Merlo AO, Honma M, Hicks GR, Wolff K, Maturuma W, Davies JP. 2006. Mutations in an auxin receptor homolog AFB5 and in SGT1b confer

resistance to synthetic picolinate auxins and not to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiology* 142(2), 542–552.

Walter H, G. Retzlaff R, Berghaus R, Landes M. 1994. Einfluß- faktoren auf die Wirkung von Quinmerac und Quinmerac-halti- gen Kombinationsprodukten. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz, Sonderheft XIV*, 583-594.

Wellburn AR. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology* 144(3):307-313

Wilson MJ, Norsworthy JK, Scott RC, Gbur EE, 2014. Program approaches to control herbicide-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Midsouthern United States rice. *Weed Technology* 28, 39-46.

Wiseman H, Halliwell B .1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemistry Journal* 313(1): 17–29.

Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: regulation action, and interaction. *Annals of Botany* 95:707–735.

Wright RM, Hagen G, Guilfoyle T. 1987. An auxin-induced polypeptide in dicotyledonous plants. *Plant Molecular Biology* 9, 625–634

Wuerzer B, Berghaus R, 1985. Substituted quinoline carboxylic acid-new elements in herbicide systems. En: *Proceedings of 10th Asian-Pacific Weed Science Society Conference* vol. 1, 177–184.

Wuerzer B, Berhaus R, Hagen H, Kohler RD, Markert J. 1985. Characteristics of the new herbicide BAS 518 H. *British crop protection conference - weeds*, 63-70

Xu WF, Shi WM, Ueda A, Takabe T. 2008. Mechanisms of salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* carrying a peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley. *Pedosphere*. 18(4):486–495

Yan J, Wang J, Tissue D, Holaday AS, Allen R, Zhang H. 2003. Photosynthesis and seed production under water-deficit conditions in transgenic tobacco plants that overexpress an *Arabidopsis* ascorbate peroxidase gene. *Crop Science* 43:1477–1483

Yasuor H, Milan M, Eckert JW, Fischer AJ. 2012. Quinclorac resistance: a concerted hormonal and enzymatic effort in *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Management Science*, 68(1), 108–115.

Yip WK, Yang S. 1988. Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. *Plant Physiology*, 88(2): 473–476.

Zheng HG, Hall JC. 2001. Understanding auxinic herbicide resistance in wild mustard: physiological, biochemical, and molecular genetic approaches. *Weed Science* 49:276–281

Zheng J, Yang X, Harrell JM, Ryzhikov S, Shim EH, Lykke-Andersen K, Wei N, Sun H, Kobayashi R, Zhang H. 2002. CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Molecular Cell* 10: 1519–1526