

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL



**Estudio de las alteraciones inducidas por imazamox en judía y veza
para la selección de simbiosis *Rhizobium*-leguminosa tolerantes**

Amaranta García Garijo

TESIS DOCTORAL

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Amaranta García Garijo
D.L.: GR 720-2013
ISBN: 978-84-9028-431-5

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

Memoria para aspirar al Grado de Doctor
por la licenciada en Ciencias ambientales
Dña. Amaranta García Garijo

Directores:

Fdo: Noel A. Tejera García
Profesor Contratado Doctor
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Fdo: Francisco José Palma Martín
Investigador Contratado
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Laboratorio de Fijación de Nitrógeno del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Granada, con ayuda de una beca de Excelencia de la Junta de Andalucía asociada al proyecto de Excelencia titulado Utilización de leguminosas grano y forrajeras en la biorrecuperación de suelos degradados (P07-AGR-02812) de la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía y del PAI de la Junta de Andalucía (Grupo AGR-139). Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se han publicado en revistas internacionales (SCI), forman parte de capítulos de libro, y se han presentado en congresos y reuniones científicas.

***Publicaciones científicas:**

García-Garijo A, Palma F, González-López J, Lluch C, Tejera NA

Imazamox in soil, effect on *Rhizobium*.

Spanish Journal of Rural Development (2010) 1(2):41-48.

García-Garijo A, Palma F, Iribarne C, Lluch C, Tejera NA

Alterations induced by imazamox on acetohydroxyacid synthase activity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) depend on leaf position

Pesticide Biochemistry and Physiology (2012)104 (1):72-76.

***Capítulos de libro:**

García-Garijo A, Palma F, González-López J, Lluch C, Tejera NA

Alteraciones en la población de *Rhizobium* en suelo por la aplicación del herbicida imazamox

El suelo: funciones y manejo. ISBN. 978-84-15026-39-6

Palma F, **García-Garijo A**, Iribarne C, Galán JA, Tejera NA y Lluch C

Estrategia de las leguminosas frente a la salinidad y herbicidas

Avances en el metabolismo del nitrógeno. Evolución e integración de las rutas del metabolismo nitrogenado en el equilibrio biogeoquímico.

ISBN: 978-84-15105-52-7

García-Garijo A, Palma F, Galán JA, Iribarne C, Lluch C y Tejera NA

Estudio comparativo de los cambios inducidos por el herbicida imazamox en *Phaseolus vulgaris* y *Vicia sativa* en simbiosis

La nutrición mineral de las plantas como base de una agricultura sostenible. ISBN: pendiente.

***Congresos y reuniones científicas:**

García-Garijo A, Palma F, Iribarne C, Lluch C, Tejera NA
Efecto del herbicida imazamox en el crecimiento y metabolismo oxidativo de plantas de judía.
XI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal
Zaragoza, 8-11 Septiembre de 2009.

García-Garijo A, Palma F, Iribarne C, Lluch C, Tejera NA
Respuesta de la actividad acetolactato sintasa foliar en judía tratada con el herbicida imazamox.
X Reunión Nacional de Metabolismo del Nitrógeno
Benalauría, 23-26 Junio de 2010.

García-Garijo A, Palma F, González-López J, Lluch C, Tejera NA
Alteraciones en la población de *Rhizobium* en suelo por la aplicación del herbicida imazamox
IV Congreso Ibérico de la Ciencia del Suelo
Granada, 21-24 Septiembre de 2010.

García-Garijo A, Palma F, Iribarne C, Galán JA, Lluch C, Tejera NA
Efecto del herbicida imazamox en la actividad acetolactato sintasa y contenido foliar de aminoácidos ramificados libres de *Vicia sativa*.
XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal
Castellón, 21-24 Junio de 2011.

García-Garijo A, Palma F, Iribarne C, Galán JA, Lluch C, Tejera NA
Use of legumes in degraded soils biorecovery.
Workshop “Nitrogen use efficiency in plants: toward models of sustainable agriculture”
Baeza, 26-28 Septiembre 2011.

García-Garijo A, Palma F, Iribarne C, Galán JA, Lluch C, Tejera NA
Estudio comparativo de los cambios inducidos por el herbicida imazamox en *Phaseolus vulgaris* y *Vicia sativa* en simbiosis
XIV Simposio Hispano-Luso de Nutrición Mineral de las Plantas
Cantoblanco, 23 -26 Julio 2012.

Agradecimientos:

Mi agradecimiento especial a la Dra. Carmen Lluch, por darme esta oportunidad y enseñarme tantas cosas, al Dr. Noel Tejera, por sus sabios consejos y al Dr. Francisco Palma, mi principal pilar de apoyo todo este tiempo, a él va dedicada esta tesis, por hacerla posible.

Este trabajo también le debe mucho a todos los demás miembros del Laboratorio de Fijación de Nitrógeno: Carmen Iribarne, José Antonio Herrera, Miguel López, Antonio Ocaña, Mónica Gozávez, y también a aquéllos que estuvieron de paso: Daniel Pacheco, José Antonio Galán, Diego Mendizábal, Néstor del Saz y Javier Hidalgo. Gracias también a todo el resto de compañeros y profesores del Departamento de Fisiología Vegetal. Todos ellos no sólo me han ayudado sino que me han brindado su amistad.

Gracias al Dr. David Dowling por permitirme completar mi formación en el Institute of Technology Carlow y a Guiomar García, David Ryan, Kieran Germaine, Martina McGuinness, Edwina Brennan, Eileen Kelly, Van Than Nguyen, Moses Nyongesa y Sarah Clarke.

Por supuesto miles de gracias a mi pareja, a mi familia y a mis amigos por todo su apoyo, con cariño especial para los que ya no están.

En un espacio tan pequeño no he podido condensar toda la gratitud que siento por los que me han ayudado a llegar hasta aquí, así que se la expresaré en persona delante de unas cañas...

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Aa ó AA	Aminoácidos totales
AB	α -Aminobutirato
ABH	Acetohidroxibutirato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADH	Alcohol deshidrogenasa
AHAS	Acetohidroxiácido sintasa
AL	Acetolactato
Alta	Alanina aminotransferasa
ALS	Acetolactato sintasa
APX	Ascorbato peroxidasa
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
Ast ó AST	Azúcares solubles totales
AT	Aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
Cm	Cloramfenicol
Cla	Clorofila a
Clb	Clorofila b
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DH	Dihidroxiácido deshidratasa
DTI	Días después del tratamiento con imazamox
ECA	Etanol-cloroformo-agua
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EROs	Especies reactivas del oxígeno
ES	Error estándar
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFP	Proteína verde fluorescente
Glu	Glutamato
GPX	Guaiacol peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación-S-transferasa
HE-TPP	Hidroxietil-TPP
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo
Ile	Isoleucina
IZ	Imazamox
KARI	Cetoácido reductoisomerasa
KB	α -Cetobutirato

KG	Cetoglutarato
Kn	Kanamicina
LDH	Lactato deshidrogenasa
Leu	Leucina
MCPA	Ácido 2 -metil-4-clorofenoxiacético
MDA	Malondialdehido
MDS	Mínima diferencia significativa
mmR	Medio mínimo para <i>Rhizobium</i>
MO	Materia Orgánica
NAD	Nicotinamida adenina
NADH	Nicotinamida adenina reducido
NADP	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NBT	Azul de nitrotetrazolio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Parte aérea
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDC	Piruvato descarboxilasa
PF	Peso fresco
PNUMA	Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente
POX	Peroxidasa
PP	Precipitaciones
PSN	Peso seco nódulo
PSP	Peso seco de planta
PSPA	Peso seco parte aérea
PSR	Peso seco raíz
PST	Proteína soluble total
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
R	Raíz
RPA	Relación raíz/parte aérea
SOD	Superoxido dismutasa
SDS	Dodecilo sulfato sódico
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TD	Treonina desaminasa
TNB	5-tio-2-ácido nitrobenzoico
TPP	Tiamina pirofosfato
UPLC MS/MS	Ultra-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta definición
Val	Valina
X+C	Xantofilas y carotenos

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Contaminación por pesticidas	3
2. Pesticidas en el medio ambiente	4
3. Detoxificación de xenobióticos	6
4. Fitorremediación	8
5. Herbicidas	12
5.1. Clasificación de los herbicidas.....	12
5.2. Herbicidas inhibidores de la actividad acetohidroxiácido sintasa.....	15
5.2.1. Ruta de síntesis de los aminoácidos ramificados.....	15
5.2.2. Actividad acetohidroxiácido sintasa.....	17
5.2.3. Efectos fisiológicos de los herbicidas inhibidores de la AHAS.....	20
5.2.4. Imidazolinonas.....	25
6. Leguminosas	27
6.1. Leguminosas y herbicidas.....	29
6.2. <i>Phaseolus vulgaris</i>	30
6.3. <i>Vicia sativa</i>	31
II. OBJETO	33
III. MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Material	39
1.1. Material biológico.....	39
1.1.1. Microorganismos.....	39
1.1.2. Material vegetal.....	39
1.2. Herbicidas.....	39
2. Cultivo de microorganismos	39
2.1. Medios de cultivo.....	39
2.2. Preparación de inóculos y almacenamiento de las cepas bacterianas.....	41
3. Cultivo de plantas	41
3.1. Siembra.....	41
3.2. Condiciones de la cámara de cultivo y solución nutritiva.....	42
4. Experimentos realizados	43
4.1. Elección de cepas resistentes de <i>Rhizobium</i>	43
4.2. Estudio de la respuesta a imazamox para la selección de variedades tolerantes de <i>P. vulgaris</i> y <i>V. sativa</i>	44
4.3. Estudio ontogénico de diferentes órganos de plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>V. sativa</i> tratados con imazamox.....	45
4.4. Respuestas inducidas por imazamox en la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 y <i>Vicia sativa</i> - <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> VF39.....	46
5. Metodología empleada	47
5.1. Técnicas microbiológicas.....	47
5.1.1. Experimentos en sistema de microcosmos.....	47

5.1.2. Actividad AHAS en suspensiones de <i>Rhizobium</i> incubados con herbicida imazamox.....	48
5.1.3. Actividad AHAS en extractos de <i>Rhizobium</i> incubados con herbicida imazamox.....	49
5.1.4. Conjugación bacteriana	49
5.1.5. Técnicas de caracterización de cepas.....	50
5.1.6. Técnicas moleculares.....	51
5.2. Recolección de las plantas.....	53
5.3. Determinaciones analíticas.....	53
5.3.1. Pigmentos fotosintéticos.....	53
5.3.2. Relación C/N	53
5.3.3. Azúcares solubles totales.....	54
5.3.4. Aminoácidos libres totales.....	54
5.3.5. Aminoácidos ramificados libres	55
5.3.6. Proteína soluble	55
5.3.7. Peróxido de hidrógeno.....	56
5.3.8. Peroxidación de lípidos.....	56
5.3.9. Determinación de imazamox	57
5.4. Actividades enzimáticas	57
5.4.1. Acetohidroxiácido sintasa.....	57
5.4.2. Superóxido dismutasa.....	58
5.4.3. Catalasa.....	58
5.4.4. Guaiacol peroxidasa.....	59
5.4.5. Ascorbato peroxidasa.....	59
5.4.6. Glutación-S-transferasa	60
6. Presentación y estudio estadístico de resultados	60
IV. RESULTADOS	61
1. Selección de cepas de <i>Rhizobium</i> tolerantes a herbicidas.....	63
1.1. Experimentos con cepas nodulantes de judía: <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. etli</i> CFN42.....	63
1.1.1 Viabilidad en microcosmos	63
1.1.2 Actividad acetohidroxiácido sintasa	65
1.2. Experimentos con cepas nodulantes de veza: <i>R. leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> VF39 y <i>R. leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> UPM791	66
1.2.1 Viabilidad en microcosmos	66
1.2.2 Actividad acetohidroxiácido sintasa	68
1.3. Transformación de cepas de <i>Rhizobium</i> para aumentar la actividad glutación-S-transferasa	70
1.4. Tolerancia de las cepas estudiadas a distintos herbicidas	75
2. Estudio de la respuesta a imazamox para la selección de variedades tolerantes de <i>P. vulgaris</i> y <i>V. sativa</i>.....	77
2.1. Experimentos con <i>Phaseolus vulgaris</i>	77
2.1.1 Análisis del crecimiento	77
2.1.2 Pigmentos fotosintéticos.....	79
2.1.3 Actividad acetohidroxiácido sintasa	80

2.1.4 Contenido de aminoácidos totales y proteína soluble total.....	81
2.1.5 Contenido de azúcares solubles totales.....	81
2.1.6 Contenido de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica	82
2.1.7 Enzimas antioxidantes	83
2.2. Experimentos con <i>Vicia sativa</i>	85
2.2.1 Análisis del crecimiento	85
2.2.2 Pigmentos fotosintéticos.....	86
2.2.3 Actividad acetohidroxiácido sintasa	87
2.2.4 Contenido de aminoácidos totales y proteína soluble total.....	87
2.2.5 Contenido de azúcares solubles totales.....	88
2.2.6 Contenido de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica	89
2.2.7 Enzimas antioxidantes	90
3. Estudio ontogénico de diferentes órganos de plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>V. sativa</i> tratadas con imazamox	97
3.1. Experimentos con <i>Phaseolus vulgaris</i>	97
3.1.1 Análisis del crecimiento	97
3.1.2 Actividad acetohidroxiácido sintasa	98
3.1.3 Contenido de aminoácidos totales y ramificados.....	100
3.1.4 Contenido de imazamox	103
3.1.5 Actividad glutatión-S-transferasa	104
3.1.6 Actividad guaiacol peroxidasa.....	106
3.2. Experimentos con <i>Vicia sativa</i>	109
3.2.1 Análisis del crecimiento	109
3.2.2 Actividad acetohidroxiácido sintasa	110
3.2.3 Contenido de aminoácidos totales y ramificados.....	111
3.2.4 Contenido de imazamox	114
3.2.5 Actividad glutatión-S-transferasa	115
3.2.6 Actividad guaiacol peroxidasa.....	116
4. Respuestas inducidas por imazamox en las simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i>-<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 y <i>Vicia sativa</i>-<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> VF39	121
4.1. Experimentos con <i>Phaseolus vulgaris</i>	121
4.1.1 Análisis del crecimiento	121
4.1.2 Pigmentos fotosintéticos.....	122
4.1.3 Relación carbono/nitrógeno.....	123
4.1.4 Actividad acetohidroxiácido sintasa	124
4.1.5 Contenido de aminoácidos totales y ramificados.....	124
4.1.6 Contenido de imazamox	127
4.1.7 Actividad glutatión-S-transferasa	128
4.1.8 Actividades antioxidantes	128
4.2. Experimentos con <i>Vicia sativa</i>	131
4.2.1 Análisis del crecimiento	131
4.2.2 Pigmentos fotosintéticos.....	131
4.2.3 Relación carbono/nitrógeno.....	132
4.2.4 Actividad acetohidroxiácido sintasa	133
4.2.5 Contenido de aminoácidos totales y ramificados.....	134

Índice

4.2.6 Contenido de imazamox	137
4.2.7 Actividad glutatión-S-transferasa	138
4.2.8 Actividades antioxidantes	139
V. DISCUSIÓN	143
VI. CONCLUSIONES	169
VII. BIBLIOGRAFÍA	173

Introducción

1. Contaminación por pesticidas

Desde la aparición de la agricultura el hombre ha intentado evitar la proliferación de plagas que interfieren en el crecimiento de los cultivos, de hecho en las últimas décadas, se han desarrollado pesticidas orgánicos sintéticos para el control de estas plagas que han permitido un aumento considerable de los rendimientos agrícolas (Warren, 1998). Se estima que gracias a la aplicación de pesticidas, las pérdidas de cosechas se reducen cerca del 30% (Zhang *et al.*, 2011), lo que constituye un hito importante, teniendo en cuenta que en octubre de 2011 la población mundial alcanzó los 7000 millones de habitantes (ONU, 2011).

Junto con estos innegables beneficios, desafortunadamente el uso de pesticidas acarrea también graves perjuicios. Los efectos nocivos de estas sustancias comenzaron a descubrirse poco después de la difusión de su uso (Woodard *et al.*, 1945, Cottam y Higgins, 1946, Harrison y Rees, 1946), y con el tiempo se ha recopilado una cantidad abrumadora de pruebas sobre el peligro que entraña la utilización de las mismas. La contaminación por pesticidas está extendida globalmente, empleándose a nivel mundial 4,6 millones de toneladas de pesticidas químicos al año (Zhang *et al.*, 2011), y es dramática en aquellas partes del mundo en desarrollo, especialmente en India y China (Kramer, 2005).

Esta contaminación conlleva graves consecuencias para los ecosistemas, puesto que los pesticidas son tóxicos para toda una serie de organismos distintos de las especies diana a las que originalmente van dirigidos. Se sabe que pueden desestabilizar el equilibrio de poblaciones de microorganismos que son de vital importancia para mantener la calidad del suelo (González-López *et al.*, 2004), y son dañinos para una amplia variedad de especies vegetales y animales, incluyendo peces, aves y mamíferos, entre los que se encuentran los humanos (Benachour *et al.*, 2007, Aktar *et al.*, 2009). Muchos agricultores han desarrollado enfermedades crónicas debido a su constante exposición a estas sustancias (Valavanidis y Vlachogianni, 2011), y de acuerdo con datos de la OMS y el PNUMA, en el mundo hay más de 26 millones de intoxicaciones humanas al año, con cerca de 220.000 muertes, provocadas por pesticidas, que llegan a nosotros fundamentalmente a través del agua o los alimentos (Richter, 2002). Otros peligros añadidos son la aparición de especies resistentes, por la continua presión de selección (Georghiou, 1990, Owen y Zelaya, 2005, Preston *et al.*, 2009), o la bioacumulación a la que algunas de estas sustancias son propensas, alcanzando concentraciones crecientes a medida que se avanza en el nivel trófico de la cadena alimenticia (Ellgehausen *et al.*, 1980, Singh y Singh, 2008). Además de la toxicidad directa sobre los organismos, se producen efectos indirectos sobre la vida silvestre mediante la alteración de los hábitats adecuados para las especies (Rattner, 2009, Isenring, 2010).

2. Pesticidas en el medio ambiente

Los problemas mencionados anteriormente son difíciles de controlar porque los pesticidas se difunden desde el lugar de aplicación hacia todo el medio ambiente (George y Frear, 1966). Cuando se aplican pesticidas en un terreno, éstos pueden recorrer múltiples vías (Fig. 1). Una parte del compuesto puede llegar a la atmósfera por dispersión, si se administra mediante rociado o pulverización (Gil y Sinfort, 2005), o por volatilización desde el suelo o la cubierta vegetal (Yao *et al.*, 2008). Del pesticida que haya llegado al suelo, una parte se absorberá por la vegetación, pudiendo volver al medio mediante excreción radical, o por procesos de evapotranspiración (Koehne *et al.*, 2009), y otra quedará en el suelo. El pesticida en el suelo puede ser interceptado por animales, o ser adsorbido por las partículas del suelo, o bien puede ser degradado por factores abióticos como la luz, o bióticos como los microorganismos o los exudados radicales (Rahman *et al.*, 2011). Si la adsorción al suelo es muy fuerte, se acepta comúnmente que los compuestos son menos accesibles a los microorganismos, lo que en consecuencia, limita su degradación, así como su movilidad (Koskinen *et al.*, 2001), pudiendo hacerse altamente persistentes (Gevao *et al.*, 2000). Si por el contrario la unión al suelo es muy débil podrán ser dispersados por todo el suelo (Flury, 1996), o arrastrados fácilmente por las aguas de escorrentía hasta los sistemas de agua superficiales (Davies *et al.*, 2003), o bien llegar por lixiviación a las aguas subterráneas (Arias-Estevez *et al.*, 2008, Brown y van Beinum, 2009).

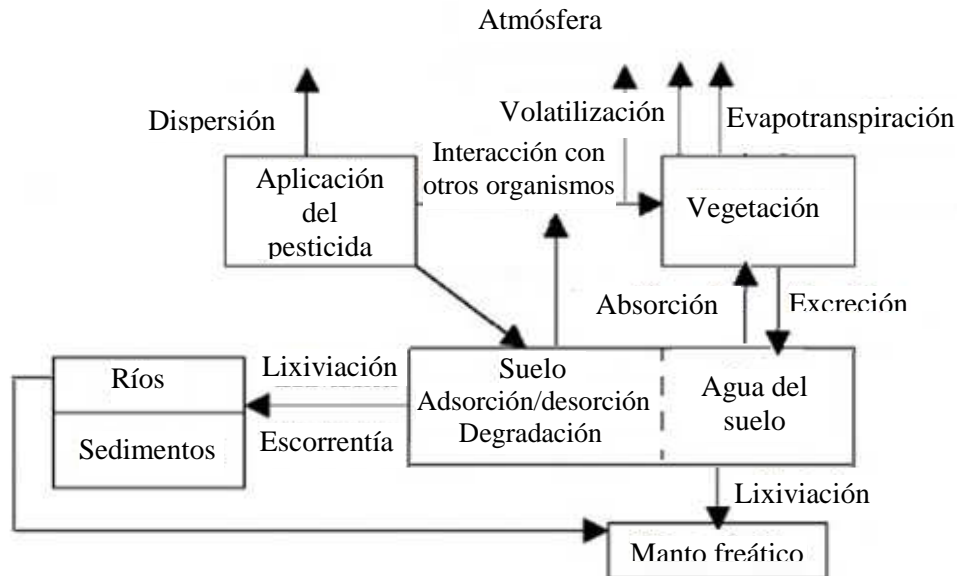


Figura 1. Destino de los pesticidas tras su aplicación. Adaptado de Arias-Estevez *et al.* (2008).

Es obvio, que la movilidad de los pesticidas en el suelo y, por consiguiente, su biodisponibilidad y transferencia a otros compartimentos ambientales (la atmósfera o el agua), depende de una variedad de procesos físicos, químicos y biológicos (Tabla 1). De la naturaleza del compuesto depende su posible volatilidad y, concretamente, la carga y la lipofilidad determinan su adsorción en el suelo y/o su absorción por las plantas (Arias-Estevez *et al.*, 2008). Las condiciones ambientales en el suelo, como la temperatura, el pH y la humedad, influyen en la degradación del compuesto, especialmente si ocurre por medio de microorganismos (Gevao *et al.*, 2000). Por otro lado, las características físico-químicas del suelo, tales como textura, contenido y naturaleza de la materia orgánica, o capacidad de intercambio catiónico, condicionan la cinética de adsorción-desorción de los compuestos en las partículas del suelo (Moorman *et al.*, 2001), así por ejemplo, los suelos arcillosos, poco arenosos y con alto contenido de materia orgánica, retendrán más los pesticidas, mientras que suelos arenosos con poca materia orgánica, permitirán su lixiviación (Sakaliene *et al.*, 2007). Finalmente, factores tales como el régimen de vientos y de precipitaciones, las características geográficas del terreno, o las particularidades de las prácticas agrícolas empleadas, influirán en la velocidad y magnitud de la dispersión de los pesticidas (Moyer *et al.*, 2010).

Tabla 1. Factores que influyen en la distribución de los pesticidas en el medio ambiente. Adaptado de Arias-Estevez *et al.* (2008).

Compuesto	Suelo	Zona	Clima	Prácticas agrícolas
Naturaleza química	Textura,	Extensión de la superficie	Vientos	Método de aplicación
Volatilidad	Estructura y compactación	Elevación, pendiente, orientación, ubicación geográfica	T ^a	Momento de aplicación
Lipofilidad	Contenido de M.O. y humus	Características de la cubierta vegetal	Irradiación solar	Frecuencia de aplicación
Carga	Humedad	Fauna	PP	Dosis empleada
Formulación	pH	Poblaciones microbianas	Humedad relativa	Combinación con otros agroquímicos
Concentración	CIC	Entorno adyacente (accidentes geográficos, masas de agua, etc)		Uso de mantillo u abonos verdes Tipo, frecuencia e intensidad del riego y la labranza

M.O.= Materia orgánica; CIC= Capacidad de intercambio catiónico; PP=Precipitaciones; T^a=Temperatura

3. Detoxificación de xenobióticos

El tiempo de vida de los pesticidas orgánicos en el medio ambiente está determinado por la tasa de degradación de los mismos, así los compuestos susceptibles de degradación se descomponen mediante procesos abióticos, consistentes en reacciones de oxidación provocadas por la luz solar, o bióticos, mediante microorganismos del suelo, asociados o no a la rizosfera, o plantas, que los absorben y detoxifican (Mansour y Feicht, 1994).

Para penetrar en las plantas, el compuesto orgánico puede hacerlo a través de las hojas o de la raíz. Para su absorción foliar debe pasar a través de los estomas, o atravesar la epidermis, si son gases depende del grado de apertura de los estomas y si son líquidos de la permeabilidad y humectación de la superficie de la hoja, la tensión superficial del líquido, y la morfología de los estomas (Kvesitadze *et al.*, 2009). La penetración de contaminantes por las raíces es esencialmente diferente, siendo en general menos selectiva que la absorción foliar. La tasa de absorción de los pesticidas por las raíces está limitada por la lipofilidad o hidrofobicidad de estos compuestos, aquellos con lipofilidad cercana a la de las raíces, difunden de forma espontánea, pero si ésta es demasiado baja, no pueden penetrar a través de los lípidos de la epidermis, mientras que si es demasiado elevada, quedan retenidos por éstos o por el mucílago que rodea la raíz (Schröder y Collins, 2002). También intervienen otros factores como la masa molecular, la concentración, la polaridad, temperatura, humedad del suelo, o el pH (Korte *et al.*, 2000). Así, el transporte de los ácidos débiles es más complejo que el de las moléculas no ionizadas, ya que cuanto mayor es el pH, menor es la absorción, porque la permeabilidad de la membrana es mucho más reducida para los aniones. Una vez en el interior de la planta, la movilidad del compuesto está, una vez más, influenciada por sus propiedades físico-químicas, por ejemplo, los compuestos más lipofílicos se mueven con más lentitud porque son retenidos por las membranas y por los compuestos de la pared celular como la lignina (Schröder y Collins, 2002).

Dentro de la planta los contaminantes orgánicos, considerados xenobióticos porque son extraños al vegetal y no son producidos en la naturaleza, pueden estar expuestos a diversos procesos que reducen su toxicidad. La cascada de reacciones que tiene lugar se ha considerado similar al funcionamiento de un “hígado verde” (Sandermann, 1994) y generalmente ocurre en varias fases: (I) activación de los xenobióticos, (II) detoxificación y (III) excreción (Fig. 2).

La fase I de activación se denomina así porque la reactividad de la sustancia química madre es normalmente realzada, y comprende reacciones catalizadas mayoritariamente por monooxigenasas P-450 y peroxidasas (POX). En esta fase los xenobióticos se someten a modificaciones oxidativas que normalmente aumentan la polaridad y pueden proporcionar sitios de unión para la conjugación,

que se produce en la fase siguiente (Passardi *et al.*, 2005). De acuerdo con la hipótesis actual, la gran mayoría de los contaminantes orgánicos en las plantas son oxidados por peroxidasas (Stiborova y Anzenbacher, 1991, Kvesitadze *et al.*, 2009).

Las reacciones de la fase II se denominan de detoxificación propiamente dichas, porque dan lugar a compuestos estables considerados menos tóxicos. Comprende reacciones de conjugación, principalmente con azúcares o glutatión, que pueden ser transferidos a los xenobióticos activados dependiendo de la estructura de la molécula y sus sitios activos. Los grupos funcionales -OH, -NH₂, -SH y -COOH, generalmente desencadenan la conjugación con azúcares, mediada por glicosiltransferasas, mientras que la presencia de dobles enlaces conjugados o halógenos fomenta la conjugación con glutatión, catalizada por glutatión S-transferasas (Schröder y Collins, 2002). La conjugación mediada por glicosiltransferasas, que se produce simplemente como una reacción de adición de glucosa, puede ser reversible y, por lo tanto, el sustrato xenobiótico original puede ser recuperado. Contrariamente, la conjugación con glutatión es una reacción de sustitución o de eliminación del grupo electrofílico de la molécula diana, por lo que, incluso después de una posible escisión del glutatión del conjugado, la toxicidad sigue siendo generalmente menor que la del compuesto original. Se ha destacado la importancia de la conjugación con azúcares en los procesos de detoxificación (Brazier-Hicks *et al.*, 2007), y la conjugación con glutatión se ha descrito para numerosos xenobióticos desde su descubrimiento en plantas (Frear y Swanson, 1970, Marrs, 1996, Scarponi *et al.*, 2006, Katerova y Miteva, 2010, Cummins *et al.*, 2011, Zhao *et al.*, 2012).

En la fase III las moléculas conjugadas suelen almacenarse, lo que ha llevado a considerar que el glutatión y la glucosa, en cierto modo, funcionan como señal para el secuestro vacuolar, ya que las bombas de membrana ATP-dependientes, reconocen y transfieren los conjugados a través de las membranas (Marrs, 1996), evitando así la acumulación de conjugados. Este almacenaje es generalmente temporal, un paso intermedio que permite amortiguar el desfase producido entre la rápida tasa de conjugación de los compuestos y las tasas más lentas de los pasos metabólicos posteriores (Kvesitadze *et al.*, 2009).

La mayoría de los conjugados, posteriormente sufren un metabolismo adicional en la célula que puede incluir escisión o conjugación secundaria, mediante la intervención de peptidasas, malonil transferasas y transaminasas, entre otras enzimas (Schröder y Collins, 2002). Finalmente, pueden ser segregados al apoplasto, incorporados a la pared de la célula, o excretados hacia la rizosfera, o incluso hacia la atmósfera (Schröder *et al.*, 2007, Verkleij *et al.*, 2009).

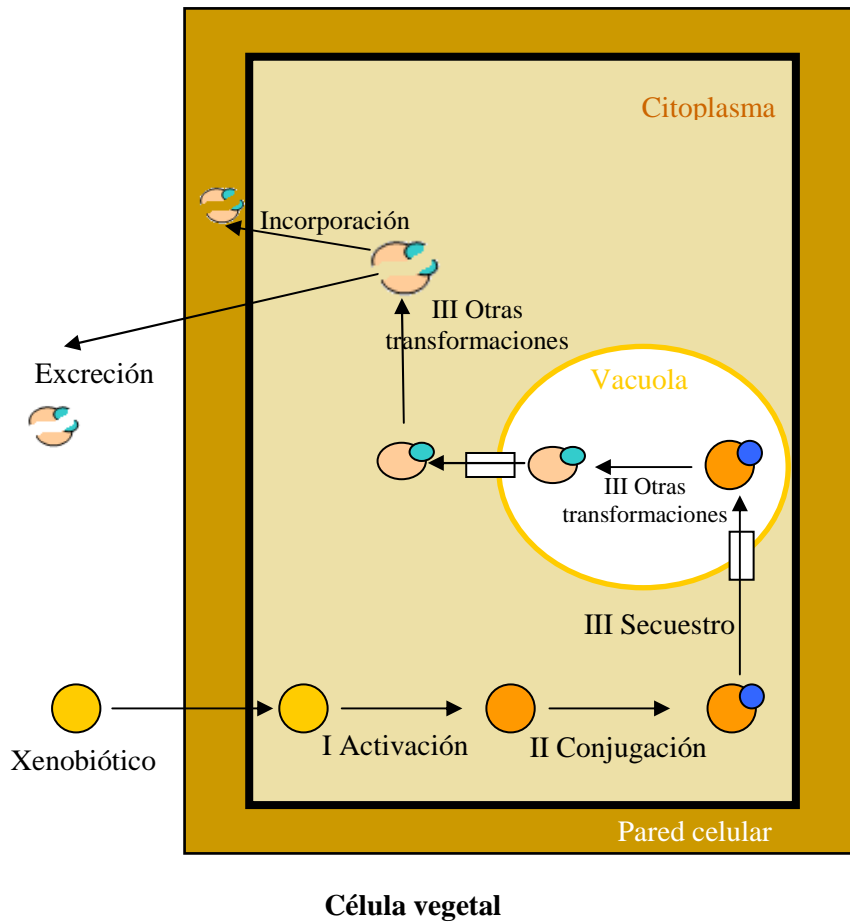


Figura 2. Principales rutas de detoxificación de xenobióticos orgánicos en la célula vegetal. Adaptado de Kvesitadze *et al.* (2009) y de Pilon-Smits (2005).

4. Fitorremediación

Para eliminar los residuos de pesticidas de los ambientes contaminados se han utilizado diversas estrategias de recuperación. En el caso de suelos, se emplean técnicas tales como incineración, enterramiento o tratamiento químico (Kempa, 1997, Wehtje *et al.*, 2000), procedimientos que con frecuencia provocan la alteración total o parcial del suelo, pues a veces se requiere la retirada física de los sustratos contaminados para su tratamiento *ex situ*. En el caso de aguas contaminadas, se emplean métodos como la precipitación o floculación,

microfiltración, ósmosis reversa, fotooxidación, etc... (Miltner *et al.*, 1989, Huston y Pignatello, 1999, Ormad *et al.*, 2008). Estas tecnologías suelen ser costosas, lo que limita su uso en la remediación de sustratos contaminados (Dijkgraaf y Vollebergh, 2004, Jin *et al.*, 2006). También existe una variedad de técnicas biológicas que son respetuosas con el medio ambiente y en general más económicas, aunque en ocasiones es necesario aplicar una combinación de varias de ellas (Dowling y Doty, 2009).

El uso de organismos vivos en técnicas de descontaminación de suelos y aguas se denomina biorremediación y comenzó a emplearse hace más de 50 años cuando aparecieron los primeros indicios sobre la polución causada por los pesticidas (Fletcher, 2006). Si bien esta tecnología conlleva un enfoque multidisciplinario, dado que el prefijo “bio” sugiere la implicación de cualquier organismo vivo, el eje central depende de la microbiología y las primeras investigaciones en este campo se centraron en el uso de bacterias. Más adelante empezó a considerarse la capacidad de las plantas en la recuperación de suelos u otros sustratos contaminados, llegando incluso a establecerse un campo de estudio aparte denominado fitorremediación (Dzantor *et al.*, 2000, Gerhardt *et al.*, 2009).

En realidad, la convergencia de estrategias de utilización de microorganismos y del uso de plantas para la remediación de contaminantes, ha llevado a un enfoque más exitoso, particularmente para la eliminación de compuestos orgánicos, ya que plantas, hongos, y bacterias pueden trabajar en conjunto para degradar eficazmente estos compuestos (Gerhardt *et al.*, 2009). De hecho, comúnmente, plantas y microorganismos se asocian y benefician mutuamente, y se ha comprobado que en las zonas adyacentes a las raíces se pueden encontrar entre 10 y 100 veces más microorganismos que en un suelo sin vegetación (Susarla *et al.*, 2002, Gerhardt *et al.*, 2009). Es bien sabido que cerca del 25% del carbono fijado por una planta puede ser depositado en el suelo en forma de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos orgánicos más complejos, y que estos exudados radicales se usan como fuentes de carbono y energía por los microorganismos del suelo (Rovira, 1969, Příklad y Vančura, 1980, Badri y Vivanco, 2009). Por otro lado, las plantas obtienen beneficios de estos microorganismos, pues pueden producir sustancias que estimulan el crecimiento vegetal, facilitar la adquisición de nutrientes o reducir la infección por patógenos (Bonfante y Anca, 2009, Lugtenberg y Kamilova, 2009, Compant *et al.*, 2010).

Por tanto, la combinación de plantas con microorganismos en la eliminación de contaminantes reúne las ventajas de utilizar ambos métodos. Por un lado, las plantas pueden degradar un sustrato si la concentración es moderada, pero si es alta puede resultar tóxico, mientras que los microorganismos suelen crecer bien a concentraciones elevadas (Trapp *et al.*, 2007). Por otro lado, las plantas hacen contacto simultáneamente con el suelo, el agua y el aire, lo que permite ampliar el

ámbito de captación de los contaminantes (Pilon-Smits, 2005). Además, los productos fenólicos secundarios y compuestos alifáticos vegetales pueden solubilizar moléculas orgánicas en las proximidades de las raíces (Verkleij *et al.*, 2009). Por todo ello, se considera un sistema muy prometedor (Weyens *et al.*, 2009a, Glick, 2010) y diversos estudios proponen la posibilidad de emplear la ingeniería genética para producir bacterias con rutas metabólicas optimizadas para la biodegradación (Pieper y Reineke, 2000, Germaine *et al.*, 2009, Brennan *et al.*, 2009), o bien, plantas transgénicas (Kawahigashi, 2009).

Estas técnicas (planta-microorganismo) presentan grandes ventajas respecto a los métodos tradicionales, ya que: el tratamiento se realiza *in situ*, tiene un reducido impacto sobre el paisaje, son métodos apropiados para descontaminar grandes superficies, son poco costosas porque las plantas emplean la energía solar, por lo que el mantenimiento que se requiere es mínimo, generan menos residuos secundarios y existe la posibilidad de la recuperación y reutilización de productos valiosos (Shukla *et al.*, 2010). Sin embargo, también presentan limitaciones: el proceso se circunscribe a la profundidad de penetración de las raíces o a aguas poco profundas, y a aquellos contaminantes que estén biodisponibles (Verkleij *et al.*, 2009), la duración del proceso pueden ser muy prolongada (Weyens *et al.*, 2009b) y su eficacia depende de las condiciones que permiten el crecimiento vegetal. Finalmente existe el peligro de evapotranspiración de los contaminantes volátiles, y/o sus intermedios de degradación, a través de las hojas (Gerhardt *et al.*, 2009).

La tecnología que emplea tanto plantas como microorganismos a menudo se incluye dentro de la definición de fitorremediación (Salt *et al.*, 1998), o se considera una subclase dentro de la misma (Pilon-Smits, 2005). También existen denominaciones específicas como la de rizorremediación, que engloba todos los procesos de remediación que se pueden desarrollar en la rizosfera, y otros términos como bioestimulación, que supone la estimulación de la población microbiana nativa, o bioaumentación, que implica la introducción artificial de una población de microorganismos en un suelo para su descontaminación (Shukla *et al.*, 2010).

Pilon-Smits (2005) sugiere las siguientes subcategorías dentro del concepto de fitorremediación, dependiendo de la forma en que la planta neutraliza al contaminante (Fig. 3): **a) fitoextracción**, cuando los elementos tóxicos presentes en el suelo son absorbidos y concentrados en la parte cosechable de la planta; **b) fitoestabilización**, cuando éstos son inmovilizados en el suelo de manera que dejan de estar biodisponibles; **c) fitodegradación**, cuando los compuestos son degradados al completo por la planta o transformados en productos menos nocivos; **d) fitovolatilización**, que implica que los tóxicos se volatilizan desde la superficie foliar; **e) fitoestimulación**, cuando las plantas, mediante los exudados radicales,

influyen en la composición y características de los microorganismos del suelo, potenciando el crecimiento de aquéllos que degraden los xenobióticos.

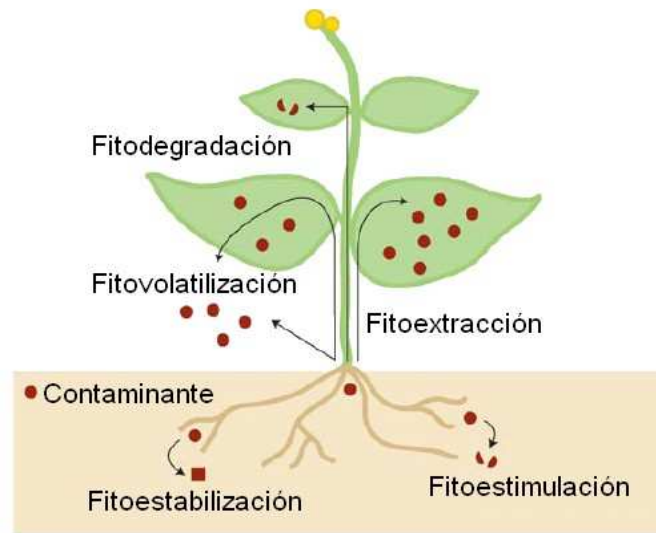


Figura 3. Procesos de transformación de los xenobióticos (representados por círculos) en fitorremediación (Pilon-Smits, 2005).

Entre las plantas señaladas como apropiadas para su uso potencial en fitorremediación se encuentran varias leguminosas (Dzantor *et al.*, 2000, Sriprang *et al.*, 2002). Por una parte, se ha propuesto abundantemente el uso de leguminosas y sus simbiontes para la descontaminación de metales y metaloides. Por ejemplo, se han realizado con éxito experimentos de fitoestabilización con *Lupinus albus* (Vazquez *et al.*, 2006), y *Lupinus luteus* (Dary *et al.*, 2010), en suelos contaminadas con lodos de pirita, se ha descrito la capacidad de la judía para acumular metales pesados (Meers *et al.*, 2007, Gupta *et al.*, 2007), notablemente plomo (Piechalak *et al.*, 2008) y extraer uranio de aguas contaminadas mediante rizofiltración (Lee y Yang, 2010), y también se ha documentado la potencialidad del trébol en la fitorremediación de suelos contaminados por cadmio (Ike *et al.*, 2007), de soja para el tratamiento de contaminación por arsénico (Reichman, 2007) y de veza para acumular zinc (Pečiulytė *et al.*, 2006). Por otra parte, también se ha descrito la capacidad de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa para degradar contaminantes orgánicos, así el empleo de *Lupinus angustifolius* puede disminuir la

toxicidad de pesticidas como triazinas, fenilureas, carbamatos y piretroides (Garcinuno *et al.*, 2003), *Vicia faba* y *Lupinus albus* son útiles en la recuperación de suelos de áreas desérticas contaminadas con petróleo (Radwan *et al.*, 2005, Dashti *et al.*, 2009), *Astragalus chrysopteru* puede usarse en la descontaminación de pentaclorofenol (Wei *et al.*, 2008) y *Medicago sativa* es capaz de degradar bifenilos policlorados (Xu *et al.*, 2010).

5. Herbicidas

En la actualidad la mayor parte de los contaminantes orgánicos son herbicidas (Dorigo *et al.*, 2007), pues la proporción de éstos en el conjunto total de pesticidas que se consumen se ha incrementado en las últimas décadas, pasando del 20% en 1960 al 48% en 2005 (Zhang *et al.*, 2011). El uso de herbicidas se ha intensificado porque el rendimiento de los cultivos agrícolas disminuye considerablemente por la proliferación de malezas, comúnmente denominadas malas hierbas, especies endémicas adaptadas al medio, muy competitivas y con gran facilidad para extenderse. En los sistemas de producción agraria intensivos actuales, los herbicidas constituyen el método más extendido para el control de malas hierbas, y además se utilizan no sólo en la agricultura, sino también para otros fines, desde el uso doméstico en jardines, hasta el mantenimiento de vías férreas libres de malezas, por ejemplo (Villeneuve *et al.*, 2011).

El primer herbicida orgánico sintético fue el 2,4-D, desarrollado durante la Segunda Guerra Mundial por un equipo británico de la Estación Experimental de Rothamsted con el objeto de aumentar el rendimiento de los cultivos. En 1946 fue lanzado comercialmente convirtiéndose en el primer herbicida selectivo exitoso para el control de malezas en cultivos de cereales (Peterson, 1967). A partir de entonces se empezaron a sintetizar una gran cantidad de herbicidas con diversos mecanismos de acción, intensificándose este proceso en las últimas décadas (Timmons, 2005).

5.1. Clasificación de los herbicidas

La gran variedad de compuestos utilizados como herbicidas puede clasificarse en función de diferentes criterios, como el tiempo y modo de aplicación, la selectividad de las especies diana, las propiedades químicas o el mecanismo de acción (Katerova y Miteva, 2010). Siguiendo esta última pauta, se han clasificado los herbicidas en una veintena de mecanismos de acción que se pueden agrupar por procesos fisiológicos afectados (Tabla 2):

- a) **Inhibidores de la fotosíntesis**, que afectan al fotosistema I, al II o a la biosíntesis de pigmentos. Entre ellos se encuentran los bupiridilos, como el

paraquat, que desvían el flujo de electrones del fotosistema I para generar radicales libres.

- b) **Inhibidores de la síntesis de lípidos**, que afectan a la enzima acetil-CoA-carboxilasa.
- c) **Inhibidores de la mitosis y división celular.**
- d) **Auxinas sintéticas**, como el 2,4-D, que en plantas sensibles causa efectos fisiológicos similares a los producidos por el ácido indol-3-acético (AIA).
- e) **Desacopladores de la fosforilación oxidativa.**
- f) **Inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos**, entre los que se encuentran los de la síntesis de glutamina, de los aminoácidos aromáticos, como es el caso del glifosato, o de los aminoácidos ramificados, como las imidazolinonas.
- g) **Otros.** Se podría considerar un último grupo en el que se encuentran los herbicidas que afectan a la síntesis de la pared celular, a la biosíntesis del ácido fólico, etc...

Tabla 2. Clasificación de los herbicidas según modo de acción. Adaptado de (Labrada *et al.*, 1994)

Función afectada	Modo de acción	Grupos químicos	Ejemplos
Fotosíntesis	Desvío del transporte electrónico en el Fotosistema I	Bipiridilos	Paraquat
	Inhibición del transporte electrónico en el Fotosistema II	Anilidas Nitrilos Triazinas Triazinonas Ureas Uracilos	Propanil Bromoxynil Atrazina Metribuzín Diurón Lenacil
	Inhibición de la síntesis de clorofila	Difenil éteres	Acifluorcén
	Bloqueo de la síntesis de carotenoides	Anilidas Piridazinonas	Diflufenicán Norflurazón
Crecimiento	Inhibición de la Síntesis de lípidos	Ésteres de ácidos ariloxi-fenoxi-alcanoicos	Diclofopmetil
		Ácidos haloalifáticos	Dalapón
		Oximas	Setoxydim
		Tiocarbamatos	EPTC
	Inhibición de la división celular	Amidas	Difenamida
		Carbamatos	Asulam
		Cloroacetanilidas Dinitroanilinas	Alaclor Pendimetalina
	Auxinas sintéticas	Ácidos arilcarboxílicos	Dicamba
		Ácidos ariloxialcanoicos	2,4-D, MCPA
		Ácidos quinolino-carboxílicos	Quinclorac
Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa	Nitrilos	Bromoxynil	
Inhibición de la síntesis de aminoácidos ramificados	Imidazolinonas	Imazamox	
	Sulfonilureas	Metsulfurón	
Inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos Inhibición de la síntesis de glutamina	Compuestos organofosforados	Glifosato	
		Glufosinato	
	Otros		

5.2. Herbicidas inhibidores de la actividad acetohidroxiácido sintasa

Entre los diversos procesos fisiológicos afectados por los herbicidas, la inhibición de la ruta biosintética de los aminoácidos ramificados y aromáticos es de gran interés. Estas rutas no están presentes en los animales, por lo que los compuestos que las tienen por diana presentan baja toxicidad para la fauna y son muy selectivos para las plantas, lo que además permite tasas de aplicación bajas (Tan *et al.*, 2006). Los herbicidas inhibidores de la ruta de aminoácidos de cadena ramificada son de los más utilizados en todo el mundo, debido a su amplio espectro de actividad de control de malezas, y actúan mediante la inhibición de la primera enzima común de esta vía biosintética, la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, EC 2.2.1.6).

Por las características anteriores, el uso de herbicidas inhibidores de la AHAS ha aumentado de forma constante desde su aparición en la década de los 80, así en 1994 había 30 herbicidas pertenecientes a este grupo en el mercado (Saari *et al.*, 1994), y hoy en día hay más de 50 (Zhou *et al.*, 2007). A pesar de las características nombradas, los inhibidores de la AHAS no son completamente inocuos, pueden producir cambios en la estructura de la comunidad microbiana de la rizosfera (Forlani *et al.*, 1995), algunos de estos herbicidas han mostrado fitotoxicidad residual en la rotación de cultivos (Matocha *et al.*, 2003), otros pueden filtrarse y llegar a las aguas superficiales o subterráneas, pudiendo alterar los ecosistemas acuáticos (Battaglin *et al.*, 2000). Además, han dado lugar a la aparición de un gran número especies resistentes, se contabilizan más de 100, lo que no sólo constituye una amenaza para su uso en el futuro, sino también para la producción agrícola sostenible (Tranel y Wright, 2002, Massa *et al.*, 2011).

Existen cinco clases principales de herbicidas, comercializados en varios países de todo el mundo, cuya diana es la enzima AHAS: sulfonilaminocarboniltriazolinonas, triazolopirimidinas, ácidos pirimidinilsalicílicos (también conocidos como ácidos pirimidiniloxibenzoicos y pirimidiniltiobenzoicos), sulfonilureas e imidazolinonas (McCourt y Duggleby, 2006). Los más populares son los pertenecientes a las dos últimas clases: las sulfonilureas, entre las que se incluyen, por ejemplo, el clorimuron etil, el clorsulfurón o el metsulfuron metil, y las imidazolinonas, de las que se hablará más extensamente.

5.2.1 Ruta de síntesis de los aminoácidos ramificados: valina, leucina e isoleucina

Los aminoácidos ramificados se caracterizan por presentar cadenas de hidrocarburos ramificadas, responsables del carácter alifático de estas moléculas. Como resultado de esta naturaleza alifática, muestran alta hidrofobicidad y se encuentran predominantemente en los dominios de las proteínas anclados a la

membrana (Binder, 2010). De los tres aminoácidos ramificados, la isoleucina (Ile) pertenece a la vía derivada del aspartato, mientras que la valina (Val) y la leucina (Leu) se derivan a partir de piruvato. Las plantas y los microorganismos sintetizan estos aminoácidos a través de una ruta común (Fig. 4).

Una característica de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada es que Val e Ile son sintetizados en dos vías paralelas. Un conjunto de cuatro enzimas catalizan las reacciones hacia la formación de estos aminoácidos con diferentes sustratos. Estas enzimas comunes son: acetohidroxiácido sintasa (AHAS, EC 4.1.3.18), cetoácido reductoisomerasa (KARI, EC 1.1.1.86), dihidroxiácido deshidratasa (DH, EC 4.2.1.9) y una aminotransferasa (AT, EC 2.6.1.42). Además, la treonina desaminasa (TD, EC 4.2.1.16), cataliza la desaminación y la deshidratación de treonina y esta reacción produce α -cetobutirato, uno de los sustratos iniciales para la síntesis de Ile. La ruta de síntesis de Leu parte del intermediario final de la biosíntesis de Val (Singh y Shaner, 1995, Singh, 1999a).

Se sabe que en plantas, los aminoácidos de cadena ramificada se sintetizan en los cloroplastos y son degradados en mitocondrias y/o peroxisomas (Ellerstrom *et al.*, 1992, Zybilov *et al.*, 2008). Aunque todas las actividades enzimáticas requeridas para la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada se han detectado en plantas, no todas las enzimas y genes implicados en la formación de estos aminoácidos han sido caracterizados en detalle (Binder, 2010).

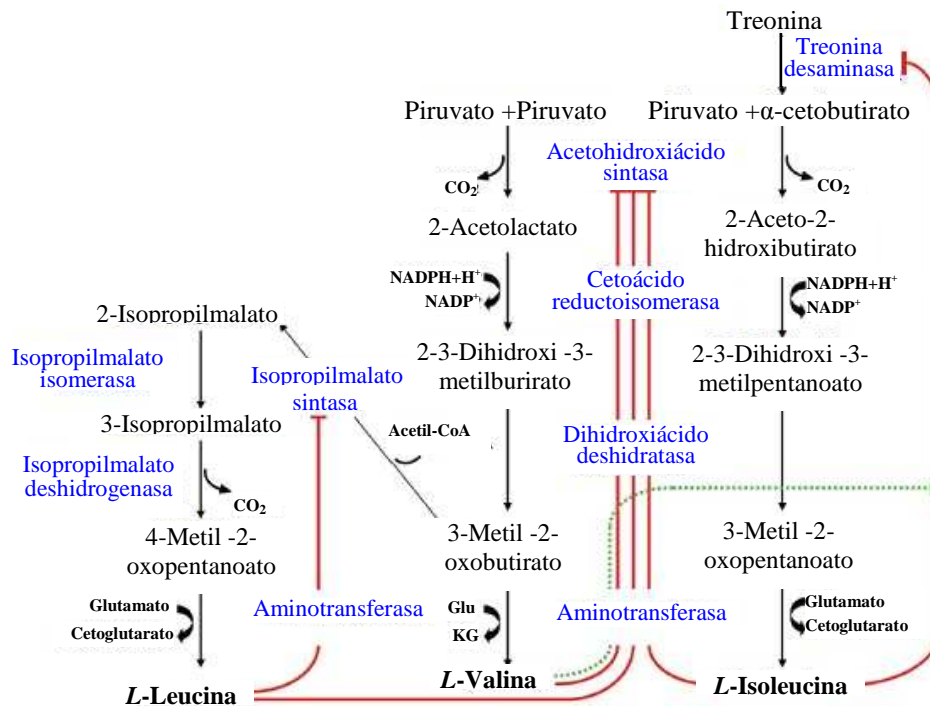


Figura 4. Ruta de síntesis de los aminoácidos ramificados. Binder (2010).

5.2.2 Actividad acetohidroxiácido sintasa

Han pasado más de 50 años desde el descubrimiento de la acetohidroxiácido sintasa (EC 4.1.3.18) y su papel en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Umbarger y Brown, 1958). Desde entonces ha habido un gran interés en esta enzima por ser, como se ha visto, la diana de un considerable número de herbicidas.

Es la primera enzima común en la ruta de biosíntesis de los aminoácidos ramificados, y cataliza la condensación de dos moléculas de piruvato para formar acetolactato (AL), en la rama principal de la ruta que lleva a la síntesis de valina y leucina, o una molécula de piruvato y una molécula de α -cetobutirato (KB) para formar acetohidroxiacetato (AHB) en la rama de la ruta que conduce a la síntesis de isoleucina (Umbarger y Brown, 1958, Radhakrishnan y Snell, 1960).

En la literatura a menudo se llama acetolactato sintasa a esta enzima, pero este nombre no es adecuado porque ignora el papel de la enzima en la síntesis de AHB. La nomenclatura acetohidroxiácido sintasa (AHAS) es más apropiada y el nombre acetolactato sintasa (ALS) debe ser reservado para una enzima diferente que produce solo AL (Gollop *et al.*, 1989, Chipman *et al.*, 1998, Duggleby *et al.*, 2008).

La reacción catalizada por esta enzima (Fig. 5), está mediada por el cofactor tiamina pirofosfato (TPP), e implica la descarboxilación del piruvato para producir CO_2 y la formación de un intermediario hidroxietil-TPP (HE-TPP) que se une con el segundo 2-cetoácido y finalmente se disocia para dar TPP y liberar el producto, AHB o AL (Tittmann *et al.*, 2003). La AHAS también requiere un ión metálico divalente, Mg^{2+} , que sirve para anclar el TPP al sitio activo de la enzima, y una molécula de flavín adenín dinucleótido (FAD) que no participa en la reacción (Duggleby, 2006).

El α -cetobutirato y el piruvato compiten por el intermediario, y se observa en la mayoría de las formas de AHAS, que existe una marcada preferencia por el primero. Esta preferencia se compensa por el hecho de que las concentraciones intracelulares de piruvato son notablemente mayores, resultando en flujos similares las dos ramas de la vía (Duggleby *et al.*, 2008).

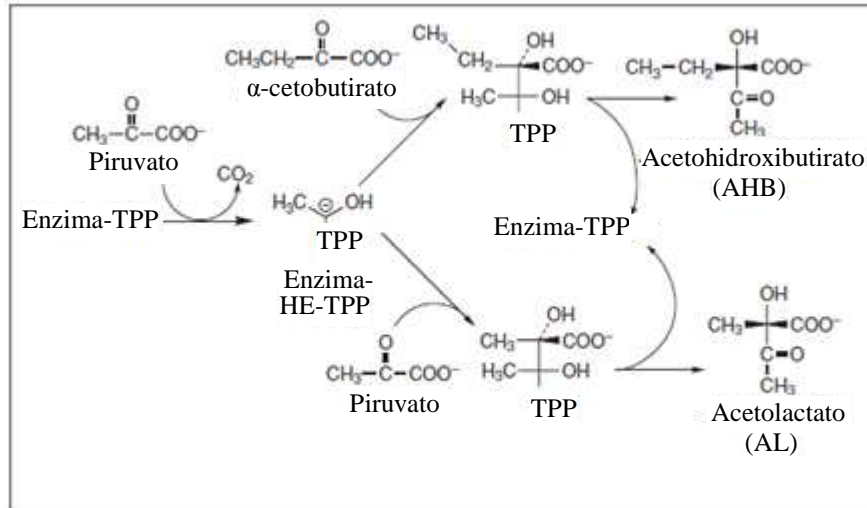


Figura 5. Reacciones catalizadas por la enzima acetohidroxilasa (AHAS). Fuente: Chipman *et al.* (2005).

La enzima se compone de dos tipos de subunidades, una contiene el TPP, se designa como la subunidad catalítica, y tiene una masa molecular en el rango de los 59 a 66 kDa. La segunda subunidad aumenta la actividad de la subunidad catalítica y es necesaria para la regulación por retroalimentación mediante la inhibición por uno o varios de los aminoácidos ramificados (Eoyang y Silverman, 1984, Weinstock *et al.*, 1992, Vyazmensky *et al.*, 1996), por lo que está designada como la subunidad reguladora. Su masa molecular varía mucho entre especies, en bacterias es por lo general bastante pequeña, entre 10 y 20 kDa, y en plantas es de más de 50 kDa (Lee y Duggleby, 2001). Generalmente se presenta como un dímero, formado por pares de subunidades catalíticas, que contiene dos sitios activos en la interfase entre dos monómeros (Chipman *et al.*, 2005). En plantas se ha caracterizado la AHAS de *Arabidopsis thaliana* y se ha descrito que cristaliza como un tetrámero (McCourt *et al.*, 2006). Cada monómero se compone de tres dominios; α , β , y γ . La enzima también presenta una cola C-terminal (Pang *et al.*, 2004).

Størmer y Umbarger (1964) fueron los primeros en aislar la AHAS de *S. typhimurium* y con el tiempo se han identificado tres isoenzimas en enterobacterias AHASI, AHASII, y AHASIII (Guardiola *et al.*, 1974, Grimminger y Umbarger, 1979). Las isoenzimas difieren unas de otras en términos de sus propiedades

cinéticas, especificidad de sustrato, sensibilidad a la inhibición por el producto final y el tamaño de la subunidad reguladora.

La existencia de varias isoenzimas en enterobacterias les permite hacer frente a condiciones ambientales variables. Bajo condiciones de crecimiento normales, la concentración celular de piruvato es mucho mayor que la de KB. La AHASI, que tiene poca preferencia para cualquiera de los sustratos (Barak *et al.*, 1987), es la isoenzima más útil para la célula en condiciones de baja concentración de piruvato (Dailey y Cronan, 1986), ya que es capaz de mantener la síntesis de valina y leucina. Las isoenzimas AHASII AHASIII presentan mucha mayor afinidad por el KB, y juegan un papel importante en la síntesis de isoleucina. Sin embargo, la AHASII, a diferencia de las otras dos isoenzimas, requiere absolutamente la presencia de la subunidad reguladora para la catálisis (Hill *et al.*, 1997) y es completamente insensible a la inhibición por retroalimentación por cualquiera de los aminoácidos ramificados (Lawther *et al.*, 1987). De esta manera, en presencia de exceso de valina, que inhibe la AHASIII pero no la AHASII, esta última impide la muerte celular por falta de isoleucina.

Parece que en plantas existe una única isoforma de AHAS que es codificada en el núcleo y contiene un péptido señal en el N-terminal que la dirige al cloroplasto, donde el péptido de tránsito se escinde para dar la proteína madura (McCourt y Duggleby, 2006).

En bacterias la AHAS, cuando está presente como una sola isoforma (AHASI), está codificada por el gen *ilvBN* y las isoenzimas AHASII, y AHASIII están codificadas por los genes *ilvGM* y *ilvIH*, respectivamente. Las plantas varían entre tener desde un único alelo (*A. thaliana* y *Xanthium sp.*), dos copias de AHAS (*N. tabacum* y *Z. mays*) o hasta familias complejas de genes (*B. napus*) (Duggleby y Pang, 2000). En las plantas que tienen más de un gen que codifica AHAS, se ha descrito que estas isoformas no tienen necesariamente diferentes propiedades enzimáticas y funciones fisiológicas, como las isoenzimas bacterianas, sino que más bien parece que esas plantas son aloploidos, con genes derivados de diferentes especies progenitoras (Fang *et al.*, 1992).

En todas las especies de plantas examinadas, al menos un gen de AHAS se expresa de manera constitutiva, a pesar de que el nivel de expresión puede variar entre tejidos y etapas de desarrollo (Duggleby y Pang, 2000). El nivel más alto de transcripción y actividad de AHAS se encuentra en los tejidos meristemáticos metabólicamente activos (Keeler *et al.*, 1993).

La AHAS de todas las especies estudiadas se regula por sus productos finales. Para la AHAS bacteriana esta regulación está mediada principalmente y, por lo general, únicamente, por valina. La enzima de plantas se inhibe por cada uno de los aminoácidos de cadena ramificada con una potencia similar, pudiendo la

leucina actuar sinérgicamente con valina o isoleucina, aunque no se ha descrito sinergia entre valina e isoleucina. Se sugiere que hay dos sitios de unión distintos, uno para leucina y otro para valina o isoleucina, en la subunidad reguladora de AHAS de *A. thaliana* (Duggleby, 2006).

Parece ser que la inhibición de AHAS por los aminoácidos ramificados es incompleta, de modo que incluso a concentraciones de saturación de estos aminoácidos, la actividad se mantiene residualmente. Esta última observación puede indicar que los aminoácidos ramificados se unen a la subunidad reguladora y actúan para alterar la conformación de la subunidad catalítica, de modo que la enzima tiene una actividad específica más baja (Chipman *et al.*, 2005).

La inhibición de la AHAS de plantas por sulfonilureas e imidazolinonas es compleja, debido en parte a que es dependiente del tiempo. Hay una inhibición inicial débil que se convierte en progresivamente más fuerte. Se cree que la unión del herbicida induce un daño progresivo al cofactor TPP cuando tiene lugar la catálisis, lo que explica por qué la inhibición es dependiente del tiempo. La actividad puede ser regenerada, al menos parcialmente, si las condiciones permiten la sustitución del cofactor dañado con TPP nuevo (Duggleby *et al.*, 2008). Por otra parte, la inhibición por estos herbicidas es no competitiva (Chang y Duggleby, 1997) en el sentido de que no compiten con el sustrato, sino que se unen al canal de acceso del sustrato, bloqueando su acceso al sitio activo (McCourt *et al.*, 2006). Si la inhibición por los herbicidas es reversible o no continúa siendo polémico (Chipman *et al.*, 2005).

En la actualidad hay más plantas resistentes a los inhibidores de AHAS que a cualquier otra clase de herbicidas y las cifras van en aumento (Tranel y Wright, 2002), lo que supone un problema mundial. Una de las razones de este alto nivel de tolerancia es que la resistencia se transmite por un único gen dominante codificado en el núcleo (Newhouse *et al.*, 1991) que, a nivel molecular, generalmente resulta en el cambio de un único aminoácido (Tranel y Wright, 2002).

5.2.3 Efectos fisiológicos de los herbicidas inhibidores de la AHAS

Los mecanismos precisos que relacionan la inhibición de la enzima AHAS con la muerte de la planta, no han sido completamente dilucidados todavía. Se conoce que estos herbicidas actúan de forma lenta, los síntomas visuales tales como detención del crecimiento (Shaner, 1991, Royuela *et al.*, 2000), acumulación de antocianinas (Suttle y Schreiner, 1982), clorosis de la hoja y necrosis de las áreas meristemáticas (Blair y Martin, 1988), generalmente no aparecen hasta pasados varios días tras la aplicación del herbicida, por lo que la muerte de toda la planta puede llevar varias semanas.

La consecuencia directa de la inhibición de la AHAS es una reducción de los contenidos de aminoácidos ramificados (Scarponi *et al.*, 2001, Trenkamp *et al.*,

2009) y un incremento de los aminoácidos libres totales (Shaner y Reider, 1986, Scarponi *et al.*, 1995, Scarponi *et al.*, 1997, Sidari *et al.*, 1998). Este incremento se ha asociado al aumento de la tasa de renovación de proteínas, para mantener, mediante la degradación de proteínas pre-existentes, el nivel de aminoácidos ramificados que se requiere en la síntesis de proteínas nuevas, necesarias para el metabolismo (Rhodes *et al.*, 1987). También se ha descrito un decremento del nivel de proteínas soluble (Devine, 1989, Shaner y Singh, 1997), aunque debido al mencionado aumento de la proteólisis, este parámetro no siempre se ve afectado (Wittenbach y Abell, 1999, Royuela *et al.*, 2000). Por lo expuesto anteriormente, se produce una modificación de las proporciones de los aminoácidos, que no sólo afecta a los aminoácidos ramificados, ya que se ha establecido una relación entre las rutas biosintéticas de éstos y los aminoácidos aromáticos (Orcaray *et al.*, 2010) y con otras rutas metabólicas (Binder *et al.*, 2007, Joshi *et al.*, 2010).

Se han descrito otros efectos en plantas tratadas con esta clase de herbicidas: **a)** acumulación de α -cetobutirato (KB), o del producto de su transaminación, α -aminobutirato (AB) (Larossa y Vandyk, 1987, Larossa *et al.*, 1987, Rhodes *et al.*, 1987); **b)** inhibición de la mitosis y de la síntesis de ADN, (Rost, 1984); **c)** acumulación de carbohidratos, tanto en hoja (Shaner y Reider, 1986, Chao *et al.*, 1994, Bestman *et al.*, 1990), como en raíz (Royuela *et al.*, 2000, Zabalza *et al.*, 2004, Zabalza *et al.*, 2011); **d)** Estimulación del metabolismo fermentativo en raíz (Gaston *et al.*, 2002, Zabalza *et al.*, 2005) y un incremento de la oxidasa alternativa (Aubert *et al.*, 1997, Gaston *et al.*, 2003); **e)** alteraciones fotosintéticas, tales como reducción de los pigmentos (Riethmuller-Haage *et al.*, 2006), disminución de la fluorescencia de las clorofilas (Percival y Baker, 1991), y descenso de la tasa de fotosíntesis neta (Zabalza *et al.*, 2004); **f)** inhibición de la absorción y reducción de nitrato (Scarponi *et al.*, 1997, Keutgen *et al.*, 2000, Zabalza *et al.*, 2006), de la asimilación de amonio (Scarponi *et al.*, 1995, Scarponi *et al.*, 1997, Holmes *et al.*, 2006), y de la inhibición de la fijación de nitrógeno en las plantas simbióticas (Martensson y Nilsson, 1989, Sawicka *et al.*, 1996, Royuela *et al.*, 2000); **g)** acumulación de quinato (Orcaray *et al.*, 2010), de GABA (Zabalza *et al.*, 2011) y putrescina (Giardina y Carosi, 1990, Zabalza *et al.*, 2011).

Se ha especulado sobre si la acumulación de KB o AB que se produce en plantas (Rhodes *et al.*, 1987) es dañina o no (Rost *et al.*, 1990), tras demostrarse que es tóxica para bacterias (Larossa *et al.*, 1987). Sin embargo, Shaner y Singh (1993) demostraron que la fitotoxicidad provocada por el herbicida imazaquin no era debida a la acumulación de estos productos intermediarios, y que estos compuestos no son tóxicos para las plantas.

No está claro si la inhibición de la división celular (Rost, 1984) es una consecuencia directa de la inhibición de la AHAS, aunque parece que este efecto es independiente del nivel de aminoácidos ramificados de la célula (Rost *et al.*, 1990).

Se ha sugerido que está relacionada con una alteración del conjunto de metabolitos intermedios (Gaston *et al.*, 2002), o de los niveles de ATP tras la inhibición de la AHAS (Zabalza *et al.*, 2004).

Con respecto a la acumulación de carbohidratos en hoja (Shaner y Reider, 1986, Chao *et al.*, 1994, Bestman *et al.*, 1990), se ha explicado como la consecuencia de un decrecimiento de la translocación de fotoasimilados a los órganos sumidero, (Devine, 1989, Bestman *et al.*, 1990), provocada por un fallo en la carga del floema (Chao *et al.*, 1994, Kim y VandenBorn, 1996), lo que sería parte del mecanismo de letalidad del herbicida, ya que esto provocaría la detención del crecimiento, por falta de carbono en los tejidos meristemáticos (Shaner, 1991, Bestman *et al.*, 1990, Kim y VandenBorn, 1997). Sin embargo, se demostró que la acumulación de carbohidratos en hoja no es la causa de la inhibición del crecimiento de la raíz, puesto que la acumulación de azúcares solubles en raíz precede a la de almidón en hoja (Royuela *et al.*, 2000, Gaston *et al.*, 2002). Se ha sugerido que la inhibición de la división celular (Rost, 1984), o una alteración en el metabolismo carbonado de la raíz, reduce la utilización de carbohidratos, de forma que la sacarosa es transportada desde las hojas a las raíces a una velocidad superior de lo que los sumideros son capaces de usarla y, bajo estas condiciones, el gradiente de azúcares que se requiere para el transporte a larga distancia es abolido y la carga del floema se desequilibra (Zabalza *et al.*, 2004).

El aumento del metabolismo fermentativo detectado en raíces de plantas tratadas con estos herbicidas (Gaston *et al.*, 2002), viene dado por un incremento de las actividades piruvato descarboxilasa (PDC), alcohol deshidrogenasa (ADH), lactato deshidrogenasa (LDH) y alanina aminotransferasa (AlaAT) (Zabalza *et al.*, 2005). Se han propuesto varias explicaciones, no excluyentes entre sí, para esta inducción de la fermentación, pudiendo estar relacionada con: **a)** un aumento de la disponibilidad de piruvato, el sustrato común de la PDC y la AHAS (Zabalza *et al.*, 2005); **b)** una disminución de la disponibilidad de oxígeno, provocada por el engrosamiento de las raíces tratadas con esta clase de herbicidas, una modificación morfológica que podría conducir a un deterioro en la capacidad de absorción de oxígeno de la solución circundante (Zabalza *et al.*, 2011); **c)** también se ha sugerido que la fermentación puede ser considerada como una respuesta fisiológica general al estrés (Orcaray *et al.*, 2012).

Las actividades fermentativas son responsables de la síntesis de acetaldehído, etanol y lactato, que pueden ser tóxicos para las plantas, por tanto podrían estar involucrados en la inhibición del crecimiento y la muerte de la planta (Zabalza *et al.*, 2011). También el aumento de la vía de la oxidasa alternativa (Aubert *et al.*, 1997, Gaston *et al.*, 2003) podría estar relacionado con el proceso de la muerte. Sin embargo, no está claro si esto es así o, por el contrario ambos

procesos son parte de los mecanismos de la respuesta adaptativa de la planta a la inhibición de la AHAS (Orcaray *et al.*, 2012).

La reducción de la fotosíntesis observada en algunos casos (Percival y Baker, 1991, Zabalza *et al.*, 2004, Riethmuller-Haage *et al.*, 2006), se considera una respuesta secundaria de la inhibición de la AHAS, y se ha propuesto que está mediada por un cierre de los estomas, y/o bien es una respuesta al alto contenido de carbohidratos acumulado en las hojas (Zabalza *et al.*, 2004). Por otra parte, la inhibición de la absorción y reducción de nitrato, de asimilación de amonio, y de la fijación de nitrógeno de plantas simbióticas detectada en algunos estudios (Martensson y Nilsson, 1989, Scarponi *et al.*, 1995, Sawicka *et al.*, 1996, Scarponi *et al.*, 1997, Keutgen *et al.*, 2000, Royuela *et al.*, 2000, Holmes *et al.*, 2006, Zabalza *et al.*, 2006), se ha relacionado con el cese del crecimiento de la planta, que puede resultar en una menor demanda de nitrógeno, lo que provoca una regulación a la baja de estos procesos (Hartwig y Trommler, 2001, Zabalza *et al.*, 2006, Holmes *et al.*, 2006).

Por lo tanto, parece que la detención del crecimiento inducida por la inhibición de la AHAS, puede ser debida a cambios en las proporciones relativas de los contenidos de aminoácidos libres. Ambas cosas provocan un desequilibrio en el metabolismo del carbono/nitrógeno, que está relacionado con el proceso de muerte de la planta (Orcaray *et al.*, 2012). No está claro cual puede ser el papel que juega la concentración de metabolitos como el etanol (Zabalza *et al.*, 2005), el quinato (Orcaray *et al.*, 2010), la putrescina o el GABA (Zabalza *et al.*, 2011), u otros que posiblemente se acumulen. En cualquier caso, probablemente varios de los factores mencionados interaccionan entre sí para producir la muerte de la planta.

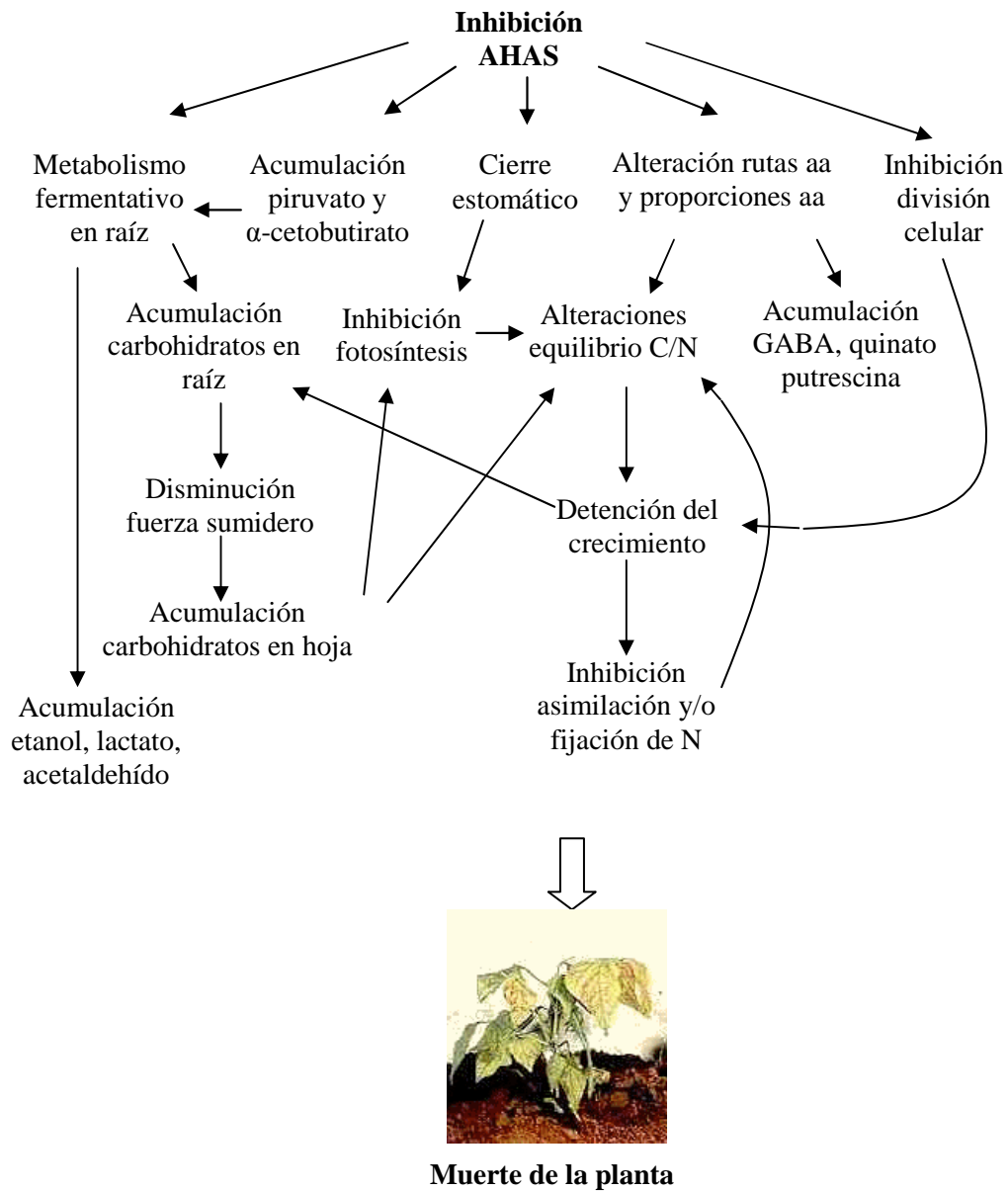


Figura 6. Consecuencias fisiológicas derivadas de la aplicación de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS en plantas. Elaboración propia a partir de lo descrito en bibliografía.

5.2.4. Imidazolinonas

Las imidazolinonas fueron creadas en la década de 1980 por el Dr. Marinus Los (Los, 1984), en los laboratorios de American Cyanamid Company, en Princeton, New Jersey (EE.UU), actualmente BASF Corporation. Sin embargo, no fueron desarrolladas específicamente para inhibir la AHAS, ya que no fue hasta pasados dos años de la introducción del imazaquin, la primera imidazolinona comercial (Scepter®), cuando se demostró que estos herbicidas actúan por inhibición de esta enzima (Shaner *et al.*, 1984).

Todas las imidazolinonas presentan en su estructura molecular un anillo imidazol con un grupo metilo, y una segunda estructura cíclica, generalmente un anillo aromático carboxilado, que puede variar (Duggleby *et al.*, 2008). En el caso del imazetapir, imazapir, imazapic e imazamox se trata de un anillo pirimidínico, distinguiéndose entre ellas únicamente por el sustituyente del C5 de ese anillo (Fig. 7). El anillo imidazol y la segunda estructura cíclica juegan un papel importante en la inhibición de la AHAS, mientras que los diferentes grupos funcionales del anillo pirimidínico se relacionan con otras características del herbicida como su metabolismo en plantas (Tan *et al.*, 2005).

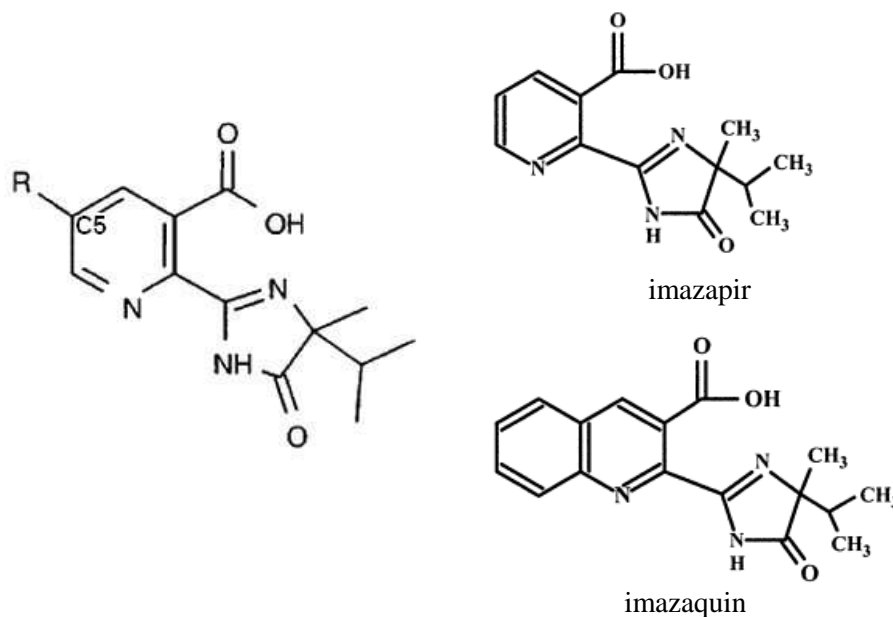


Figura 7. Estructura general de una imidazolinona con anillo pirimidínico (izquierda) y ejemplos (derecha). Adaptado de Duggleby *et al.* (2008).

Existen pocos trabajos sobre la detoxificación de estos herbicidas en plantas. Se piensa que la vía de detoxificación más común se puede producir por

desalquilación, hidroxilación del anillo, conjugación con glucosa, o escisión del anillo (Shaner y Singh, 1997). Aunque se han descrito variaciones entre rutas de degradación de imidazolinonas, en función de las diferencias en la lipofilidad (Teclé *et al.*, 1993). También se han relacionado las enzimas P450 y glutatión-S-transferasas con la tolerancia a esta clase de herbicidas (Holmes *et al.*, 2006, Kaspar *et al.*, 2011).

En los últimos años se ha hecho popular desarrollar cultivos resistentes a las imidazolinonas, en lugar de seleccionar el herbicida para adaptarse a la cosecha (Teclé *et al.*, 1993), así, se han desarrollado cultivos de arroz, colza, maíz, trigo y girasol tolerantes a las imidazolinonas, denominados Clearfield® y patentados por BASF Corporation (Tan *et al.*, 2005).

El **imazamox** (C₁₅H₁₉O₄N₃), pertenece al grupo de las imidazolinonas y presenta un sustituyente metoximetil (CH₃-O-CH₂) en el C5 del anillo pirimidínico (Fig. 8). Es un herbicida utilizado en cultivos de alfalfa, guisante, soja, judía, cacahuete, girasol y maíz, entre otros. Se comercializa con varios nombres: Beyond, Raptor, Clearcast y Pulsar 40.

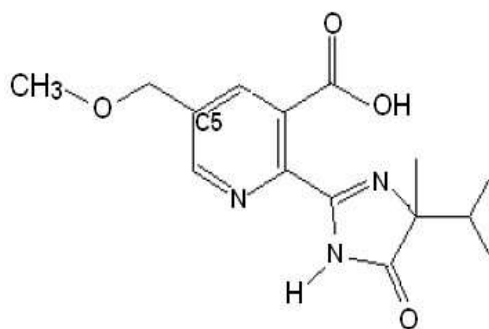


Figura 8. Estructura del herbicida imazamox. McCourt y Duggleby (2006).

Se trata de un compuesto relativamente polar, de baja lipofilidad y de carga negativa, que adquiere a pH mayores de 6, ya que se trata de un ácido débil. Estas propiedades determinan su adsorción débil al suelo, lo que facilita su dispersión y difusión, y su facilidad para ser absorbido por las raíces, siendo lo bastante hidrofóbico como para moverse a través de la bicapa lipídica de las membranas, pero suficientemente soluble en agua como para moverse por la vía simplasto o apoplasto (Aichele y Penner, 2005, Cedergreen *et al.*, 2005). El imazamox no está clasificado como fácilmente biodegradable y es estable a la hidrólisis, pero susceptible a la fotólisis (Safarpour *et al.*, 2004).

6. Leguminosas

La familia de las leguminosas presenta cerca de 750 géneros y es la tercera familia con mayor número de especies, cerca de 20000. Se divide en tres subfamilias: *Mimosoideae*, y *Cesalpinoideae*, representadas ambas por árboles y arbustos tropicales y subtropicales, y *Papilionaceae*, que incluye especies arbóreas, arbustivas y herbáceas, entre las que encontramos la mayoría de especies cultivables (aproximadamente un 8-9% del total). Se trata de una familia cosmopolita en la que una amplia variedad de estrategias adoptadas ha permitido a sus especies adaptarse a las condiciones ecológicas más diversas. Sus representantes se pueden encontrar en los trópicos o en zonas templadas, incluso en zonas áridas o en altas latitudes (Maxted y Bennett, 2001).

Algunas especies se utilizan como plantas ornamentales y otras se emplean en la industria, obteniéndose de ellas productos tales como madera, medicamentos, taninos, resinas o colorantes, pero fundamentalmente tienen interés agronómico. En la actualidad, las leguminosas representan el segundo cultivo más extendido en la agricultura mundial después de los cereales (Gepts *et al.*, 2005). Ambas familias han sido la base principal de la alimentación de la mayoría de culturas durante milenios, complementándose las propiedades nutritivas de ambas. El cultivo de leguminosas se remonta al Neolítico, coincidiendo con el nacimiento de la agricultura, pues se han hallado en Oriente Próximo restos fósiles de semillas de lentejas y guisantes de más de ocho mil años de antigüedad, y también se conoce su uso desde antiguo en América, norte de Asia y norte de África (Kaplan, 2008).

Las leguminosas cultivadas se pueden clasificar en dos grupos atendiendo a su uso: forrajeras y de grano. Las leguminosas forrajeras son aquellas que se aprovechan por sus hojas y tallos mediante corte o pastoreo, como es el caso de las forrajeras alfalfa, trébol o veza (Doyle y Luckow, 2003). Las leguminosas grano son aquellas especies cuya principal utilidad económica reside en las semillas, entre las especies que más se utilizan para el consumo humano se pueden citar, entre otras, el guisante (*Pisum sativum* L.), el garbanzo (*Cicer arietinum*), la judía (*Phaseolus vulgaris* L.), el haba (*Vicia faba*), la soja (*Glycine max*) y la lenteja (*Lens culinaris*) (Graham y Vance, 2003).

Su importancia radica en que constituyen una fuente de proteínas de calidad para la alimentación animal y humana, además contienen fitoestrógenos, como los flavonoides, o los isoflavonoides, que pueden tener efectos beneficiosos sobre la salud (Lee *et al.*, 2008, Velazquez *et al.*, 2010). Estas características resultan fundamentales en un mundo con ochocientos cincuenta millones de personas subalimentadas, según datos de la FAO (2008), y una presión demográfica creciente, además, en un escenario de cambio global como el actual, se hace necesario realizar un esfuerzo por disminuir el gasto de recursos. Sustituir en la dieta humana parte de la proteína animal que se consume actualmente por proteína vegetal, contribuiría a aliviar la demanda de tierras cultivables, agua y

energía (Smil, 2002, Pimentel y Pimentel, 2003), y ayudaría a reducir problemas de salud (Ferguson *et al.*, 2002, Johnson y Choi, 2012), y los problemas ambientales derivados de la enorme cantidad de residuos ganaderos que se producen en la actualidad (Mawdsley *et al.*, 1995, Martinez *et al.*, 2009).

Una característica de gran interés de las leguminosas es su facultad para establecer simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. Como resultado de esta simbiosis, en las raíces de las leguminosas se forman unas estructuras denominadas nódulos, en cuyo interior las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico, valiéndose de un complejo enzimático clave, la nitrogenasa (Igarashi y Seefeldt, 2003). Los nódulos bacterianos pueden ser de dos tipos: nódulos determinados, formados en leguminosas de origen tropical como soja o judía, y nódulos indeterminados formados en leguminosas de origen subtropical y templado como guisante o veza. Las diferencias radican en la presencia o no de meristemo apical, en la forma, en la organización histológica y anatómica, en la vía de asimilación del amonio y en el tipo de metabolitos nitrogenados que exportan (Sprent y James, 2007).

Esta facultad de las leguminosas para asociarse con *Rhizobium* las hace menos dependientes de abonos nitrogenados (Broughton *et al.*, 2003), esto permite ahorrar la energía necesaria para la producción, el transporte y la aplicación de dichos fertilizantes, así como las emisiones de dióxido de carbono asociadas, de hecho, se calcula que se utiliza entre el 35% y el 60% menos de energía fósil que en los cultivos en los que se usan fertilizantes, y la inclusión de leguminosas en la rotación de cultivos, reduce el consumo medio anual de energía entre el 12% y el 34% (Jensen *et al.*, 2012). Otra ventaja es que, al utilizarse menor cantidad de abonos nitrogenados, se evita la acumulación de nitratos, que corren el riesgo de ser lixiviados y contaminar las aguas, lo que puede derivar en un problema de salud pública (Du *et al.*, 2007).

Las leguminosas favorecen, por tanto, un estado de fertilización natural del suelo mejorando su calidad, y ayudando a preservar la diversidad de la microflora del ecosistema edáfico (Peoples *et al.*, 2009). Además, los rizobios estimulan la simbiosis de estas plantas con otros microorganismos beneficiosos de la rizosfera, tales como los hongos formadores de micorrizas, que facilitan la captación de agua y nutrientes, lo que favorece la productividad agrícola (Barea *et al.*, 2002). Por otra parte, mediante el uso de leguminosas se pueden recuperar para la agricultura zonas marginales, ya que son capaces de tolerar y adaptarse a diferentes estreses abióticos y bióticos, lo que permite su uso en zonas castigadas por prácticas agrícolas abusivas o inadecuadas, que han provocado en los suelos cierto grado de salinización, desertificación o contaminación por insumos químicos (Dimkpa *et al.*, 2009).

6.1. Leguminosas y herbicidas

Las leguminosas presentan diferente sensibilidad a los herbicidas, fundamentalmente en función de la especie, pero también dependiendo de la clase de compuesto empleado, el tipo y momento de la aplicación, la dosis y duración de la exposición, así como la edad de las plantas (Abd-Alla *et al.*, 2000). En los cultivos de leguminosas se utilizan diferentes herbicidas para controlar las malezas, por lo que, presumiblemente, presentan tolerancia a éstos. En la tabla 3 se recogen los principales herbicidas recomendados en España para su uso en cultivos de leguminosas, entre los que se incluyen inhibidores de la biosíntesis de ácidos alifáticos, de la biosíntesis de carotenoides, o de la enzima AHAS.

Tabla 3. Herbicidas autorizados en España para el cultivo de leguminosas.

Cultivo	Herbicida
Garbanzo	quizalofop-p-etil
Guisante proteaginoso	tepraloxidim
Guisante grano	bentazona, cicloxidim, diclofop, prosulfocarb, quizalofop-p-etil, quizalofop-p-tefuril, trialato, imazamox + pendimetalina
Guisante verde	cicloxidim, clomazona, diclofop, pendimetalina, imazamox + pendimetalina
Habas grano	cicloxidim, diclofop, glifosato, trialato
Habas verdes	cicloxidim, diclofop, glifosato, linuron
Judía verde	cicloxidim, clomazona, quizalofop-p-tefuril
Judía grano	bentazona, cicloxidim, etalfluralina, prosulfocarb, quizalofop-p-etil, quizalofop-p-tefuril, trialato
Otras leguminosas grano	aclonifen, cletodim, fluazifop-p-butil, propaquizafop
Lenteja	benfluralina, cicloxidim, diclofop, quizalofop-p-etil, quizalofop-p-tefuril, trialato
Soja	bentazona, cicloxidim, etalfluralina, oxadiazon, pendimetalina, quizalofop-p-tefuril
Veza	quizalofop-p-etil

Fuente: Centro de Protección Vegetal (2010)

Por otra parte, en la bibliografía se ha descrito que el uso de herbicidas puede provocar efectos tóxicos en las leguminosas, afectando al establecimiento de la simbiosis y a la fijación biológica de nitrógeno (Zaidi *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007). Esto se debe a la interferencia del herbicida en el metabolismo del microsimbionte, de la planta hospedadora o de ambos cuando se encuentran en simbiosis (Arruda *et al.*, 2001). El mayor daño ocurre cuando estos compuestos alteran la síntesis de aminoácidos u otras rutas metabólicas comunes a microorganismos y plantas (Santos *et al.*, 2006).

Con respecto a los inhibidores de la AHAS, se ha documentado la tolerancia de varias especies de leguminosas a estos herbicidas (Bauer *et al.*, 1995, Baerg y Barrett, 1996, Gonzalez *et al.*, 1999, Alonso-Prados *et al.*, 2002, Tan *et al.*, 2005, Hekmat *et al.*, 2008). Pero también se han descritos efectos nocivos en el crecimiento (Blackshaw y Saindon, 1996, Gaston *et al.*, 2002, Ulbrich *et al.*, 2005, Bohm *et al.*, 2009, Grichar y Ocumpaugh, 2009) y en el establecimiento de la simbiosis y el proceso de fijación de nitrógeno (Martensson y Nilsson, 1989, Royuela *et al.*, 2000, Anderson *et al.*, 2004, Drew *et al.*, 2007)

6.2. *Phaseolus vulgaris*

La judía es una especie de origen americano, cuestión puesta de manifiesto por diversos hallazgos arqueológicos y por evidencias botánicas e históricas. Los indicios más antiguos de cultivo datan del año 5000 a.C (Gepts, 1990). La introducción en España y posterior difusión al resto de Europa tuvo lugar en las expediciones de comienzos del siglo XVI.

Pertenece a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionaceae*, su nombre científico es *Phaseolus vulgaris* L. y es la especie de *Phaseolus* más extensamente cultivada, entre las cerca de 50 que se conocen (Martinez-Romero, 2003). Es una planta anual, de crecimiento rápido, con un sistema radicular muy ligero y poco profundo que está constituido por una raíz principal y gran número de raíces secundarias, con elevado grado de ramificación. Posee un tallo principal herbáceo que en variedades enanas presenta un porte erguido y una altura aproximada de 30 a 40 centímetros, mientras que en las judías de enrame alcanza una altura de 2 a 3 metros, siendo voluble y dextrógiro (se enrolla alrededor de un soporte o tutor en sentido contrario a las agujas del reloj). La hoja es un trifolio, de foliolos lanceolados y acuminados, de tamaño variable según la variedad, y la flor puede presentar diversos colores, únicos para cada variedad, aunque en las variedades más importantes la flor es blanca. Las flores se presentan en racimos en número de 4 a 8, cuyos pedúnculos nacen en las axilas de las hojas o en las terminales de algunos tallos. El fruto es una legumbre de color, forma y dimensiones variables, en cuyo interior se disponen de 4 a 6 semillas. Existen frutos de color verde, amarillo jaspeado o rojo sobre verde, etc., aunque los más demandados por el

consumidor son los verdes y amarillos con forma tanto cilíndrica como acintada (Singh, 1999b). Establece simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, siendo *R. etli* la especie predominante en los nódulos judía, aunque se han encontrado muchas otras especies en las regiones donde la judía se ha introducido, tales como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. gallicum* bv. *phaseoli* y *R. giardinii* bv. *Phaseoli* o *R. tropici*, que se adaptan bien a suelos ácidos y altas temperaturas. El gran número de especies de rizobios capaz de nodular judía supone que esta especie es un hospedador promiscuo y existen diversidad de interacciones judía-rizobio (Martinez-Romero, 2003).

El cultivo de la judía en grano es considerado como un cultivo extensivo, mientras que la judía verde se considera netamente hortícola. La superficie dedicada al cultivo de la judía en grano se ha reducido en los últimos años (debido a los cambios alimenticios de la sociedad y a su importación); los rendimientos se han mantenido prácticamente constantes, ya que la producción total ha aumentado considerablemente. En el caso de la judía verde, la reducción de superficie es también apreciable, pero mucho menos importante cuantitativamente. La judía es una leguminosa con grandes posibilidades para la alimentación humana, por su doble aprovechamiento (de grano y de vaina) y por su aporte proteico, además una parte de su producción se comercializa congelada y en conserva. Los países importadores de las cosechas españolas de judía verde son: Francia, Alemania, Suiza y Reino Unido (Nadal *et al.*, 2004a).

6.3. *Vicia sativa*

La veza es originaria del centro y sur de Europa y del área mediterránea. Ha sido parte de la dieta humana desde el Neolítico, aunque las evidencias de cultivo no aparecen hasta la Antigua Roma (Zohary y Hopf, 2000). En la Península Ibérica aparece espontáneamente en casi todo el territorio. Actualmente también se distribuye por América del Norte y Australia.

Pertenece a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionaceae* y su nombre científico es *Vicia sativa* L. Algunos consideran que engloba un cierto número de subespecies como *segetalis*, *angustifolia* o *cordata*, mientras que otros elevan éstas al rango de especies. Es una planta herbácea anual, que desarrolla una raíz ramificada que es capaz de profundizar. Sus tallos son trepadores y pueden alcanzar de 30 a 80 centímetros de altura. Las hojas son paripinnadas, de 1 a 8 pares de folíolos, pecioladas y con estípulas lanceoladas, que terminan en un zarcillo ramificado que ayuda a trepar a la planta. Las flores se agrupan en inflorescencias con una o dos flores, generalmente de color violeta. Los frutos son vainas con los márgenes pilosos y con un número variable de semillas en su interior (Nadal *et al.*, 2004b). *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* es el simbionte específico de las leguminosas pertenecientes a la tribu Vicieae

La veza presenta distintos usos: en alimentación animal su aprovechamiento puede ser doble, ya que es productora tanto de forraje como de grano y puede ser empleada como cubierta vegetal, ya que su hábito de crecimiento en forma de mata, ayuda a proteger el suelo de la erosión, y también es planta mejoradora del terreno como abono verde. En España su uso prácticamente se restringe al destinado de alimento del ganado en sus dos vertientes, grano y forraje. Rusia, Turquía y España son los principales productores (Nadal *et al.*, 2004b).

Objeto

La acumulación de **herbicidas** en el suelo puede desestabilizar el equilibrio de las poblaciones de microorganismos, de vital importancia para mantener la calidad del mismo al descomponer y mineralizar la materia orgánica que suministra elementos nutricionales a los vegetales. Entre las poblaciones de microorganismos rizosféricos que establecen relaciones beneficiosas con las plantas se encuentran las bacterias del género *Rhizobium*, capaces de asociarse simbióticamente con las raíces de las leguminosas y proporcionarles nitrógeno orgánico, característica de especial interés en el contexto de la sostenibilidad agrícola.

La asociación ***Rhizobium*-leguminosa** se considera prometedora en la recuperación de áreas contaminadas, pudiendo incluso de degradar herbicidas y ser útil en la descontaminación de estas sustancias, aún cuando éstas podrían interferir en el metabolismo del microsimbionte, de la planta hospedadora, o de ambos.

Los herbicidas pertenecientes a la clase de las imidazolinonas, entre los que se encuentra el herbicida **imazamox**, tienen como modo de acción primario la inhibición de la acetohidroxiácido sintasa (AHAS), la primera enzima común de la ruta de síntesis de los aminoácidos ramificados: valina, leucina e isoleucina. En microorganismos esta ruta biosintética también está presente, por lo que el contacto con imidazolinonas puede desestabilizar los niveles de aminoácidos de las bacterias. En plantas, los procesos fisiológicos que se desencadenan a partir de la inhibición de la actividad AHAS son muy complejos, y no se conoce con precisión ni los mecanismos de detoxificación de las plantas tolerantes, ni el proceso que lleva a la muerte de las plantas sensibles, además los efectos provocados por la aplicación de estos herbicidas y las estrategias de adaptación desarrolladas por la planta pueden ser diferentes cuando ésta se encuentra en asociación simbiótica.

El estudio de los efectos derivados de la aplicación del herbicida imazamox en plantas leguminosas y en sus rizobios asociados puede ayudar a entender los mecanismos de adaptación al herbicida en ambos simbioses. Los resultados obtenidos potencialmente podrán ser transferidos y utilizados para mejorar o manipular cultivos de leguminosas en los que se utilicen imidazolinonas, o bien en técnicas de biorrecuperación de suelos o aguas contaminadas por estos herbicidas mediante el empleo de la interacción *Rhizobium*-leguminosa.

Este trabajo se ha llevado a cabo en dos especies leguminosas y en sus microsimbiontes asociados: la leguminosa grano *Phaseolus vulgaris* y la leguminosa forrajera *Vicia sativa* y las especies de *Rhizobium* con las que forman nódulos, determinados en el primer caso, e indeterminados en el segundo.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral fue determinar las implicaciones fisiológicas de la aplicación de imazamox en las leguminosas estudiadas, así como en sus rizobios asociados, y conocer los **mecanismos y/o**

estrategias que adoptan las leguminosas frente al herbicida, tanto aisladamente como en simbiosis.

La **hipótesis de partida** se centra en analizar el comportamiento de las cepas de *Rhizobium* tratadas con el herbicida, por una parte, y por otra, examinar los cambios fisiológicos y bioquímicos producidos por el herbicida en las plantas, así como posibles mecanismos de degradación y determinación de los niveles de compuesto presente en los tejidos vegetales, para finalmente, tras haber seleccionado las variedades de las leguminosas y las cepas de *Rhizobium* asociadas más tolerantes, abordar el estudio de la respuesta de la asociación simbiótica al herbicida.

Los objetivos concretos fueron:

1. **Seleccionar las cepas** de *Rhizobium* más **tolerantes** a herbicidas, mediante el estudio de los cambios inducidos en la supervivencia y en la actividad acetohidroxiácido sintasa de las bacterias. Paralelamente, obtener cepas que sobreexpresen la actividad glutatión-S-transferasa.
2. Estudiar la respuesta a **imazamox** en diferentes **variedades de *P. vulgaris* y *V. sativa***, analizando los procesos metabólicos afectados por la aplicación del herbicida.
3. Estudiar los cambios provocados por imazamox en **diferentes órganos** durante la **ontogenia** de las plantas de *P. vulgaris* y *V. sativa* de las variedades seleccionadas.
4. Analizar las **respuestas** inducidas por imazamox **en las simbiosis** *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici* CIAT899 y *Vicia sativa-Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* VF39.

Material y Métodos

1. Material

1.1. Material biológico

1.1.1. Microorganismos

La cepa de *Rhizobium tropici* CIAT899, originaria del Centro Internacional de Agricultura Tropical de Colombia, fue seleccionada según trabajos previos de (Zúñiga, 1997) y la cepa de *Rhizobium etli* CFN42 fue aislada en México por Piñero *et al.* (1988). Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 y UPM791 proceden originariamente de Alemania (Priefer, 1989) y España (Leyva *et al.*, 1987), respectivamente.

Por su parte, las cepas *R. gallicum* bv. *gallicum* R602, y *R. giardinii* bv. *giardinii* H152, fueron originalmente aisladas en el Instituto Científico de Investigación Agronómica de Francia (Amarger *et al.*, 1997), y las cepas *Sinorhizobium fredii* Rp84 y *Rhizobium leguminosarum* Rp64 provienen de la Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) (Herrera-Cervera *et al.*, 1999). La cepa *E. coli* BphK^{LB400}, utilizada para transferir el gen *bphK*, proviene del Instituto Tecnológico de Carlow, en Irlanda (McGuinness *et al.*, 2006).

1.1.2. Material vegetal

Las especies vegetales utilizadas en los distintos experimentos fueron judía (leguminosa grano) *Phaseolus vulgaris*, variedades Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto, y veza (leguminosa forrajera) *Vicia sativa*, variedades Corina y Látigo, suministradas por Semillas Bolivar (Granada).

1.2. Herbicidas

El herbicida imazamox es comercializado por la empresa BASF como PULSAR 40, siendo su formulación en forma de líquido soluble, con una concentración de 40 g/l. En los experimentos del capítulo 1 también se utilizaron los herbicidas Paraquat, (Metil viológeno dicloro hidrato 98%) suministrado por Sigma, y ácido 2 -metil-4-clorofenoxiacético 60% p/v (MCPA) adquirido de Cequisa.

2. Cultivo de microorganismos

2.1. Medios de cultivo

Para el crecimiento, preparación de los inóculos y conservación de las cepas de *Rhizobium* se utilizó el medio de cultivo TY y, como medio selectivo en el proceso de transformación de las cepas, medio mínimo. En el caso de la cepa de *E. coli* se utilizó LB como medio de crecimiento.

**Medio de Triptona y Extracto de Levadura (TY)
(Beringer, 1974)**

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.9 g
Agua destilada	1000 ml
Agar (medio sólido)	15 g

Se ajustó el pH a 7 con NaOH y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min

**Medio de Luria-Bertani (LB)
(Miller, 1972)**

NaCl	5 g
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada	1000 ml
Agar(medio sólido)	15 g

El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

**Medio mínimo para *Rhizobium* (mmR)
modificado de Robertsen *et al.* (1981)**

K ₂ HPO ₄	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.15 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0.05 g
FeCl ₃	0.006 g
NaCl	0.05 g
Glutamato sódico	1.1 g
Manitol	10 g
Agar purificado para medio sólido	13 g
Agua destilada	1000 ml
Agar (medio sólido)	15 g

Se ajustó el pH a 6.8–7.2 con NaOH y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min. Después se añadió 1 ml/litro de una solución concentrada de vitaminas

Solución concentrada de vitaminas (1000 x)

Biotina	0.2 g
HCl de tiamina	0.1 g
Pantotenato sódico	0.1 g
Agua destilada estéril.....	1000 ml

Finalmente el medio se esterilizó a través de unidades de filtración de 0.2 μm de diámetro de poro

2.2. Preparación de inóculos y almacenamiento de las cepas bacterianas

Los inóculos de las distintas cepas se obtuvieron a partir de cultivos frescos crecidos en medio sólido durante 72 h a 28 °C. Las bacterias, fueron posteriormente crecidas en medio líquido a 28 °C hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a una suspensión bacteriana de aproximadamente 10^9 células viables ml^{-1} .

Las cepas bacterianas se mantuvieron utilizando distintos métodos para asegurar la supervivencia de las mismas. El método de almacenamiento dependió de la frecuencia de uso, para un uso frecuente las cepas se sembraron sobre placas de petri, se dejaron crecer a 28 °C hasta hacer visibles las colonias y se almacenaron a 4 °C hasta un periodo máximo de 3 semanas. Para almacenar las cepas de forma indefinida y evitar la pérdida de caracteres genéticos por sucesivas resiembras, los cultivos líquidos microbianos en fase logarítmica de crecimiento, se guardaron a -80 °C en glicerol al 20% (v/v).

3. Cultivo de plantas

3.1. Siembra

Las semillas de *V. sativa* y *P. vulgaris* fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 5% (v/v) durante 3 min, a continuación se lavaron varias veces con abundante agua estéril. Tras este proceso se dejaron en imbibición durante 2 h, y posteriormente, las semillas se trasladaron a semilleros de vermiculita estéril convenientemente humedecida. Los semilleros fueron cubiertos con bolsas de polietileno a fin de evitar la pérdida de humedad, y se mantuvieron en oscuridad durante 48 h a 28 °C en estufa de germinación.

El sistema de cultivo para *V. sativa* consiste en semilleros con 56 pocillos de 300 ml de capacidad, utilizando una mezcla de vermiculita/perlita (3/1) como sustrato inerte, que permite un adecuado desarrollo radical gracias a su porosidad. Los semilleros se colocaron sobre bandejas que contenían la solución nutritiva que

ascendía por capilaridad. El sustrato se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 1 h y los semilleros y bandejas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5%. Las semillas germinadas se colocaron en los pocillos y se cubrieron con la mezcla vermiculita/perlita. Sobre toda la superficie se colocó una capa de perlita estéril para disminuir las pérdidas de agua por evaporación.

Para los experimentos con *P. vulgaris* se utilizaron jarras Leonard modificadas (Leonard, 1943) conteniendo como sustrato vermiculita. Las jarras (1.5 l) constan de dos partes de vidrio que encajan perfectamente: la parte superior contiene el sustrato y la inferior la solución nutritiva. A través de una mecha de papel secante, asciende la solución por capilaridad manteniéndose de esta forma el grado de humedad del sustrato. Una vez preparadas las jarras se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 1 h. En cada jarra se sembraron 2 semillas germinadas y se cubrieron con vermiculita y una capa de perlita estéril.

En los experimentos en simbiosis (Capítulo 4), las semillas germinadas de ambas especies se inocularon con 1 ml de inóculo en el momento de la siembra, con *R. tropici* CIAT899 en el caso de judía y de *R.l.viciae* VF39 en el caso de veza, y a la semana siguiente del inicio del cultivo se realizó una reinoculación.

3.2. Condiciones de la cámara de cultivo y solución nutritiva

En todos los experimentos realizados las plantas fueron cultivadas en una cámara KOXKA (SA8/17-27/R) con las siguientes condiciones ambientales:

*Fotoperiodo: 16 h luz/ 8 h oscuridad.

*Temperatura: 24 °C día/ 18 °C noche \pm 1 °C.

*Humedad relativa: 55% día/ 75% noche.

*Intensidad luminosa: 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400-700 nm) en la superficie de las macetas, suministrada por lámparas fluorescentes Sylvania Cool-White (F72T12-CW-VHO) y lámparas incandescentes de 40 vatios (30% del total de vatios).

Los semilleros y las jarras Leonard se distribuyeron sobre la mesa de cultivo completamente al azar, cambiándose de forma periódica de lugar. En las bandejas se añadió solución nutritiva estéril cada dos o tres días, mientras que en las jarras ésta se renovó cada tres días.

La solución nutritiva nitrogenada, utilizada para el cultivo de las plantas en los experimentos de los capítulos 2 y 3, tenía la siguiente composición:

Macronutrientes		Micronutrientes	
KNO ₃	0.850 g	Na ₂ FeEDTA	0.09300 g
KH ₂ PO ₄	0.312 g	MnCl ₂	0.00040 g
KCl	0.373 g	ZnCl ₂	0.00010 g
CaCl ₂	0.367 g	CuCl ₂	0.00004 g
MgCl ₂	0.305 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.00010 g
K ₂ SO ₄	0.284 g	H ₃ BO ₃	0.00300 g
Agua		1000 ml	

La solución nutritiva sin nitrógeno, utilizada en los experimentos en simbiosis del capítulo 4, es la descrita por Rigaud y Puppo (1975) con la siguiente composición:

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH ₂ PO ₄	0.200 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.004 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.200 g	MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.002 g
KCl	0.200 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.002 g
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.120 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.003 g
Na ₂ FeEDTA	0.025 g	H ₃ BO ₃	0.018 g
		CoCl ₂ ·4H ₂ O	0.120 mg
Agua		1000 ml	

En ambos casos el pH de la solución se ajustó a 6.8 con NaOH y la esterilización se llevó a cabo a 120 °C durante 30 min.

4. Experimentos realizados

4.1. Selección de cepas de *Rhizobium* tolerantes a herbicidas

***Viabilidad en microcosmos:** Cepas de *Rhizobium*: *R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN42, *R.l. viciae* VF39 y *R.l. viciae* UPM791 fueron inoculadas en suelo estéril tratado con imazamox (0, 5, 50 y 500 µM), en sistemas de microcosmos de vidrio en los que se llevaron a cabo muestreos en los días 1, 2, 3, 7 y 14 de experimentación. El diseño experimental constó de 4 tratamientos para cada cepa (4 dosis de imazamox) tomando 6 réplicas por tratamiento en cada muestreo. El experimento se realizó dos veces, determinándose la supervivencia de la población microbiana.

***Actividad AHAS en suspensiones de las cepas:** Estas cepas fueron crecidas en un medio líquido, concentrándose posteriormente el inóculo. El precipitado de células se resuspendió en solución salina estéril y se repartió en alícuotas en tubos de vidrio añadiéndose herbicida imazamox (0, 50 y 500 μ M). Se tomaron alícuotas tras 2 y 4 horas de incubación para proceder a la determinación de la actividad AHAS (procedimiento explicado en el apartado 5.4.1). Este diseño experimental, para cada cepa, constó de 6 tratamientos (3 dosis de imazamox x 2 muestreos) con 6 réplicas, y se repitió dos veces.

***Actividad AHAS en extractos bacterianos:** Se realizaron extractos bacterianos de las cepas, obtenidos por sonicación (apartado 5.1.3), y el extracto se repartió en alícuotas en tubos de vidrio añadiéndose herbicida imazamox (0, 50 y 500 μ M). Se realizaron determinaciones de la actividad AHAS tras 1, 6, 12 y 24 horas de incubación. Este diseño experimental, para cada cepa, constó de 12 tratamientos (3 dosis de imazamox x 4 muestreos) con 6 réplicas, y se repitió dos veces.

***Transformación de cepas:** Se procedió a la transformación de cepas *Rhizobium* (*R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN42, *R. gallicum* R602, *R. giardinii* H152, *Rp* 84 y *Rp* 64, *R.l. viciae* VF39 y *R.l. viciae* UPM791) mediante conjugación con una cepa de *E. coli* portadora del gen *bphK*. Posteriormente se utilizaron diversas técnicas microbiológicas y moleculares para caracterizar las cepas resultantes.

***Tolerancia de las cepas a distintos herbicidas:** En un último experimento las cepas *R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN42, *R.l. viciae* VF39 y *R.l. viciae* UPM791 y la cepa transformada CIAT899 BphK^{LB400} fueron crecidas en placas petri a las que se adicionaron distintas concentraciones de los herbicidas imazamox, paraquat y MCPA (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 y 10 mM) para conocer la resistencia de las bacterias mediante observación del crecimiento en términos cualitativos. Este diseño experimental, para cada cepa y herbicida, constó de 8 tratamientos (8 dosis de herbicida) con 6 réplicas, y se repitió dos veces.

4.2. Estudio de la respuesta a imazamox para la selección de variedades tolerantes de *P. vulgaris* y *V. sativa*

Las plantas de judía, de las variedades Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto, crecieron en jarras Leonard con solución nutritiva nitrogenada hasta el día 21 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el cual se adicionó al medio el tratamiento de imazamox (0, 25, 50 y 100 μ M), manteniéndose hasta el final del tiempo de experimentación, el día 28 de cultivo coincidiendo con el inicio de floración.

Las plantas de veza, de las variedades Corina y Látigo, crecieron en bandejas de cultivo con solución nutritiva nitrogenada hasta el día 28 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el cual se adicionó al medio el tratamiento de imazamox (0, 100 y 250 μM) manteniéndose hasta el final del tiempo de experimentación, el día 35 de cultivo, coincidiendo con el inicio de floración.

El diseño experimental consta de 12 tratamientos en el caso de judía (4 dosis de imazamox x 3 variedades) con 6 réplicas por tratamiento, y de 6 tratamientos en el caso de veza (3 dosis de imazamox x 2 variedades) con 8 réplicas por tratamiento, cada experimento se realizó dos veces, determinándose los siguientes parámetros:

- Análisis del crecimiento: peso seco de parte aérea, raíz y total por planta, y relación raíz/parte aérea.
- Actividad acetohidroxiácido sintasa y actividades antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y guaiacol peroxidasa en hoja.
- Contenido foliar de pigmentos fotosintéticos, aminoácidos libres totales, proteína soluble total, y azúcares solubles totales.
- Peroxidación de lípidos y contenido de peróxido de hidrógeno en hoja.

4.3. Estudio ontogénico de diferentes órganos de plantas de *P. vulgaris* y *V. sativa* tratados con imazamox

Las semillas de judía de la variedad Coco Blanc (seleccionada como más tolerante en el experimento 2), una vez desinfectadas y germinadas se transfirieron a jarras Leonard con solución nutritiva nitrogenada. En estas condiciones crecieron hasta el día 21, momento en que se aplicó a la solución nutritiva el tratamiento de imazamox (0, 100 y 250 μM) y se mantuvo hasta el final del tiempo de experimentación (35 días). Se recogieron muestras a distintos tiempos de experimentación: tiempo cero (antes de aplicar el tratamiento), a las 24 h, a las 48 h, a la semana y a las dos semanas de tratamiento. En estas cosechas se tomaron muestras de raíz joven y vieja, cotiledones, hoja media, última hoja completamente expandida, hoja joven y meristemo apical.

Las semillas de veza de la variedad Corina (seleccionada como más tolerante en el experimento 2), una vez desinfectadas y germinadas se transfirieron a bandejas de cultivo con solución nutritiva nitrogenada. En estas condiciones crecieron hasta el día 28, momento en que se aplicó a la solución nutritiva el tratamiento de imazamox (0, 100 y 250 μM) y se mantuvo hasta el final del tiempo de experimentación (42 días). Se recogieron muestras a distintos tiempos de experimentación: tiempo cero (antes de aplicar el tratamiento), a las 24 h, a las

48 h, a la semana y a las dos semanas de tratamiento. En estas cosechas se tomaron muestras de raíz, hoja joven y hoja vieja.

En ambos casos el diseño experimental consta de 15 tratamientos (3 dosis de imazamox x 5 recolectas) con 6 repeticiones por tratamiento para la judía y 8 para la veza. El experimento se realizó dos veces, determinándose en cada cosecha los siguientes parámetros:

- Análisis del crecimiento: peso seco de parte aérea, raíz y total por planta, y relación raíz/parte aérea.
- Actividades enzimáticas acetohidroxiácido sintasa, glutatión-S-transferasa y guaiacol peroxidasa en todos los órganos seleccionados.
- Contenido de aminoácidos libres ramificados y totales en última hoja expandida y meristemo de judía, y en hoja joven y vieja de veza.
- Contenido de imazamox acumulado en última hoja expandida, hoja joven y meristemo de judía, y en hoja joven y vieja de veza.

4.4. Respuestas inducidas por imazamox en la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* CIAT899 y *Vicia sativa*-*Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* VF39

Las semillas de judía de la variedad Coco Blanc, desinfectadas y germinadas, se transfirieron a jarras Leonard, con solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975), donde se procedió a su inoculación con *R. tropici* CIAT899, seleccionada como la cepa más tolerante de las nodulantes de judía (capítulo 1). En estas condiciones crecieron las plantas hasta el día 21 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el que se adicionó al medio el tratamiento de imazamox (0, 100 y 250 μM), manteniéndose hasta el final del tiempo de experimentación, el día 28 de cultivo coincidiendo con el inicio de floración.

Las semillas de veza de la variedad Corina, desinfectadas y germinadas, se transfirieron a bandejas de cultivo donde se procedió a la inoculación con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, VF39, seleccionada como la cepa más tolerante de las ondulantes de veza (capítulo 1). Las plantas crecieron con solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975) hasta el día 28 de cultivo (crecimiento vegetativo), momento en el que se adicionó al medio el tratamiento imazamox (0, 100 y 250 μM), manteniéndose hasta el final del tiempo de experimentación, el día 35 de cultivo coincidiendo con el inicio de floración.

El diseño experimental para cada especie vegetal consta de 3 tratamientos (3 dosis de imazamox), con 6 repeticiones por tratamiento para la judía y 8 para la

veza, cada experimento se realizó dos veces, determinándose en ambas leguminosas los siguientes parámetros:

- Análisis del crecimiento: peso seco de parte aérea, raíz y total por planta, y relación raíz/parte aérea
- Actividades enzimáticas acetohidroxiácido sintasa, glutatión-S-transferasa, superóxido dismutasa y guaiacol peroxidada en hoja joven y adulta, raíz y nódulo.
- Contenido de pigmentos fotosintéticos en hoja joven y adulta.
- Relación carbono/nitrógeno en parte aérea y raíz.
- Contenido de aminoácidos libres ramificados y totales en hoja joven y adulta, raíz y nódulo.
- Contenido de imazamox acumulado en hoja joven y adulta, raíz y nódulo.

5. Metodología empleada

5.1. Técnicas microbiológicas

5.1.1. Experimento en sistema de microcosmos

El uso de sistemas de microcosmos en el estudio de la persistencia en suelo de cepas de *Rhizobium* para evaluar la influencia de distintos estreses se ha descrito en bibliografía (Vischetti *et al.*, 2002, Del Papa *et al.*, 2003). Las especies de *Rhizobium* ensayadas fueron expuestas a dosis crecientes de imazamox en sistemas de microcosmos de vidrio para conocer su evolución en términos de crecimiento.

La unidad experimental consistió en un contenedor de vidrio (recipiente circular de 10.5 cm de altura y 22 cm de diámetro) con 2.5 kg de suelo inoculado con *Rhizobium*. El suelo utilizado fue recogido en el Parque Natural Sierra de Baza, en la provincia de Granada. Se escogió este suelo porque al proceder de una zona protegida, no había estado previamente expuesto a contaminación por pesticidas. Este suelo, caracterizado por el grupo “Formación y Degradación del Suelo” del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Granada, contenía: arena 59.45%, arcilla 22.37%, limo fino 9.25%, limo grueso 8.92% y capacidad de campo 20% (p/p). Posteriormente fue tamizado, con el fin de generar una matriz más homogénea, y a continuación esterilizado por vapor fluyente en autoclave en ciclos de 1 h a 100 °C y 1 atmósfera de presión durante 3 días consecutivos (Trevors, 1996), eliminando así microorganismos y formas de resistencia bacteriana como las esporas, de este modo los rizobios inoculados no tendrían competencia con la microbiota del suelo. Finalmente se secó en estufa a 70 °C.

A partir de este suelo se pesaron 2.5 kg para cada unidad experimental, que fue tratada con 150 ml de solución de imazamox (5, 50 o 500 μM), o de agua estéril para el caso de los controles, y con 150 ml de inóculo de *Rhizobium*. De esta forma el contenido de humedad quedó ajustado al 60% de la capacidad de campo (Pérez *et al.*, 2008) y se mantuvo a dicho nivel durante el tiempo de experimentación mediante adición periódica de agua destilada estéril. El suelo con el inóculo y la solución contaminante fue convenientemente homogenizado con una varilla estéril y distribuido en los contenedores de vidrio sobre un lecho de grava estéril colocada al propósito de facilitar el drenado y evitar la compactación del suelo. Finalmente se colocaron en estufa a una temperatura de 28 °C y se llevaron a cabo muestreos en los días 1, 2, 3, 7 y 14 de experimentación para determinar la supervivencia de la población microbiana.

Las bacterias para inocular el suelo crecieron en medio TY líquido a 28 °C y agitación constante (150 rpm) durante 48 horas. Para conocer el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de este inóculo, se realizaron diluciones seriadas de una muestra del mismo y se sembraron 100 μl de cada una en placas petri, realizando, tras un período apropiado de incubación, un recuento del número de colonias formadas. Este inóculo se concentró por centrifugación a 17000 g durante 12 min. y el precipitado fue resuspendido en solución salina estéril, para alcanzar el volumen final requerido (150 ml para cada microcosmos).

Para el recuento de bacterias a partir de las muestras de suelo se procedió de la forma siguiente: de cada microcosmos se tomaron 6 muestras al azar de 1 g de suelo y fueron agitadas en tubos con 10 ml de solución salina estéril, con el fin de extraer las bacterias, y posteriormente centrifugadas durante 5 min a 120 g para clarificar el extracto. A partir de ahí se realizaron diluciones seriadas del sobrenadante obtenido y se sembraron 100 μl de cada dilución en placas con medio TY que contenían 15% de cicloheximida y 0.0125% de cristal violeta para impedir el posible crecimiento de hongos y bacterias Gram +. Estas placas se incubaron en estufa a 28 °C el tiempo suficiente para poder apreciar las colonias formadas (48-62 h). Posteriormente se realizaron recuentos del número de UFC de cada placa.

5.1.2. Actividad AHAS en suspensiones de *Rhizobium* incubadas con imazamox

Las bacterias fueron crecidas en un medio TY líquido a 28 °C y agitación constante (150 rpm) durante 48 horas. Posteriormente el inóculo se concentró mediante centrifugación en tubos a 3300 g durante 20 min, descartando el sobrenadante. El precipitado de células se resuspendió en solución salina estéril y se repartió en alícuotas en tubos de vidrio añadiéndose herbicida imazamox en concentraciones de 50 y 500 μM , dejando suspensión bacteriana sin tratar como

control. Los tubos se dejaron en incubación a 28 °C y agitación constante (150 rpm). Se tomaron muestras después de 2 y 4 horas de incubación para la determinación de la actividad AHAS como se indica a continuación. Se concentraron las células mediante centrifugación a 3300 g durante 20 min y este precipitado se lavó con solución salina estéril por dos veces para eliminar los restos de herbicida (resuspendiendo y volviendo a recoger las bacterias por precipitación). El precipitado lavado se resuspendió en el tampón de extracción de la enzima AHAS (ver apartado 5.4.1) y a continuación se sometió a sonicación en 3 ciclos de 6 pulsos de 6 segundos a máxima amplitud (Vibra cell™, Sonics & Materials inc. Danbury, Connecticut, U.S.A.). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 35000 g durante 45 min, recogiendo el sobrenadante. Con este extracto se procedió a determinar la actividad AHAS como se describe en el apartado 5.4.1.

5.1.3. Actividad AHAS en extractos de *Rhizobium* incubados *in vitro* con imazamox

Las bacterias fueron crecidas en un medio TY líquido a 28 °C y agitación constante (150 rpm) durante 48 horas. A continuación, la suspensión bacteriana se concentró por centrifugación y a partir del precipitado se obtuvo un extracto libre de células mediante sonicación y centrifugación, tal como se describe en el apartado anterior. Este extracto se repartió en alícuotas en tubos de vidrio añadiéndose herbicida imazamox en concentraciones de 0, 50 y 500 µM, y los tubos se dejaron en incubación en cámara fría. Se tomaron alícuotas tras 1, 6, 12 y 24 h de incubación para realizar determinaciones de la actividad AHAS como se describe en el apartado 5.4.1.

5.1.4. Conjugación bacteriana

Se realizó la transferencia, a cepas de *Rhizobium*, de la construcción "S 17.1 λpir pUTmTn5gusA-Cm-bphKAla180Pro-NptII-pgfp". La misma contiene el gen *bphK* de *Burkholderia xenovorans* LB400 con una mutación en el aminoácido conservado en la posición 180 de una alanina a una prolina, que confiere un aumento en la actividad GST 8 veces mayor que el del fenotipo salvaje (Brennan *et al.*, 2009). Además, contiene marcadores de resistencia a los antibióticos cloramfenicol (Cm) y kanamicina (Kn) y el gen de expresión de la proteína verde fluorescente. Esta construcción estaba portada por una cepa competente de *Escherichia coli* (*E. coli* BphK^{LB400}).

La transferencia de la construcción se llevó a cabo utilizando el método de conjugación en filtro. Las cepas fueron cultivadas durante una noche, la cepa donadora a 200 rpm en medio LB con cloramfenicol a 37 °C, la cepa receptora se cultivó en medio mínimo para *Rhizobium* a 28 °C. Posteriormente se transfirió 1 ml de cada cultivo de células a un tubo estéril de 1.5 ml y se recogieron las células por

centrifugación a 12000 g durante 1 min. Las células fueron lavadas dos veces con solución salina estéril (NaCl al 0.85%), para eliminar los antibióticos del medio, y se recolectaron de nuevo por centrifugación a 12000 g durante 1 min. El precipitado de células final se resuspendió en 100 µl de medio LB estéril en el caso de la cepa donadora, o de solución salina estéril para el caso de la cepa receptora y se transfirieron a un filtro de membrana estéril sobre una placa de agar, homogeneizando ambas suspensiones bacterianas con suavidad, y se incubaron durante 48 h a 28 °C, realizándose 10 réplicas para cada cepa receptora. El filtro se separó después de la placa y se sumergió en 5 ml de solución salina estéril en un tubo de polipropileno de 20 ml, agitando vigorosamente para desprender las células del filtro. A continuación se extendieron 100 µl de la suspensión celular sobre placas con medio mínimo para *Rhizobium* (mmR) con los antibióticos Kn y Cm, y se incubó durante al menos 48 h a 28 °C.

Las colonias de potenciales transconjugantes que crecieron en estas placas selectivas fueron aisladas y sembradas en placas de selección frescas, repitiendo este proceso varias veces para asegurar la pérdida completa de la cepa donante.

5.1.5. Técnicas de caracterización de cepas

Para identificar con más seguridad la identidad de las bacterias, además de, comprobar el crecimiento de las mismas en medio selectivo (mmR) se comprobó la expresión de la proteína GFP mediante la utilización de un microscopio de epifluorescencia Nikon E400, equipado con una lámpara foto-óptica y dos filtros con longitud de onda de excitación de 465-495 y 450-490 nm. Para capturar y procesar las imágenes microscópicas se utilizó el software de imagen Lucia ® 4.6. Además se realizaron un conjunto de pruebas que permitieron una mejor caracterización de las cepas:

- Crecimiento en **Microplaca Biolog GN2** que permite obtener un patrón característico en base a la utilización o no por la bacteria de 95 fuentes de carbono diferentes proporcionando una huella metabólica (Garland y Mills, 1991). A partir de cultivos puros de las cepas en placas petri con medio selectivo, se extrajeron colonias aisladas y se suspendieron en 5 ml de solución de NaCl estéril 0.85%. Una alícuota de 150 µl de esta suspensión se pipeteó a continuación, en cada pocillo en la placa de Biolog ®. Las placas Biolog ® se incubaron a la temperatura apropiada (30 °C para *E. coli* y 28 °C para *Rhizobium*) durante 24-48 h. Las placas se leyeron visualmente después de 24-48 h de incubación. Un color púrpura indica un resultado positivo. El patrón obtenido para cada cepa en las microplacas Biolog GN2 fue procesado en la base de datos del programa Biolog® MicroLog System 3.5.

- Siembra en placas con **agar Mac Conkey**, que inhibe el desarrollo de Gram positivas (MacConkey, 1905).
- Prueba de la **oxidasa**, que determina si la bacteria producen citocromo c oxidasa. Esta prueba fue llevada a cabo utilizando protocolos estándar (Farmer *et al.*, 1981, Faller y Schleifer, 1981)
- Incubación de placas a **42 °C**, temperatura que permite el crecimiento de *E. coli* pero no de los rizobios.
- Prueba del **indol** que determina la capacidad del organismo de romper el aminoácido triptófano por medio de la enzima *triptofanasa*, siguiendo protocolos estándar (McClain y Lee, 1988).

5.1.6. Técnicas moleculares

*Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído utilizando el kit de purificación Wizard® siguiendo las indicaciones del fabricante para extraer el ADN de Gram negativas.

*Amplificación por PCR del gen *16S* del ARNr

La amplificación del *16S* se llevó a cabo utilizando reactivos Sigma bajo condiciones estándar (Weisburg *et al.*, 1991). En las siguientes tablas se muestran los detalles de los primers, la mezcla de reacción y las condiciones de programación para la amplificación del gen.

Primers de amplificación del *16S* (Weisburg *et al.*, 1991)

Primer	Secuencia 5'-3'
<i>16S</i> fwd	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
<i>16S</i> rev	AAGGAGGTGATCCAGCC

Mezcla de reacción PCR para la amplificación del gen *16S*

Reactivo	µl/ tubo de reacción	Concentración final
MgCl ₂ (25mM)	4.50	3.0 mM
Tampón (10 X ,sin MgCl ₂)	5.00	1.0 X
dNTPs (40mM)	1.00	2.4 mM
Taq ADN polimerasa (5U/ µl)	0.25	0.025 U
primer <i>16 S</i> fwd (10 pmol/ µl)	1.00	0.4 pmol
primer <i>16 S</i> rev (10 pmol/ µl)	1.00	0.2 pmol
ADN	1.00	< 0.01 ng/ µl
H ₂ O destilada estéril	36.25	

Programa de PCR para la amplificación del fragmento 16S

Paso	Ciclos	Temperatura (°C)	Duración
Desnaturalización inicial	1	95	1 min
Amplificación	25	95	2 min
		72	4 min
		53	30 sec
Extensión final	1	72	20 min
Espera		4	

***Digestión enzimática del fragmento 16S**

A continuación se digirió el producto de la amplificación anterior usando distintas enzimas de restricción, *EcoRI*, *BamHI* y *Sau3AI* (Promega), para identificar diferencias de secuencias de dicho gen, para ello se procedió a la siguiente mezcla:

Digestión enzimas de restricción

Reactivo	µl/ tubo de reacción
H ₂ O destilada estéril	16.3
Tampón de digestión (10 X)	2.0
BSA 10µg/µl	0.2
ADN, 1µg/µl	1.0
Enzima de restricción, 10u/µl	0.5
Volumen final	20.0

Los tubos se incubaron 3 h a la temperatura óptima correspondiente a cada enzima y posteriormente se añadieron 4 µl de tampón de carga 6X y se procedió a separar los fragmentos formados por electroforesis en gel de agarosa.

***Electroforesis en gel de agarosa**

El ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con tampón TAE (40 mM Tris-acetato y 1mM EDTA), y bromuro de etidio a una concentración final de 1 µl/ml (Sambrook y Russell, 2001). De 5-20 µl de muestra se mezclaron con 1-3 µl de tampón de carga (Promega) y finalmente se cargaron en el gel, junto con los marcadores de peso molecular de 1kb (Bioline). Los geles se corrieron con tampón TAE a 400 mA y 80 V durante períodos variables de tiempo,

y después se visualizaron usando el transiluminador Alpha INNOTECH y las imágenes se capturaron con el software Ultra Violet Products Ltd Grab-It 2.5.

5.2. Recolección de las plantas

Se seleccionaron de forma aleatoria plantas de *P. vulgaris* y *V. sativa*, en las que se determinaron los parámetros relacionados con el crecimiento. Para ello, se separó la raíz de la parte aérea, se registró su peso fresco, y a continuación, se procedió al secado del material vegetal en estufa de corriente forzada de aire a 70 °C durante 48 h. Pasado este tiempo, se determinó el peso seco de cada órgano. El resto de plantas se extrajeron del medio de cultivo y las raíces se lavaron con agua para eliminar los restos de vermiculita y perlita. Las plantas de cada tratamiento se separaron en tres grupos para realizar repeticiones, separándose las distintas partes para su análisis. El material vegetal se conservó a -80 °C hasta su posterior utilización.

5.3. Determinaciones analíticas

5.3.1. Pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofilas totales, así como de clorofila a, clorofila b, y xantofilas más carotenos, se determinó según el método de Wolfenden *et al.* (1988). El material vegetal (0.1 g) fue extraído con 1 ml de metanol al 50% y 3 ml de triclorometano. Tras la filtración se centrifugó a 3750 g durante 10 min. Todas las clorofilas pasaron a la capa de cloroformo que fue de nuevo filtrada. A continuación, el volumen obtenido se diluyó en cloroformo en un factor de 5 y se tomaron alícuotas para la lectura de la absorbancia a 470, 648 y 666 nm. Los resultados se obtuvieron a partir de las siguientes fórmulas y se expresaron en $\mu\text{g g}^{-1}\text{PF}$:

$$\text{Cla} = 10.9 A_{666} - 1.2 A_{648}$$

$$\text{Clb} = 16.38 A_{648} - 4.57 A_{666}$$

$$x+c = (1000 A_{470} - 2.48 \text{Cla} - 142.11 \text{Clb}) / 174$$

$$\text{Pigmentos totales: Cla} + \text{Clb} + (x+c)$$

5.3.2. Relación C/N

En primer lugar se realizó una digestión ácida a muestras de 0.1 g de material seco de raíz y parte aérea, con $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ en Ultraclave-Microondas Milestone. Posteriormente se procedió a determinar la relación carbono/nitrógeno mediante espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo

(ICP-OES) en un equipo ICAP 6500 DUO THERMO. Para ello se pesaron 0.1 g de muestra sólida en el tubo de teflón del digestor y se adicionaron 4 ml de HNO₃ PA-ISO 69% y 1 ml de H₂O₂ 33%. Este tubo se tapó y colocó en el reactor con una rampa de temperatura final de 20 min a 220 °C. Una vez enfriado el reactor se enrasaron los tubos a 25 ml con agua milliQ y se medieron en los equipos de ICP-OES. Esta determinación se llevó a cabo en el Servicio de Ionómica del CEBAS (CSIC, Murcia).

5.3.3. Azúcares solubles totales

El disolvente utilizado como medio de extracción en hoja fue la mezcla etanol-cloroformo-agua (ECA) en la proporción 12:5:1 de acuerdo con Tully *et al.* (1979), con una relación peso fresco de muestra/volumen de medio de 1/20. Tras la maceración se centrifugó a 3500 g durante 10 min. Al sobrenadante obtenido se le añadió 15 ml de agua destilada y 1 ml de cloroformo, se agitó y se dejó en reposo hasta la aparición de dos fases (24 h), una transparente y una verde. La fase transparente se utilizó para la determinación analítica.

La valoración colorimétrica de los azúcares solubles totales se realizó por el método propuesto por Irigoyen *et al.* (1992). A alícuotas de 0.05 ml de extracto se les añadió 3 ml de reactivo de antrona, consistente en ácido sulfúrico diluido al 72 % más antrona en una proporción de 0.15 g/100 ml. A continuación los tubos se agitaron vigorosamente y se llevaron a un baño en ebullición durante 10 min, tras los cuales se enfriaron rápidamente en hielo. De igual modo se procedió para preparar una curva patrón de concentraciones conocidas de glucosa (0-2.5 mM). La absorbancia debida al color verde desarrollado se midió a 625 nm y los resultados se expresaron en mg de glucosa g⁻¹ PF.

5.3.4. Aminoácidos libres totales

La determinación de aminoácidos libre se realizó siguiendo el método de Yemm y Cocking (1955). Se utilizaron los extractos preparados para determinar azúcares solubles totales (5.3.3.). Alícuotas de 0.5 ml de muestra, se le adicionaron 1.5 ml de ninhidrina preparada al 2% (p/v) en una solución formada por tampón citrato 0.2 M pH 5.0, y etilenglicol monometiléter. Los tubos se agitaron y se incubaron a 100 °C durante 15 min. A continuación se detuvo la reacción enfriando en hielo, se añadió 5 ml de isopropanol al 50% y se tomaron los valores de absorbancia a 570 nm. Como referencia se preparó una curva patrón a partir de asparagina (0-7.5 mM). El contenido en aminoácidos se expresó en mg asparagina g⁻¹ PF.

5.3.5. Aminoácidos ramificados libres

Los aminoácidos libres de las muestras fueron extraídos según el método de Irigoyen *et al.* (1992), y la fase transparente del sobrenadante se evaporó al vacío a 35 °C con un speed-vac SPD11V Thermo (Thermo FisherScientific, USA). Las muestras fueron resuspendidas y derivatizadas con el kit AccQ-Tag™ (Waters®), de acuerdo con el protocolo del fabricante. A continuación, se procedió a la separación y cuantificación de aminoácidos por HPLC aplicando el método AccQ-Tag, en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Nova-Pak™ (3,9 mm × 150 mm, 4 µm) equipada con un Nova-Pak™ Sentry C₁₈. La columna fue termostatzada a 37 °C, el caudal fue de 1 ml min⁻¹ y el volumen de inyección de 5 µl. La fase móvil A consistió en eluyente AccQ-Tag (100 ml AccQ-Tag A concentrado + 1 l de agua Milli-Q) y las fases móviles B y C fueron acetonitrilo y agua Milli-Q, respectivamente. Los aminoácidos derivatizados se cuantificaron con un detector de fluorescencia programado a una longitud de onda de excitación de 250 nm, y una de emisión de 395 nm. Se realizó una curva patrón para cada aminoácido a determinar y se utilizó como estándar interno ácido-γ-aminobutírico. El contenido total de aminoácidos libres fue calculado sumando los valores de cada aminoácido cuantificado por HPLC. El porcentaje de aminoácidos de cadena ramificada se obtuvo sumando los valores obtenidos para valina, leucina e isoleucina y dividiéndolos por el contenido total de aminoácidos libres.

5.3.6. Proteína soluble

La extracción se realizó macerando 0.2 g de material vegetal fresco en 1.5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7. El homogeneizado se filtró y se centrifugó a 9100 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de proteína soluble total mediante el método de Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones introducidas por Markwell *et al.* (1978). El contenido de proteínas solubles en los extractos utilizados para determinar las actividades enzimáticas, se estimó también mediante este método.

A 100 µl de muestra se adicionaron 400 µl de agua destilada y 1.5 ml de reactivo A, se agitaron los tubos e incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se adicionó 0.15 ml de reactivo de Folin-Cicolteau (reactivo de fenol) diluido 1:1 en agua destilada y se incubó a temperatura ambiente 30 min en oscuridad, midiéndose la absorbancia a 660 nm. Los resultados, expresados como mg g⁻¹ PF, se obtuvieron a partir de una curva patrón de albúmina (0-80 µg ml⁻¹). El reactivo A presenta 100 partes de reactivo B y una de reactivo C. El reactivo B contiene: Na₂CO₃ 2% (p/v), NaOH 0.4% (p/v), tartrato de sodio y

potasio 0.16% (p/v), dodecil sulfato sódico (SDS) 1% (p/v). El reactivo C contiene $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4% (p/v).

5.3.7. Peróxido de hidrógeno

La determinación se realizó siguiendo el método propuesto por Alexieva *et al.* (2001), en el cual el H_2O_2 reacciona con el yoduro en un medio ácido, liberando yodo que dará un color amarillo. El material vegetal (0.5 g) se homogeneizó con 6 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 0.1 % (p/v) y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Para la reacción se usó 0.5 ml del sobrenadante obtenido y se les añadió 0.5 ml de tampón fosfato 100 mM pH 7 y 1 ml de yoduro de potasio 1 M. A continuación los tubos se agitaron e incubaron durante 60 min en oscuridad, y pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 390 nm. La curva patrón se preparó del mismo modo a partir de concentraciones conocidas de H_2O_2 (0-100 μM) y un blanco con TCA. El contenido de H_2O_2 se expresó en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF}$.

5.3.8. Peroxidación de lípidos

La determinación del daño oxidativo a lípidos (lipoperoxidación) se realizó mediante el método descrito por Ohkawa *et al.* (1979), midiendo las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método está basado en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del malonaldehído (MDA), que es un producto final de la lipoperoxidación. La reacción del TBA con el MDA forma un producto (TBA-MDA) cromóforo rosado con un máximo de absorción a 532 nm. El material vegetal (0.5 g) se extrajo con 5 ml de TCA al 20 % (p/v) y 1 ml de butilhidroxitolueno al 4 % (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 10000 g durante 15 min a 4 °C.

Para la reacción, alícuotas de 0.5 ml de extracto se les añadió 1.5 ml de reactivo de TBA al 0.5% (p/v), preparado con TCA al 20 %. A continuación los tubos se agitaron vigorosamente y se llevaron a un baño regulado a 94 °C durante 30 min en oscuridad. Pasado este tiempo, se paró la reacción enfriando los tubos en hielo durante 10 min, y después se centrifugaron a 10000 g durante 15 min a 4 °C. La absorbancia leída se le restó la obtenida a 600 nm (absorbancia inespecífica). La curva patrón se preparó del mismo modo a partir de concentraciones conocidas de MDA (0-20 μM) y un blanco con TCA. La peroxidación de lípidos se expresó en $\text{nmol MDA g}^{-1} \text{ PF}$.

5.3.9. Determinación de imazamox

Las muestras (0.1 g) fueron maceradas en acetonitrilo, añadiéndose imazetapir como estándar interno, y centrifugadas a 8000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se reservó y el precipitado fue resuspendido en acetonitrilo usando un homogeneizador Ultra-Turrax® (pulsos de 20 segundos), de nuevo se centrifugó a 8000 g durante 15 minutos y el sobrenadante resultante fue unido al anterior. A continuación las muestras se secaron durante 2 h a 45 °C con un speed-vac SPD11V Thermo (Thermo FisherScientific, USA). Posteriormente las muestras se resuspendieron en 1 ml de agua, aplicando ultrasonidos durante 10 min para favorecer la disolución y se filtraron con un filtro de nylon de 0.22 µm. Para la cuantificación de imazamox 10 µl de muestra se inyectaron en un UPLC con un detector de triple cuadrupolo (MS/MS), modelo XEVO TQS de Waters, en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. La separación se llevó a cabo en una columna Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 X 50 mm, 1.7µm), con un caudal de 0.4 ml/min⁻¹ y un tiempo de cromatografía de 3.5 min por pinchazo. La fase móvil consistió en agua con 0.01% de ácido fórmico y 0.05% de amonio (A) y acetonitrilo (B), y el gradiente aplicado fue: t₀: 95% A y 5% B, t_{3,5}: 95% A y 5% B.

5.4. Actividades enzimáticas

5.4.1 Acetohidroxiácido sintasa

La actividad AHAS (EC 2.2.1.6) cataliza la formación de acetolactato a partir de piruvato. La extracción y posterior cuantificación de la enzima se determinó según el método propuesto por Singh *et al.* (1988). 0.2 g de material vegetal se maceraron en 1.5 ml de un tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, 5 mM piruvato sódico, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 100 µM FAD, 0.5 mM TPP, 10% glicerol (v/v) y 16% de PVPP. El homogeneizado se centrifugó a 25000 g durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad. A 0.2 ml de extracto enzimático se añadieron 0.3 ml de tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7), 10 mM MgCl₂, 100 mM piruvato sódico, 10 µM FAD y 1 mM TPP y se incubó a 37 °C durante 60 min, transcurrido este tiempo la reacción se detuvo por la adición de 50 µl de H₂SO₄ 3 M. La nueva mezcla se incubó a 60 °C durante 15 min para que, en condiciones ácidas, el acetolactato se descarboxilara hasta acetoína, y cuantificar la cantidad de acetoína formada por el método descrito por Westerfeld (1945). A cada tubo se le añadió 0.5 ml de creatina 0.6% en agua y 0.5 ml de α-naftol 6% en NaOH 1.25 M, y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Finalmente los tubos fueron centrifugados a 5000 g durante 10 min y la cantidad de acetoína se determinó en el sobrenadante espectrofotométricamente a 525 nm, utilizando como estándar una curva patrón de acetoína (2-20 µg ml⁻¹). La actividad se expresó como µg de acetolactato mg⁻¹ prot h⁻¹.

5.4.2. Superóxido dismutasa

La actividad SOD (EC 1.15.1.1) cataliza la dismutación de superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno. La extracción y posterior cuantificación de la enzima SOD se realizó mediante la técnica de inhibición de la reducción fotoquímica del azul de nitrotetrazolio (NBT) propuesta por Beyer y Fridovich (1987) con algunas modificaciones y optimizada para nuestras condiciones. La extracción se realizó macerando 0.4 g de material vegetal en 3 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, que contiene EDTA 0.1 mM y β -mercaptoetanol 10 mM. Además se añadió PVPP insoluble en una cantidad equivalente al 40% del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se filtró a través de doble capa de gasa y a continuación se centrifugó a 15000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la actividad enzimática, para lo cual se prepararon tres tandas de tubos (control, blanco, muestra) que contenían:

	<u>Control (µl)</u>	<u>Blanco (µl)</u>	<u>Muestra (µl)</u>
*Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8 y EDTA 0.1 mM	1800	1750	1750
*Metionina 13 mM	100	100	100
*Riboflavina 2 µM	50	50	50
*NBT 75 µM	50	50	50
*Extracto enzimático	--	50	50

A continuación se agitaron los tubos, se pusieron en oscuridad y se procedió a su lectura a una longitud de onda de 560 nm ($t = 0$ min). Una vez terminada la lectura los tubos del blanco continuaron en oscuridad, y los controles y las muestras fueron iluminadas con tubos fluorescentes durante 10 min con una intensidad lumínica media de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a una temperatura de 25 °C. Transcurrido este tiempo, se trasladaron todos los tubos a oscuridad, y se volvieron a medir en el mismo orden y a la misma longitud de onda ($t = 10$ min). La actividad SOD se expresó como $\text{U mg}^{-1} \text{prot}$.

5.4.3. Catalasa

La actividad CAT (EC 1.11.1.6) cataliza la destrucción del peróxido de hidrógeno formando agua y oxígeno. La extracción y posterior cuantificación de la enzima CAT se determinó según el método propuesto por Aebi (1984) basado en la disminución de absorbancia, debida a la desaparición del H_2O_2 , que se produce a 240 nm y 30 °C. El extracto se obtiene homogeneizando 0.4 g de material vegetal en 5 ml de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7, que contiene EDTA 100 mM y tritón X-100 al 0.1%. Además se añade PVPP insoluble en una cantidad equivalente al 20% del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se filtró a

través de doble capa de gasa y a continuación se centrifugó a 27000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido, se utilizó para determinar la actividad enzimática según la siguiente mezcla de reacción:

*Tampón fosfato potásico pH 7	50 mM
*Tritón X-100	0.1%(v/v)
*H ₂ O ₂	10.6 mM

La reacción se inició al añadir 50 µl de extracto hasta completar un volumen de 1 ml. La actividad CAT se expresó como µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹.

5.4.4. Guaiacol peroxidasa

La actividad GPX (EC 1.11.1.7) elimina el peróxido de hidrógeno utilizando guaiacol como donador de electrones, que es transformado en tetraguaiacol. En la determinación se utilizó el método descrito por Kato y Shimizu (1987), con algunas modificaciones para optimizarlo a nuestras condiciones. La extracción se realizó homogeneizando 0.2 g de material vegetal en 5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, que contiene EDTA 100 mM y β-mercaptoetanol 10 mM. Además se añadió PVPP insoluble en una cantidad equivalente al 25% del peso fresco de la muestra. El homogeneizado se filtró a través de doble capa de gasa y a continuación se centrifugó a 15000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido, se utilizó para determinar la actividad enzimática según la reacción siguiente:

*Tampón fosfato sódico pH 5.8	200 mM
*Guaiacol	7.2 mM
*H ₂ O ₂	11.8 mM

La reacción se inicia con la adición de 25 µl del extracto diluido 50 veces para completar un volumen final de 1 ml. La lectura de las muestras se realizó a una absorbancia de 470 nm a 25 °C. La actividad GPX se expresó en µmol H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹.

5.4.5. Ascorbato peroxidasa

La actividad de esta enzima (APX, EC 1.11.1.1) elimina el peróxido de hidrógeno, utilizando ascorbato, que se transformará en monodehidroascorbato. La actividad se determinó según el método de Hossain y Asada (1984), y debido a la elevada actividad de esta enzima, para la determinación de la misma, los extractos fueron diluidos 10 veces. La mezcla de reacción fue la siguiente:

*Tampón Tris-HCl pH 7.8	50 mM
*L-Ascorbato sódico	0.4 mM
*H ₂ O ₂	0.3 mM

La reacción se inicia con la adición de 50 μ l del extracto diluido para completar un volumen final de 1 ml. La lectura de las muestras se realizó a una absorbancia de 290 nm a 25 °C. La actividad APX se expresó en μ mol ascorbato mg^{-1} prot min^{-1} .

5.4.6. Glutación-S- transferasa

La actividad GST (EC 2.5.1.18) cataliza la conjugación de glutatión reducido a los centros electrofílicos de una amplia variedad de sustratos. La extracción y posterior cuantificación de la enzima se determinó según el método propuesto por Habig y Jakoby (1981). 0.2 g de material vegetal se maceraron en 1.6 ml de un tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 10mM mercaptoetanol y 20% de PVPP. El homogeneizado se centrifugó a 15000 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad, según la reacción siguiente:

*Tampón fosfato potásico pH 6.5	100 mM
*GSH	1 mM
*DCNB	1 mM

La reacción se inicia con la adición de 50 μ l del extracto para completar un volumen de 1 ml. La lectura de las muestras se realizó a una absorbancia de 340 nm a 25 °C. La actividad GST se expresó en pmol GSH-CDNB mg^{-1} prot min^{-1} .

6. Presentación y estudio estadístico de los resultados

En todos los experimentos con plantas se utilizó un diseño completamente al azar, distribuyendo las macetas de cada tratamiento siempre de forma totalmente aleatoria por la superficie de la mesa de cultivo. Los experimentos fueron repetidos al menos una vez, considerándose los valores más representativos. Los datos originales así obtenidos se sometieron a un análisis estadístico, asistido por ordenador con la ayuda del programa SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA, 2007), consistente en:

- Análisis de la varianza uni o multifactorial.
- Test de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias.
- Coeficientes de correlación simple entre variables.

Los resultados se presentaron en gráficas o diagramas de barras con el error estándar (ES) de la muestra y una letra que indica si los valores difieren significativamente, comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

Resultados

1. Selección de cepas de *Rhizobium* tolerantes a herbicidas

En este experimento se estudian los cambios inducidos por el herbicida imazamox en la supervivencia de cepas de *Rhizobium*, crecidas en sistema de microcosmos, y en la actividad acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de la bacteria. Paralelamente se transformaron algunas cepas de *Rhizobium* para conseguir sobreexpresión de la actividad glutatión-S-transferasa.

Las bacterias fueron inoculadas en sistemas abiertos de microcosmos con suelo natural al que se le aplicaron distintas dosis de herbicida (0, 5, 50 y 500 μM de imazamox) y muestras de suelo se recolectaron después de 1, 2, 3, 7 y 14 días de incubación en esas condiciones. Las bacterias se extrajeron de las muestras de suelo y se sembraron en placa para realizar el recuento de unidades formadoras de colonias. Por otro lado se determinó la actividad AHAS de suspensiones de las cepas incubadas en medio líquido con imazamox (50 y 500 μM) durante 2 y 4 horas y finalmente se realizó un ensayo de inhibición *in vitro* de la actividad AHAS en extractos bacterianos incubados con distintas dosis de imazamox (0, 50 y 500 μM) durante 1, 6, 12 y 24 horas.

En otros ensayos se procedió a transferir a cepas de *Rhizobium* el gen *bphK* de *Burkholderia xenovorans* LB400 portado por una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli* BphK^{LB400}), mediante el método de conjugación en filtro.

1.1. Experimentos con cepas nodulantes de judía: *R. tropici* CIAT899 y *R. etli* CFN42

1.1.1. Viabilidad en microcosmos

En la figura 1.1 se muestra la viabilidad de las cepas de *Rhizobium* en el sistema de microcosmos de vidrio durante un periodo de 14 días, expresado como número de unidades formadoras de colonias por gramo de de suelo. Se aprecia que la población de *R. tropici* descendió durante los primeros días tras su inoculación en el suelo del microcosmos, al tercer día se produjo un incremento del 20% y en los muestreos posteriores se produjo una caída progresiva de la población bacteriana. En *R. etli*, por el contrario, la población aumentó tras ser inoculada en el microcosmos, alcanzando un máximo a los dos días, para descender a partir de ahí hasta los niveles iniciales.

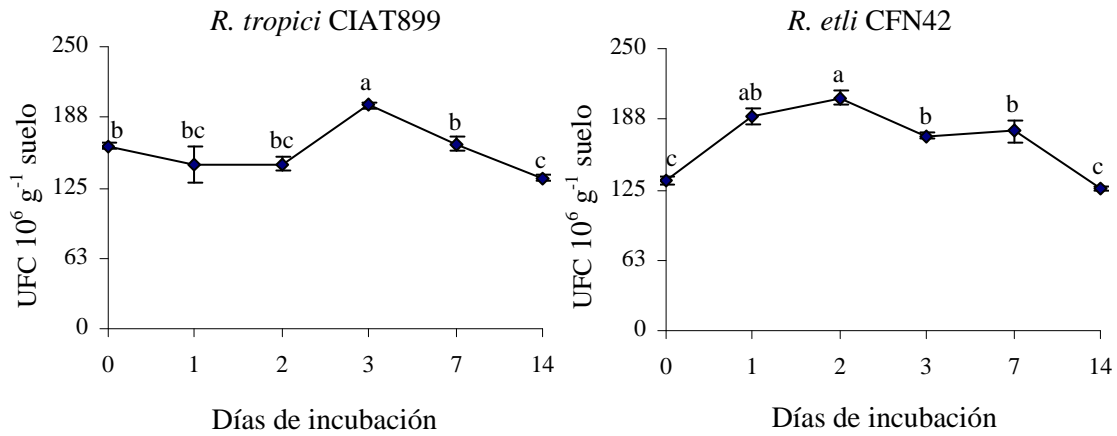


Figura 1.1. Viabilidad de *R. tropici* CIAT899 y *R. etli* CFN42 incubados en sistema de microcosmos. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

Los diagramas de barras de la figura 1.2 representan el porcentaje de supervivencia de las cepas incubadas con distintas dosis de imazamox en sistema de microcosmos, referido a la población control en cada punto.

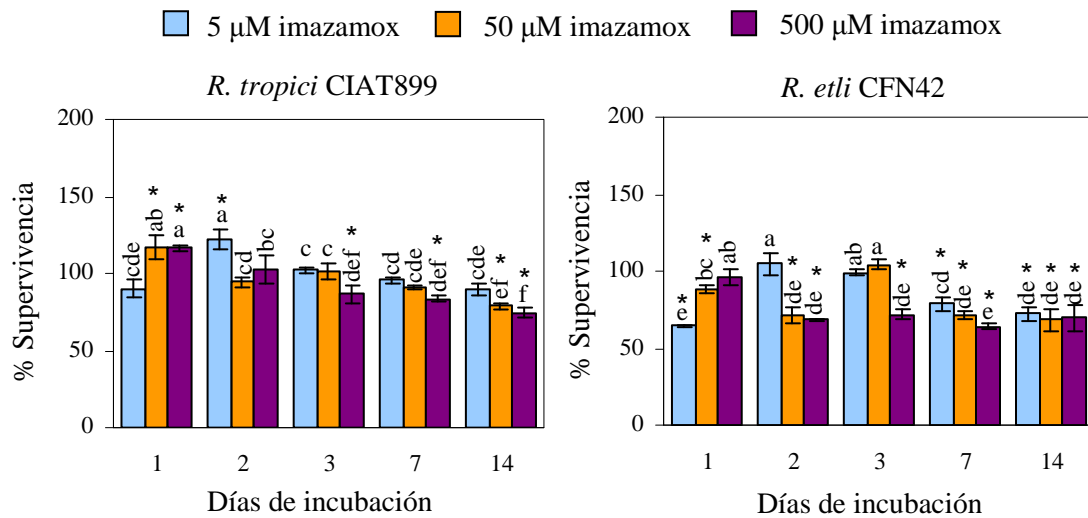


Figura 1.2. Porcentaje de supervivencia, con respecto al valor del control en cada punto, de *R. tropici* CIAT899 y de *R. etli* CFN42 incubados en sistema de microcosmos y tratados con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$). La presencia de un asterisco indica diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la población del control.

En *R. tropici* CIAT899 la población prácticamente no se vio afectada con la dosis menor, mientras que con las dosis mayores el número de unidades formadoras de colonias aumentó durante el primer día y partir de ahí se redujo gradualmente de forma proporcional a la dosis aplicada del herbicida, alcanzando el 25% de inhibición con 500 μM a los 14 días. En *R. etli* CFN42 la población se inhibió en general con todas las dosis de herbicida, aunque con 5 y 50 μM la población se recuperó en los primeros días para luego inhibirse, mientras que con la dosis de 500 μM se mantuvo inhibida más del 30% a partir del día 2 de experimentación, por lo tanto, la cepa de *R. etli* se afectó más por la presencia del herbicida. El análisis de la varianza (datos no mostrados) indicó que la mayor fuente de variación de este parámetro fue el tiempo (40%) para la cepa de *R. tropici* y la interacción tiempo-herbicida (50%) para la cepa de *R. etli*.

1.1.2. Actividad acetohidroxiácido sintasa

En la figura 1.3 se muestra la actividad AHAS en suspensiones bacterianas incubadas *in vivo* con imazamox. Se aprecia que la actividad AHAS de *R. tropici* CIAT899 incubado con 50 μM de imazamox se inhibió tras 2 horas de incubación y a las 4 horas recuperó los niveles del control, mientras que con la dosis de 500 μM la actividad inicialmente se incrementó el 15%, pero se redujo el 13% a las 4 horas de incubación. La actividad AHAS de la población de *R. etli* CFN42 se inhibió a las 2 horas de incubación con ambas dosis (25 y 35% respectivamente), tras 4 horas ambas actividades se recuperaron, superando ligeramente con la dosis 50 μM a la actividad control, pero manteniéndose inhibida casi el 20% con la dosis mayor.

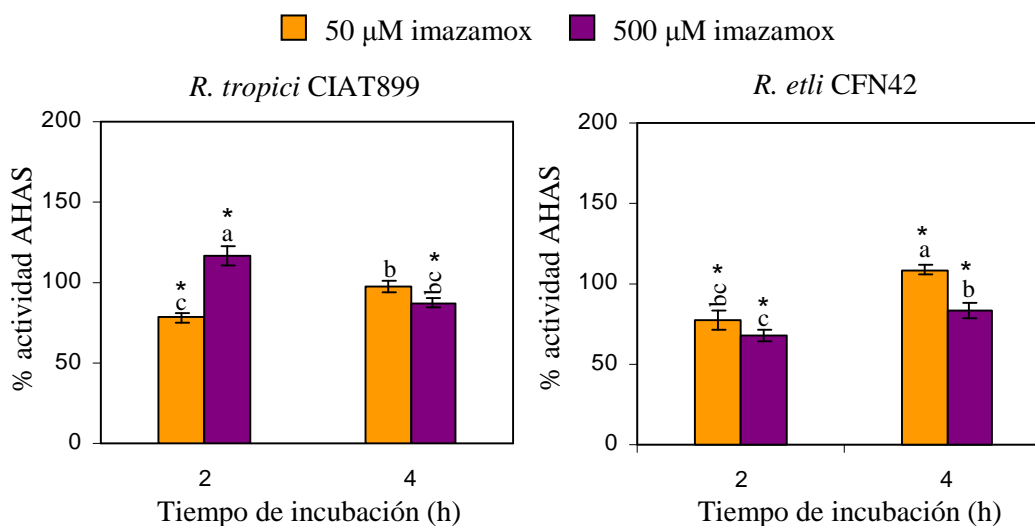


Figura 1.3. Porcentaje de actividad AHAS respecto al control en cada punto en *R. tropici* CIAT899 y de *R. etli* CFN42 incubado con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$). La presencia de un asterisco indica diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la actividad control.

Resultados

El análisis de la varianza (datos no mostrados) indicó que la variabilidad de este parámetro se debió fundamentalmente a la interacción herbicida-tiempo (60%) para la cepa de *R. tropici* y al tiempo (50%) para la cepa de *R. etli*.

La figura 1.4 representa la actividad AHAS en extractos bacterianos de las cepas de *Rhizobium* incubados *in vitro* con imazamox. En ambos casos la actividad del extracto fue atenuándose a lo largo del tiempo de forma gradual, reduciéndose a las 24 horas el 27% en la cepa de *R. tropici* y el 38% en la de *R. etli*. En la primera cepa el herbicida inhibió la actividad AHAS cerca del 10% con respecto al control en todos los muestreos con 50 μM , y alrededor del 15% con 500 μM . En la cepa de *R. etli* la actividad, respecto al control, incrementó con ambas dosis a las 6 horas de incubación, pero esas diferencias desaparecieron a las 12 horas. Con el tiempo de incubación mayor (24 h) la actividad disminuyó el 13% con la dosis de 50 μM y el 25% con la de 500 μM . El análisis de varianza de estos resultados (datos no mostrados), reflejó que la principal fuente de variación en esta actividad AHAS (80%) de debió al tiempo de incubación en ambas cepas.

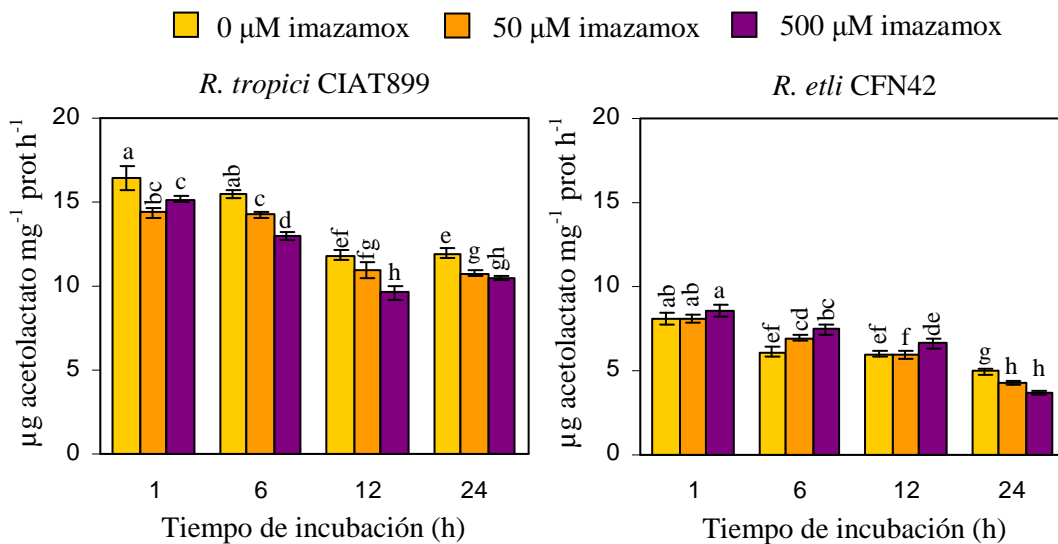


Figura 1.4. Actividad acetohidroxiácido sintasa en extractos de *R. tropici* CIAT899 y de *R. etli* CFN42 incubados con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

1.2. Experimentos con cepas nodulantes de veza: *R. leguminosarum* bv *viciae* VF39 y *R. leguminosarum* bv *viciae* UPM791

1.2.1. Viabilidad en microcosmos

En la figura 1.5 se muestra la viabilidad de las cepas de *R. leguminosarum* en el sistema de microcosmos de vidrio durante un periodo de 14 días, expresado

como número de unidades formadoras de colonias por gramo de de suelo. La cepa UPM791 incrementó considerablemente su número de células viables en los dos primeros días de incubación, pero después la población descendió en el día 3, se recuperó ligeramente tras 7 días y finalmente decreció en la última semana de incubación. En la cepa VF39 el crecimiento se mantuvo continuo en el sistema de microcosmos durante todo el tiempo de experimentación, aunque al igual que la cepa anterior el ritmo de crecimiento varió, siendo exponencial solo al inicio del experimento.

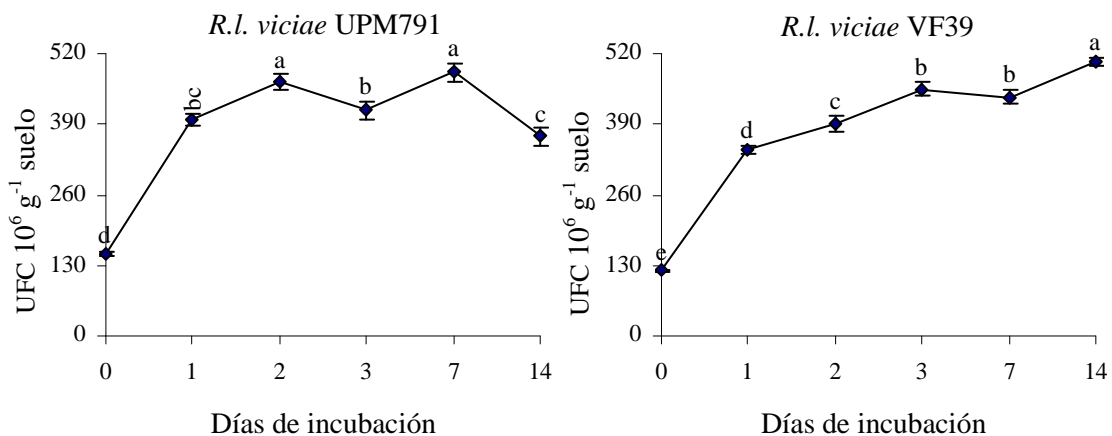


Figura 1.5. Viabilidad de *R.l. viciae* UPM791 y *R.l. viciae* VF39 incubados en sistema de microcosmos. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

La figura 1.6 muestra el porcentaje de supervivencia de las cepas de *Rhizobium* incubadas con distintas dosis de imazamox en sistema de microcosmos. Como en el apartado anterior (Fig. 1.1.2), el porcentaje está referido a la población control en cada punto, indicándose de esta manera las variaciones producidas en la población como resultado del tratamiento del herbicida. El número de bacterias viables en la cepa UPM791 aumentó con las dosis de 50 y de 500 μ M en el primer día de incubación, el día 3 se registró un aumento con la dosis mayor, y a los 14 días en los microcosmos tratados con 50 y 500 μ M se determinó una inhibición de la población del 30%. Con respecto a la cepa VF39 en general el herbicida estimuló el crecimiento de las bacterias en los primeros días, pero la población empezó a decrecer a partir del día 3, para finalmente quedar por debajo de los valores del control a los 14 días, el 20% menos con 5 y 50 μ M y el 25% menos con 500 μ M. En el análisis de la varianza (datos no mostrados) se encontró que este parámetro varió principalmente por el factor tiempo, representando el 40% de la variabilidad en la cepa UPM791 y el 70% en VF39.

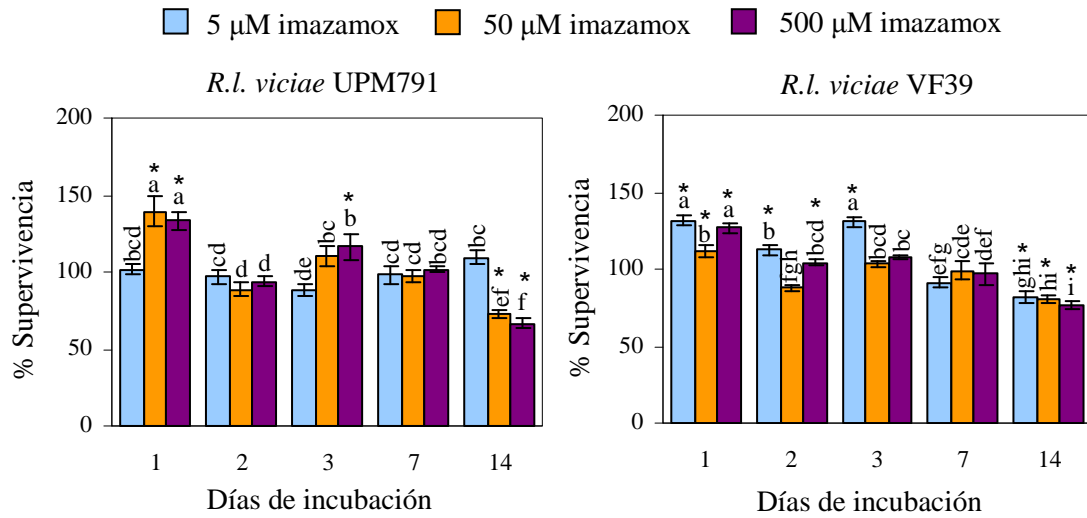


Figura 1.6. Porcentaje de supervivencia, con respecto al valor del control en cada punto, de *R.l. viciae* UPM791 y *R.l. viciae* VF39 incubados en sistema de microcosmos y tratados con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$). La presencia de un asterisco indica diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la población control.

1.2.2. Actividad acetohidroxiácido sintasa

La actividad AHAS en suspensiones bacterianas de las cepas UPM791 y VF39 incubadas *in vivo* con el herbicida, se recoge en la figura 1.7. En el caso de UPM791 al cabo de dos horas de incubación con el herbicida la actividad se inhibió el 35% con la dosis de 50 μM , pero no varió significativamente con respecto al control con la dosis mayor. A las 4 horas de incubación la actividad decayó con ambas dosis cerca del 50%. En la cepa VF39 la actividad AHAS se redujo tras 2 horas de incubación el 25% con ambas dosis, sin embargo con el tiempo ambas actividades aumentaron, a las 4 horas la actividad se incrementó el 30% con la dosis de 50 μM y no cambió significativamente con respecto al control con la de 500 μM . El análisis de la varianza (datos no mostrados) indicó que en ambas cepas la mayor fuente de variabilidad (60%) se debió al tiempo de incubación.

El análisis de la actividad AHAS en extractos enzimáticos bacterianos incubados *in vitro* durante 24 horas con el herbicida (Fig. 1.8) mostró resultados casi idénticos en las dos cepas. En ambos casos la actividad descendió paulatinamente alcanzando el 50% de reducción en UPM791 y el 40% en VF39 a las 24 horas y la actividad de los extractos tratados con herbicida se mantuvo entre el 15 y el 20% más baja que los controles. Se encontró en el análisis de la varianza

(datos no mostrados) que la actividad AHAS varió principalmente por el factor tiempo en las dos cepas, representando más del 80% de la variabilidad en ambos casos.

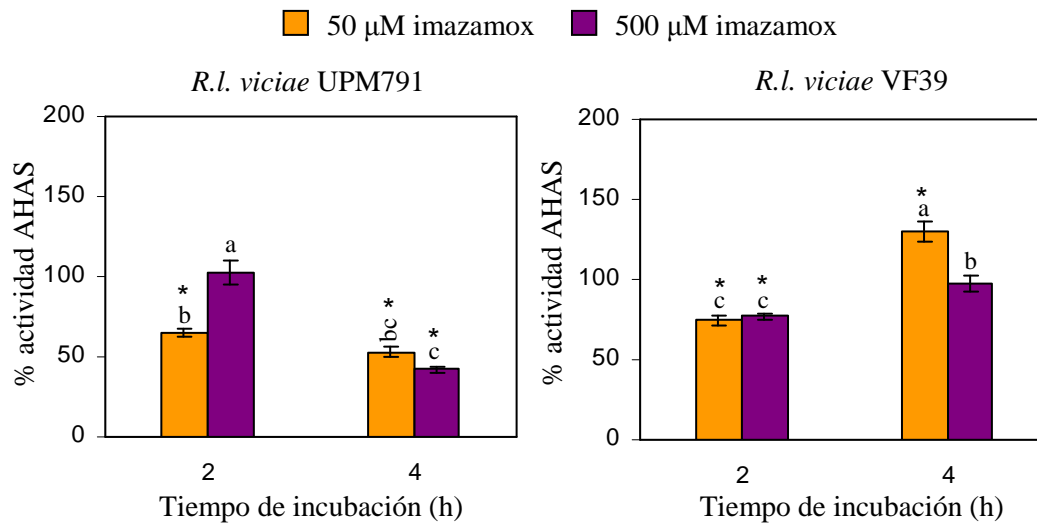


Figura 1.7. Porcentaje de actividad AHAS con respecto al control en cada punto, en suspensiones de poblaciones de *R.l. viciae* UPM791 y *R.l. viciae* VF39 incubadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$). La presencia de un asterisco indica diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con la actividad control.

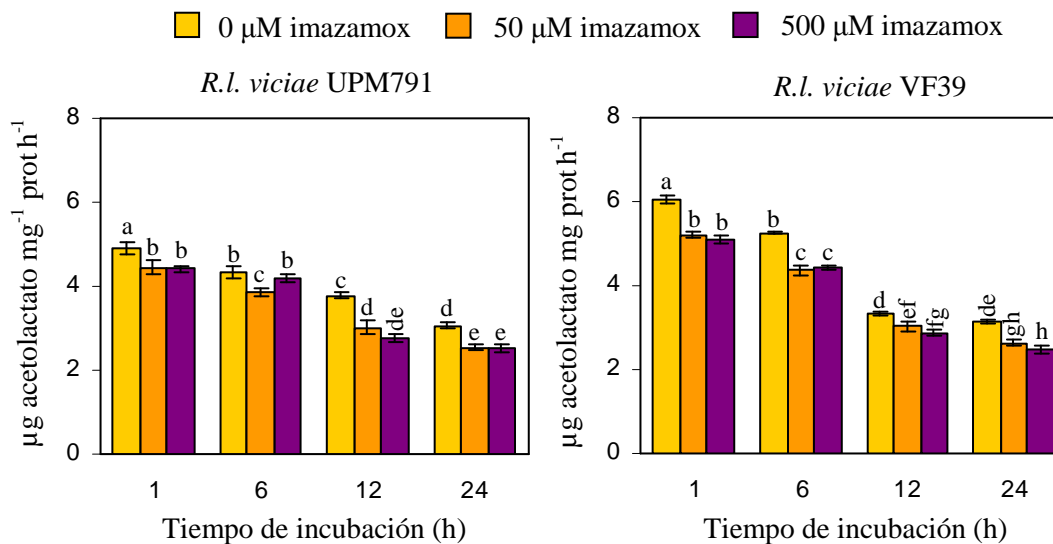


Figura 1.8. Actividad acetohidroxiácido sintasa en extractos de *R.l. viciae* UPM791 y *R.l. viciae* VF39 incubados con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

1.3. Transformación de cepas de *Rhizobium* para aumentar la actividad glutatión-S-transferasa

Se procedió a transformar distintas cepas de *Rhizobium* (*R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN42, *R. l. viciae* UF 39 y *R. l. viciae* UPM 791, *R. gallicum* R602, *R. giardinii* H152, Rp 84 y Rp 64) a fin de obtener bacterias que sobreexpresaran el gen *bphK*. Este gen, localizado en el operón *bph* de *Burkholderia xenovorans* LB400, codifica una proteína, BphKLB400, con una secuencia significativamente similar a la de la enzima glutatión-S-transferasa. Esta es una superfamilia de enzimas involucradas en la detoxificación de muchas sustancias endobióticas y xenobióticas. Las bacterias transformadas potencialmente presentarían alta tolerancia a pesticidas, especialmente herbicidas clorados.

Se utilizó el método de conjugación en filtro para tratar de transferir a las cepas la construcción "S 17.1 λ pir pUTmTn5*gusA-Cm-bphK*Ala180Pro-NptII-*pgfp*" portada por una cepa competente de *Escherichia coli* (*E. coli* BphK^{LB400}). Esta construcción aportaría a las cepas de *Rhizobium* que la incorporasen a su genoma, además del gen *bphK*, el gen que expresa la proteína verde fluorescente GFP, y genes que confieren resistencia a los antibióticos kanamicina y cloramfenicol.

En el aislamiento de las cepas transformadas con éxito se utilizaron placas con medio selectivo para *Rhizobium* (mmR) adicionadas con kanamicina y cloramfenicol. De las ocho cepas iniciales, cinco posibles mutantes (CIAT899', CFN42', R602', H152' y Rp84') fueron capaces de crecer en este medio. Mediante microscopio epifluorescente se comprobó que estas bacterias además expresaban la proteína GFP (Fig. 1.3.1).

Por otra parte, además de comprobar el crecimiento de las bacterias en medio selectivo (mmR) y la expresión de la proteína GFP (Fig. 1.9), se realizaron distintas pruebas complementarias que permitieron una mejor caracterización de las cepas iniciales y transformadas:

- a) Crecimiento en **Microplaca Biolog GN2** que permite obtener un patrón característico en base a la utilización o no por la bacteria de 95 fuentes de carbono diferentes, proporcionando una huella metabólica.
- b) Crecimiento en **agar Mac Conkey**, que inhibe el desarrollo de Gram positivas.
- c) Prueba de la **oxidasa**, que determina si la bacteria producen citocromo c oxidasa.
- d) Crecimiento a **42 °C**, temperatura que permite el crecimiento de *E. coli* pero no de los rizobios.

e) Prueba del **indol** que determina la capacidad del organismo de romper el aminoácido triptófano por medio de la enzima *triptofanasa*.

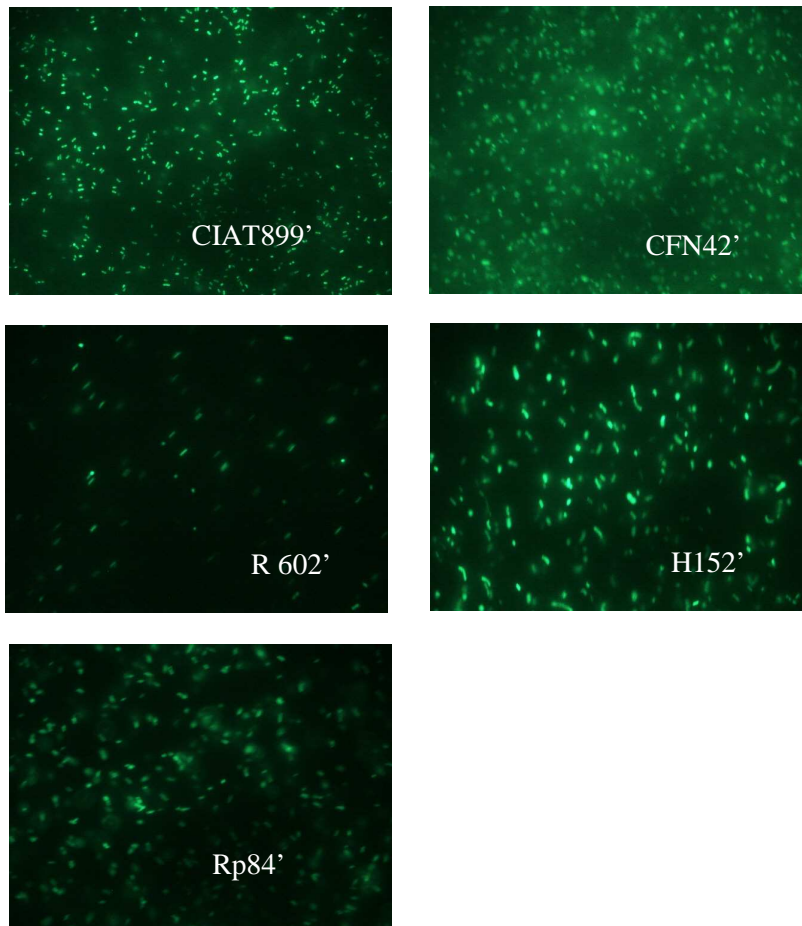


Figura 1.9. Cepas *R. tropici* CIAT899', *R. etli* CFN42', *R. gallicum* R602', *R. giardinii* H152' y Rp 84' expresando la proteína GFP vistas al microscopio epifluorescente.

El patrón obtenido para cada cepa en las microplacas Biolog GN2 fue procesado en la base de datos del programa Biolog® MicroLog System 3.5. En general los perfiles obtenidos no fueron muy precisos, por lo que el sistema no encontró la identificación exacta de las cepas, tan sólo se identificó el género en algunos casos (Tabla 1.1).

Los resultados obtenidos en el resto de pruebas realizadas tanto para las cepas silvestres como para las potencialmente transformadas y para la cepa de *E. coli* utilizada, se resumen en las tablas 1.2 y 1.3.

Resultados

Tabla 1.1. Resultados de la incubación de microplacas Biolog GN2 indicadas por el programa Biolog® MicroLog System 3.5 para las cepas *R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN42, Rp84, *R. giardinii* H152 y *R. gallicum* R602 silvestres y potencialmente transformadas.

Cepa	Silvestre	Potencial mutante
<i>R. tropici</i> CIAT899	<i>R. radiobacter</i> (SIM 0.5)	<i>R. radiobacter</i> (SIM 0.122)
<i>R. etli</i> CFN42	<i>R. like-cystic fibrosis</i> (SIM 0.146)	Incierto
Rp84	<i>S. meliloti</i> (SIM 0.166)	<i>R. rhizogenes</i> (SIM 0.269)
H152	<i>R. radiobacter</i> (SIM 0.7)	<i>R. radiobacter</i> (SIM 0.266)
R602	Incierto	Incierto

Se indica la especie reconocida por la base de datos y el grado de similitud (SIM), hallado, indicando el valor 1 identidad exacta

Tabla 1.2. Resultado de las pruebas de crecimiento en mmR, agar McConkey, medio con cloramfenicol y kanamicina (Cm+Kn), expresión de la proteína GFP, prueba de la oxidasa, crecimiento a 42 °C y prueba del indol en las cepas *R. tropici* CIAT899 y *R. etli* CFN42 silvestres y potencialmente transformadas, y *E. coli* BphK^{LB400}.

	CIAT899	CIAT899'	CFN42	CFN42'	BphK ^{LB400}
McConkey	++	++	--	-	+
mmR	++	++	++	++	-
Cm+Kn	--	++	--	++	+
GFP	N	P	N	P	+
Prueba oxidasa	P	P	P	N	-
42 °C	--	--	--	--	+
Prueba indol	N	X	N	N	P

(++crecimiento bueno, - poco crecimiento, -- no crecimiento, P resultado positivo, N resultado negativo, X resultados imprecisos)

Tabla 1.3. Resultado de las pruebas de crecimiento en mmR, agar McConkey, medio con cloramfenicol y kanamicina (Cm+Kn), expresión de la proteína GFP, prueba de la oxidasa, crecimiento a 42 °C y prueba del indol en las cepas *Rp84*, *R. giardinii* H152 y *R. gallicum* R602 silvestres y potencialmente transformadas.

	Rp84	Rp84'	H152	H152'	R602	R602'
McConkey	--	++	--	-	--	++
mmR	++	++	++	++	++	++
Cm+Kn	--	++	--	++	--	++
GFP	N	P	N	P	N	P
Prueba oxidasa	P	N	N	N	N	N
42 °C	--	--	--	--	--	--
Prueba indol	X	P	X	X	N	N

(++crecimiento bueno, - poco crecimiento, -- no crecimiento, P resultado positivo, N resultado negativo, X resultados imprecisos)

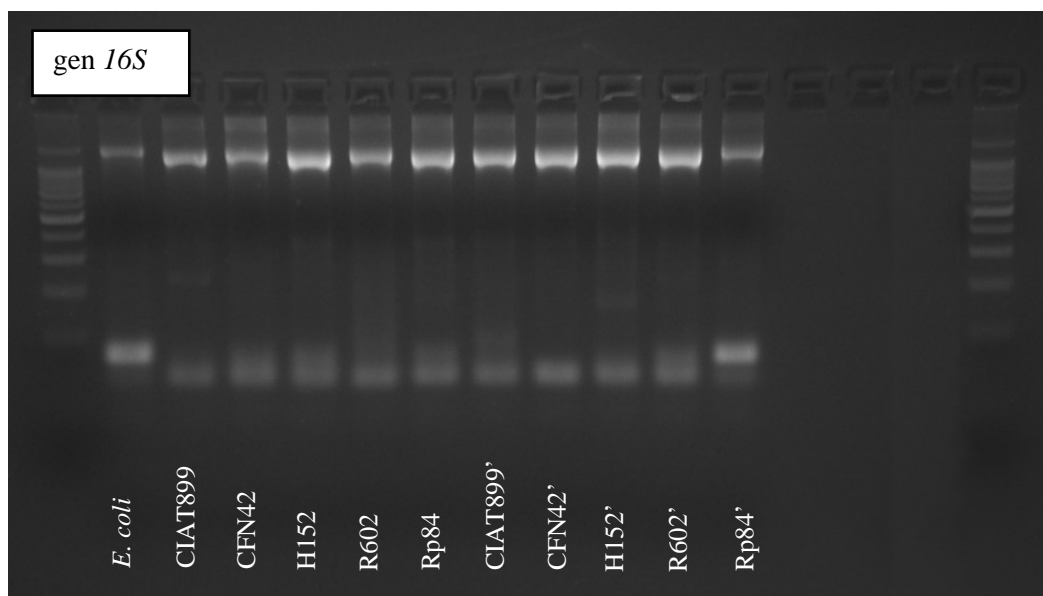


Figura 1.10. Expresión del gen *16S* del ADN_r amplificado por PCR y visualizado por electroforesis en gel de agarosa de las cepas *E. coli* BphK^{LB400}, *R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN42, *R. giardinii* H152, *R. gallicum* R602, y Rp 84 silvestres y potencialmente transformadas.

Resultados

El análisis de estos resultados arrojó algunas contradicciones que no permitieron extraer conclusiones claras, con lo que se procedió a amplificar el gen *16S* del ADNr (Fig. 1.10), para a continuación digerir el producto usando distintas enzimas de restricción, *EcoRI*, *BamHI* y *Sau3AI*, lo que permitió identificar diferencias de secuencias de dicho gen, separando los fragmentos formados por electroforesis en gel de agarosa (Figs. 1.11 y 1.12).

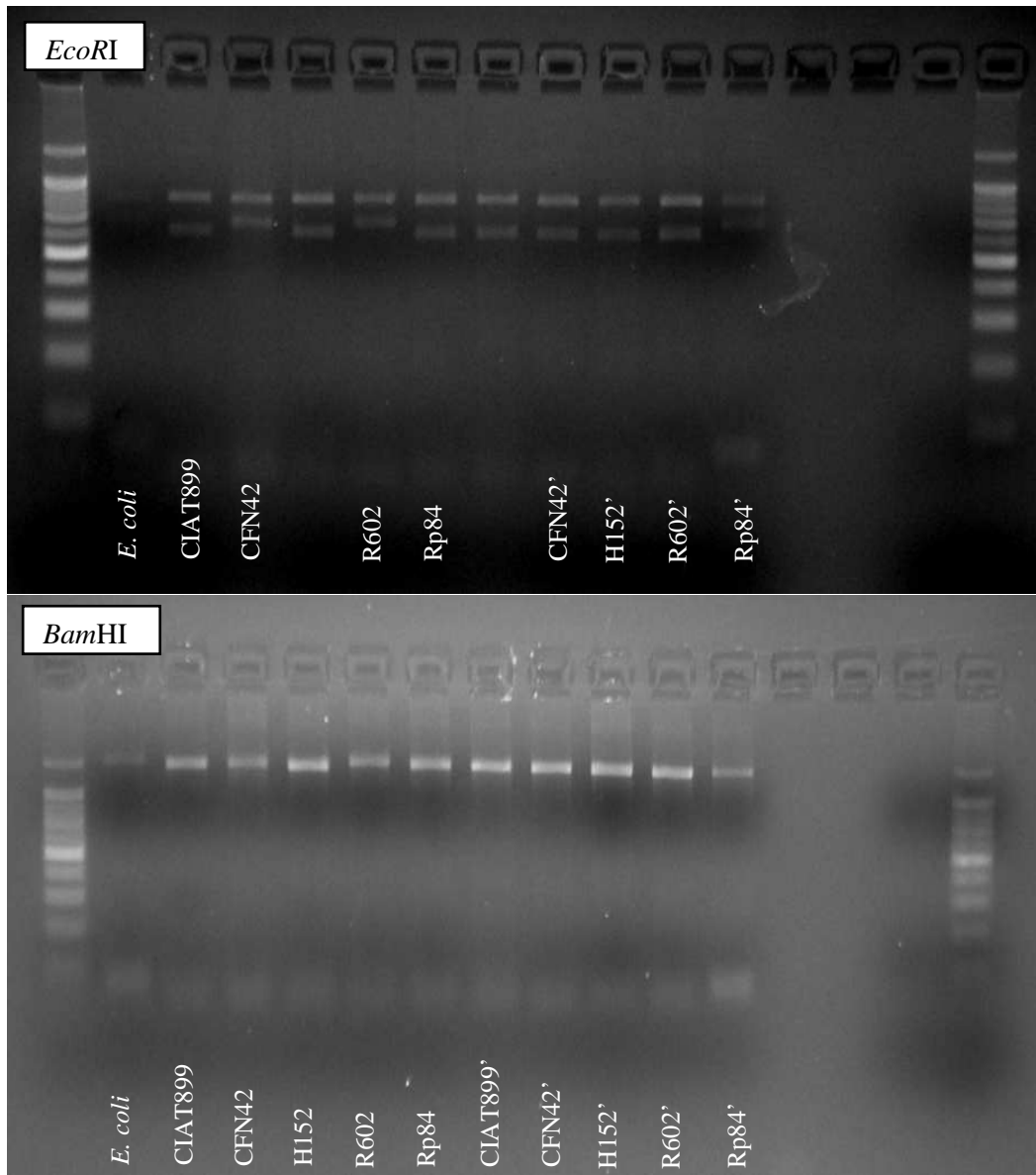


Figura 1.11 Fragmentos del gen *16S* resultado de la digestión de las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* visualizados por electroforesis en gel de agarosa de las cepas *E. coli* BphK^{LB400}, *R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN42, *R. giardinii* H152, *R. gallicum* R602, y Rp 84 silvestres y potencialmente transformadas.

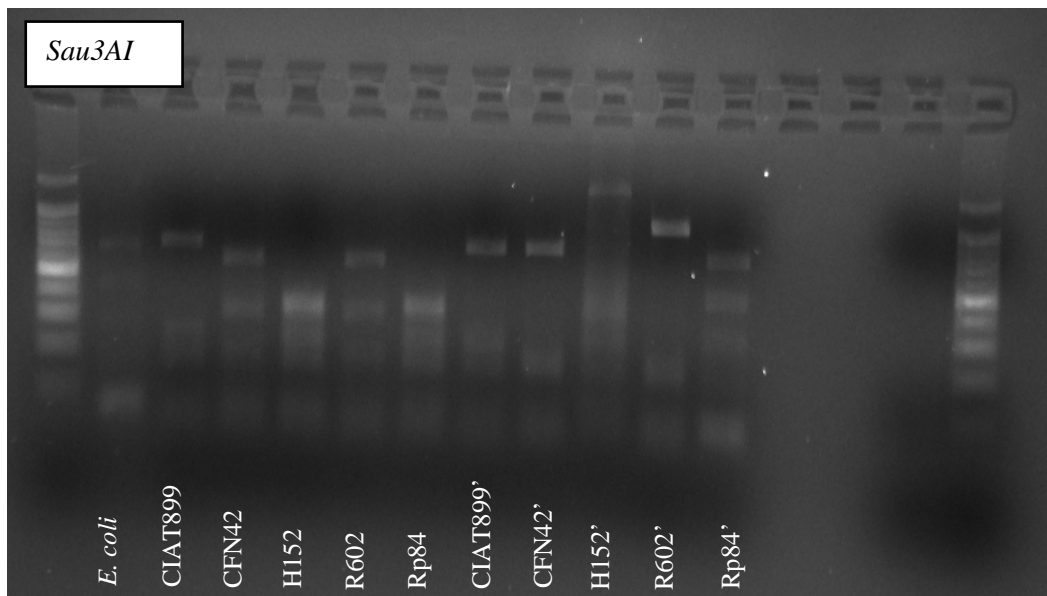


Figura 1.12 Fragmentos del gen *16S* resultado de la digestión de la enzima de restricción *Sau3AI* visualizados por electroforesis en gel de agarosa de las cepas *E. coli* BphK^{LB400}, *R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN42, *R. giardinii* H152, *R. gallicum* R602, y Rp 84 silvestres y potencialmente transformadas.

Observando los resultados se puede afirmar que el perfil de digestión del gen *16S* obtenido por el empleo de las tres enzimas de restricción fue idéntico en la cepa silvestre de *R. tropici* y la potencial mutante, por tanto se deduce que sólo se consiguió una cepa transformada que denominamos aquí como *R. tropici* CIAT899 BphK^{LB400} o simplemente CIAT'.

1.4. Tolerancia de las cepas estudiadas a distintos herbicidas

Del estudio de los resultados de las tablas 1.4, 1.5 y 1.6 se deduce que: a) la cepa más tolerante a herbicidas de las estudiadas es *R. tropici* CIAT899 y la menos *R.l. viciae* UPM791, b) todas las cepas mostraron mayor tolerancia a la presencia en el medio de ácido 2 -metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) que a imazamox o paraquat, c) las cepas *R. etli* CFN42 y la *R.l. viciae* UPM791 toleran concentraciones más altas de paraquat que de imazamox, al contrario que la *R.l. viciae* VF39, mientras que la cepa *R. tropici* CIAT899 tolera la misma concentración de uno que de otro, d) de las dos cepas que nodulan *P. vulgaris*, *R. tropici* CIAT899 es la más tolerante a herbicidas, y de las que nodulan *V. sativa* lo es *R.l. viciae* VF39 e) no se observaron diferencias entre la tolerancia mostrada a los distintos herbicidas por la cepa de *R. tropici* silvestre y la mutante CIAT899 BphK^{LB400}.

Resultados

Tabla 1.4. Tolerancia a **imazamox** de las cepas *R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN 42, *R. leguminosarum* bv *viciae* VF 39, *R. leguminosarum* bv *viciae* UPM791 y *R. tropici* CIAT899 BphK^{LB400} (CIAT') en base a la presencia o ausencia de colonias visibles durante 3 días de incubación a 28 °C.

Cepa	Concentración de imazamox (mM)							
	0	0.05	0.1	0.25	0.5	1	5	10
CIAT899	+++	+++	+++	+++	+++	++	--	--
CFN42	+++	+++	+++	+++	-	--	--	--
VF39	+++	+++	+++	+++	+++	--	--	--
UPM791	+++	+++	+++	--	--	--	--	--
CIAT'	+++	+++	+++	+++	+++	+++	--	--

(+++ crecimiento abundante, ++crecimiento bueno- poco crecimiento, -- no crecimiento)

Tabla 1.5. Tolerancia a **paraquat** de las cepas *R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN42, *R. leguminosarum* bv *viciae* VF39, *R. leguminosarum* bv *viciae* UPM791 y *R. tropici* CIAT899 BphK^{LB400} (CIAT') en base a la presencia o ausencia de colonias visibles durante 3 días de incubación a 28 °C.

Cepa	Concentración de paraquat (mM)							
	0	0.05	0.1	0.25	0.5	1	5	10
CIAT899	+++	+++	+++	+++	+++	++	--	--
CFN42	+++	+++	+++	-	--	--	--	--
VF39	+++	+++	+++	++	--	--	--	--
UPM791	+++	+++	+++	++	--	--	--	--
CIAT'	+++	+++	+++	+++	+++	++	--	--

(+++ crecimiento abundante, ++crecimiento bueno- poco crecimiento, -- no crecimiento)

Tabla 1.6. Tolerancia a **ácido 2 -metil-4-clorofenoxiacético** (MCPA) de las cepas *R. tropici* CIAT899, *R. etli* CFN 42, *R. leguminosarum* bv *viciae* VF 39, *R. leguminosarum* bv *viciae* 791 y *R. tropici* CIAT899 BphK^{LB400} (CIAT') en base a la presencia o ausencia de colonias visibles durante 3 días de incubación a 28 °C.

Cepa	Concentración de MCPA (mM)							
	0	0.05	0.1	0.25	0.5	1	5	10
CIAT899	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
CFN42	+++	+++	+++	+++	+++	++	--	--
VF39	+++	+++	+++	+++	+++	++	--	--
UPM791	+++	+++	+++	++	++	--	--	--
CIAT'	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

(+++ crecimiento abundante, ++crecimiento bueno- poco crecimiento, -- no crecimiento)

2. Estudio de la respuesta a imazamox para la selección de variedades tolerantes de *P. vulgaris* y *V. sativa*

En este experimento se estudia el efecto de la aplicación del herbicida imazamox (IZ) en el crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos, actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa, contenido de aminoácidos libres y proteína soluble total, azúcares solubles totales, contenido de peróxido de hidrógeno, peroxidación lipídica y metabolismo antioxidante en diferentes variedades de las dos especies seleccionadas: *P. vulgaris* (Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto) y *V. sativa* (Corina y Latigo).

Plantas de judía (*P. vulgaris*) y veza (*V. sativa*) crecieron en cultivo hidropónico en cámara de ambiente controlado. El tratamiento de imazamox se adicionó a la solución nutritiva en la etapa de crecimiento vegetativo, día 21 de cultivo en judía (0, 25, 50 y 100 μM de IZ) y día 28 en veza (0, 100 y 250 μM de IZ). Ambas leguminosas fueron cosechadas después de 7 días de tratamiento con herbicida, coincidiendo con el inicio de floración. En ambas leguminosas, el material vegetal recolectado para las posteriores determinaciones analíticas fue la última hoja totalmente expandida.

2.1. Experimentos con *Phaseolus vulgaris*

2.1.1. Análisis del crecimiento

Los datos correspondientes a los parámetros de crecimiento de las tres variedades de judía, expresados como peso seco de planta, parte aérea y raíz y relación raíz/parte aérea, se muestran en la tabla 2.1. El imazamox provocó una reducción del **peso seco de planta** proporcional a la dosis en las tres variedades de judía. Con la dosis más elevada (100 μM) la disminución fue del 60% en Bush Plaja, del 55% en Borloto y del 40% en Coco Blanc, siendo esta última variedad la menos afectada. Los **pesos seco de parte aérea y raíz** presentaron un comportamiento similar al descrito para el peso seco de planta, de hecho, con 100 μM de imazamox la parte aérea se redujo su crecimiento en torno al 50% en las tres variedades y la raíz disminuyó con esta dosis el 60% y 70% en Borloto y Bush Plaja, respectivamente, y tan sólo el 30% en Coco Blanc. La **relación raíz/parte aérea**, considerada como un índice de equilibrio entre el crecimiento de la raíz y la parte aérea, en Bush Plaja disminuyó con el herbicida, observándose el valor más bajo con la dosis de 50 μM . En las otras dos variedades estudiadas no se encontraron diferencias significativas en este parámetro. En la tabla 2.1 se observa que existe un nivel de significación del $p \leq 0.001$ en el peso seco de planta y de parte aérea.

Resultados

Tabla 2.1. Parámetros de crecimiento: peso seco de planta (PSP), peso seco de la parte aérea (PSPA) y peso seco de raíz (PSR), expresados en g, y relación raíz/parte aérea de tres variedades de *P. vulgaris* (Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto) tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

Variedad	IZ (μM)	PSP	PSPA	PSR	RPA
Bush Plaja	0	3.07 \pm 0.20 ^a	2.33 \pm 0.11 ^a	0.74 \pm 0.12 ^a	0.31 \pm 0.04 ^a
	25	2.06 \pm 0.21 ^b	1.75 \pm 0.17 ^b	0.32 \pm 0.05 ^b	0.18 \pm 0.02 ^b
	50	1.62 \pm 0.18 ^{bc}	1.40 \pm 0.14 ^{bc}	0.22 \pm 0.04 ^b	0.15 \pm 0.02 ^b
	100	1.29 \pm 0.11 ^c	1.09 \pm 0.09 ^c	0.20 \pm 0.02 ^b	0.19 \pm 0.01 ^b
	P-valor	***	***	***	**
	MDS(P \leq 0.05)	0.52	0.39	0.20	0.08
Coco Blanc	0	3.70 \pm 0.10 ^a	3.05 \pm 0.13 ^a	0.65 \pm 0.06 ^{ab}	0.22 \pm 0.03
	25	3.23 \pm 0.25 ^a	2.41 \pm 0.19 ^b	0.83 \pm 0.12 ^a	0.35 \pm 0.05
	50	2.65 \pm 0.24 ^b	2.12 \pm 0.21 ^{bc}	0.53 \pm 0.07 ^b	0.26 \pm 0.03
	100	2.13 \pm 0.13 ^b	1.66 \pm 0.14 ^c	0.47 \pm 0.06 ^b	0.30 \pm 0.06
	P-valor	***	***	*	NS
	MDS(P \leq 0.05)	0.57	0.49	0.24	0.13
Borloto	0	3.16 \pm 0.10 ^a	2.39 \pm 0.07 ^a	0.77 \pm 0.05 ^a	0.32 \pm 0.02
	25	1.89 \pm 0.23 ^b	1.45 \pm 0.17 ^b	0.43 \pm 0.08 ^{bc}	0.30 \pm 0.06
	50	1.85 \pm 0.21 ^b	1.33 \pm 0.19 ^b	0.52 \pm 0.06 ^b	0.49 \pm 0.14
	100	1.45 \pm 0.14 ^b	1.16 \pm 0.11 ^b	0.29 \pm 0.03 ^c	0.24 \pm 0.02
	P-valor	***	***	***	NS
	MDS(P \leq 0.05)	0.52	0.42	0.17	0.23

Los resultados (\pm ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P \leq 0.05). Para cada variedad las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 y NS (No significativo) p $>$ 0.05.

2.1.2. Pigmentos fotosintéticos

El contenido de **clorofilas, xantofilas y carotenos**, así como el de **pigmentos totales** en hoja de las tres variedades de judía, se presentan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb), xantofilas y carotenos (X+C) y pigmentos totales (PT), expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, de tres variedades de *P. vulgaris* (Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto) tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

Variedad	IZ (μM)	Cla	Clb	X+C	PT
Bush Plaja	0	144.2 \pm 8.0 ^a	48.9 \pm 3.6 ^a	39.5 \pm 1.9 ^a	2326 \pm 98 ^a
	25	152.4 \pm 3.3 ^a	48.2 \pm 1.5 ^a	39.6 \pm 1.1 ^a	2402 \pm 56 ^a
	50	110.6 \pm 3.2 ^b	32.2 \pm 1.0 ^b	27.9 \pm 1.0 ^b	1708 \pm 46 ^b
	100	75.2 \pm 2.8 ^c	21.1 \pm 0.8 ^c	20.8 \pm 0.9 ^c	1171 \pm 44 ^c
	P-valor	***	***	***	***
	MDS(P \leq 0.05)	14.9	6.4	4.0	200
Coco Blanc	0	89.7 \pm 2.0 ^b	22.7 \pm 0.7 ^b	24.8 \pm 0.7 ^a	1373 \pm 29 ^b
	25	60.4 \pm 2.2 ^c	15.1 \pm 0.4 ^c	18.8 \pm 0.9 ^b	943 \pm 29 ^c
	50	82.0 \pm 4.8 ^b	22.4 \pm 1.2 ^b	21.5 \pm 1.3 ^{ab}	1260 \pm 73 ^b
	100	105.0 \pm 5.2 ^a	30.9 \pm 1.6 ^a	24.2 \pm 1.7 ^a	1601 \pm 82 ^a
	P-valor	***	***	*	***
	MDS(P \leq 0.05)	11.4	3.3	3.7	180
Borloto	0	62.4 \pm 2.2 ^b	15.7 \pm 1.1 ^b	15.0 \pm 0.3 ^b	930 \pm 35 ^b
	25	92.3 \pm 0.5 ^a	26.9 \pm 0.3 ^a	19.6 \pm 0.4 ^a	1387 \pm 10 ^a
	50	92.5 \pm 0.6 ^a	27.4 \pm 0.2 ^a	19.6 \pm 0.2 ^a	1395 \pm 7 ^a
	100	63.6 \pm 0.5 ^b	15.1 \pm 0.1 ^b	15.6 \pm 0.2 ^b	943 \pm 6 ^b
	P-valor	***	***	***	***
	MDS(P \leq 0.05)	3.5	1.8	0.9	57

Los resultados (\pm ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P \leq 0.05). Para cada variedad las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 y NS (No significativo) p $>$ 0.05.

En la variedad Bush Plaja el contenido de pigmentos totales, clorofila y carotenos y xantofilas no experimentó cambios significativos con la dosis más baja de imazamox (25 μM), sin embargo, con 50 y 100 μM se observa una reducción alrededor del 75% y 50% respectivamente en estos parámetros. En Coco Blanc todos los pigmentos disminuyeron con la dosis de 25 μM (alrededor del 70%), sin embargo, hay que resaltar que con la dosis mayor aumentaron en torno al 15%, excepto las xantofilas y carotenos que no cambiaron significativamente. En Borloto todos los parámetros fotosintéticos estudiados aumentaron con las dosis intermedias de imazamox (25 y 50 μM), en cambio no hubo diferencias significativas entre la dosis mayor y los controles.

2.1.3. Actividad acetohidroxiácido sintasa

En el diagrama de barras de la figura 2.1 se representa la **actividad acetohidroxiácido sintasa (AHAS)** en hoja de las tres variedades de judía tratadas con imazamox. El imazamox estimuló esta actividad enzimática en las tres variedades de judía estudiadas, de modo que se observa que en Bush Plaja y Borloto se duplica o triplica según la dosis de herbicida aplicada, y en Coco Blanc se multiplicó por 5 con 25 μM , por 2 con 50 μM y se triplicó con 100 μM .

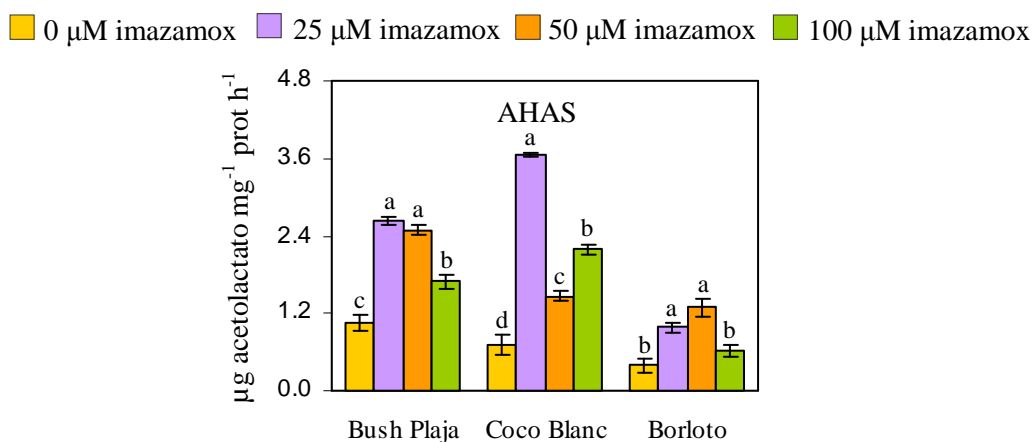


Figura 2.1. Actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en hoja de tres variedades de plantas de *P. vulgaris* (Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto) tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

2.1.4. Contenido de aminoácidos totales y proteína soluble total

Se determinó el contenido de aminoácidos libres totales y de proteína soluble total en hoja de las tres variedades de judía (Fig. 2.2). El contenido de **aminoácidos libres totales** (Aa) incrementó con el imazamox en las tres variedades de judía estudiadas. El valor más elevado de aminoácidos libres se detectó en Bush Plaja, donde se duplicó con 100 μM . En Coco Blanc y Borloto el incremento producido por el herbicida no fue tan drástico. Por el contrario, la **proteína soluble total** (PST) disminuyó con el imazamox en las tres variedades, de hecho en la figura 2.2 podemos observar que: **a)** en Bush Plaja decreció proporcionalmente con la dosis de herbicida, alcanzando una reducción del 25% con 100 μM ; **b)** en Coco Blanc se registró el valor de PST más bajo con la dosis de 50 μM (40%); **c)** en Borloto también se observó la máxima reducción con 50 μM (50%). El estudio de las correlaciones de estos parámetros muestra que existe una correlación negativa y significativa entre los parámetros de crecimiento (PSP, PSPA y PSR) y el contenido de aminoácidos libres en Bush Plaja (Tabla 2.5). También se observa una correlación negativa y significativa ($P \leq 0.01$) entre la PST y el contenido de aminoácidos libres en Coco Blanc (Tabla 2.6). Por otro lado, la actividad AHAS y la PST en Borloto se correlacionan negativamente ($P \leq 0.01$) (Tabla 2.7).

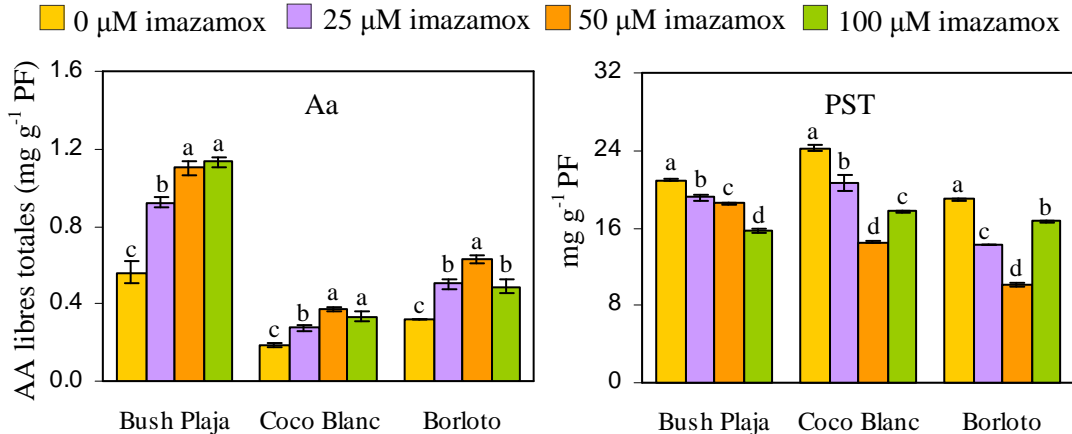


Figura 2.2. Aminoácidos libres totales (Aa) y proteína soluble total (PST) en hoja de tres variedades de *P. vulgaris* (Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto) tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

2.1.5. Contenido de azúcares solubles totales

El contenido de **azúcares solubles totales** (AST) en hoja de las tres variedades de judía se expone en la figura 2.3. Se aprecia que el contenido de

AST incrementó con el imazamox en las variedades Bush Plaja y Borloto, aunque no lo hizo de forma proporcional a la dosis aplicada. Por el contrario, en Coco Blanc se detectó una reducción, siendo del 40% con la dosis de 50 μM y del 25% con 100 μM . En la tabla 2.6 se visualiza una correlación positiva ($P \leq 0.05$) entre los AST y la PST en Coco Blanc. En la tabla 2.7, correspondiente a las correlaciones en la variedad Borloto, se detecta que los AST se correlacionan significativamente ($P \leq 0.05$) y de forma negativa con la PST, y de forma positiva con el contenido de aminoácidos libres y actividad AHAS.

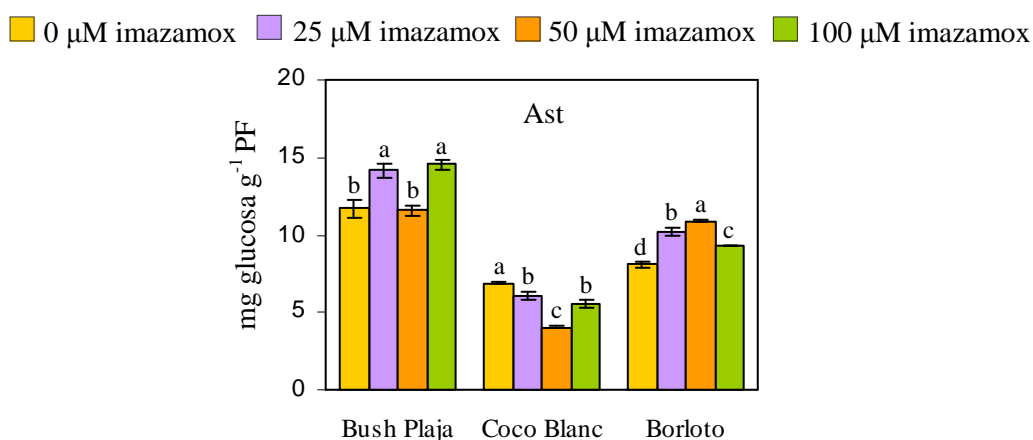


Figura 2.3. Contenido foliar de azúcares solubles totales (Ast) de tres variedades de *P. vulgaris* (Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto) tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

2.1.6. Contenido de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica

El **contenido de H_2O_2** disminuye alrededor del 40% con las distintas dosis de imazamox en hoja de Bush Plaja, en cambio en hoja de Coco Blanc incrementó con 25 μM (cerca del 30%), y se duplicó respecto al control con 100 μM . En hoja de la variedad Borloto se observó la misma respuesta que en Coco Blanc, de hecho aumentó con 25 μM (20%) y con 100 μM (10%).

La **peroxidación de lípidos** en hoja, determinada como concentración de malonaldehído (MDA), incrementa con el herbicida en Bush Plaja (alrededor del 20%) y en Borloto, aunque en esta última variedad sólo se aprecia daño oxidativo con las dosis mayores (50 y 100 μM). Por el contrario, en Coco Blanc el imazamox no produjo daño oxidativo en las membranas, ya que se observaron valores similares en la peroxidación de lípidos a los de plantas control.

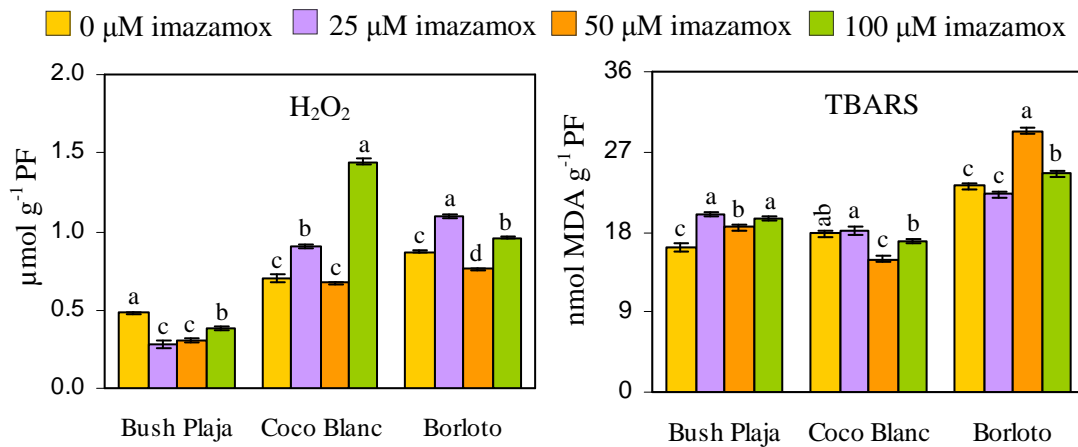


Figura 2.4. Contenido foliar de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) de tres variedades de *P. vulgaris* (Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto) tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

2.1.7. Enzimas antioxidantes

Se determinaron las actividades antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y guaiacol peroxidasa (GPX) en hoja de judía (Fig. 2.5). La actividad **superóxido dismutasa** en Bush Plaja y Coco Blanc incrementó con la dosis de 25 μ M de imazamox el 20% y el 10% respectivamente. En cambio, con el resto de dosis del herbicida los valores de actividad enzimática no cambiaron de forma significativa con respecto al control o disminuyeron, de hecho en Bush Plaja con 100 μ M se reduce un 15% y en Coco Blanc un 35% con 50 μ M. En Borloto las tres concentraciones de herbicida activaron de la misma forma la actividad SOD, multiplicándola por 4.5.

En general, el imazamox incrementó la actividad **catalasa** en las tres variedades de judía estudiadas, de esta forma en Bush Plaja con 25 μ M aumentó el 50% y no cambió significativamente con el resto de dosis, en Coco Blanc lo hizo de forma proporcional al tratamiento, duplicándose con respecto al control con 100 μ M, y en Borloto se activó el 90% con todas las dosis.

La **ascorbato peroxidasa** foliar aumentó con la aplicación del herbicida en las tres variedades de judía, observándose la mayor actividad en Bush Plaja y Coco Blanc con 25 μ M, ya que se multiplica por 2 y 4 respectivamente, en cambio en Borloto se alcanzó la máxima actividad con 100 μ M.

La **guaiacol peroxidasa** se activó de forma proporcional a la concentración de imazamox aplicada en las tres variedades. El incremento más drástico se detectó

Resultados

en Bush Plaja, que se multiplicó por 180 con la dosis mayor. En Coco Blanc y Borloto esta actividad se multiplicó por 5 y 1.5, respectivamente, con 100 μM .

El estudio de las correlaciones de estas actividades enzimáticas con el resto de parámetros determinados en este experimento mostró que los parámetros de crecimiento, peso seco de planta y peso seco de parte aérea se correlacionan significativamente ($P \leq 0.05$) y de forma negativa con: **a)** actividad CAT en Coco Blanc y Borloto (Tablas 2.6 y 2.7); **b)** actividad APX en Borloto (Tabla 2.7); **c)** actividad GPX en Bush Plaja (Tabla 2.5). Además, las actividades CAT y SOD se correlacionan positivamente en Bush Plaja ($P \leq 0.05$) (Tabla 2.5) y en Borloto ($P \leq 0.01$) (Tabla 2.7).

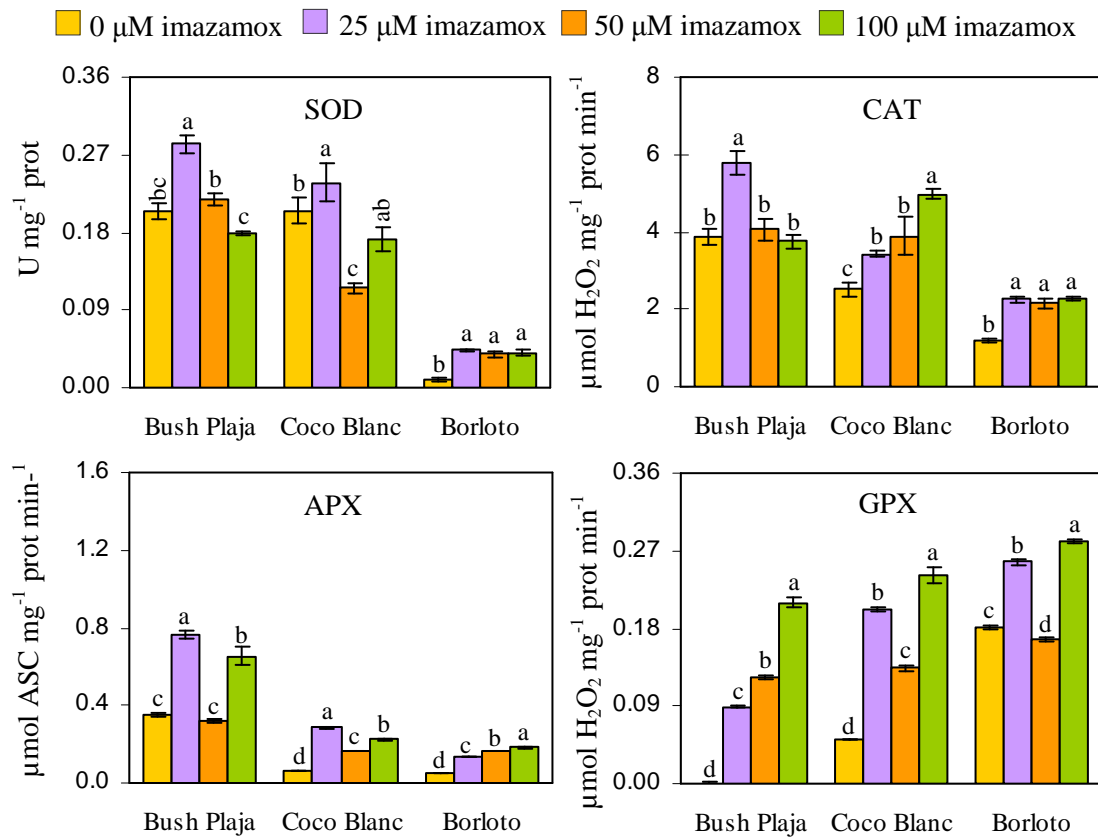


Figura 2.5. Actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y guaiacol peroxidasa (GPX) foliar de tres variedades de *P. vulgaris* (Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto) tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

2.2. Experimentos con *Vicia sativa*

2.2.1. Análisis del crecimiento

El crecimiento expresado como peso seco de planta, parte aérea y raíz, y la relación raíz/parte aérea de plantas de veza tratadas con imazamox, se expone en la tabla 2.3. El **peso seco de planta y de parte aérea** en la variedad Corina no cambió significativamente con el tratamiento herbicida, mientras que en Látigo el PSP se redujo el 70% con ambas dosis y el PSPA alrededor del 60%. Por el contrario, el **peso seco de raíz** se duplicó en Corina con la dosis más elevada de imazamox (250 μ M), pero no cambió significativamente en Látigo. La **relación raíz/parte aérea** incrementó en ambas variedades con el herbicida, de hecho en Corina aumentó de forma proporcional a la dosis llegando a duplicarse con respecto al control con 250 μ M, y en Látigo el incremento fue del 30% con ambas dosis.

Tabla 2.3. Parámetros de crecimiento: peso seco de planta (PSP), peso seco de la parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) expresados en g, y relación raíz/parte aérea de dos variedades de plantas de *V. sativa* (Corina y Látigo) tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

Variedad	IZ (μ M)	PSP	PSPA	PSR	RPA
Corina	0	0.11 \pm 0.01	0.095 \pm 0.006	0.013 \pm 0.001 ^b	0.14 \pm 0.01 ^b
	100	0.10 \pm 0.01	0.086 \pm 0.006	0.015 \pm 0.001 ^b	0.18 \pm 0.02 ^b
	250	0.12 \pm 0.01	0.093 \pm 0.006	0.027 \pm 0.001 ^a	0.30 \pm 0.02 ^a
	P-valor	NS	NS	***	***
	MDS(P \leq 0.05)	0.02	0.02	0.003	0.057
Látigo	0	0.10 \pm 0.01 ^a	0.096 \pm 0.006 ^a	0.008 \pm 0.000	0.09 \pm 0.01 ^b
	100	0.07 \pm 0.01 ^b	0.064 \pm 0.005 ^b	0.008 \pm 0.000	0.13 \pm 0.01 ^a
	250	0.07 \pm 0.00 ^b	0.059 \pm 0.003 ^b	0.007 \pm 0.001	0.12 \pm 0.01 ^a
	P-valor	***	***	NS	**
	MDS(P \leq 0.05)	0.015	0.015	0.002	0.033

Los resultados (\pm ES) son la media de 8 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P \leq 0.05). Para cada variedad las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 y NS (No significativo) p>0.05.

2.2.2. Pigmentos fotosintéticos

En la tabla 2.4 se recogen los datos correspondientes al contenido foliar de **clorofilas (a y b), xantofilas y carotenos**, así como **pigmentos totales** en las dos variedades de veza. En la variedad Corina se observa que la dosis de 100 µM de imazamox no provocó cambios significativos en las distintas determinaciones de pigmentos estudiadas, mientras que con la dosis mayor (250 µM) el contenido de clorofila a, xantofilas y carotenos, y los pigmentos totales disminuyeron alrededor del 10%, pero la clorofila b aumentó el 30% respecto al control. En general, en Látigo el contenido de clorofila a, xantofilas y carotenos, y pigmentos totales se redujeron de forma proporcional a la dosis de herbicida, siendo entre el 15-30% con 250 µM. Por el contrario, en esta variedad la clorofila b se incrementó el 20% con 100 µM y el 27% con 250 µM.

Tabla 2.4. Contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb), xantofilas y carotenos (X+C) y pigmentos totales (PT), expresado en µg g⁻¹ PF, de dos variedades de plantas de *V. sativa* (Corina y Látigo) tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

Variedad	IZ (µM)	Cla	Clb	X+C	PT
Corina	0	41.0±0.3 ^a	9.3±0.3 ^b	19.8±0.2 ^a	700±4 ^a
	100	41.1±0.5 ^a	10.2±0.3 ^b	19.0±0.1 ^a	704±5 ^a
	250	36.2±0.2 ^b	12.5±0.4 ^a	14.7±0.6 ^b	635±4 ^b
	P-valor	***	***	***	***
	MDS(P≤0.05)	1.1	1.1	1.2	14
Látigo	0	41.2±0.4 ^a	9.6±0.5 ^b	19.2±0.4 ^a	699±3 ^a
	100	37.2±0.2 ^b	11.5±0.4 ^a	14.8±0.3 ^b	635±1 ^b
	250	34.4±0.3 ^c	12.2±0.3 ^a	13.7±0.4 ^b	603±3 ^c
	P-valor	***	**	***	***
	MDS(P≤0.05)	0.9	1.3	1.2	8

Los resultados (± ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P≤0.05). Para cada variedad las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 y NS (No significativo) p>0.05.

2.2.3. Actividad acetohidroxiácido sintasa

En el diagrama de barras de la figura 2.6 se muestran los resultados correspondientes a la **actividad acetohidroxiácido sintasa (AHAS)** en hoja de las dos variedades de veza tratadas con imazamox. La actividad de la enzima acetohidroxiácido sintasa se inhibió por el tratamiento de herbicida en ambas variedades de forma proporcional a la dosis aplicada. En Corina el descenso fue más drástico que en la variedad Látigo, siendo del 75% con 100 μM y del 85% con 250 μM en Corina, por sólo el 20% y el 35% con 100 y 250 μM , respectivamente, en Látigo.

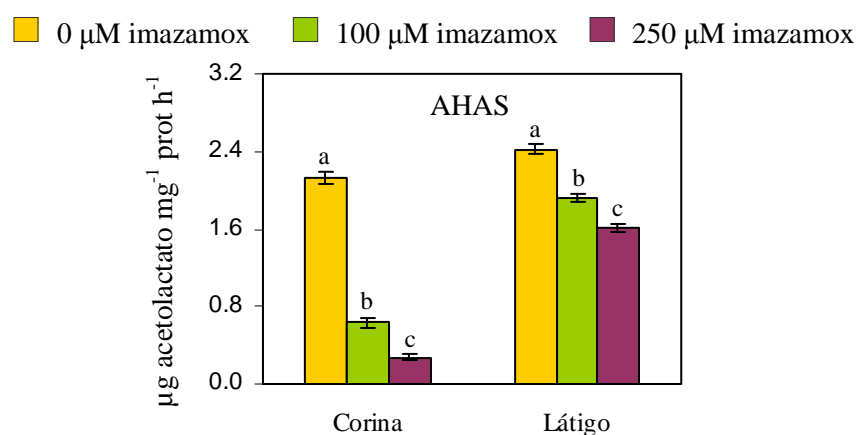


Figura 2.6. Actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en hoja de dos variedades de plantas de *V. sativa* (Corina y Látigo) tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

En la tabla 2.9 correspondiente a las correlaciones en la variedad Látigo se detecta que la actividad AHAS se correlacionan significativamente ($P \leq 0.05$) y de forma positiva con el contenido de clorofila a y pigmentos totales.

2.2.4. Contenido de aminoácidos totales y proteína soluble total

Se evaluó el contenido de aminoácidos libres totales y de proteína soluble total en hoja de plantas de veza (Fig. 2.7). En ambas variedades el contenido de **aminoácidos libres totales** sólo se redujo de forma significativa con la mayor dosis de imazamox (250 μM), siendo del 25% en Corina y del 10% en Látigo. Las dos dosis de herbicida disminuyeron (15-25%) de forma significativa la **proteína soluble total** en la variedad Corina, mientras que en Látigo sólo con 250 μM se observa un descenso (10%).

Resultados

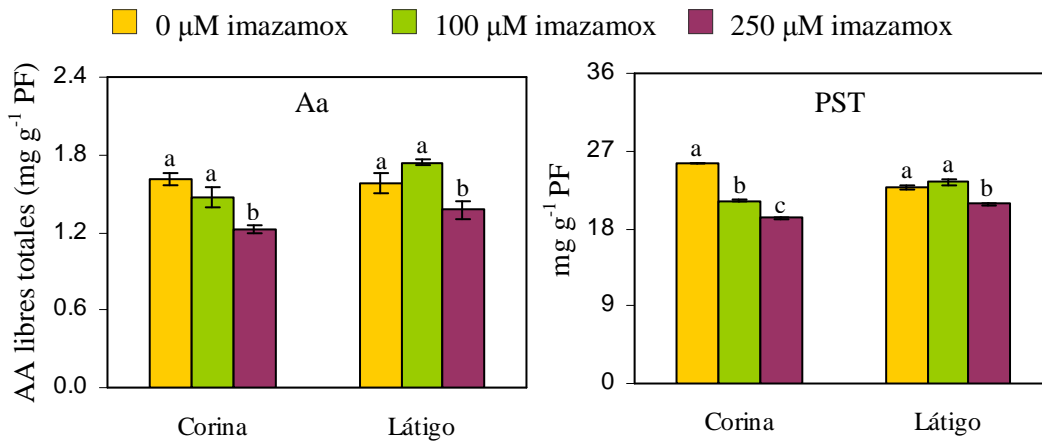


Figura 2.7. Aminoácidos libres totales (Aa) y proteína soluble total (PST) en hoja de dos variedades de *V. sativa* tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

2.2.5. Contenido de azúcares solubles totales

Las dos variedades de veza, cuando fueron tratadas con imazamox, aumentaron su contenido de **azúcares solubles totales** en hoja (Fig. 2.8). Hay que destacar que ambas dosis de herbicida provocaron el mismo efecto en la cantidad de azúcares solubles totales en las dos variedades, de hecho se multiplicó por 3 en Corina y por 4.5 en Látigo con respecto a las plantas control. Además, la variedad Látigo acumuló mayor contenido de azúcares solubles que Corina en condiciones de estrés.

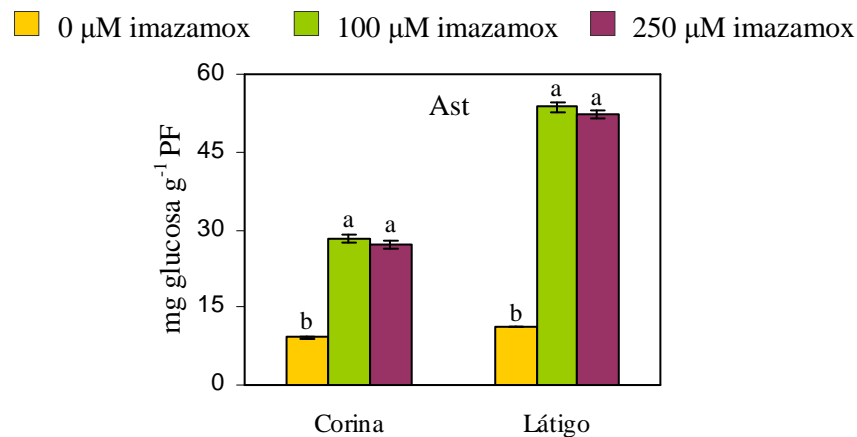


Figura 2.8. Contenido foliar de azúcares solubles totales (Ast) de dos variedades de *V. sativa* (Corina y Látigo) tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

2.2.6. Contenido de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica

En la figura 2.9 se exponen los datos de contenido de peróxido de hidrógeno y de peroxidación lipídica de hoja de las dos variedades de veza. En ambas variedades el contenido de **peróxido de hidrógeno** se incrementó con el imazamox, siendo más acusada en las plantas tratadas con la dosis menor. En Corina se observó un aumento del 50% con 100 μM y del 10% con 250 μM , y en Látigo el contenido se multiplicó por 7 y por 5 con 100 y 250 μM respectivamente. La **peroxidación de lípidos** se incrementó drásticamente en las hojas de plantas de veza expuestas al herbicida, de hecho en Corina lo hizo de forma proporcional a la dosis aplicada, multiplicándose por 3 con 100 μM y por 5 con 250 μM , mientras que en Látigo el daño oxidativo se multiplicó por 6 con ambas dosis. En la tabla 2.9 correspondiente al estudio de correlaciones de la variedad Látigo, se observa que la peroxidación de lípidos se correlaciona de forma positiva y significativa ($P \leq 0.05$) con el contenido de azúcares solubles totales.

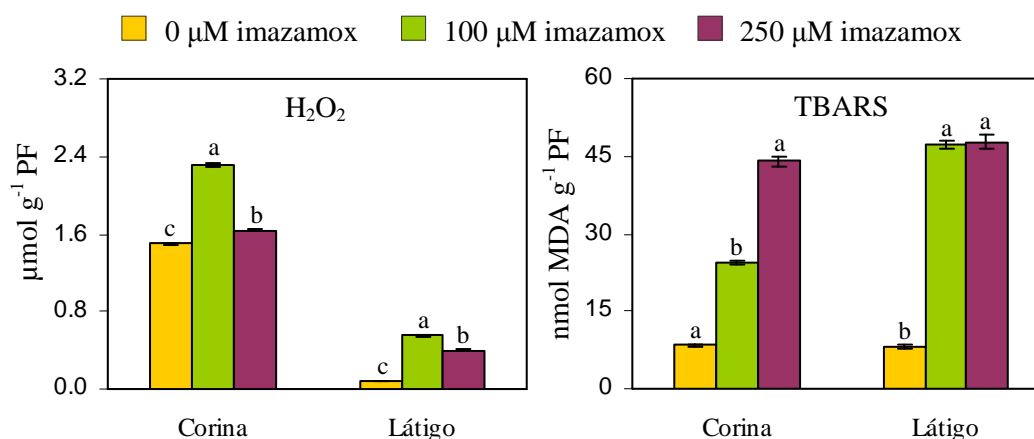


Figura 2.9. Contenido foliar de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) de dos variedades de *V. sativa* (Corina y Látigo) tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

2.2.7. Metabolismo antioxidante

Las actividades antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y guaiacol peroxidasa (GPX) determinadas en hoja de veza (var. Corina y var. Látigo) se representan en la figura 2.10.

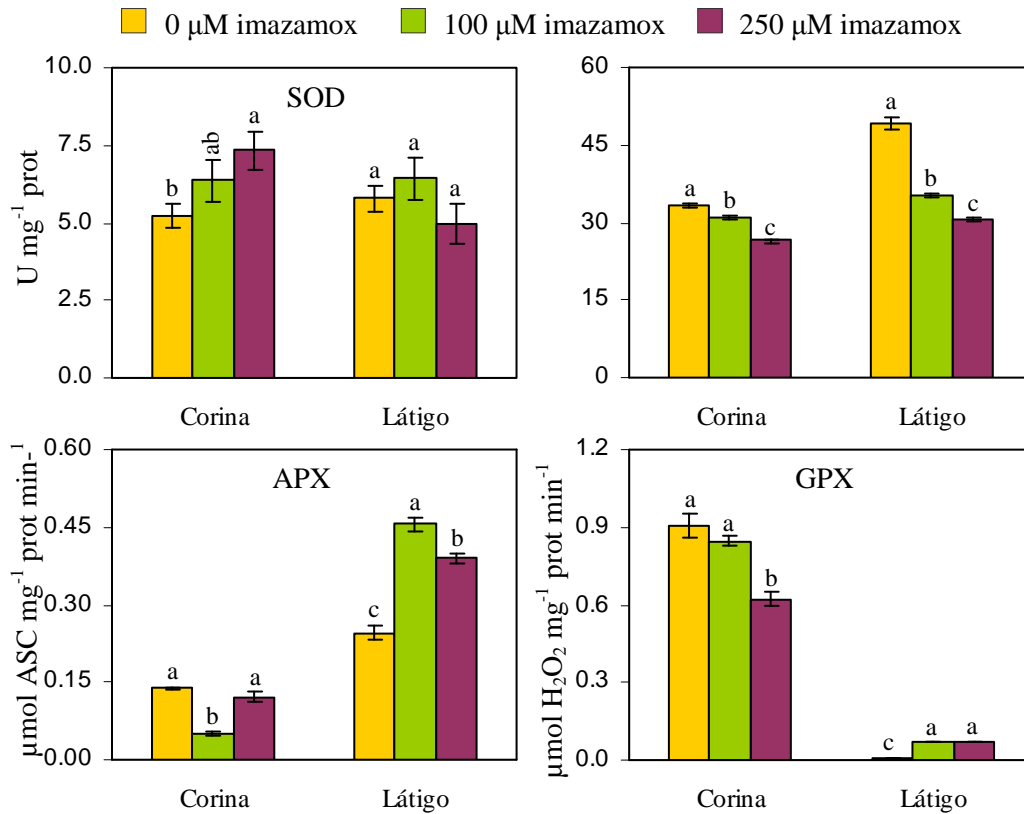


Figura 2.10. Actividades enzimática superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y guaiacol peroxidasa (GPX) foliar de dos variedades de *V. sativa* (Corina y Látigo) tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

La actividad **superóxido dismutasa** foliar se estimuló alrededor del 25% con ambas dosis de imazamox en Corina, sin embargo, en Látigo las diferencias encontradas no fueron significativas. La actividad **catalasa** se inhibió de forma proporcional a la dosis de herbicida en las dos variedades, aunque lo hizo de forma más acusada en Látigo, donde se redujo el 40% con la dosis mayor. La actividad **ascorbato peroxidasa** en hoja de Corina se redujo el 60% con respecto al control con 100 µM y no cambió con 250 µM. Por el contrario, esta actividad enzimática aumentó con ambas dosis en la variedad Látigo, siendo del 80% con 100 µM y del

60% con 250 μ M. La actividad **guaiacol peroxidasa** presentó un comportamiento similar al descrito para la ascorbato peroxidasa, de este modo en el diagrama de barras correspondiente a la actividad GPX se observa que en Corina esta enzima se inhibió sólo con la dosis mayor (40%), y en cambio en Látigo aumentó drásticamente con ambas dosis, multiplicándose por 6.

El estudio de las correlaciones de estas actividades enzimáticas antioxidantes determinadas en hoja con el resto de parámetros determinados en este experimento mostró que: **a)** la actividad APX se correlaciona con el contenido de peróxido de hidrógeno de forma negativa y significativa en Corina (Tabla 2.8) y positiva en Látigo (Tabla 2.9); **b)** la actividad APX foliar de Corina se correlaciona de forma significativa y positiva con el peso seco de parte aérea (Tabla 2.8); **c)** la actividad CAT foliar de Corina se correlaciona con el contenido de aminoácidos libres ($r= 0.999^{***}$) y de clorofila b ($r= -0.999^{***}$) (Tabla 2.8); **d)** la actividad SOD foliar de Látigo se correlaciona con el contenido de aminoácidos libres totales ($r= 0.999^{***}$) (Tabla 2.9); **e)** la actividad GPX se correlaciona significativamente ($P\leq 0.05$) y de forma negativa con la relación raíz parte/aérea en Corina (Tabla 2.8) y con el peso seco de planta en Látigo (Tabla 2.9).

Tabla 2.5. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables siguientes: Peso seco de planta (PSP), Peso seco de parte aérea (PSPA), Peso seco de raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), Contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb), xantofilas y carotenos (x+c), pigmentos totales (PT), actividad acetohidroxiácidos sintasa (AHAS), aminoácidos libres totales (AATT), proteína soluble total (PST), azúcares solubles totales (AST), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBARS) y actividades superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidada (APX) y guiacol peroxidada (GPX) en plantas de *P. vulgaris*, variedad **BUSH PLAJA**, tratadas con imazamox.

	PSP	PSPA	PSR	RPA	Cla	Clb	x+c	PT	AHAS	AATT	PST	AST	H ₂ O ₂	TBARS	SOD	CAT	APX	GPX
PSP	1.000																	
PSPA	0.994	1.000																
PSR	0.973	0.942	1.000															
RPA	0.879	0.823	0.962	1.000														
Cla	0.773	0.836	0.608	0.404	1.000													
Clb	0.851	0.901	0.711	0.529	0.990	1.000												
x+c	0.839	0.890	0.698	0.519	0.990	0.999	1.000											
PT	0.803	0.862	0.648	0.452	0.998	0.996	0.996	1.000										
AHAS	-0.554	-0.461	-0.730	-0.878	0.083	-0.059	-0.048	0.029	1.000									
AATT	-0.991	-0.975	-0.988	-0.927	-0.714	-0.805	-0.795	-0.750	0.637	1.000								
PST	0.918	0.948	0.816	0.628	0.890	0.918	0.903	0.901	-0.220	-0.858	1.000							
AST	-0.516	-0.514	-0.499	-0.351	-0.304	-0.324	-0.289	-0.307	0.226	0.438	-0.664	1.000						
H ₂ O ₂	0.600	0.509	0.768	0.897	-0.037	0.104	0.090	0.016	-0.996	-0.674	0.287	-0.307	1.000					
TBARS	-0.787	-0.737	-0.863	-0.836	-0.292	-0.392	-0.365	-0.327	0.760	0.784	-0.681	0.787	-0.813	1.000				
SOD	0.166	0.268	-0.057	-0.262	0.752	0.660	0.675	0.720	0.679	-0.093	0.407	0.137	-0.661	0.392	1.000			
CAT	0.041	0.135	-0.161	-0.313	0.633	0.545	0.568	0.604	0.674	0.006	0.220	0.386	-0.678	0.555	0.966	1.000		
APX	-0.362	-0.333	-0.410	-0.334	-0.015	-0.053	-0.017	-0.024	0.359	0.309	-0.444	0.952	-0.428	0.796	0.424	0.643	1.000	
GPX	-0.965	-0.984	-0.889	-0.731	-0.866	-0.912	-0.898	-0.884	0.345	0.923	-0.990	0.622	-0.405	0.731	-0.329	-0.161	0.421	1.000

P ≤
0.05 0.01
0.950 0.990

Tabla 2.6. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables siguientes: Peso seco de planta (PSP), Peso seco de parte aérea (PSPA), Peso seco de raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), Contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb), xantofilas y carotenos (x+c), pigmentos totales (PT), actividad acetohidroxiácidos sintasa (AHAS), aminoácidos libres totales (AATT), proteína soluble total (PST), azúcares solubles totales (AST), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBARS) y actividades superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidada (APX) y guiacol peroxidada (GPX) en plantas de *P. vulgaris*, variedad **COCO BLANC**, tratadas con imazamox.

	PSP	PSPA	PSR	RPA	Cla	Clb	x+c	PT	AHAS	AATT	PST	AST	H ₂ O ₂	TBARS	SOD	CAT	APX	GPX	
PSP	1.000																		
PSPA	0.982	1.000																	
PSR	0.720	0.578	1.000																
RPA	-0.307	-0.478	0.435	1.000															
Cla	-0.498	-0.349	-0.880	-0.508	1.000														
Clb	-0.662	-0.532	-0.916	-0.349	0.979	1.000													
x+c	-0.070	0.095	-0.658	-0.752	0.900	0.792	1.000												
PT	-0.501	-0.353	-0.879	-0.502	1.000	0.980	0.898	1.000											
AHAS	-0.194	-0.373	0.537	0.993	-0.593	-0.449	-0.793	-0.588	1.000										
AATT	-0.872	-0.882	-0.532	0.345	0.126	0.301	-0.285	0.128	0.257	1.000									
PST	0.806	0.796	0.563	-0.204	-0.125	-0.280	0.249	-0.126	-0.121	-0.984	1.000								
AST	0.647	0.631	0.483	-0.089	-0.010	-0.138	0.298	-0.010	-0.025	-0.919	0.972	1.000							
H ₂ O ₂	-0.708	-0.725	-0.403	0.441	0.536	0.648	0.245	0.541	0.356	0.315	-0.166	0.071	1.000						
TBARS	0.530	0.448	0.652	0.291	-0.229	-0.295	-0.017	-0.227	0.353	-0.762	0.863	0.927	0.204	1.000					
SOD	0.778	0.659	0.948	0.322	-0.681	-0.752	-0.405	-0.681	0.423	-0.736	0.783	0.737	-0.266	0.847	1.000				
CAT	-0.985	-0.990	-0.628	0.427	0.456	0.628	0.025	0.461	0.318	0.817	-0.723	-0.540	0.801	-0.383	-0.665	1.000			
APX	-0.457	-0.615	0.288	0.984	-0.424	-0.245	-0.728	-0.419	0.960	0.503	-0.368	-0.245	0.486	0.132	0.152	0.559	1.000		
GPX	-0.756	-0.855	-0.127	0.829	0.039	0.225	-0.348	0.044	0.759	0.619	-0.469	-0.275	0.807	0.030	-0.177	0.847	0.889	1.000	

P ≤
0.05 0.01
0.950 0.990

Tabla 2.7. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables siguientes: Peso seco de planta (PSP), Peso seco de parte aérea (PSPA), Peso seco de raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), Contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb), xantofilas y carotenos (x+c), pigmentos totales (PT), actividad acetohidroxiácidos sintasa (AHAS), aminoácidos libres totales (AATT), proteína soluble total (PST), azúcares solubles totales (AST), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBARS) y actividades superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidada (APX) y guiacol peroxidada (GPX) en plantas de *P. vulgaris*, variedad **BORLOTO**, tratadas con imazamox.

	PSP	PSPA	PSR	RPA	Cla	Clb	x+c	PT	AHAS	AATT	PST	AST	H ₂ O ₂	TBARS	SOD	CAT	APX	GPX	
PSP	1.000																		
PSPA	0.995	1.000																	
PSR	0.963	0.931	1.000																
RPA	0.076	-0.024	0.341	1.000															
Cla	-0.367	-0.430	-0.178	0.607	1.000														
Clb	-0.307	-0.374	-0.111	0.647	0.998	1.000													
x+c	-0.435	-0.496	-0.249	0.582	0.997	0.990	1.000												
PT	-0.358	-0.422	-0.167	0.616	1.000	0.998	0.996	1.000											
AHAS	-0.537	-0.612	-0.309	0.722	0.925	0.918	0.938	0.925	1.000										
AATT	-0.777	-0.835	-0.580	0.560	0.751	0.726	0.789	0.748	0.929	1.000									
PST	0.529	0.608	0.288	-0.776	-0.869	-0.865	-0.883	-0.870	-0.990	-0.942	1.000								
AST	-0.686	-0.747	-0.486	0.588	0.893	0.873	0.919	0.891	0.981	0.967	-0.965	1.000							
H ₂ O ₂	-0.234	-0.161	-0.419	-0.750	0.051	0.008	0.068	0.041	-0.209	-0.208	0.332	-0.092	1.000						
TBARS	-0.307	-0.389	-0.070	0.823	0.361	0.374	0.374	0.366	0.661	0.721	-0.759	0.607	-0.826	1.000					
SOD	-0.944	-0.949	-0.884	0.016	0.617	0.563	0.673	0.609	0.687	0.821	-0.643	0.813	0.359	0.228	1.000				
CAT	-0.972	-0.973	-0.919	-0.016	0.549	0.492	0.609	0.540	0.648	0.814	-0.613	0.782	0.331	0.249	0.995	1.000			
APX	-0.974	-0.983	-0.902	0.066	0.328	0.275	0.395	0.321	0.568	0.826	-0.590	0.698	0.013	0.494	0.876	0.914	1.000		
GPX	-0.611	-0.530	-0.797	-0.823	-0.174	-0.238	-0.119	-0.185	-0.216	0.006	0.281	-0.031	0.807	-0.535	0.554	0.582	0.460	1.000	

P ≤
0.05 0.01
0.950 0.990

Tabla 2.8. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables siguientes: Peso seco de planta (PSP), Peso seco de parte aérea (PSPA), Peso seco de raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), Contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb), xantofilas y carotenos (x+c), pigmentos totales (PT), actividad acetohidroxiácidos sintasa (AHAS), aminoácidos libres totales (AATT), proteína soluble total (PST), azúcares solubles totales (AST), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBARS) y actividades superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidada (APX) y guiacol peroxidada (GPX) en plantas de *V. sativa*, variedad **CORINA**, tratadas con imazamox.

	PSP	PSPA	PSR	RPA	Cla	Clb	x+c	PT	AHAS	AATT	PST	AST	H ₂ O ₂	TBARS	SOD	CAT	APX	GPX
PSP	1.0000																	
PSPA	0.5933	1.0000																
PSR	0.8922	0.1658	1.0000															
RPA	0.8430	0.0671	0.9951	1.0000														
Cla	-0.9507	-0.3143	-0.9883	-0.9683	1.0000													
Clb	0.8091	0.0069	0.9873	0.9982	-0.9515	1.0000												
x+c	-0.8885	-0.1577	-1.0000	-0.9958	0.9870	-0.9886	1.0000											
PT	-0.9561	-0.3313	-0.9854	-0.9636	0.9998	-0.9458	0.9840	1.0000										
AHAS	-0.3505	0.5459	-0.7357	-0.7993	0.6238	-0.8340	0.7412	0.6096	1.0000									
AATT	-0.7696	0.0574	-0.9750	-0.9923	0.9297	-0.9979	0.9768	0.9229	0.8678	1.0000								
PST	-0.4703	0.4314	-0.8182	-0.8712	0.7209	-0.8992	0.8228	0.7083	0.9914	0.9254	1.0000							
AST	0.1252	-0.7244	0.5598	0.6393	-0.4268	0.6844	-0.5665	-0.4105	-0.9731	-0.7298	-0.9344	1.0000						
H ₂ O ₂	-0.6548	-0.9969	-0.2429	-0.1454	0.3881	-0.0857	0.2350	0.4046	-0.4783	0.0214	-0.3590	0.6678	1.0000					
TBARS	0.6873	-0.1770	0.9412	0.9701	-0.8787	0.9830	-0.9440	-0.8700	-0.9212	-0.9927	-0.9643	0.8068	0.0990	1.0000				
SOD	-0.9923	-0.6882	-0.8296	-0.7700	0.9050	-0.7303	0.8250	0.9126	0.2321	0.6848	0.3577	-0.0016	0.7432	-0.5922	1.0000			
CAT	-0.7876	0.0287	-0.9810	-0.9954	0.9399	-0.9994	0.9825	0.9336	0.8531	0.9996	0.9142	-0.7099	0.0501	-0.9889	0.7055	1.0000		
APX	0.6333	0.9987	0.2155	0.1175	-0.3620	0.0576	-0.2075	-0.3787	0.5028	0.0067	0.3851	-0.6885	-0.9996	-0.1270	-0.7241	-0.0220	1.0000	
GPX	-0.8537	-0.0872	-0.9969	-0.9998	0.9731	-0.9968	0.9975	0.9688	0.7870	0.9895	0.8611	-0.6236	0.1654	-0.9650	0.7827	0.9933	-0.1375	1.0000

P ≤
0.05 0.01
0.9969 0.9999

Tabla 2.9. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables siguientes: Peso seco de planta (PSP), Peso seco de parte aérea (PSPA), Peso seco de raíz (PSR), relación raíz/parte aérea (RPA), Contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb), xantofilas y carotenos (x+c), pigmentos totales (PT), actividad acetohidroxiácidos sintasa (AHAS), aminoácidos libres totales (AATT), proteína soluble total (PST), azúcares solubles totales (AST), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), peroxidación de lípidos (TBARS) y actividades superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidada (APX) y guiacol peroxidada (GPX) en plantas de *V. sativa*, variedad **LÁTIGO**, tratadas con imazamox.

	PSP	PSPA	PSR	RPA	Cla	Clb	x+c	PT	AHAS	AATT	PST	AST	H ₂ O ₂	TBARS	SOD	CAT	APX	GPX	
PSP	1.0000																		
PSPA	0.9998	1.0000																	
PSR	0.6104	0.5944	1.0000																
RPA	-0.9421	-0.9487	-0.3095	1.0000															
Cla	0.9578	0.9518	0.8124	-0.8060	1.0000														
Clb	-0.9883	-0.9850	-0.7241	0.8799	-0.9904	1.0000													
x+c	0.9983	0.9970	0.6549	-0.9213	0.9727	-0.9954	1.0000												
PT	0.9816	0.9776	0.7503	-0.8608	0.9950	-0.9992	0.9910	1.0000											
AHAS	0.9673	0.9620	0.7914	-0.8262	0.9994	-0.9947	0.9803	0.9979	1.0000										
AATT	0.2068	0.1872	0.9012	0.1331	0.4794	-0.3538	0.2628	0.3898	0.4484	1.0000									
PST	0.4078	0.3894	0.9722	-0.0781	0.6532	-0.5424	0.4597	0.5746	0.6262	0.9777	1.0000								
AST	-0.9871	-0.9901	-0.4755	0.9837	-0.8993	0.9510	-0.9762	-0.9383	-0.9140	-0.0473	-0.2561	1.0000							
H ₂ O ₂	-0.9039	-0.9123	-0.2130	0.9950	-0.7428	0.8281	-0.8778	-0.8057	-0.7658	0.2314	0.0218	0.9608	1.0000						
TBARS	-0.9926	-0.9948	-0.5096	0.9759	-0.9157	0.9624	-0.9840	-0.9512	-0.9292	-0.0864	-0.2939	0.9992	0.9492	1.0000					
SOD	0.1855	0.1658	0.8916	0.1546	0.4602	-0.3333	0.2417	0.3696	0.4288	0.9998	0.9729	-0.0255	0.2526	-0.0647	1.0000				
CAT	0.9936	0.9911	0.6960	-0.8982	0.9841	-0.9992	0.9984	0.9969	0.9897	0.3161	0.5084	-0.9626	-0.8498	-0.9725	0.2954	1.0000			
APX	-0.9050	-0.9133	-0.2154	0.9952	-0.7444	0.8294	-0.8790	-0.8072	-0.7674	0.2290	0.0194	0.9615	1.0000	0.9500	0.2502	-0.8511	1.0000		
GPX	-0.9967	-0.9981	-0.5440	0.9663	-0.9312	0.9726	-0.9904	-0.9629	-0.9434	-0.1267	-0.3323	0.9968	0.9357	0.9992	-0.1050	-0.9811	0.9366	1.0000	

P ≤

Valor crítico

0.05 0.01

0.9969 0.9999

3. Estudio ontogénico de diferentes órganos de plantas de *P. vulgaris* y *V. sativa* tratadas con imazamox

En este experimento se estudian los cambios inducidos por imazamox en los parámetros de crecimiento, la actividad acetohidroxiácido sintasa, el contenido de aminoácidos y de imazamox acumulado y las actividades glutatión-S-transferasa y guaiacol peroxidasa, en distintas partes de *P. vulgaris* (meristemo, hoja joven, última hoja expandida, hoja media, cotiledones, raíz joven y raíz vieja) y de *V. sativa* (hoja joven, hoja vieja y raíz), durante la ontogenia de las plantas.

Plantas de judía (*P. vulgaris*) y veza (*V. sativa*), de las variedades seleccionadas como más tolerantes en los experimentos anteriores (variedad Coco Blanc de judía y Corina de veza), crecieron en cultivo hidropónico en cámara de ambiente controlado. El tratamiento con imazamox (0, 100 y 250 μM) se adicionó a la solución nutritiva en la etapa de crecimiento vegetativo, día 21 de cultivo en judía y día 28 en veza. Muestras de las distintas partes de judía y veza se recolectaron en el tiempo 0 y después de 1, 2, 7 y 14 días de tratamiento con herbicida.

3.1. Experimentos con *Phaseolus vulgaris*

3.1.1. Análisis del crecimiento

Los parámetros de crecimiento de plantas de judía se representan en la figura 3.1. El imazamox redujo el **peso seco de planta y de parte aérea** a los 7 días de tratamiento (30%) y a los 14 días (alrededor del 50%) con ambas dosis. El **peso seco de raíz** no cambió significativamente después de un día de tratamiento, mientras que disminuyó el 25% después de dos días con 250 μM y el 65% después 14 días con ambas dosis. Como consecuencia de estas respuestas la **relación raíz/parte aérea**, considerada como un índice de equilibrio entre raíz y parte aérea, se redujo con respecto a las plantas control a los dos y 14 días de tratamiento, mientras que a los 7 días esta relación fue mayor en las plantas tratadas que en el control (25% con 100 μM y casi 50% con 250 μM).

El análisis de varianza realizado a los parámetros de crecimiento (datos no mostrados) muestra que la mayor fuente de variación de los distintos parámetros estudiados se debió a la edad de cultivo.

Resultados

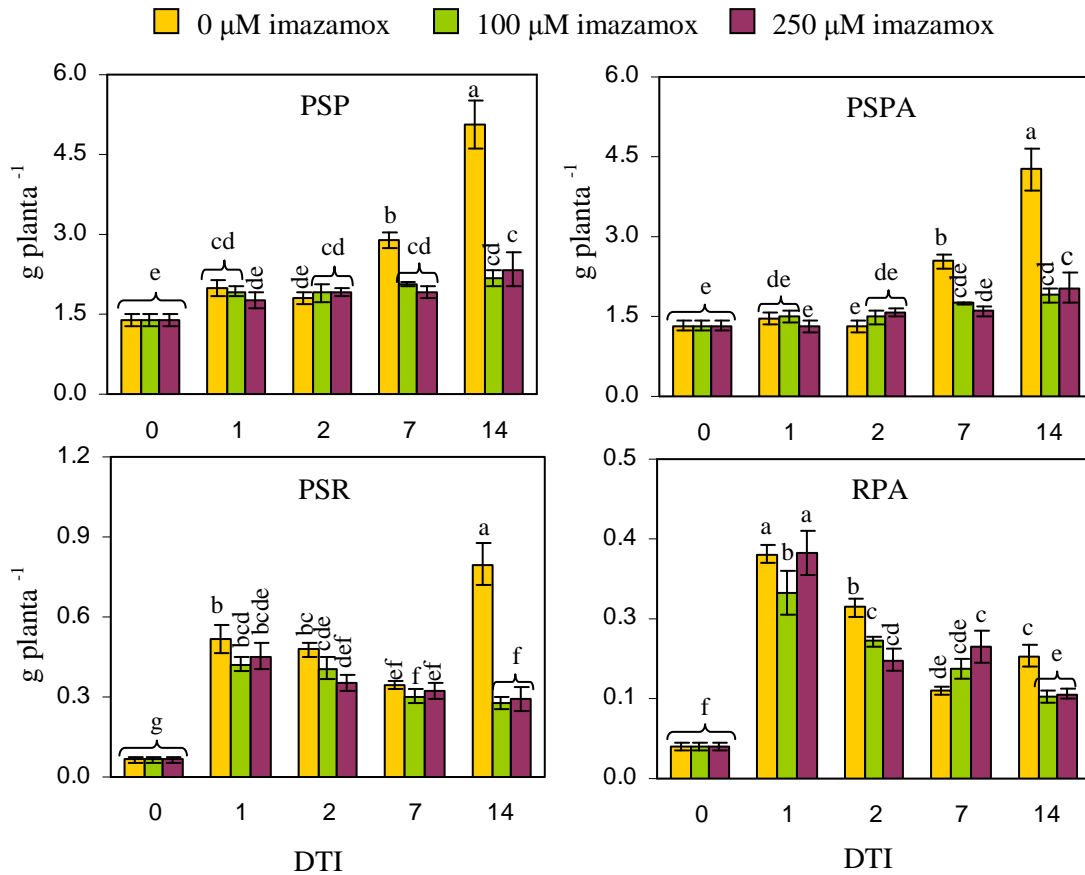


Figura 3.1. Peso seco total de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA) de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS (P<0.05).

3.1.2. Actividad acetohidroxiácido sintasa

En la figura 3.2 se puede apreciar que la hoja joven y el meristemo son los órganos donde la actividad **acetohidroxiácido sintasa** (AHAS) es mayor, alcanzando valores 10 veces superiores a los registrados en hoja media y última hoja expandida. Por otra parte, los cotiledones muestran la más baja actividad enzimática, de hecho no se detectó actividad en el control y sólo a los 2 días con la dosis menor, y a los 7 y 14 días con ambas dosis. En hoja media, hay que destacar que a los 14 días el herbicida estimuló la actividad AHAS, triplicándola con ambas dosis. En última hoja expandida el tratamiento de imazamox inhibió la actividad a los 1 y 2 días de tratamiento, por el contrario a los 7 y 14 días la multiplicó por 4 con respecto al control. En hoja joven el herbicida inhibió la actividad AHAS drásticamente desde el inicio de su aplicación, de forma proporcional a la dosis,

excepto a los 14 días con 100 μM , cuando se observa una recuperación de la actividad. En meristemo se observó un comportamiento similar al descrito para hoja joven, con una inhibición inicial del 80%, sin embargo, a los 14 días con 250 μM se mostró una actividad similar a la del control (Fig. 3.2).

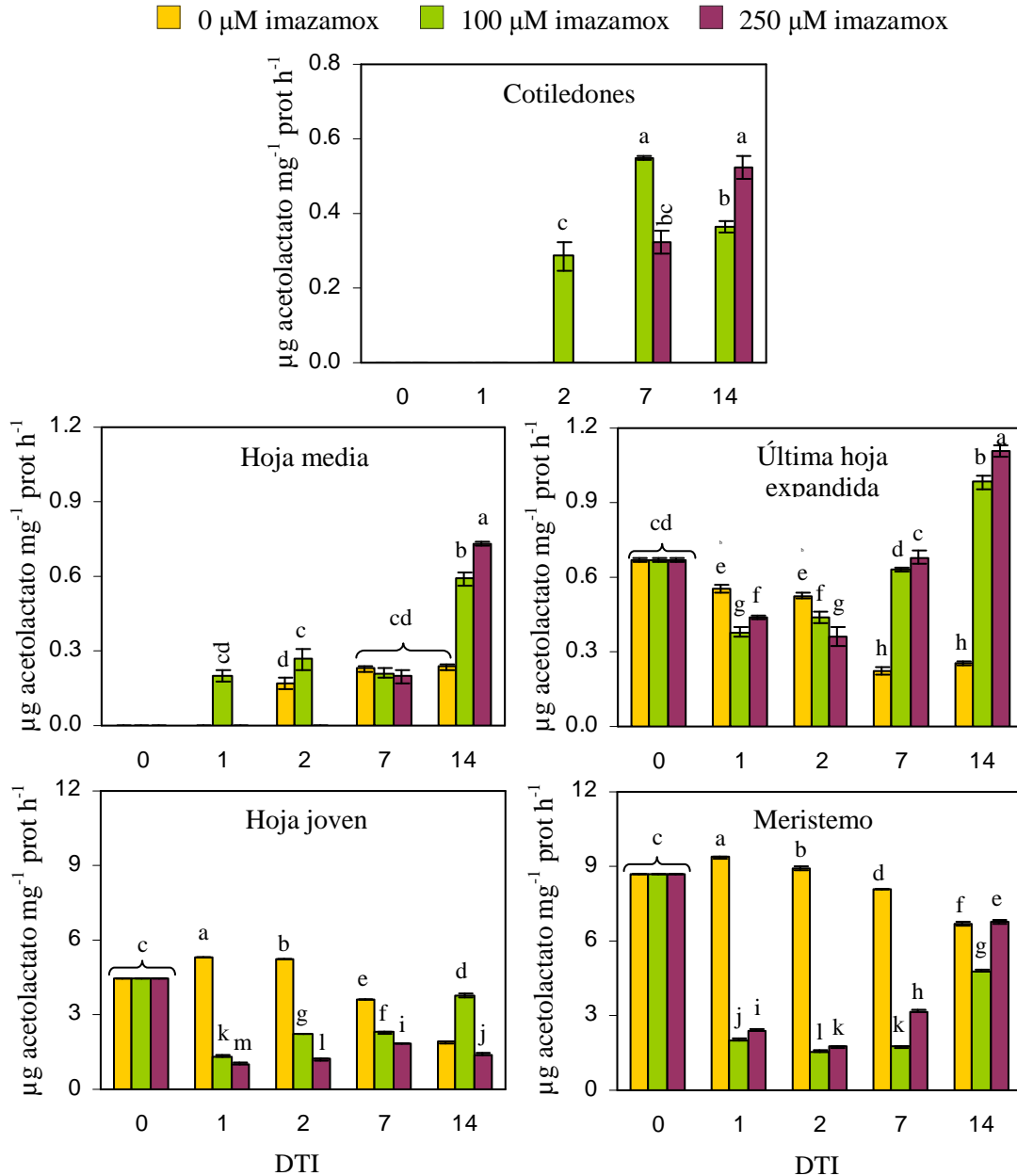


Figura 3.2. Actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en cotiledones, hoja media, última hoja expandida, hoja joven y meristemo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

Resultados

En general, la actividad AHAS en raíz joven (Fig. 3.3) se inhibió con imazamox, excepto a los 2 días con 100 μM cuando se duplicó con respecto al control, y a los 7 días con 250 μM que aumentó el 70%. En raíz vieja con 100 μM de herbicida, la actividad se incrementó con respecto al control, mientras que con la dosis mayor no se apreció una tendencia clara.

El análisis de la varianza de los datos correspondientes a la actividad AHAS en los distintos órganos (datos no mostrados) indica que la principal fuente de variación en cotiledones, hoja media, raíz joven y raíz vieja la constituyó la edad del cultivo, mientras que en última hoja expandida y hoja joven fue la interacción tiempo-herbicida y en meristemo fue el tratamiento herbicida.

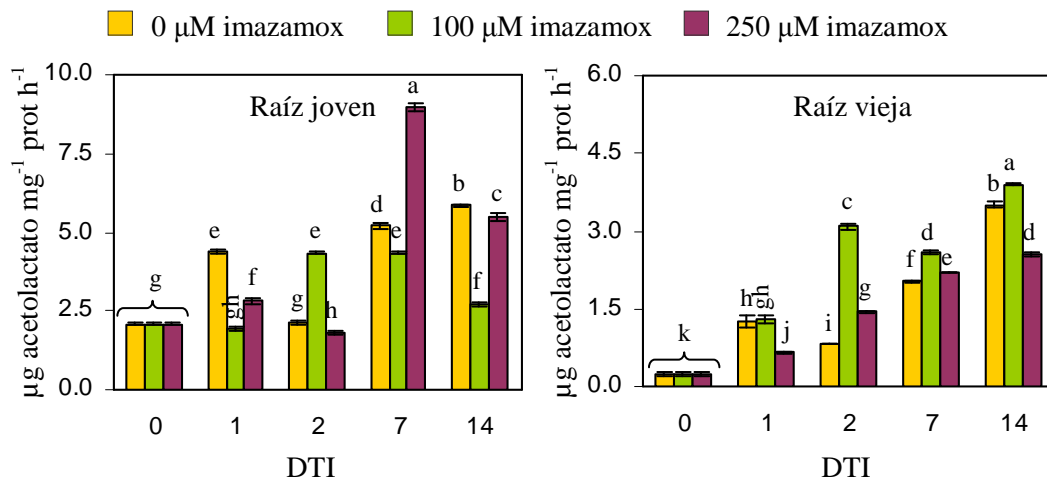


Figura 3.3. Actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en raíz joven y vieja de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

3.1.3. Contenido de aminoácidos totales y ramificados

El **contenido de aminoácidos libres totales** (Fig. 3.4) aumentó con el herbicida en meristemo y en última hoja expandida a lo largo de la ontogenia del cultivo. En meristemo incrementó de forma proporcional a la dosis, mientras que en última hoja expandida los valores más elevados se alcanzaron con 100 μM . Por el contrario, el imazamox redujo el **porcentaje de aminoácidos libres ramificados** en los dos órganos estudiados, en meristemo disminuyó alrededor del 30% con 100 μM y del 40-50% con 250 μM , mientras que en última hoja expandida la reducción fue más drástica con la dosis menor, alcanzando el 62% de inhibición después de 1 y 2 días de tratamiento.

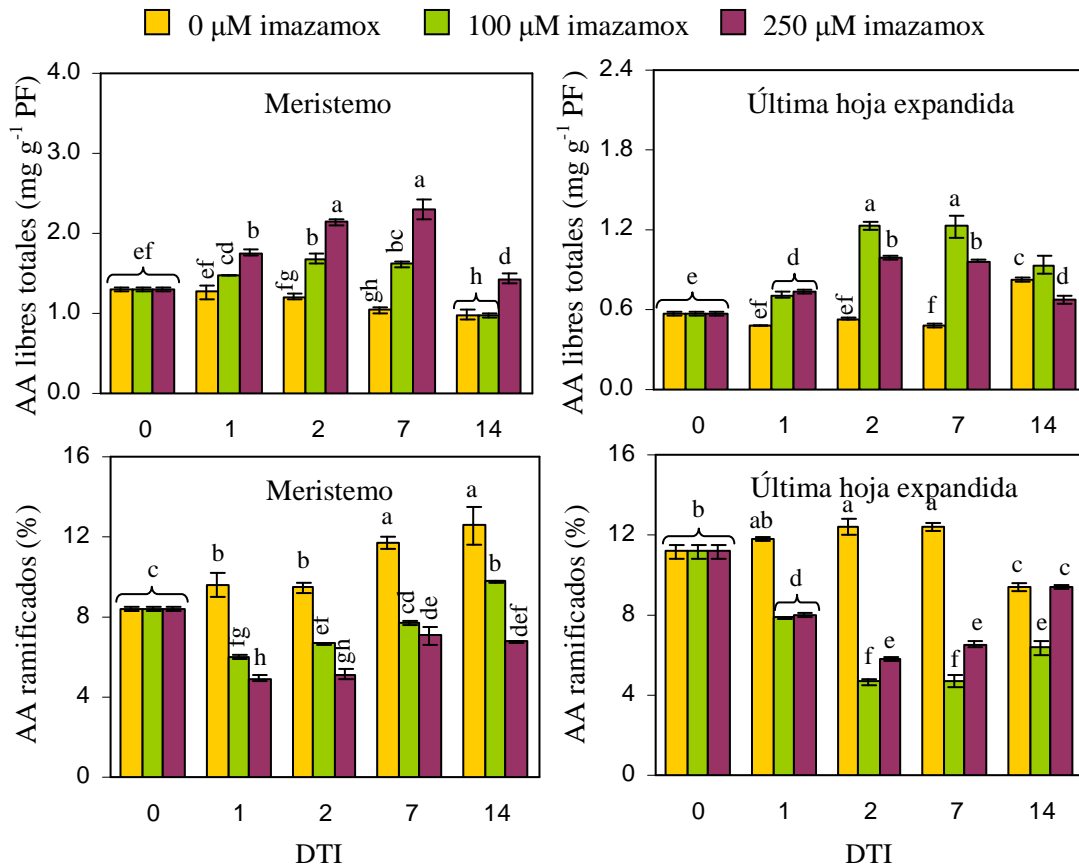


Figura 3.4. Aminoácidos libres totales y porcentaje de aminoácidos ramificados libres en meristemo y última hoja expandida de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

Los datos relativos al contenido de cada aminoácido libre ramificado, valina, leucina e isoleucina, se representa en la figura 3.5. A lo largo de la ontogenia del cultivo, el contenido de **valina** se redujo en meristemo (más del 35%) y en última hoja expandida con ambas dosis de herbicida. En general, el contenido de **leucina** mostró la misma respuesta que la descrita para valina, disminuyendo en ambos órganos con el imazamox. En cambio, el contenido de **isoleucina** incrementó en meristemo y última hoja expandida, de hecho en meristemo se triplicó a los 7 días con la dosis mayor.

El análisis de la varianza de los datos correspondientes al contenido de aminoácidos (datos no mostrados), indica que la variabilidad en todos los parámetros estudiados se debió principalmente al imazamox (entre el 35 y el 55% en todos los casos), a excepción de la leucina en última hoja expandida, cuyo

Resultados

principal factor de variación fue la interacción tiempo-herbicida, y el contenido de isoleucina de meristemo y última hoja expandida, cuya fuente principal de variación fue la edad del cultivo.

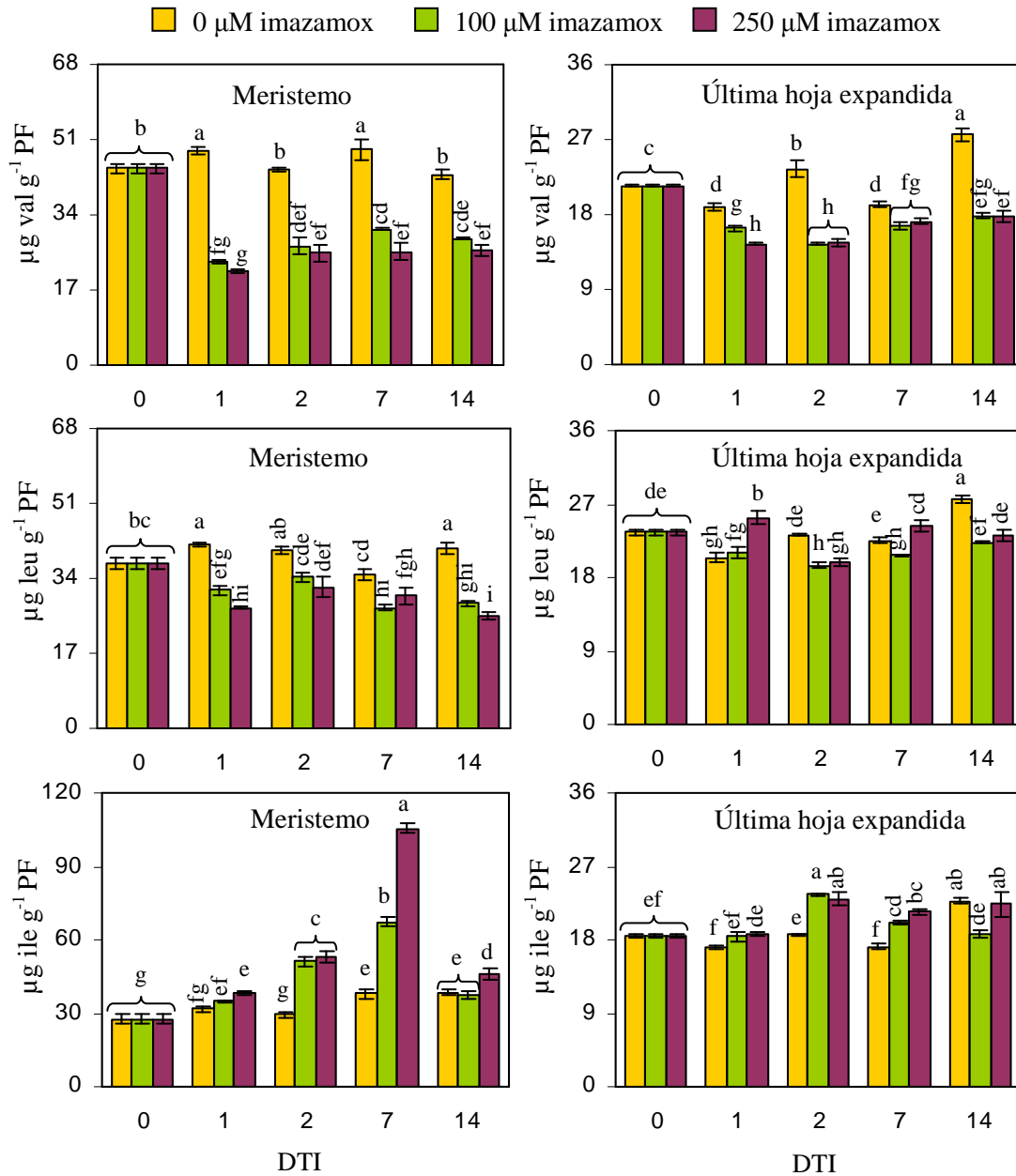


Figura 3.5. Contenido de aminoácidos libres ramificados: valina (val), leucina (leu) e isoleucina (ile), expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, en meristemo y última hoja expandida de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

En la tabla de correlaciones 3.1 se detecta que el porcentaje de aminoácidos libres ramificados de meristemo y de última hoja expandida se correlaciona significativamente ($P \leq 0.01$) y de forma positiva con la actividad AHAS de meristemo. Además, el contenido de valina y leucina se correlaciona positivamente ($P \leq 0.01$). Por el contrario, el contenido de aminoácidos libres totales de meristemo y de última hoja expandida se correlaciona negativamente ($P \leq 0.01$) con la actividad AHAS de meristemo.

3.1.4. Contenido de imazamox

En la figura 3.6 se muestra el contenido de imazamox acumulado en meristemo, hoja joven y última hoja expandida.

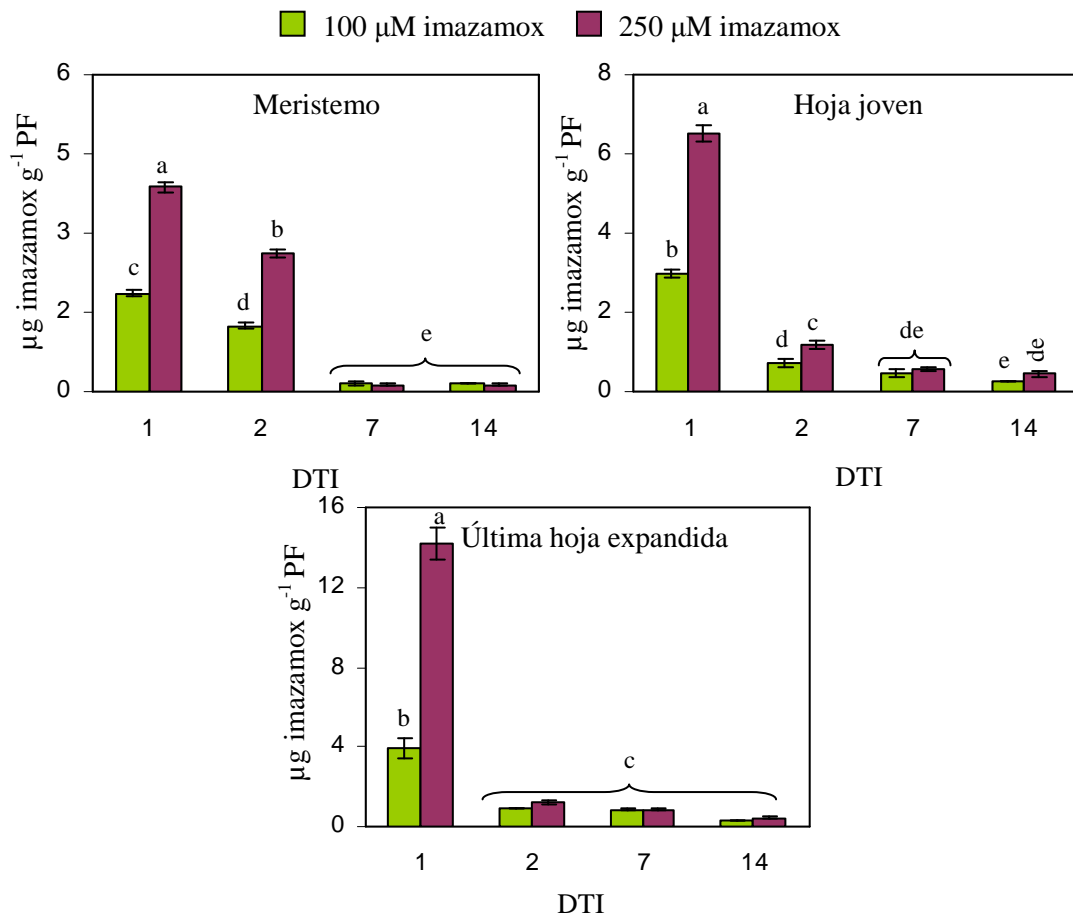


Figura 3.6. Contenido de imazamox (iz), expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, en meristemo, hoja joven y última hoja expandida de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

El herbicida se acumuló en los tres órganos analizados desde el inicio del tratamiento, observándose los valores más elevados después de un día de tratamiento, y posteriormente la cantidad de herbicida se redujo de forma paulatina (Fig. 3.6). Hay que destacar que la última hoja expandida es el órgano donde se registró la concentración más alta de imazamox, siendo aproximadamente el doble que en hoja joven y meristemo.

El contenido de imazamox acumulado en los tres órganos se correlaciona positivamente y de forma significativa ($P \leq 0.05$) con la relación raíz/parte aérea (Tabla 3.1). El contenido de herbicida en meristemo y hoja joven se correlaciona significativamente de forma negativa ($P \leq 0.05$) con la actividad AHAS de estos órganos. El contenido de herbicida detectado en meristemo se correlaciona: a) de forma negativa con el porcentaje de aminoácidos libres ramificados en meristemo ($r = -0.71^{**}$); b) de forma positiva con el contenido de aminoácidos libres totales en meristemo ($r = 0.52^{**}$).

3.1.5. Actividad glutatión-S-transferasa

La **glutatión-S-transferasa** (GST) pertenece a un grupo heterogéneo de enzimas de detoxificación, que catalizan la conjugación del tripéptido glutatión (GSH) con una amplia gama de sustratos endógenos y xenobióticos. A lo largo de la ontogenia, esta enzima incrementó en cotiledones con el tratamiento herbicida, llegando casi a triplicarse a los 14 días con la dosis de 250 μM (Fig. 3.7). En hoja media, la actividad presentó un comportamiento diferente dependiendo de la dosis de herbicida y de la edad del cultivo, aunque no se observan grandes diferencias respecto al control. En general, en última hoja expandida y en hoja joven la actividad se estimuló con el imazamox en los diferentes estados fenológicos estudiados. En meristemo la actividad presentó un comportamiento variable en función de la dosis empleada y del tiempo de exposición al herbicida, de hecho a los 2 días aumentó entre el 55-70% con ambas dosis y, por el contrario, a los 7 días se redujo cerca del 30% (Fig. 3.7).

En la tabla 3.1, donde se muestran las correlaciones entre los distintos parámetros determinados en este experimento, podemos detectar que existe una correlación negativa y significativa ($P \leq 0.01$) entre esta actividad enzimática en hoja joven y la actividad AHAS en meristemo.

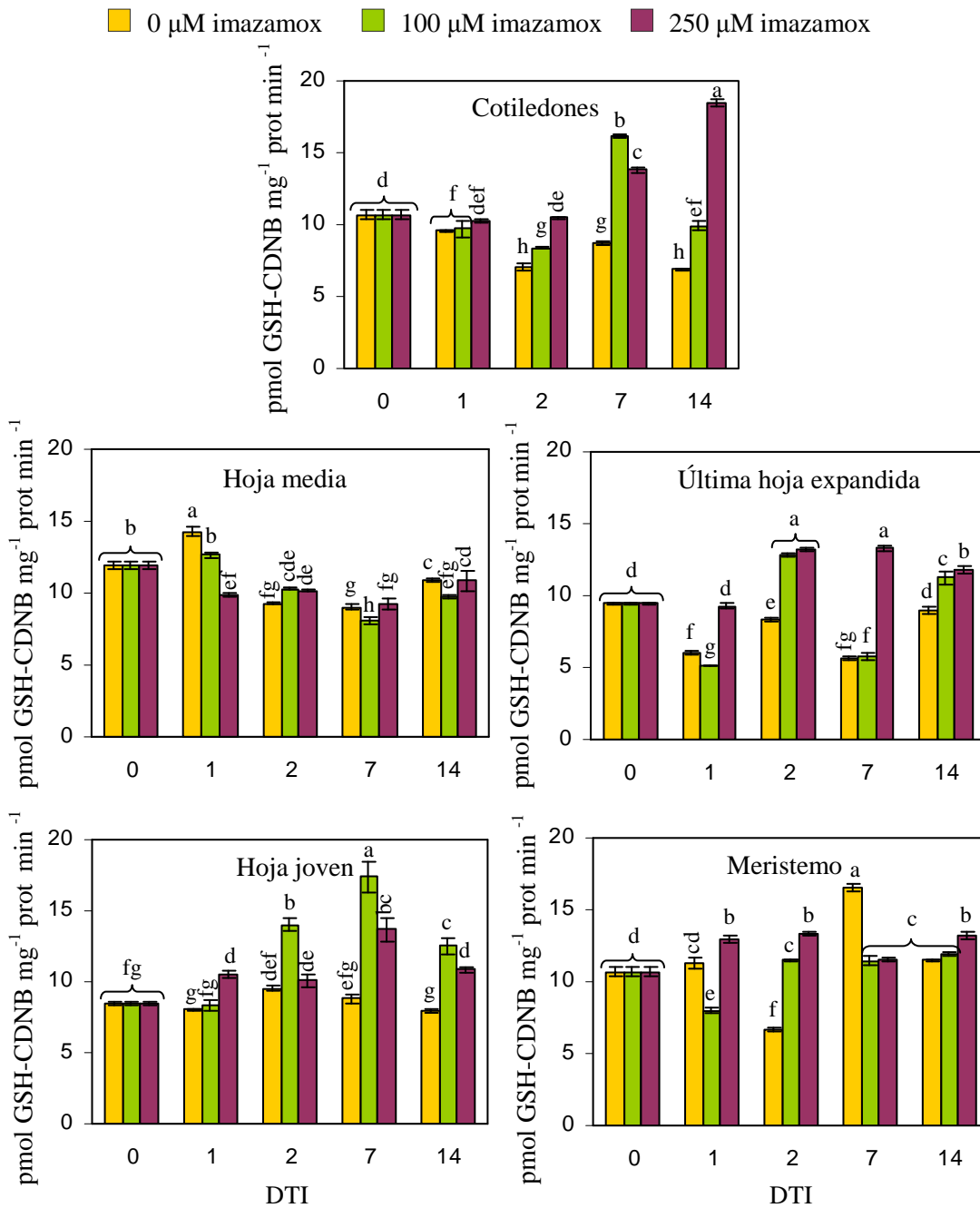


Figura 3.7. Actividad enzimática glutatión-S-transferasa (GST) en cotiledones, hoja media, última hoja expandida, hoja joven y meristemo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

Resultados

La actividad GST en raíz joven (Fig. 3.8) en general se estimuló con el imazamox, mostrando el valor más alto después de un día de tratamiento con la dosis de 100 μM , cuando se triplica respecto al control. En raíz vieja la actividad se incrementó en todos los muestreos realizados, aunque las diferencias con el control se fueron mitigando con el tiempo de exposición al imazamox.

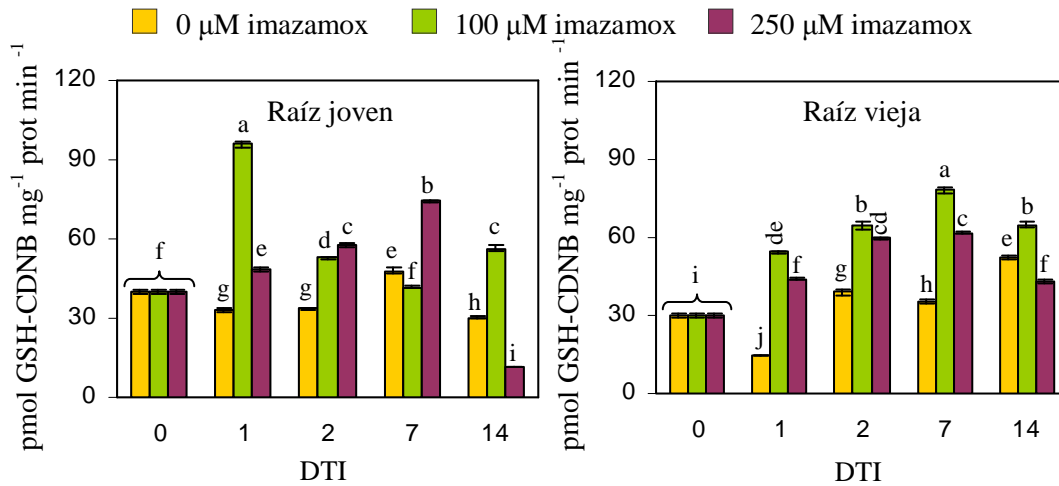


Figura 3.8. Actividad enzimática glutatión-S-transferasa (GST) en raíz joven y vieja de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

3.1.6. Actividad guaiacol peroxidasa

Los datos de la actividad **guaiacol peroxidasa** (GPX) determinada en parte aérea (cotiledones, hoja media, última hoja expandida, hoja joven y meristemo) se representa en la figura 3.9. En cotiledones de plantas control hay que destacar que esta enzima no presenta actividad o es reducida, excepto en la cosecha realizada a los 14 días. Sin embargo, el imazamox incrementa la actividad GPX, de hecho a los 2 días se registró el mayor valor en cotiledones con 250 μM . En hoja media la actividad registrada fue muy reducida con todos los tratamientos hasta los 14 días, momento en el que la actividad se multiplicó por 3.5 con 100 μM y por 4.8 con 250 μM con respecto al control. Una respuesta similar se observó en la última hoja expandida, pues a los 14 días de tratamiento la actividad se multiplicó por 4 y por 16 con 100 y 250 μM , respectivamente. Hoja joven y meristemo son los órganos donde se registra la mayor actividad GPX, esta enzima se estimuló de forma proporcional a la dosis de herbicida a partir de los 2 días, multiplicándose por 14 con 100 μM y por 27 con 250 μM a los 14 días en hoja joven, y por 3 y 4 con 100 μM y 250 μM respectivamente en este mismo muestreo.

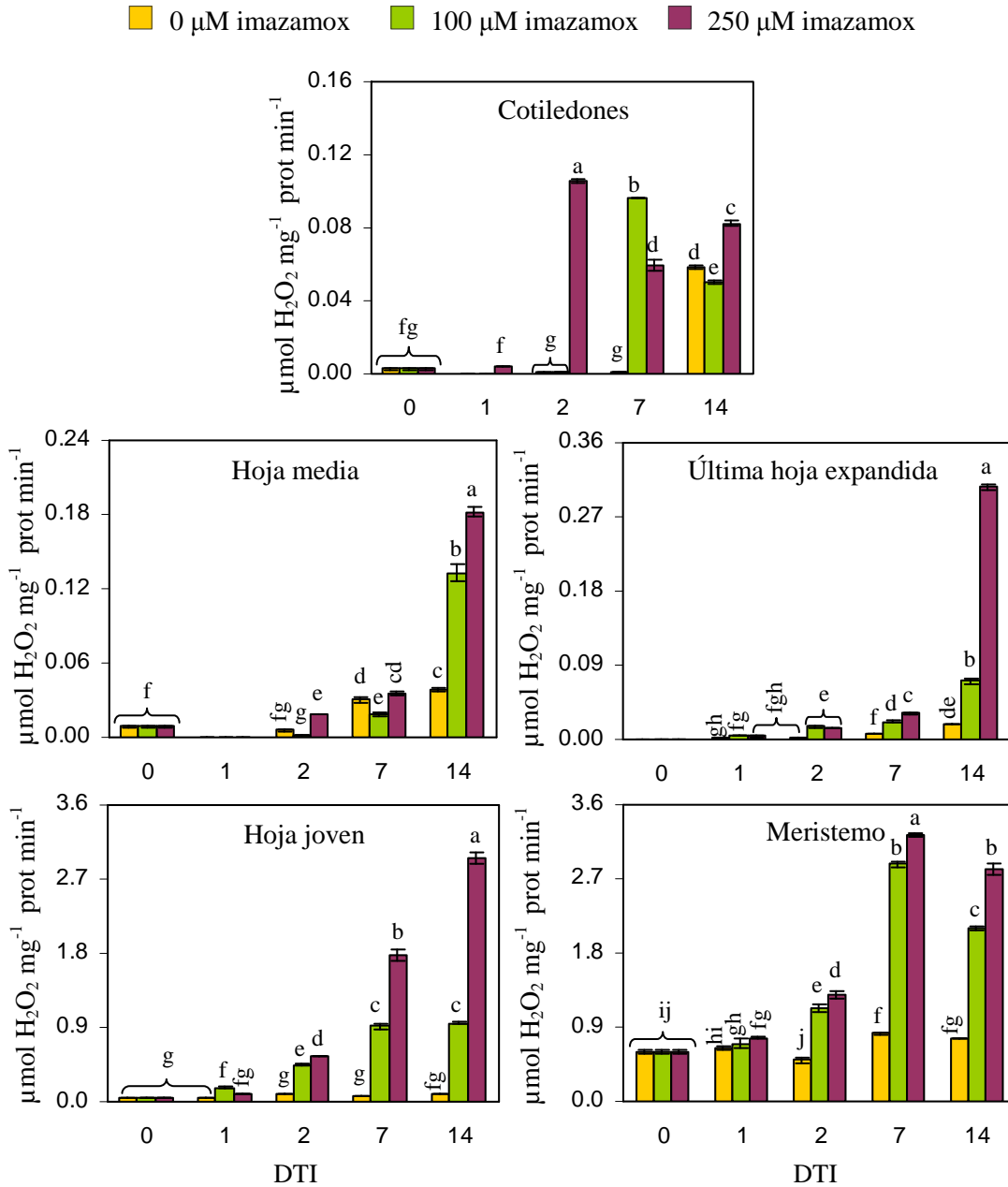


Figura 3.9. Actividad enzimática guaiacol peroxidada (GPX) en cotiledones, hoja media, última hoja expandida, hoja joven y meristemo de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

En raíz joven la actividad GPX mostró un comportamiento variable con la dosis 100 μM (Fig. 3.10), mientras que con 250 μM la actividad se estimuló en todos los muestreos, observándose en general un incremento de más del 30%. En raíz vieja la actividad aumentó con ambas dosis, de hecho en el día 1 de tratamiento se multiplicó por 7 con 100 μM y por 11 con 250 μM , pero estas diferencias con los valores de los controles no se mantuvieron el resto de tiempo de experimentación, ya que a lo largo de la ontogenia la actividad de plantas control fue incrementándose. A los 14 días la actividad con 100 μM aumentó el 14% y con 250 μM se redujo el 10%, respecto al control.

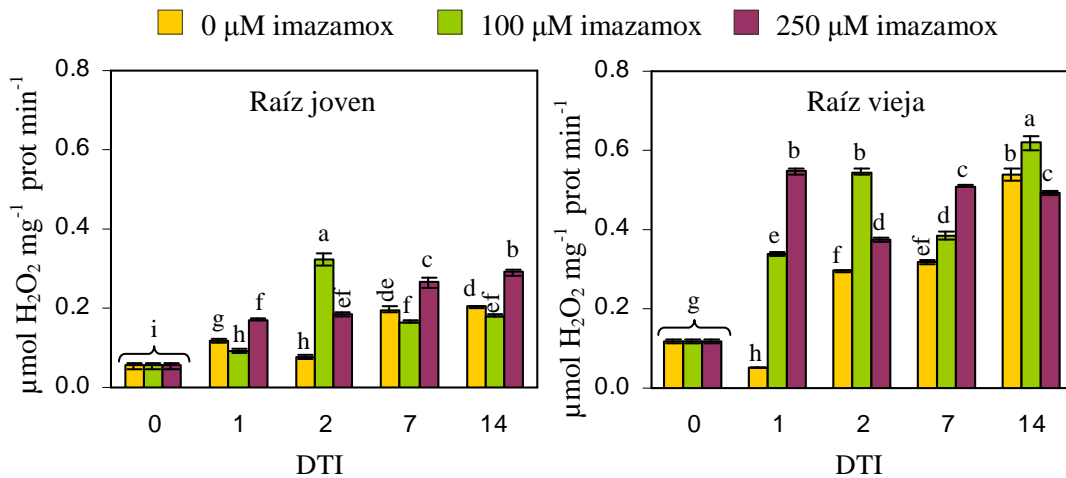


Figura 3.10. Actividad enzimática guaiacol peroxidada (GPX) en raíz joven y vieja de plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

Del estudio de las correlaciones entre la actividad GPX y los demás parámetros determinados en el experimento (Tabla 3.1), se deduce que: **a)** la actividad GPX de meristemo, hoja joven, última hoja expandida, y hoja media presenta una correlación positiva y significativa con la actividad AHAS de última hoja expandida, de cotiledones y de hoja media; **b)** la actividad GPX de meristemo, cotiledones y raíz joven se correlaciona negativamente con el porcentaje de aminoácidos ramificados en última hoja expandida y positivamente con el contenido de aminoácidos libres en este mismo órgano; **c)** la actividad GPX determinada en los distintas partes de la planta se correlaciona de forma significativa y negativa con el contenido de leucina en meristemo; **d)** en general, la actividad GPX se correlaciona positivamente y de forma significativa con la actividad GST: GPX de meristemo con GST de hoja joven y cotiledones ($P \leq 0.01$); GST de cotiledones con GPX de hoja joven, última hoja expandida ($p \leq 0.01$), hoja media y cotiledones ($p \leq 0.05$); GPX de raíz joven y cotiledones con GST de raíz vieja.

3.2. Experimentos con *Vicia sativa*

3.2.1. Análisis del crecimiento

En la figura 3.11 se muestran los parámetros de crecimiento analizados en las plantas de veza: Peso seco de planta (PSP), pesos seco de la parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA).

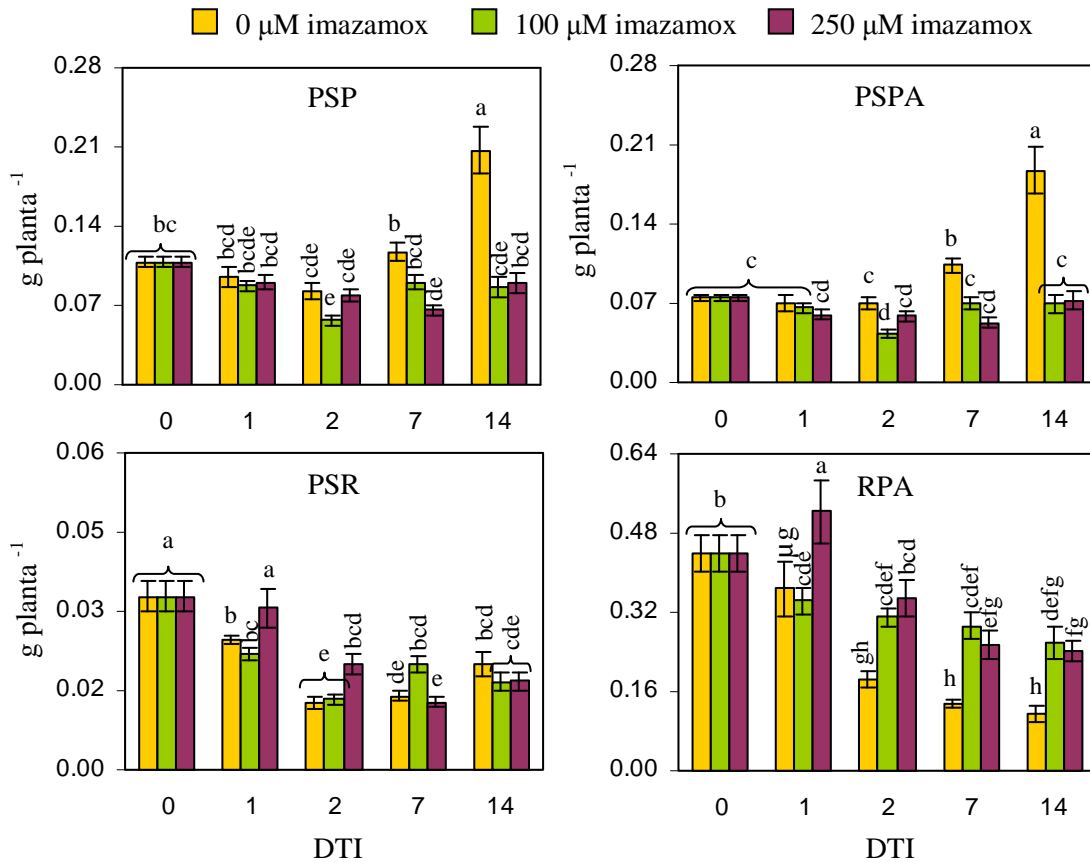


Figura 3.11 Peso seco total de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y relación raíz/parte aérea (RPA) de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=8), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

El **PSP** y el **PSPA** no cambió significativamente con el imazamox en las dos primeras cosechas, mientras que disminuyeron cerca del 35% después de una semana de tratamiento con herbicida, y alcanzó el 60% después de dos semanas con ambas dosis. El **PSR** aumentó con 250 µM de imazamox después de 1 y 2 días de tratamiento, en cambio a los 14 días no se apreciaron diferencias significativas con respecto a las plantas control. La **RPA** aumentó considerablemente con el

tratamiento de imazamox, llegando a duplicarse con ambas dosis después de 7 y 14 días de tratamiento.

El análisis de varianza realizado a los parámetros de crecimiento (datos no mostrados), indica que la mayor fuente de variación para el PSP y el PSPA fue la interacción tiempo-imazamox, mientras que en el caso del PSR y la RPA se debió a la edad del cultivo.

3.2.2. Actividad acetohidroxiácido sintasa

La actividad **acetohidroxiácido sintasa** foliar de veza se expone en la figura 3.12

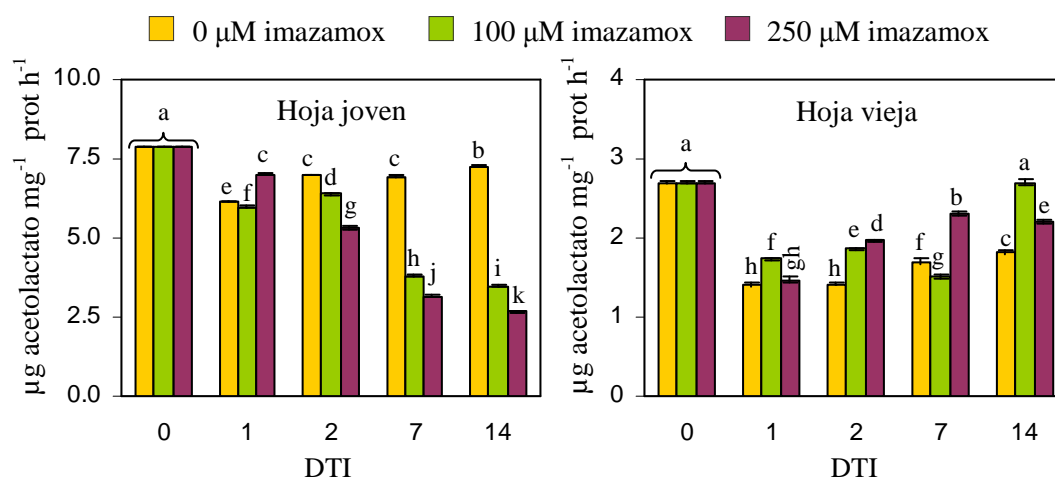


Figura 3.12. Actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en hoja joven y vieja de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

En la hoja joven a corto plazo (1 día) las plantas tratadas con 250 μM presentaron mayor actividad que los controles, por el contrario a partir de los dos días de tratamiento de herbicida la actividad se inhibió de forma proporcional a la dosis, llegando a reducirse el 50% con 100 μM y el 60% con 250 μM a los 14 días. En hoja vieja, en cambio, la actividad se estimuló desde el inicio del tratamiento, alcanzando el máximo con la dosis de 100 μM a los 14 días (50%).

En la figura 3.13 se observa que, en general, el tratamiento de imazamox estimuló la actividad AHAS de raíz con ambas dosis, excepto a los 7 días de tratamiento con 100 μM , que disminuyó con respecto al control. La actividad AHAS en raíz se correlaciona negativamente y de forma significativa ($P \leq 0.05$) con la actividad AHAS en hoja joven (Tabla 3.2).

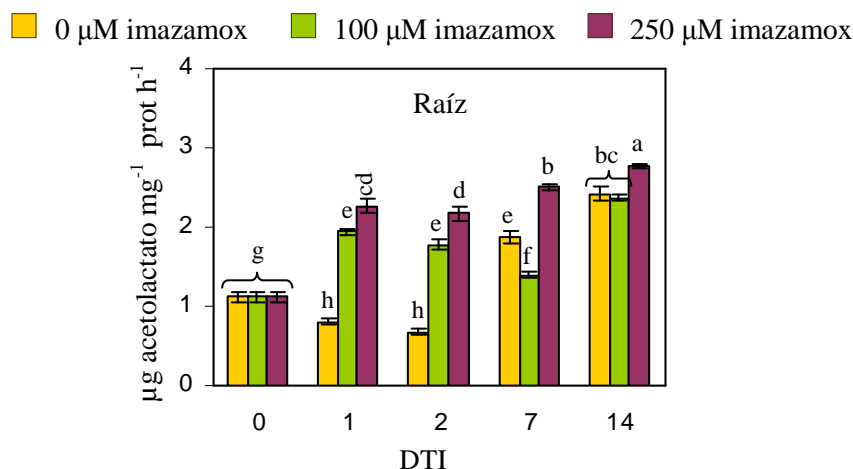


Figura 3.13. Actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en raíz de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

3.2.3. Contenido de aminoácidos totales y ramificados

Como se aprecia en la figura 3.14, en general a lo largo de la ontogenia en hoja joven los **aminoácidos libres totales** incrementaron con el imazamox, por el contrario el **porcentaje de aminoácidos libres ramificados** en este órgano se redujo cerca del 50%. El contenido de aminoácidos libres totales de hoja joven se correlaciona negativamente y de forma significativa ($P \leq 0.01$) con el porcentaje de aminoácidos libres ramificados en ese mismo órgano (Tabla 3.2). En hoja vieja los aminoácidos libres totales aumentaron a los 1 y 2 días de tratamiento de herbicida con 250 μM , en cambio disminuyeron a partir de los 7 días de imazamox, alcanzando una reducción del 20% a las dos semanas con ambas dosis. El porcentaje de aminoácidos libres ramificados en hoja vieja se redujo ligeramente al inicio del tratamiento con herbicida (1 y 2 días), mientras que a los 7 y 14 días se incrementó con respecto al control, de hecho, con la dosis mayor a los 14 días se registró un aumento del 60%.

En la figura 3.15 se muestra el contenido de aminoácidos libres ramificados: valina, leucina e isoleucina. En general, en hoja joven y vieja el contenido de **valina** disminuyó con el tratamiento de imazamox o no cambió significativamente respecto al control a lo largo de la ontogenia, excepto con la dosis mayor (250 μM) a los 14 días. El imazamox redujo el contenido de **leucina** en hoja joven, observándose las mayores diferencias respecto al control al inicio del tratamiento (día 1), donde disminuyó el 45% con ambas dosis, por tan sólo el 20% a los 14 días. En hoja vieja la dosis menor no indujo grandes cambios en el

Resultados

contenido de leucina, mientras que la mayor (250 μM) incrementó la leucina en todos los muestreos, de hecho a los 14 días fue un 35% mayor respecto al control. El contenido de **isoleucina** en hoja joven disminuyó en general con la dosis menor, mientras que con la dosis mayor no se aprecia una tendencia clara. En hoja vieja el contenido de isoleucina aumentó con ambas dosis, aunque con 100 μM lo hizo de forma significativa sólo a los 7 días de tratamiento, mientras que con la dosis de 250 μM este incremento se acentuó con el tiempo, hasta alcanzar el 60% a los 14 días.

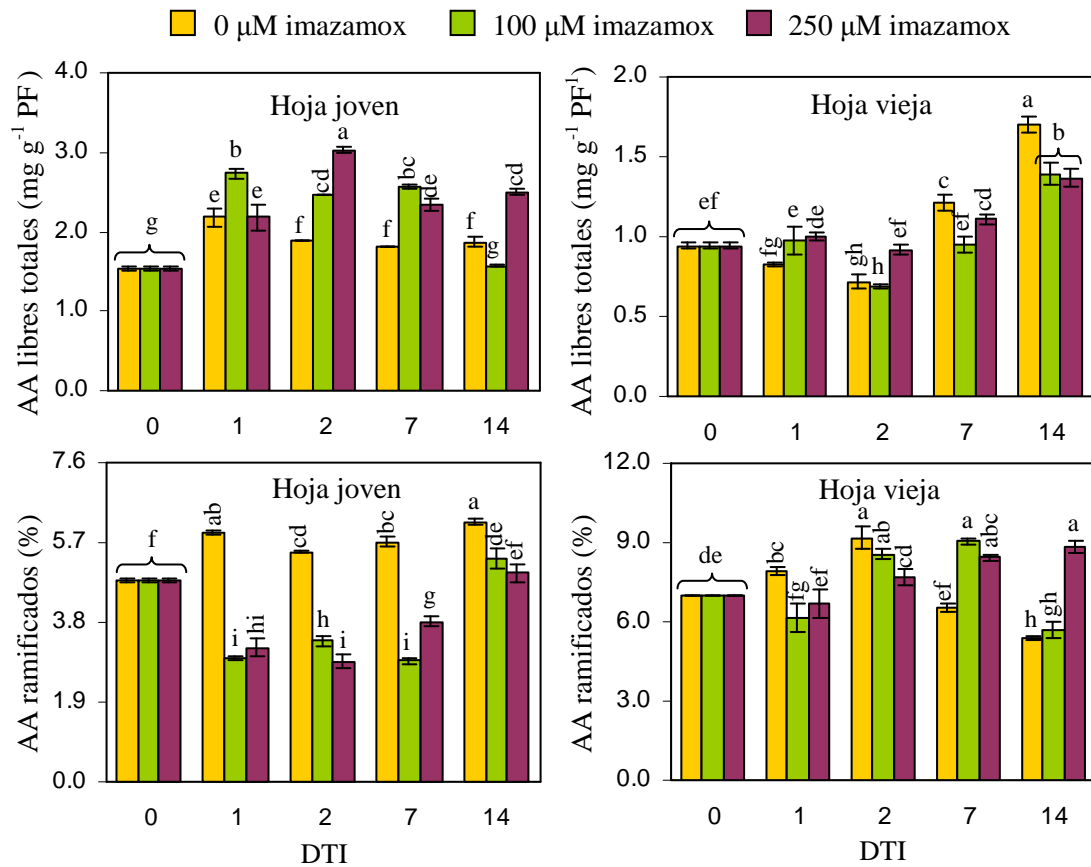


Figura 3.14. Aminoácidos libres totales y porcentaje de aminoácidos ramificados libres en hoja joven y vieja de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS (P \leq 0.05).

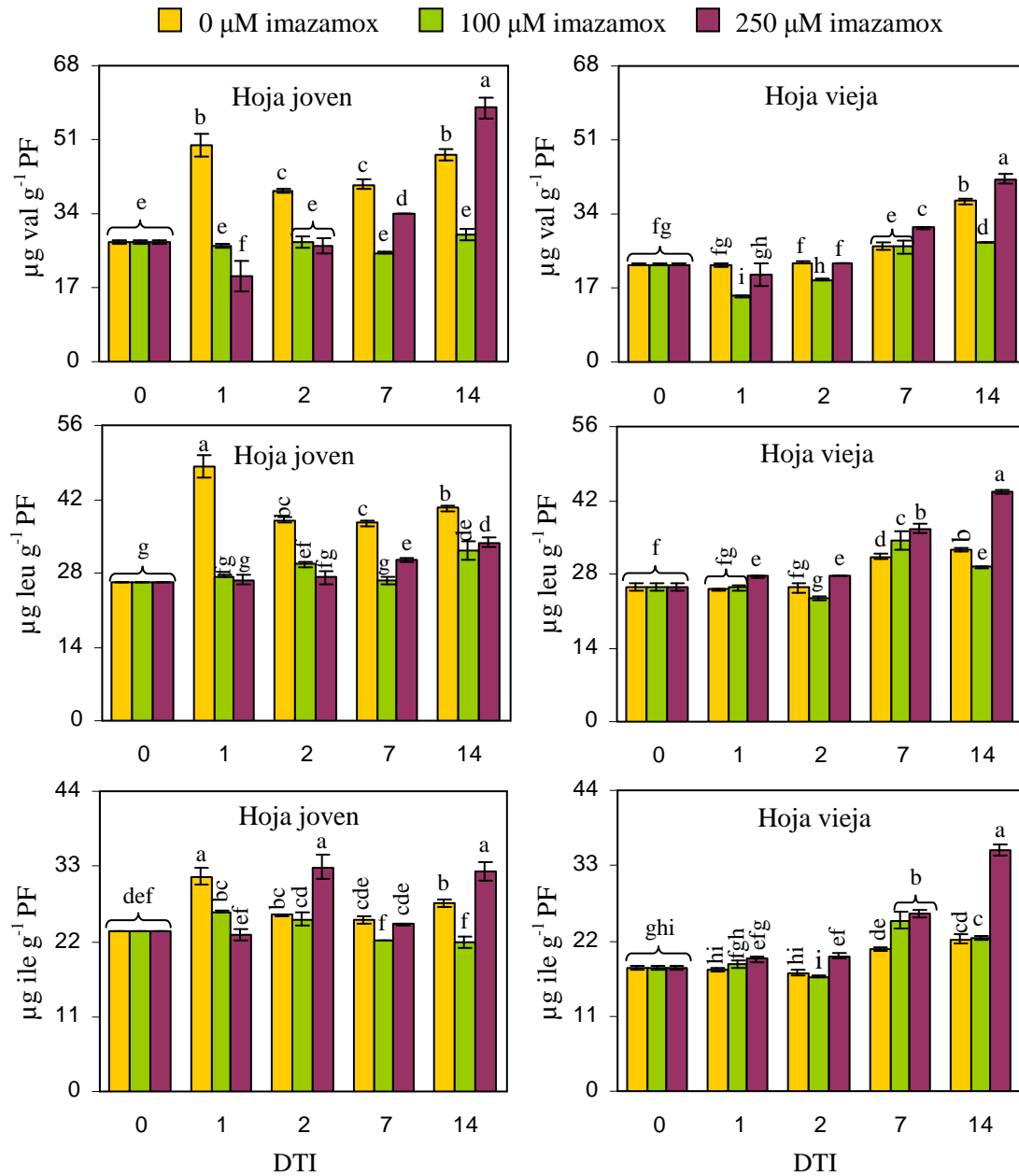


Figura 3.15. Contenido de aminoácidos libres ramificados: valina (val), leucina (leu) e isoleucina (ile) expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en hoja joven y vieja de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

En la tabla 3.2 de correlaciones se observa que el peso seco de planta y de parte aérea se correlaciona de forma positiva y significativa ($P \leq 0.05$) con el porcentaje de aminoácidos ramificados en hoja joven, mientras que de forma negativa y significativa ($P \leq 0.05$) con el porcentaje de aminoácidos ramificados en hoja vieja. Por otro lado, la actividad AHAS en raíz se correlaciona positivamente con el contenido en hoja vieja de valina ($r=0.538^*$), leucina ($r=0.642^{**}$) e isoleucina ($r=0.645^{**}$).

3.2.4. Contenido de imazamox

En la figura 3.16 se expone el diagrama de barras correspondiente a la cantidad de **imazamox** acumulada en la hoja de las plantas de veza tratadas con este herbicida. En hoja joven y vieja se acumulan cantidades muy similares de imazamox. El herbicida se acumula de forma proporcional a la dosis empleada y al tiempo de exposición, de esta forma en ambos órganos el contenido de imazamox más elevado se registró a los 14 días y con la mayor dosis, donde alcanzó cerca de los 14 μg por gramo de peso fresco, lo que supone más de 10 veces lo acumulado después de 1 día de tratamiento.

El contenido de imazamox en hoja joven y vieja se correlaciona negativamente y de forma significativa ($P \leq 0.001$) con la actividad AHAS en hoja joven, pero positivamente ($P \leq 0.05$) con la actividad AHAS en raíz (Tabla 3.2). El contenido de imazamox en hoja vieja se correlaciona positivamente con la concentración de valina ($r=0.644^{**}$) y leucina ($r=0.773^{***}$) en hoja vieja (Tabla 3.2).

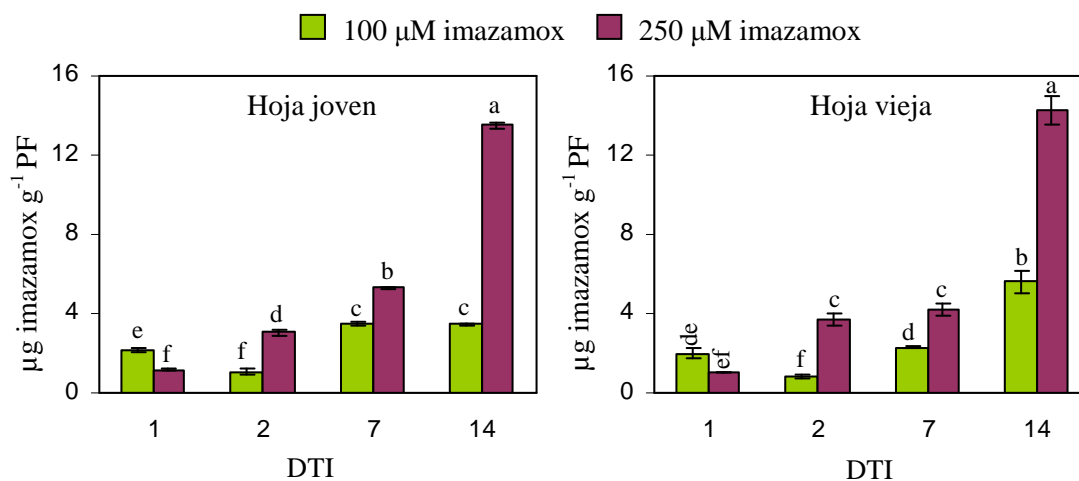


Figura 3.16. Contenido de imazamox, expresado en $\mu\text{g g}^{-1} \text{PF}$ en hoja joven y vieja de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

3.2.5. Actividad glutatión-S-transferasa

La actividad **glutatión-S-transferasa** (Fig. 3.17) incrementó en hoja joven a lo largo de la ontogenia con ambas dosis de imazamox, de hecho se triplicó a los 7 días de tratamiento, y se multiplicó por 5 y por 2.5 con 100 y 250 μM , respectivamente, a los 14 días. En hoja vieja la actividad se estimuló con la dosis de 100 μM , llegando a duplicarse a los 14 días con respecto al control, mientras que con 250 μM la actividad aumentó (día 1), no cambió significativamente (día 2) o se inhibió (días 7 y 14) respecto al control.

La actividad GST en hoja joven se correlaciona negativamente ($P \leq 0.05$) con la actividad AHAS en este órgano (Tabla 3.2). Por otro lado, la actividad GST de hoja vieja muestra una correlación negativa con el contenido de aminoácidos totales ($r = -0.762^{***}$), valina ($r = -0.832^{***}$), leucina ($r = -0.812^{***}$) e isoleucina ($r = -0.747^{**}$) en hoja vieja (Tabla 3.2).

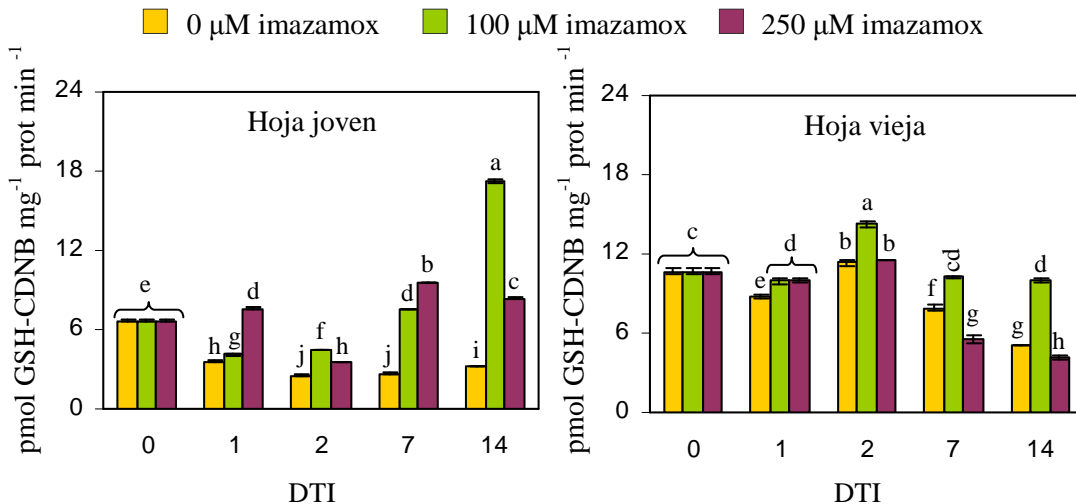


Figura 3.17. Actividad enzimática glutatión-S-transferasa (GST) en hoja joven y vieja de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

En raíz de plantas tratadas con 100 μM de imazamox, la actividad GST sólo cambió de forma significativa respecto al control a los 7 y 14 días, disminuyendo el 30% y el 20% respectivamente (Fig. 3.18). En general, con 250 μM la actividad se estimuló desde el inicio del tratamiento (día 1), llegando a duplicarse con respecto al control a los 7 días, excepto a los 14 días, cuando esta actividad se inhibió un 20%.

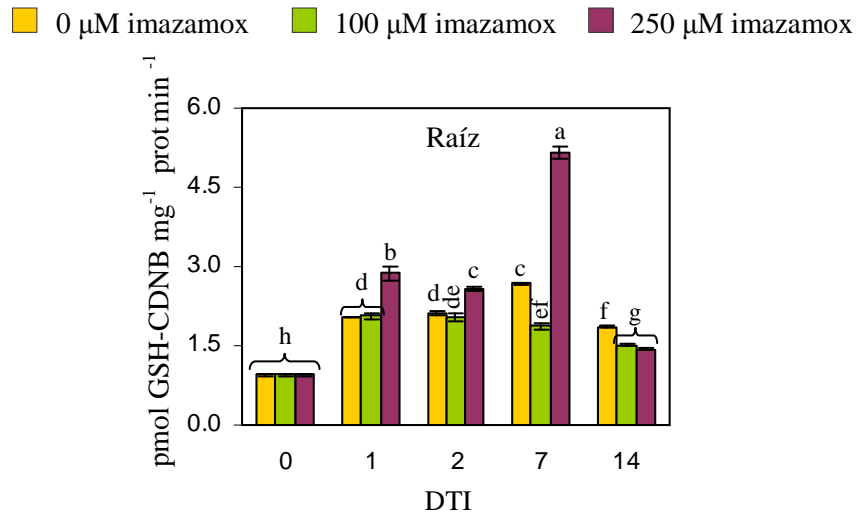


Figura 3.18. Actividad enzimática glutatión-S-transferasa (GST) en raíz de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

3.2.6. Actividad guaiacol peroxidada

En la figura 3.19 se representa la actividad guaiacol peroxidasa foliar de veza.

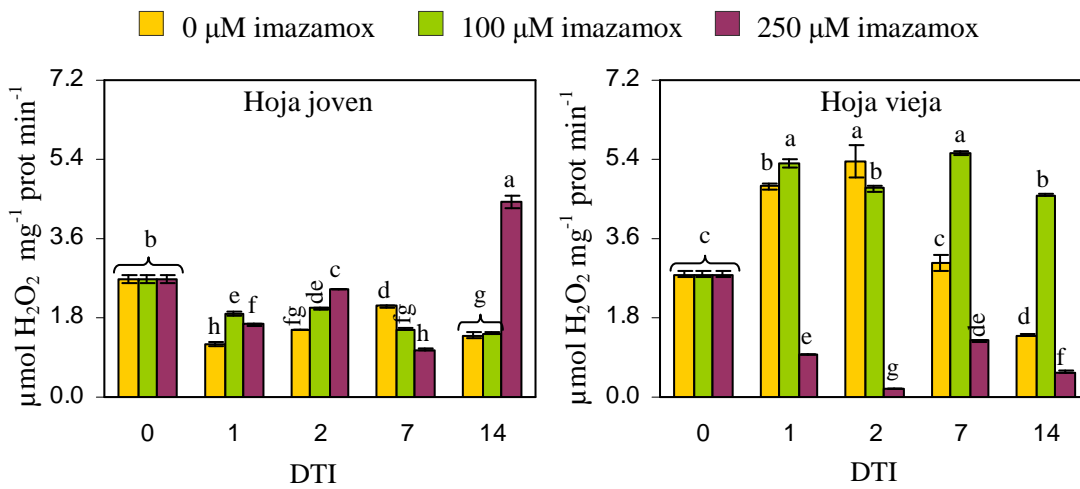


Figura 3.19. Actividad enzimática guaiacol peroxidada (GPX) en hoja joven y vieja de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

En hoja joven la GPX mostró un comportamiento variable dependiendo del tiempo de exposición al herbicida. A los 1 y 2 días de tratamiento aumentó la actividad con ambas dosis, a los 7 días disminuyó, y a los 14 días no hubo diferencias significativas con 100 μM respecto al control y con 250 μM la actividad se triplicó. En hoja vieja, en general, la actividad se estimuló con la dosis menor, llegando a triplicarse a los 14 días, por el contrario con la dosis de 250 μM la GPX se inhibió drásticamente (más del 60%) en todos los muestreos realizados (Fig. 3.19).

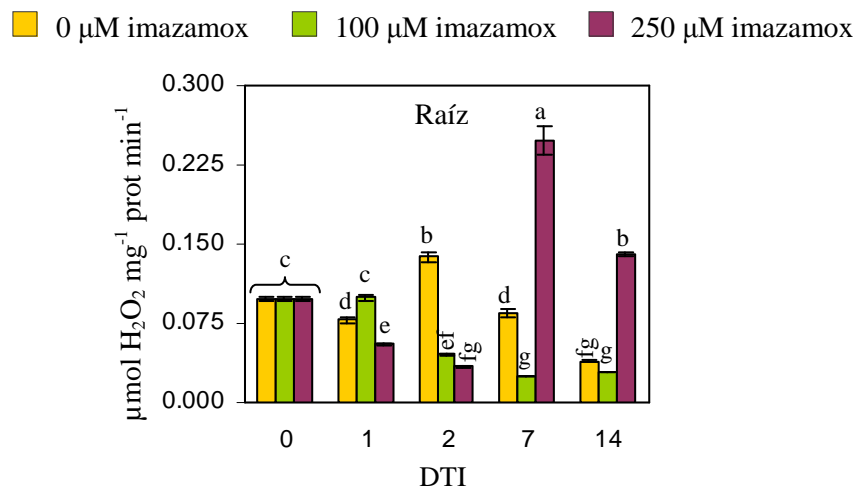


Figura 3.20. Actividad enzimática guaiacol peroxidada (GPX) en raíz de plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. DTI: Días después del tratamiento con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

La actividad GPX en raíz (Fig. 3.20) se inhibió con la dosis de 100 μM de imazamox a lo largo del tiempo de exposición, excepto en el primer día de tratamiento. Por otro lado, con la dosis mayor esta actividad enzimática decreció inicialmente (días 1 y 2), sin embargo, a partir de la semana de tratamiento se estimuló de forma drástica, multiplicándose por 2.5 a los 7 días y triplicándose a los 14 días.

El análisis de la varianza de los datos correspondientes a la actividad GPX (datos no mostrados), indica que la principal fuente de variación en hoja joven y en raíz fue la interacción tiempo-imazamox, mientras que para la hoja vieja el factor determinante de variabilidad fue el tratamiento herbicida. En la tabla 3.2 de correlaciones se muestra que la actividad GPX en hoja joven se correlaciona positivamente ($P \leq 0.05$) con el contenido de imazamox acumulado en hoja joven y hoja vieja. La actividad GPX de hoja vieja se correlaciona negativamente ($P \leq 0.05$) con la actividad AHAS de raíz.

Tabla 3.1. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables siguientes: Peso seco de planta (PSP), relación raíz/parte aérea (RPA), actividad acetohidroxiácidos sintasa (AHAS) aminoácidos libres totales (AATT), porcentaje de aminoácidos libres ramificados (%aarr), contenido de leucina (Leu), contenido de imazamox (IZ), actividad glutatión-S-transferasa (GST) y actividad guiacol peroxidada (GPX) en plantas de *P. vulgaris* tratadas con imazamox a. Las abreviaturas seguidas de “Mer”, “Hj”, “Uh”, “Hm”, “Cot”, “Rj” y “Rv” indican: meristemo, hoja joven, última hoja expandida, hoja media, cotiledones, raíz joven y raíz vieja, respectivamente.

	PSP	RPA	AHAS Mer	AHAS Hj	AHAS Hm	AHAS Uh	AHAS Cot	AATT Mer	AATT Uh	%aarr Mer	%aarr Uh	Leu Mer	IZ Mer	IZ Hj	IZ Uh	GST Hj	GST Cot	GST Rv	GPX Mer	GPX Hj	GPX Uh	GPX Hm	GPX Cot	GPX Rj
PSP	1.000																							
RPA	0.132	1.000																						
AHAS Mer	-0.062	-0.298	1.000																					
AHAS Hj	-0.340	-0.231	0.813	1.000																				
AHAS Hm	-0.268	-0.398	0.161	0.144	1.000																			
AHAS Uh	0.300	-0.124	-0.122	-0.261	0.572	1.000																		
AHAS Cot	0.082	-0.202	-0.394	-0.322	0.640	0.724	1.000																	
AATT Mer	-0.230	0.166	-0.663	-0.579	-0.050	-0.230	0.212	1.000																
AATT Uh	0.218	0.003	-0.831	-0.579	0.018	0.242	0.623	0.509	1.000															
%aarr Mer	0.515	-0.207	0.645	0.550	-0.159	0.122	-0.183	-0.779	-0.357	1.000														
%aarr Uh	-0.112	-0.094	0.925	0.686	-0.074	-0.255	-0.596	-0.593	-0.956	0.532	1.000													
Leu Mer	0.148	0.024	0.666	0.676	-0.436	-0.514	-0.687	-0.448	-0.491	0.599	0.644	1.000												
IZ Mer	-0.163	0.537	-0.656	-0.633	-0.349	-0.264	-0.223	0.517	0.244	-0.719	-0.421	-0.405	1.000											
IZ Hj	-0.136	0.579	-0.536	-0.569	-0.223	-0.187	-0.160	0.363	0.087	-0.617	-0.277	-0.465	0.893	1.000										
IZ Uh	-0.127	0.553	-0.444	-0.488	-0.199	-0.214	-0.166	0.308	0.041	-0.541	-0.206	-0.421	0.842	0.983	1.000									
GST Hj	-0.026	-0.047	-0.644	-0.350	0.282	0.346	0.833	0.450	0.837	-0.308	-0.783	-0.619	0.027	0.023	0.025	1.000								
GST Cot	-0.158	-0.296	-0.204	-0.338	0.667	0.412	0.752	0.380	0.243	-0.410	-0.302	-0.699	-0.107	-0.017	-0.027	0.502	1.000							
GST Rv	0.285	-0.003	-0.841	-0.645	0.018	0.397	0.626	0.412	0.913	-0.287	-0.900	-0.608	0.233	0.136	0.070	0.794	0.246	1.000						
GPX Mer	0.135	-0.186	-0.438	-0.435	0.558	0.598	0.900	0.445	0.579	-0.232	-0.593	-0.720	-0.157	-0.111	-0.126	0.771	0.792	0.630	1.000					
GPX Hj	0.102	-0.180	-0.230	-0.430	0.689	0.745	0.808	0.336	0.309	-0.279	-0.356	-0.670	-0.146	-0.108	-0.133	0.474	0.818	0.364	0.865	1.000				
GPX Uh	0.130	-0.163	0.025	-0.304	0.688	0.807	0.633	-0.021	0.025	-0.138	-0.076	-0.522	-0.154	-0.100	-0.115	0.158	0.688	0.089	0.567	0.877	1.000			
GPX Hm	0.223	-0.282	0.050	-0.194	0.731	0.900	0.637	-0.198	0.066	0.086	-0.117	-0.518	-0.262	-0.202	-0.203	0.182	0.539	0.193	0.596	0.800	0.893	1.000		
GPX Cot	0.389	-0.182	-0.441	-0.538	0.263	0.392	0.601	0.394	0.585	-0.178	-0.577	-0.516	0.028	-0.131	-0.166	0.511	0.582	0.630	0.736	0.634	0.457	0.493	1.000	
GPX Rj	0.387	0.138	-0.510	-0.612	0.077	0.591	0.610	0.359	0.604	-0.142	-0.577	-0.475	0.132	0.051	0.037	0.547	0.294	0.547	0.607	0.630	0.496	0.456	0.458	1.000

Valor crítico
P ≤ 0.05 0.01
0.514 0.641

Tabla 3.2. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables siguientes: Peso seco de planta (PSP), Peso seco de parte aérea (PSPA), actividad acetohidroxiácidos sintasa (AHAS) aminoácidos libres totales (AATT), porcentaje de aminoácidos libres ramificados (%aarr), contenido de valina (Val), leucina (Leu), e isoleucina (Ile), contenido de imazamox (IZ), actividad glutatión-S-transferasa (GST) y actividad guiacol peroxidada (GPX) en plantas de *V. sativa* tratadas con imazamox. Las abreviaturas seguidas de “Hj”, “Hv” y “R” indican: hoja joven, hoja vieja y raíz, respectivamente.

	PSP	PSPA	AHAS Hj	AHAS R	AATT Hj	AATT Hv	%aarr Hj	%aarr Hv	Val Hv	Leu Hv	Ile Hv	IZ Hj	IZ Hv	GST Hj	GST Hv	GPX Hj	GPX Hv
PSP	1.000																
PSPA	0.975	1.000															
AHAS Hj	0.410	0.290	1.000														
AHAS R	0.070	0.158	-0.578	1.000													
AATT Hj	-0.400	-0.321	-0.499	0.376	1.000												
AATT Hv	0.672	0.726	-0.282	0.681	-0.187	1.000											
%aarr Hj	0.568	0.590	0.246	-0.212	-0.687	0.423	1.000										
%aarr Hv	-0.600	-0.536	-0.369	-0.252	0.410	-0.554	-0.265	1.000									
Val Hv	0.407	0.496	-0.504	0.539	-0.037	0.763	0.433	0.083	1.000								
Leu Hv	0.106	0.201	-0.728	0.642	0.253	0.619	0.063	0.241	0.878	1.000							
Ile Hv	0.004	0.086	-0.784	0.646	0.280	0.574	0.021	0.265	0.846	0.974	1.000						
IZ Hj	-0.288	-0.216	-0.822	0.623	0.443	0.338	-0.172	0.382	0.651	0.830	0.922	1.000					
IZHv	-0.265	-0.194	-0.803	0.638	0.369	0.390	-0.091	0.278	0.645	0.773	0.885	0.980	1.000				
GST Hj	-0.248	-0.259	-0.555	0.377	-0.254	0.334	-0.042	-0.163	0.232	0.291	0.383	0.393	0.463	1.000			
GST Hv	-0.454	-0.512	0.407	-0.538	-0.004	-0.762	-0.410	0.119	-0.832	-0.812	-0.748	-0.536	-0.498	-0.116	1.000		
GPX Hj	-0.051	-0.105	-0.052	0.149	0.023	0.085	0.002	0.160	0.319	0.324	0.435	0.553	0.578	0.007	-0.138	1.000	
GPX Hv	-0.232	-0.201	0.071	-0.585	-0.105	-0.427	0.029	0.142	-0.481	-0.442	-0.404	-0.362	-0.361	-0.026	0.485	-0.410	1.000

P ≤ Valor crítico
0.05 0.01
0.514 0.641

4. Respuestas inducidas por imazamox en las simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* CIAT899 y *Vicia sativa*-*Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* VF39

En este experimento se estudia el efecto de la aplicación del herbicida imazamox en el crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos, nutrición mineral, actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa, contenido de aminoácidos e imazamox acumulado, y metabolismo antioxidante en dos simbiosis: *P. vulgaris*-*R. tropici* y *V. sativa*-*R.l. viciae*.

Plantas de judía (*P. vulgaris* var. Coco Blanc) y veza (*V. sativa* var. Corina) inoculadas con sus respectivos simbiosis, crecieron en cultivo hidropónico en cámara de ambiente controlado. El tratamiento con imazamox (0, 100 y 250 μ M) se adicionó a la solución nutritiva en la etapa de crecimiento vegetativo, día 21 de cultivo en judía y día 28 en veza. Ambas leguminosas fueron recolectadas después de 7 días de tratamiento con herbicida, coincidiendo con el inicio de floración.

4.1. Experimentos con *Phaseolus vulgaris*

4.1.1. Análisis del crecimiento

El crecimiento expresado como **peso seco** de planta, parte aérea, raíz, nódulo y **relación raíz/parte** aérea de plantas tratadas con imazamox se expone en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Parámetros de crecimiento: peso seco de planta (PSP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR) y peso seco de nódulo (PSN) expresados en g, y relación raíz/parte aérea de plantas de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

IZ (μ M)	PSP	PSPA	PSR	PSN	RPA
0	1.65 \pm 0.03 ^a	1.45 \pm 0.03 ^a	0.202 \pm 0.02 ^a	0.030 \pm 0.002	0.140 \pm 0.016 ^b
100	1.23 \pm 0.08 ^b	1.10 \pm 0.07 ^b	0.124 \pm 0.01 ^b	0.028 \pm 0.002	0.111 \pm 0.007 ^b
250	1.00 \pm 0.09 ^c	0.83 \pm 0.08 ^c	0.170 \pm 0.02 ^{ab}	0.022 \pm 0.002	0.208 \pm 0.021 ^a
P-valor	***	***	*	NS	**
MDS(P \leq 0.05)	0.220	0.195	0.055	0.006	0.055

Los resultados (\pm ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P \leq 0.05). Las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 y NS (No significativo) p>0.05.

Los resultados (Tabla 4.1) muestran una disminución del peso seco total de planta (PSP) y de parte aérea (PSPA) proporcional a la dosis de herbicida utilizada. En ambos parámetros la reducción detectada fue del 25 y 40% con 100 y 250 μM de imazamox, respectivamente. El crecimiento de la raíz (PSR) se inhibió un 40% con la dosis menor del herbicida, mientras que el peso seco de nódulos (PSN) no varió significativamente con el tratamiento. La **relación raíz/parte aérea** (RPA), considerada como un índice de equilibrio entre raíz y parte aérea, aumentó de forma significativa con 250 μM de imazamox.

4.1.2. Pigmentos fotosintéticos

En la tabla 4.2 se recogen los datos correspondientes al contenido foliar de **clorofilas, xantofilas y carotenos**, así como **pigmentos totales** en hoja joven y vieja de judía: la hoja joven incluye hojas en crecimiento y la hoja adulta corresponde a hojas totalmente expandidas.

Tabla 4.2. Contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb), xantofilas y carotenos (X+C) y pigmentos totales (PT), expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, en hoja joven y vieja de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

Órgano	IZ (μM)	Cla	Clb	X+C	PT
Hoja joven	0	132.8 \pm 2.9 ^a	96.2 \pm 0.9 ^a	10.2 \pm 0.8 ^b	2392 \pm 33 ^a
	100	56.7 \pm 3.4 ^b	17.9 \pm 0.7 ^b	20.1 \pm 1.0 ^a	947 \pm 46 ^b
	250	54.8 \pm 4.1 ^b	15.7 \pm 1.3 ^b	20.7 \pm 1.9 ^a	911 \pm 53 ^b
P-valor		***	***	***	***
MDS (P \leq 0.05)		11.3	3.2	4.3	144
Hoja vieja	0	135.5 \pm 1.4 ^a	118.1 \pm 0.9 ^a	0.75 \pm 0.02 ^b	2544 \pm 10 ^a
	100	133.1 \pm 0.5 ^a	108.2 \pm 1.2 ^b	1.40 \pm 0.03 ^b	2427 \pm 11 ^a
	250	103.3 \pm 6.4 ^b	39.6 \pm 2.4 ^c	30.04 \pm 1.08 ^a	1730 \pm 95 ^b
P-valor		***	***	***	***
MDS (P \leq 0.05)		17.1	5.1	2.00	177

Los resultados (\pm ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P \leq 0.05), las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 y NS (No significativo) p $>$ 0.05.

En hoja joven, ambas dosis de imazamox provocaron una disminución del 60% en el contenido de **clorofila a** y del 80% en **clorofila b**. En hoja vieja, el contenido de clorofila a no cambió significativamente con la dosis menor del herbicida, mientras que con 250 μM se produjo un descenso cercano al 25%. En esta hoja la clorofila b se redujo con ambos tratamientos, observándose un decremento del 10% y del 70% con 100 y 250 μM de imazamox respectivamente (Tabla 4.2). Por otra parte el herbicida incrementó el contenido de xantofilas y carotenos en ambos tipos de hojas: en hoja joven los valores se duplicaron con ambas dosis, y en hoja vieja el aumento más drástico se registró con la dosis mayor (250 μM). La concentración total de pigmentos en hoja joven disminuyó el 60% con 100 y 250 μM de imazamox, mientras que en hoja vieja sólo se redujo de forma significativa (30%) con 250 μM .

4.1.3. Relación carbono/nitrógeno

Los datos correspondientes al contenido de **carbono** y de **nitrógeno** en parte aérea y raíz de plantas de judía tratadas con imazamox se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Porcentaje de nitrógeno (N), porcentaje de carbono (C), relación carbono/nitrógeno (C/N) en parte aérea (PA) y raíz (R) y nitrógeno total por planta de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

IZ (μM)	N (%)		C (%)		C/N		N mg/planta
	PA	R	PA	R	PA	R	
0	4.53 \pm 0.02 ^a	2.92 \pm 0.02 ^a	44.8 \pm 0.1 ^a	39.0 \pm 0.2 ^a	9.87 \pm 0.03 ^b	13.35 \pm 0.09 ^b	71.6 \pm 0.4 ^a
100	4.21 \pm 0.02 ^b	2.77 \pm 0.02 ^b	44.0 \pm 0.2 ^b	36.3 \pm 0.2 ^b	10.45 \pm 0.03 ^a	13.09 \pm 0.09 ^b	49.8 \pm 0.2 ^b
250	4.23 \pm 0.01 ^b	2.83 \pm 0.01 ^b	44.1 \pm 0.1 ^b	39.0 \pm 0.5 ^a	10.42 \pm 0.04 ^a	13.81 \pm 0.20 ^a	40.0 \pm 0.1 ^c
P-valor	***	***	**	***	***	**	***
MDS (P \leq 0.05)	0.06	0.06	0.4	0.9	0.10	0.40	0.7

Los resultados (\pm ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P \leq 0.05). Las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 y NS (No significativo) p $>$ 0.05.

El herbicida redujo el porcentaje de nitrógeno en parte aérea (7%) y en raíz (4%) con ambas dosis respecto al control, también disminuye ligeramente el porcentaje de carbono. Como resultado de estas variaciones, la relación C/N aumentó en parte aérea con ambas dosis (6%) y en raíz sólo lo hizo con la mayor

dosis (5%). El contenido de nitrógeno total por planta descendió alrededor del 30% y del 40% con 100 μM y 250 μM de imazamox, respectivamente (Tabla 4.3).

4.1.4. Actividad acetohidroxiácido sintasa

En el diagrama de barras de la figura 4.1 se muestran los resultados correspondientes a la **actividad acetohidroxiácido sintasa (AHAS)** en distintos órganos de plantas de judía tratadas con imazamox. El herbicida reduce la actividad AHAS en todos los órganos estudiados. No obstante, la disminución más acusada (70%) se observa en hoja joven y nódulo con la mayor dosis de imazamox. En hoja vieja y raíz esta enzima sólo se inhibió con 250 μM , disminuyendo a la mitad su valor respecto al control.

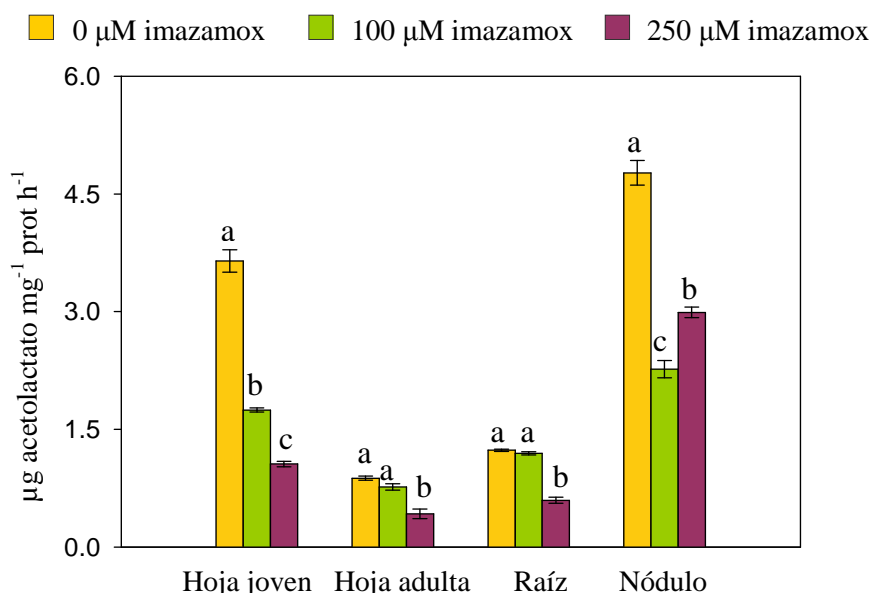


Figura 4.1. Actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de plantas de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

4.1.5. Contenido de aminoácidos totales y ramificados

Se evaluó el contenido de **aminoácidos libres totales** y el porcentaje de **aminoácidos ramificados** en los distintos órganos vegetales analizados (Fig. 4.2). El imazamox provocó un incremento de los aminoácidos libres totales en las diferentes muestras estudiadas: en hoja (joven y vieja) cerca del 80% y en raíz alrededor del 30% con ambas dosis, mientras que en nódulo solamente el 20% con la dosis más alta. En contraste, el herbicida disminuyó el porcentaje de aminoácidos ramificados libres en los cuatro órganos estudiados (Fig. 4.2): el 40%

en hoja joven y hoja vieja, el 20% en raíz, y en nódulo el 10% sólo con la dosis de 250 μM .

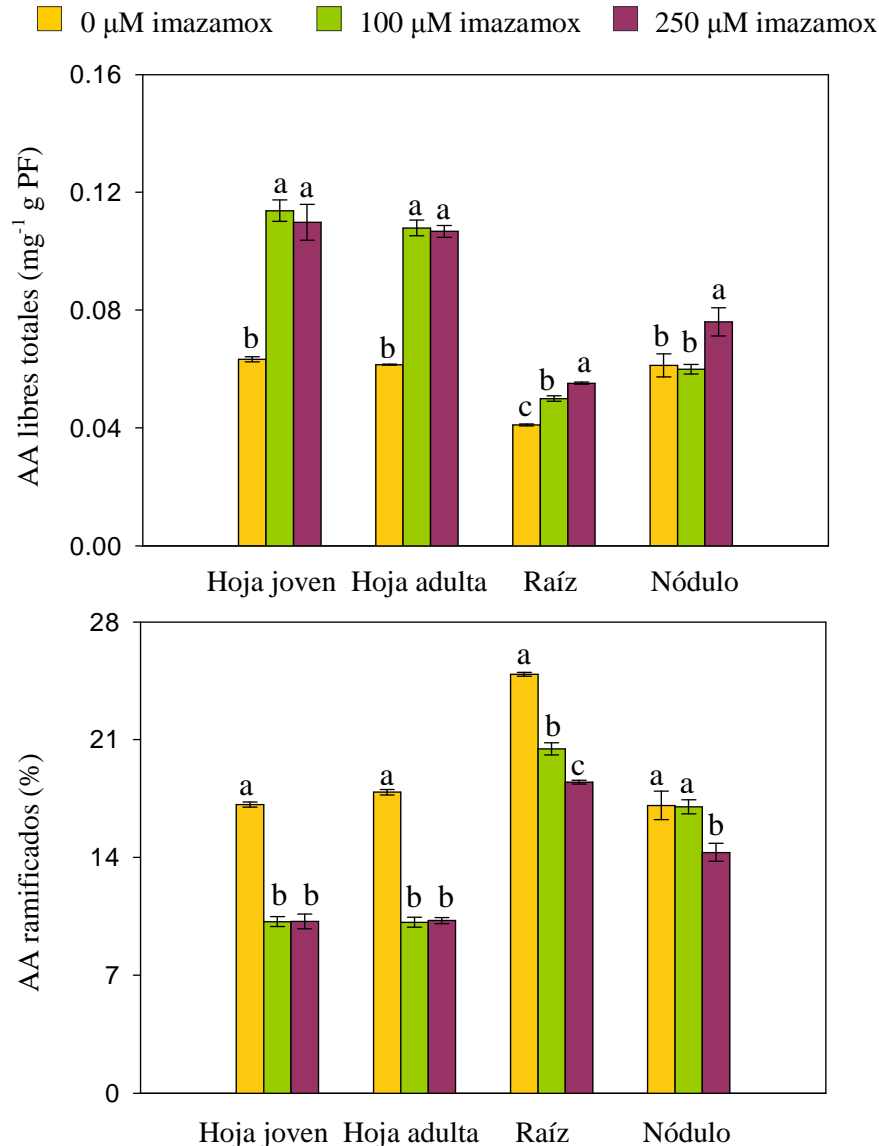


Figura 4.2. Aminoácidos libres totales y porcentaje de aminoácidos ramificados libres en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

El porcentaje de aminoácidos libres ramificados en hoja vieja y joven se correlaciona positivamente y de forma significativa ($P \leq 0.05$) con el contenido de pigmentos totales en hoja joven y con el porcentaje de nitrógeno en parte aérea (Tabla 4.9).

Tabla 4.4. Contenido de aminoácidos libres ramificados: valina (val), leucina (leu) e isoleucina (ile), expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

Órgano	IZ (μM)	Val	Leu	Ile
Hoja joven	0	34.37±0.24 ^a	47.07±0.54 ^a	27.09±0.95 ^c
	100	31.64±0.14 ^b	45.39±0.13 ^b	38.72±0.25 ^a
	250	31.18±0.18 ^b	44.92±0.21 ^b	35.43±0.90 ^b
	P-valor	***	*	***
MDS (P≤0.05)		0.63	1.26	3.00
Hoja vieja	0	34.27±0.34 ^a	47.64±0.27	27.99±0.26 ^b
	100	31.67±0.59 ^b	46.87±0.62	30.85±0.86 ^a
	250	31.69±0.15 ^b	46.32±0.83	31.31±0.81 ^a
	P-valor	**	NS	*
MDS (P≤0.05)		1.41	2.00	2.00
Raíz	0	31.58±0.16 ^a	44.68±0.05 ^a	25.87±0.14 ^b
	100	31.29±0.08 ^{ab}	44.31±0.03 ^b	26.53±0.04 ^a
	250	30.95±0.02 ^b	44.33±0.02 ^b	26.64±0.03 ^a
	P-valor	*	*	**
MDS (P≤0.05)		0.40	0.28	0.28
Nódulo	0	33.32±1.01	44.80±0.22	25.89±0.17 ^{ab}
	100	31.75±0.47	44.59±0.12	25.54±0.11 ^b
	250	35.78±1.67	45.53±0.52	26.87±0.48 ^a
	P-valor	NS	NS	*
MDS (P≤0.05)		4.00	1.09	1.09

Los resultados (\pm ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P≤0.05), las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 y NS (No significativo) p>0.05.

Los datos relativos al contenido de cada aminoácido libre ramificado, **valina**, **leucina** e **isoleucina**, se exponen en la tabla 4.4. El contenido de **valina** disminuyó (10%) en hoja joven y vieja con las dos dosis de herbicida, mientras que en general este parámetro no muestra cambios significativos en raíz y nódulo. La concentración de **leucina** sólo cambió de forma significativa en hoja joven y raíz, reduciéndose alrededor del 5%. Por el contrario, el contenido de **isoleucina** aumentó en hoja joven, el 30% con 100 μM y el 30% con 250 μM , en hoja vieja (10%), y ligeramente en raíz y en nódulo.

4.1.6. Contenido de imazamox

En la figura 4.3 se muestran los datos correspondientes al **contenido de imazamox** encontrado en los distintos tejidos. El herbicida se acumuló principalmente en raíz y nódulo, mientras que en hoja joven y hoja vieja los valores obtenidos fueron inferiores. En hoja joven el imazamox se acumuló principalmente con el tratamiento de 100 μM (4.5 veces más que con 250 μM), mientras que en hoja vieja no hay diferencias significativas entre las dos dosis.

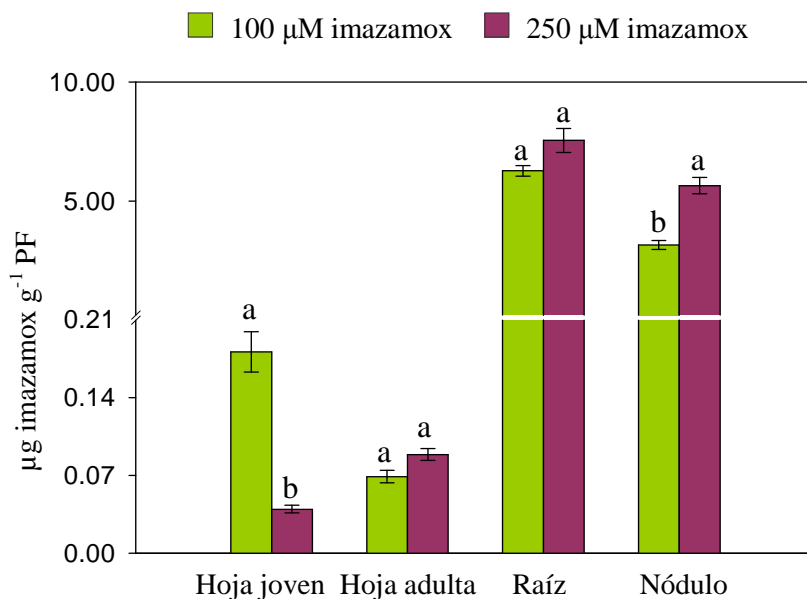


Figura 4.3. Contenido de imazamox en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

Al estudiar la tabla 4.9 se aprecia que el contenido de imazamox en raíz se correlaciona de forma negativa con la concentración de los aminoácidos ramificados valina ($r = -1.000^{***}$) y leucina ($r = -0.999^{**}$) en hoja joven. En esa

misma tabla se puede apreciar también que la concentración de herbicida en hoja vieja tiene una correlación negativa con la actividad acetohidroxiácido sintasa en hoja joven ($r = -0.999^{**}$).

4.1.7. Actividad glutatión-S-transferasa

La **glutatión-S-transferasa** (GST) mostró la actividad más elevada en raíz con respecto al resto de órganos estudiados (Fig. 4.4). En general, con el tratamiento herbicida esta enzima se estimuló en todos los órganos, de hecho con la dosis de 100 μM de imazamox los valores de GST se duplicaron en hoja joven y se incrementaron el 60% en hoja vieja y el 30% en raíz y nódulo. Sin embargo, con la dosis más elevada de imazamox el aumento de actividad GST no fue tan marcado, incrementándose sólo en hoja joven y nódulo (alrededor del 35%) con respecto al control.

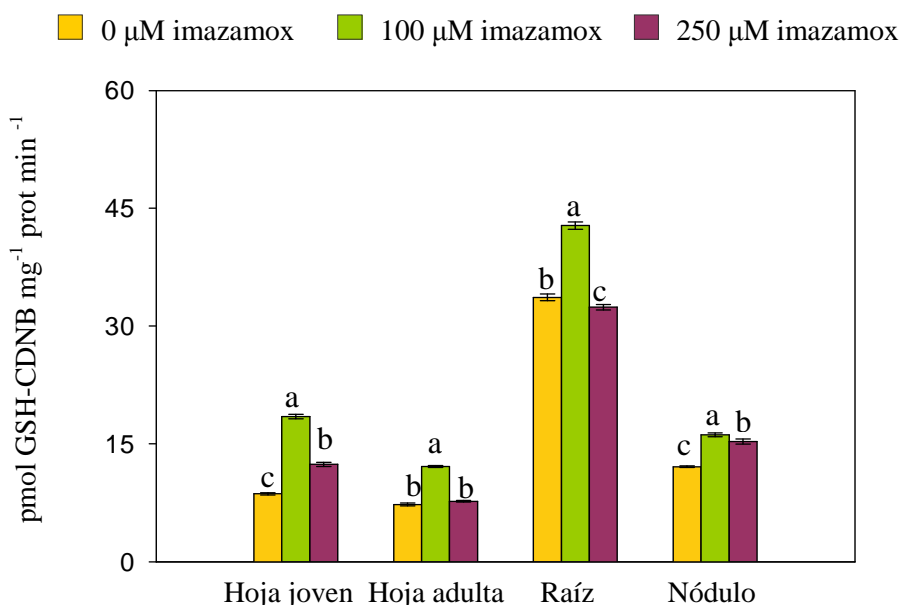


Figura 4.4. Actividad enzimática glutatión-S-transferasa (GST) en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

4.1.8. Actividades antioxidantes

Las enzimas antioxidantes **guaiacol peroxidasa** y **superóxido dismutasa** se representan en la figura 4.5. En el nódulo se observaron los valores de actividad guaiacol peroxidasa más elevados con respecto al resto de órganos estudiados. El imazamox estimuló esta actividad en hoja joven y vieja, aumentando en 4.5 y 3.5 veces, respectivamente, con ambas dosis. Por el contrario, en raíz y nódulo se

produjo un descenso en la actividad de esta enzima, en raíz del 25% con 250 μM y en nódulo del 30-40% con ambas dosis.

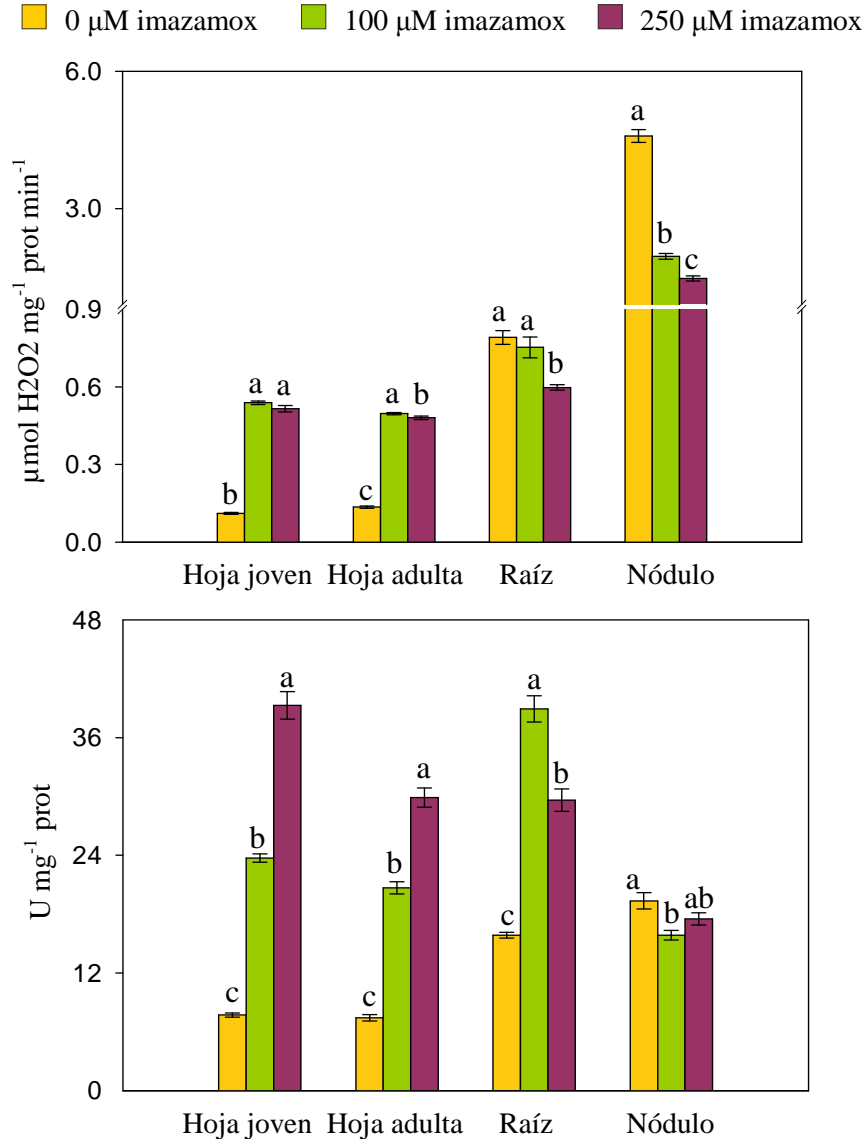


Figura 4.5. Actividades enzimáticas guaiacol peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD) en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

En la tabla 4.9 se presentan las correlaciones entre la actividad guaiacol peroxidada (GPX) y otros parámetros determinados en el experimento, del estudio de esta tabla de correlaciones se deduce que: a) la GPX de hoja joven y vieja

presenta una correlación negativa y significativa con pigmentos totales en hoja joven, porcentaje de nitrógeno en parte aérea, porcentaje de aminoácidos ramificados en hoja joven y vieja y contenido de valina en hoja vieja; **b)** en cambio, la GPX de hoja joven y vieja presenta una correlación positiva y significativa con contenido de aminoácidos totales en hoja joven y vieja; **c)** la actividad GPX nodular se correlaciona positivamente con el contenido de valina ($r=1.00^{***}$) y leucina ($r=0.999^{**}$).

El herbicida causó un aumento de la actividad superóxido dismutasa en hoja joven, siendo los valores 3 y 5 veces superiores al control con las dosis 100 y 250 μM , respectivamente (Fig. 4.5). Un comportamiento similar se registró en hoja vieja y en raíz, aunque en este último órgano el efecto producido por la dosis más elevada del herbicida fue menor. Por el contrario, en nódulo esta actividad no cambió significativamente con 250 μM de imazamox y disminuyó (15%) con 100 μM .

4.2. Experimentos con *Vicia sativa*

4.2.1. Análisis del crecimiento

Los parámetros de crecimiento se exponen en la tabla 4.5. **El peso seco de planta** (PSP) disminuyó ligeramente con el tratamiento herbicida, aunque las variaciones en este parámetro no fueron significativas, en cambio el crecimiento de la **parte aérea** (PSPA) se inhibió un 35% con la dosis mayor de imazamox. Contrario a lo comentado anteriormente, el **peso seco de raíz** (PSR) aumentó con la dosis mayor cerca del 30%, esto provocó un incremento en la **relación raíz/parte aérea** (RPA) que duplicó su valor con dicho tratamiento. El **peso seco de nódulo** (PSN) no se afectó con 100 μM , pero se redujo a la mitad con 250 μM .

Tabla 4.5. Parámetros de crecimiento: peso seco de planta (PSP), peso seco de la parte aérea (PSPA), peso seco de raíz (PSR), expresados en g, peso seco de nódulo (PSN), expresado en mg, y relación raíz/parte aérea de plantas de *V. sativa* en simbiosis con *R.l. viciae* VF39 tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

IZ (μM)	PSP	PSPA	PSR	PSN	RPA
0	0.11 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01 ^a	0.023 \pm 0.001 ^b	1.64 \pm 0.15 ^a	0.29 \pm 0.03 ^b
100	0.09 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01 ^{ab}	0.023 \pm 0.002 ^b	1.68 \pm 0.17 ^a	0.33 \pm 0.03 ^b
250	0.08 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01 ^b	0.030 \pm 0.003 ^a	0.87 \pm 0.08 ^b	0.59 \pm 0.06 ^a
p-valor	NS	**	*	***	***
MDS (P \leq 0.05)	0.02	0.02	0.007	0.41	0.12

Los resultados (\pm ES) son la media de 8 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P \leq 0.05). Las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 y NS (No significativo) p $>$ 0.05.

4.2.2. Pigmentos fotosintéticos

En la tabla 4.6 se muestran los parámetros relacionados con el **contenido de pigmentos foliares**. En hoja joven el herbicida no indujo cambios significativos en el contenido de clorofila a, clorofila b, xantofilas y carotenos, ni en los pigmentos totales. En hoja vieja la clorofila a sólo disminuyó con la dosis mayor (40%) y la clorofila b lo hizo proporcionalmente a la dosis de herbicida aplicada al cultivo (25% y 70%). Las xantofilas y carotenos disminuyeron un 20% con la dosis 250 μM y consecuentemente el contenido de pigmentos totales se redujo el 50% con ese mismo tratamiento.

Tabla 4.6. Contenido de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb), xantofilas y carotenos (X+C) y pigmentos totales (PT), expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, en hoja joven y hoja vieja de *V. sativa* en simbiosis con *R.l. viciae* VF39 tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

Órgano	IZ (μM)	Cla	Clb	X+C	PT
Hoja joven	0	40.2 \pm 0.5	13.1 \pm 0.6	16.0 \pm 1.0	693 \pm 10
	100	43.7 \pm 1.9	11.6 \pm 1.0	19.8 \pm 1.5	751 \pm 30
	250	43.6 \pm 2.8	10.9 \pm 1.8	19.2 \pm 0.8	737 \pm 45
P-valor		NS	NS	NS	NS
MDS ($P\leq 0.05$)		6.3	2.7	3.7	100
Hoja vieja	0	117.3 \pm 7.5 ^a	55.4 \pm 1.1 ^a	29.6 \pm 1.4 ^{ab}	2023 \pm 96 ^a
	100	106.0 \pm 4.5 ^a	40.7 \pm 1.1 ^b	32.7 \pm 3.2 ^a	1794 \pm 81 ^a
	250	65.6 \pm 3.3 ^b	17.1 \pm 1.1 ^c	22.6 \pm 1.7 ^b	1053 \pm 56 ^b
P-valor		***	***	*	***
MDS ($P\leq 0.05$)		17.3	3.5	7.1	254

Los resultados (\pm ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS ($P\leq 0.05$). Las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por * $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$ y NS (No significativo) $p>0.05$.

4.2.3. Nutrición mineral

El contenido de **nitrógeno** y de **carbono** en plantas de veza tratadas con imazamox se expone en la tabla 4.7. El herbicida aumentó levemente el porcentaje de nitrógeno de parte aérea y redujo el porcentaje de carbono, disminuyendo la relación C/N alrededor del 10% con ambas dosis. En raíz el porcentaje de nitrógeno aumentó cerca del 20% con respecto al control, mientras que el de carbono incrementó ligeramente, por lo que la relación C/N disminuyó el 15% con las dos dosis. El contenido de **nitrógeno total** por planta sólo presentó diferencias significativas con el tratamiento de 250 μM , disminuyendo su valor un 15%.

Tabla 4.7. Porcentaje de nitrógeno (N), porcentaje de carbono (C), relación carbono/nitrógeno (C/N) en parte aérea (PA) y raíz (R) y nitrógeno total por planta de *V. sativa* en simbiosis con *R.l. viciae* VF39 tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

IZ (μM)	N (%)		C (%)		C/N		N mg/planta
	PA	R	PA	R	PA	R	
0	2.80 \pm 0.05 ^b	2.73 \pm 0.05 ^c	44.5 \pm 0.2 ^a	36.3 \pm 0.5 ^b	15.91 \pm 0.28 ^a	13.36 \pm 0.38 ^a	2.99 \pm 0.05 ^a
100	3.03 \pm 0.02 ^a	3.36 \pm 0.01 ^a	42.7 \pm 0.1 ^b	38.9 \pm 0.1 ^a	14.12 \pm 0.11 ^b	11.59 \pm 0.05 ^b	2.94 \pm 0.01 ^a
250	2.85 \pm 0.02 ^b	3.26 \pm 0.03 ^b	40.4 \pm 0.1 ^c	36.3 \pm 0.2 ^b	14.15 \pm 0.14 ^b	11.12 \pm 0.13 ^b	2.52 \pm 0.01 ^b
P-valor	***	***	***	***	***	***	***
MDS (P \leq 0.05)	0.10	0.09	0.4	0.9	0.58	0.70	0.09

Los resultados (\pm ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P \leq 0.05). Las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001 y NS (No significativo) p $>$ 0.05.

4.2.4. Actividad acetohidroxiácido sintasa

En el diagrama de barras de la figura 4.6 se muestra la **actividad acetohidroxiácido sintasa (AHAS)** en los distintos órganos de veza. En nódulo y en hoja joven de plantas control es donde se observó la mayor actividad enzimática. Especialmente, en hoja joven es donde el imazamox inhibió la actividad AHAS, reduciendo su valor un 90% respecto al control, aunque en hoja vieja la disminución fue del 60% con ambas dosis y en nódulo del 60% con 100 μM y del 70% con 250 μM . Por el contrario, en raíz, con la dosis menor del herbicida esta actividad enzimática aumentó cerca del 70%, mientras que con la dosis mayor disminuyó alrededor del 30%.

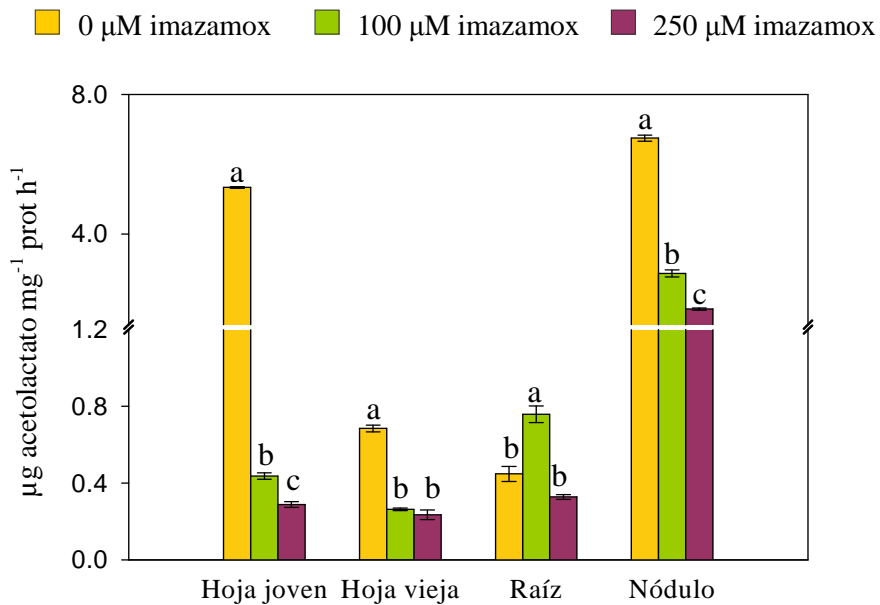


Figura 4.6. Actividad enzimática acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de plantas de *V. sativa* en simbiosis con *R.l. viciae* VF39 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

4.2.5. Contenido de aminoácidos totales y ramificados

El contenido de **aminoácidos libres totales** así como el porcentaje de **aminoácidos ramificados** se cuantificó en los distintos órganos de plantas de veza tratadas con imazamox (Fig. 4.7). El diagrama de barras muestra que no se produjeron cambios significativos en el contenido de aminoácidos libres totales en hoja joven, hoja vieja y nódulo, mientras que en raíz se incrementó casi el 50% con ambas dosis. El porcentaje de aminoácidos ramificados libres no cambió significativamente con la aplicación de imazamox tanto en hoja joven como en nódulo, sin embargo, en hoja vieja aumentó el 10% y por el contrario en raíz disminuyó alrededor del 30%.

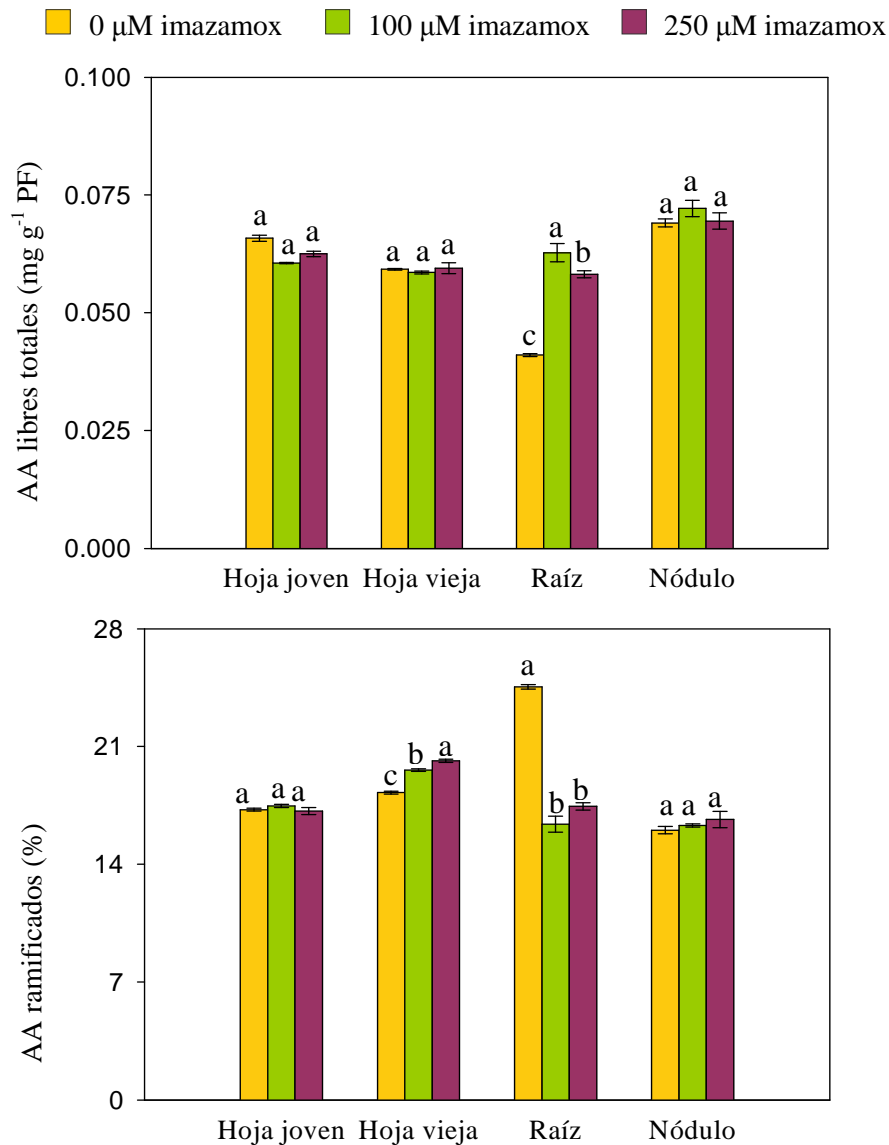


Figura 4.7. Aminoácidos libres totales y porcentaje de aminoácidos ramificados libres en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de plantas de *V. sativa* en simbiosis con *R.L. viciae* VF39 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

Los datos relativos al contenido de cada aminoácido libre ramificado, valina, leucina e isoleucina, se exponen en la tabla 4.8. La concentración de **valina** en hoja joven se redujo con el tratamiento herbicida (cerca del 12% con ambas dosis), en hoja vieja se incrementó el 9% con 250 μ M y alrededor del 5% en raíz con ambas dosis. El contenido de **leucina** disminuyó ligeramente en hoja joven y en hoja vieja aumentó el 8% respecto al control, con la dosis más elevada.

Capítulo 4

Tabla 4.8. Contenido de aminoácidos libres ramificados: valina (val), leucina (leu) e isoleucina (ile), expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de *V. sativa* en simbiosis con *R.l. viciae* VF39 tratadas durante 7 días con imazamox (IZ).

Órgano	IZ (μM)	Val	Leu	Ile
Hoja joven	0	38.21±0.40 ^a	46.62±0.12 ^a	28.69±0.17 ^a
	100	33.02±0.18 ^b	45.70±0.07 ^c	27.15±0.07 ^b
	250	33.85±0.14 ^b	46.14±0.07 ^b	27.31±0.10 ^b
	P-valor	***	*	***
MDS (P≤0.05)		0.89	0.28	0.40
Hoja vieja	0	34.20±0.23 ^b	46.89±0.27 ^b	27.12±0.24 ^b
	100	35.52±0.17 ^{ab}	48.54±0.20 ^b	30.69±0.20 ^a
	250	37.16±1.03 ^a	50.64±0.89 ^a	32.07±0.89 ^a
	P-valor	*	**	*
MDS (P≤0.05)		2.00	2.00	2.00
Raíz	0	30.83±0.07 ^c	44.44±0.10	25.46±0.05 ^b
	100	32.27±0.13 ^a	44.63±0.15	25.78±0.08 ^a
	250	31.64±0.02 ^b	44.31±0.02	25.47±0.01 ^b
	P-valor	***	NS	**
MDS (P≤0.05)		0.28	0.35	0.20
Nódulo	0	34.39±0.78	48.72±1.41	27.64±0.66
	100	37.28±1.37	49.05±0.71	31.40±1.09
	250	35.94±1.80	49.24±1.98	30.71±1.95
	P-valor	NS	NS	NS
MDS (P≤0.05)		6.32	6.32	6.32

Los resultados (\pm ES) son la media de 6 réplicas. Las medias se compararon usando el valor de MDS (P≤0.05). Las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente. Los niveles de significación se representan por *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 y NS (No significativo) p>0.05.

El contenido de **isoleucina** en hoja joven descendió el 5% con ambas dosis, en hoja vieja aumentó cerca del 15%, mientras que en raíz no se produjeron cambios. En la tabla 4.8 se observa que en nódulo el tratamiento con imazamox no provoca cambios significativos en el contenido de valina, leucina e isoleucina.

4.2.6. Contenido de imazamox

Los datos correspondientes al contenido de **imazamox** en los distintos órganos de veza se recogen en el diagrama de la figura 4.8. El imazamox se acumuló en mayor medida en todos los órganos con la dosis de 250 μM , cerca de 5 veces más en ambos tipos de hojas y el doble en raíz y nódulo respecto a los valores de la dosis de 100 μM . Además, hay que resaltar que el herbicida se acumuló principalmente en la parte aérea de la planta (hoja joven y vieja), detectándose en raíz y en nódulo, con la dosis más elevada de imazamox, valores aproximadamente 4 veces inferiores a los de la parte aérea.

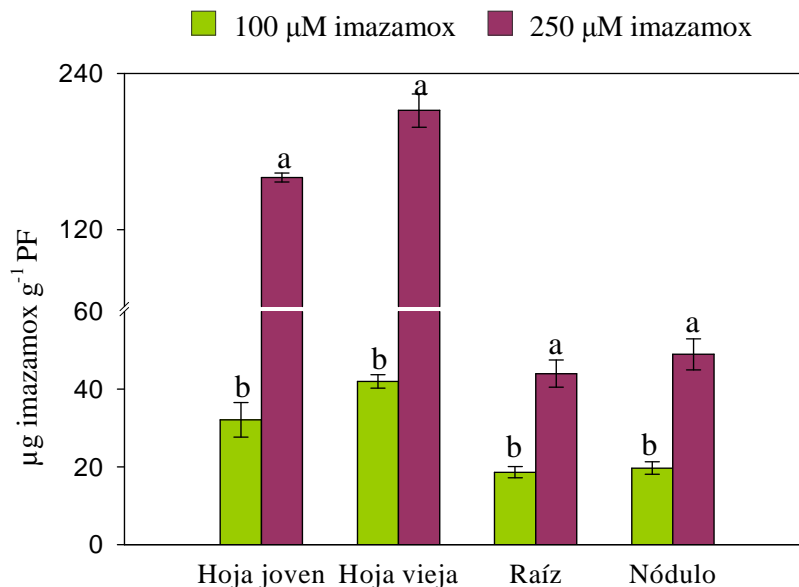


Figura 4.8. Contenido de imazamox (IZ) en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de *V. sativa* en simbiosis con *R.l. viciae* VF39 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=6$), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

Al estudiar la tabla 4.10 se aprecia que el contenido endógeno de imazamox en hoja vieja se correlacionan de forma negativa con el contenido de pigmentos totales de este órgano ($r = -0.999^{**}$). En esa misma tabla se puede apreciar también que la concentración de herbicida en raíz y nódulo tiene una

correlación positiva y significativa con el contenido de valina y leucina en hoja vieja.

4.2.7. Actividad glutatión-S-transferasa

La actividad **glutatión-S-transferasa** (GST), se representa en la figura 4.9. Los resultados ponen de manifiesto que la utilización de herbicida indujo un aumento de esta actividad en todos los órganos estudiados de forma proporcional a la dosis aplicada. Este incremento fue más drástico en hoja joven, donde el tratamiento de 100 μM triplicó los valores de actividad del control y el de 250 μM los multiplicó casi por 5. En hoja vieja la dosis más baja apenas aumentó la actividad, pero ésta enzima duplicó su valor respecto al control con 250 μM . La raíz fue el órgano de la planta donde el control mostró mayor actividad, aunque también fue donde menos efecto tuvo el tratamiento herbicida (incremento del 30%). En nódulo la actividad GST se estimuló el 50% con la dosis más baja y se duplicó con la más alta.

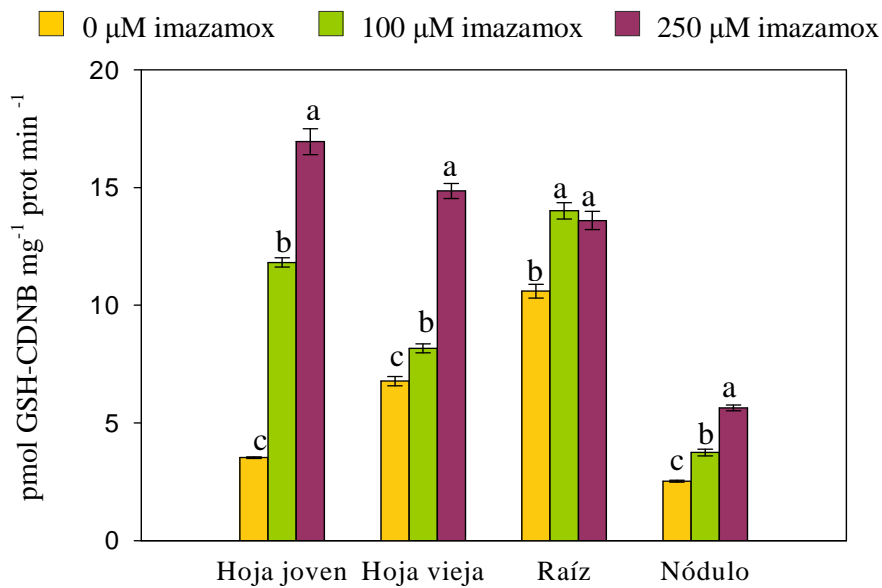


Figura 4.9. Actividad enzimática glutatión-S-transferasa (GST) en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de *V. sativa* en simbiosis con *R.l. viciae* VF39 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES (n=6), y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

4.2.8. Actividades antioxidantes

La figura 4.10 muestra los resultados de las actividades antioxidantes **guaiacol peroxidasa (GPX)** y **superóxido dismutasa (SOD)** en los distintos órganos estudiados. En general, se observa que la actividad GPX es más elevada en parte aérea (hoja joven y vieja) que en raíz y nódulo. El imazamox incrementó esta enzima cerca del 50% en hoja joven y la multiplicó por más de 2 en hoja vieja. En la raíz la GPX se estimuló con la dosis de 100 μM , siendo 2 veces superior respecto al control; sin embargo, con la dosis más elevada disminuyó un 25%. En nódulo se inhibió de forma proporcional a la dosis aplicada al cultivo, el 40% con el tratamiento de 100 μM y el 60% con el de 250 μM .

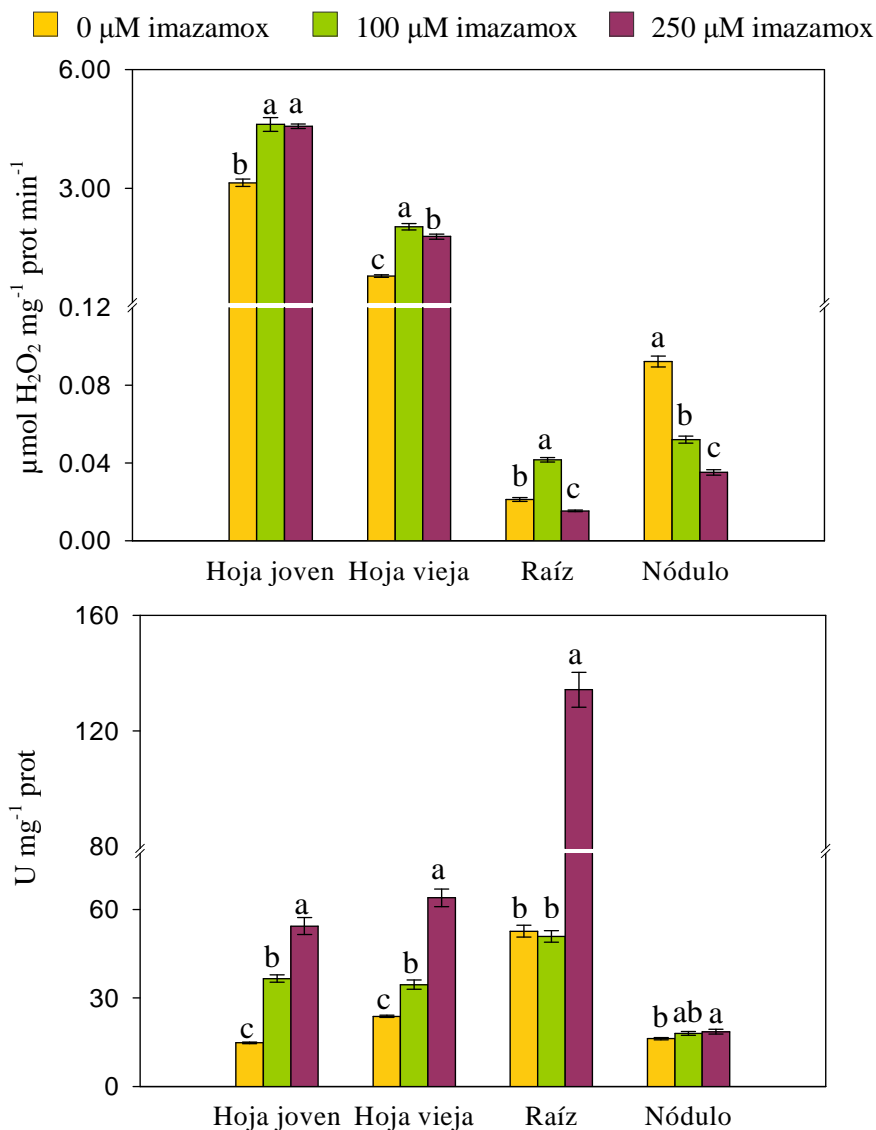


Figura 4.10. Actividades enzimáticas guaiacol peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa en hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo de *V. sativa* en simbiosis con *R.l. viciae* VF39 tratadas con imazamox. Los resultados son las medias \pm ES ($n=3$) y las diferencias entre medias son comparadas usando la MDS ($P \leq 0.05$).

La actividad guaiacol peroxidasa de hoja joven se correlaciona negativamente y de forma significativa ($P \leq 0.05$) con la actividad acetohidroxiácido sintasa y el contenido de isoleucina de este órgano (Tabla 4.10). En esta misma tabla se puede apreciar también que el porcentaje de aminoácidos ramificados en hoja joven tiene una correlación positiva con la actividad guaiacol peroxidasa de raíz ($r = 1.00^{***}$).

La aplicación de imazamox estimula la actividad **superóxido dismutasa** (SOD) en todos los órganos estudiados (Fig. 4.10). En hoja joven y vieja esta enzima incrementó proporcionalmente a la dosis de herbicida, de hecho con $250 \mu\text{M}$ se multiplicó por 4, aproximadamente, en ambos órganos. En raíz la dosis menor no provocó cambios significativos en la actividad SOD, pero con $250 \mu\text{M}$ se multiplicó por 2.5. En general en nódulo no se observaron alteraciones significativas de esta actividad enzimática con los distintos tratamientos.

Tabla 4.9. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables siguientes: pigmentos totales (PT), porcentaje de nitrógeno en la parte aérea (%N PA) actividad acetohidroxiácido sintasa (AHAS), aminoácidos libres totales (AA tot), porcentaje de aminoácidos libres ramificados (%aarr), contenido de valina (Val), leucina (Leu) e isoleucina (Ile), contenido de imazamox (IZ) y actividad guaiacol peroxidada (GPX) en plantas de *P. vulgaris* en simbiosis con *R. tropici* CIAT899 tratadas con imazamox. Los símbolos seguidos de "Hj", "Hv", "R" y "N" indican hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo respectivamente.

	PT	Hj	PT	Hv	% N PA	AHAS	AHAS	AHAS	AHAS	AA tot	AA tot	AA tot	%aarr	%aarr	Val	Val	Leu	Leu	Ile	Ile	IZ	IZ	IZ	GPX	GPX	GPX	GPX		
	Hj	Hv	Hj	Hv	Hj	Hv	N	Hj	Hv	N	Hj	Hv	Hj	Hv	Hj	Hv	Hj	Hv	Hj	Hv	Hv	R	N	Hj	Hv	R	N		
PT Hj	1.000																												
PT Hv	0.627	1.000																											
% N PA	0.996	0.557	1.000																										
AHAS	0.972	0.794	0.947	1.000																									
AHAS	0.705	0.995	0.639	0.852	1.000																								
AHAS N	0.954	0.364	0.976	0.855	0.458	1.000																							
AA tot	-0.996	-0.553	-1.000	-0.946	-0.636	-0.977	1.000																						
AA tot	-0.999	-0.593	-0.999	-0.960	-0.673	-0.966	0.999	1.000																					
AA tot N	-0.939	-0.858	-0.905	-0.994	-0.906	-0.791	0.903	0.923	1.000																				
%aarr Hj	1.000	0.614	0.997	0.967	0.692	0.959	-0.997	-1.000	-0.932	1.000																			
%aarr Hv	0.999	0.602	0.998	0.964	0.681	0.963	-0.998	-1.000	-0.927	1.000	1.000																		
Val Hj	0.994	0.711	0.980	0.992	0.780	0.914	-0.979	-0.988	-0.972	0.992	0.989	1.000																	
Val Hv	1.000	0.606	0.998	0.965	0.685	0.961	-0.998	-1.000	-0.929	1.000	1.000	0.990	1.000																
Leu Hj	0.983	0.761	0.963	0.999	0.824	0.881	-0.961	-0.974	-0.986	0.979	0.976	0.997	0.977	1.000															
Leu Hv	0.917	0.886	0.878	0.985	0.929	0.754	-0.876	-0.899	-0.998	0.910	0.903	0.956	0.906	0.975	1.000														
Ile Hj	-0.956	-0.370	-0.978	-0.859	-0.464	-1.000	0.979	0.968	0.795	-0.960	-0.965	-0.916	-0.963	-0.884	-0.758	1.000													
Ile Hv	-0.994	-0.707	-0.981	-0.991	-0.776	-0.916	0.980	0.989	0.970	-0.992	-0.990	-1.000	-0.991	-0.997	-0.954	0.919	1.000												
IZ Hv	-0.981	-0.766	-0.960	-0.999	-0.828	-0.878	0.959	0.972	0.988	-0.978	-0.974	-0.997	-0.976	-1.000	-0.977	0.881	0.996	1.000											
IZ R	-0.991	-0.728	-0.975	-0.995	-0.795	-0.904	0.974	0.984	0.977	-0.988	-0.986	-1.000	-0.987	-0.999	-0.963	0.906	1.000	0.998	1.000										
IZ N	-0.907	-0.897	-0.866	-0.981	-0.938	-0.738	0.864	0.888	0.997	-0.900	-0.893	-0.949	-0.895	-0.969	-1.000	0.742	0.947	0.971	0.956	1.000									
GPX Hj	-0.998	-0.573	-1.000	-0.953	-0.655	-0.972	1.000	1.000	0.913	-0.999	-0.999	-0.984	-0.999	-0.968	-0.888	0.973	0.985	0.966	0.979	0.876	1.000								
GPX Hv	-0.998	-0.579	-1.000	-0.956	-0.660	-0.970	0.999	1.000	0.916	-0.999	-1.000	-0.985	-0.999	-0.970	-0.891	0.972	0.986	0.968	0.980	0.880	1.000	1.000							
GPX R	0.671	0.998	0.603	0.827	0.999	0.417	-0.600	-0.638	-0.886	0.658	0.647	0.750	0.650	0.797	0.911	-0.422	-0.746	-0.801	-0.766	-0.921	-0.619	-0.625	1.000						
GPX N	0.992	0.719	0.978	0.993	0.787	0.909	-0.977	-0.986	-0.974	0.990	0.988	1.000	0.989	0.998	0.959	-0.912	-1.000	-0.998	-1.000	-0.952	-0.982	-0.983	0.758	1.000					

Valor crítico
P ≤ 0.050 0.010
0.997 0.999

Tabla 4.10. Matriz de coeficientes de correlación simple entre las variables siguientes: pigmentos totales (PT), porcentaje de nitrógeno en la parte aérea (%N PA) actividad acetohidroxiácido sintasa (AHAS), aminoácidos libres totales (AA tot), porcentaje de aminoácidos libres ramificados (%aarr), contenido de valina (Val), leucina (Leu) e isoleucina (Ile), contenido de imazamox (IZ) y actividad guiacol peroxidada (GPX) en plantas de *V. sativa* en simbiosis con *R.l. viciae* VF39 tratadas con imazamox. Los símbolos seguidos de “Hj”, “Hv”, “R” y “N” indican hoja joven, hoja vieja, raíz y nódulo respectivamente.

	PT	Hj	PT	Hv	% N PA	AHAS	AHAS	AHAS	AHAS	AA tot	AA tot	AA tot	%aarr	%aarr	Val	Val	Leu	Leu	Ile	Ile	IZ	IZ	IZ	GPX	GPX	GPX	GPX			
						Hj	Hv	N	Hj	Hv	N	Hj	Hv	Hj	Hv	Hj	Hv	Hj	Hv	Hj	Hv	R	N	Hj	Hv	R	N			
PT Hj	1.000																													
PT Hv	-0.502	1.000																												
% N PA	0.831	0.065	1.000																											
AHAS	-0.969	0.701	-0.666	1.000																										
AHAS	-0.961	0.723	-0.643	1.000	1.000																									
AHAS N	-0.911	0.814	-0.527	0.985	0.990	1.000																								
AA tot	-0.990	0.373	-0.901	0.923	0.911	0.843	1.000																							
AA tot	-0.499	-0.499	-0.897	0.267	0.238	0.097	0.617	1.000																						
AA tot N	0.772	0.163	0.995	-0.589	-0.565	-0.441	-0.855	-0.936	1.000																					
%aarr Hj	0.531	0.466	0.913	-0.304	-0.275	-0.135	-0.647	-0.999	0.949	1.000																				
%aarr Hv	0.872	-0.861	0.452	-0.966	-0.974	-0.996	-0.793	-0.011	0.362	0.049	1.000																			
Val Hj	-0.997	0.567	-0.785	0.985	0.979	0.940	0.976	0.431	-0.721	-0.465	-0.907	1.000																		
Val Hv	0.688	-0.973	0.168	-0.847	-0.863	-0.926	-0.578	0.286	0.070	-0.249	0.955	-0.742	1.000																	
Leu Hj	-0.964	0.253	-0.949	0.867	0.852	0.768	0.992	0.711	-0.913	-0.738	-0.710	0.941	-0.470	1.000																
Leu Hv	0.683	-0.974	0.161	-0.843	-0.859	-0.924	-0.572	0.292	0.063	-0.255	0.953	-0.737	1.000	-0.464	1.000															
Ile Hj	-0.991	0.612	-0.750	0.993	0.989	0.958	0.962	0.380	-0.681	-0.415	-0.929	0.998	-0.778	0.920	-0.774	1.000														
Ile Hv	0.878	-0.854	0.463	-0.970	-0.977	-0.997	-0.801	-0.023	0.374	0.062	1.000	-0.912	0.951	-0.719	0.949	-0.934	1.000													
IZ Hv	0.468	-0.999	-0.104	-0.673	-0.695	-0.791	-0.337	0.533	-0.201	-0.500	0.841	-0.534	0.963	-0.216	0.965	-0.581	0.834	1.000												
IZ R	0.669	-0.979	0.142	-0.833	-0.849	-0.916	-0.556	0.311	0.044	-0.274	0.947	-0.724	1.000	-0.447	1.000	-0.761	0.943	0.970	1.000											
IZ N	0.651	-0.983	0.118	-0.820	-0.837	-0.906	-0.537	0.333	0.020	-0.296	0.939	-0.708	0.999	-0.426	0.999	-0.746	0.935	0.975	1.000	1.000										
GPX Hj	0.981	-0.661	0.706	-0.999	-0.996	-0.974	-0.943	-0.319	0.632	0.355	0.951	-0.993	0.817	-0.893	0.813	-0.998	0.955	0.632	0.802	0.787	1.000									
GPX Hv	0.999	-0.532	0.810	-0.977	-0.970	-0.925	-0.984	-0.467	0.749	0.501	0.889	-0.999	0.714	-0.954	0.709	-0.995	0.895	0.499	0.695	0.678	0.987	1.000								
GPX R	0.507	0.491	0.901	-0.276	-0.247	-0.106	-0.624	-1.000	0.939	1.000	0.020	-0.439	-0.277	-0.718	-0.283	-0.388	0.033	-0.525	-0.302	-0.324	0.328	0.476	1.000							
GPX N	-0.869	0.864	-0.447	0.965	0.972	0.996	0.790	0.005	-0.357	-0.043	-1.000	0.905	-0.957	0.706	-0.955	0.927	-1.000	-0.844	-0.949	-0.941	-0.949	-0.886	-0.014	1.000						

Valor crítico
 $P \leq 0.050$ 0.010
0.996 0.999

Discusión

1. Selección de cepas de *Rhizobium* tolerantes a herbicidas

Las propiedades bioquímicas del suelo, íntimamente relacionadas con la fertilidad de éste, dependen en buena parte de la biomasa microbiana. Se ha estudiado profundamente la respuesta de la microflora edáfica a la acción directa o indirecta de herbicidas (Edwards, 1989, Dzantor y Felsot, 1991, Johnsen *et al.*, 2001, Lupwayi *et al.*, 2004, Bunemann *et al.*, 2006, Lo, 2010), sin embargo la relación entre las diferentes estructuras de los pesticidas con su impacto en los microorganismo del suelo no son fáciles de predecir, dado que el alcance de los efectos provocados depende de numerosos factores, tales como tipo de suelo, clima, propiedades físico-químicas del compuesto, características de la biomasa microbiana, etc. (Chowdhury *et al.*, 2008). Algunos pesticidas estimulan el crecimiento de la biomasa microbiana (Gomez *et al.*, 2009, Pampulha *et al.*, 2007), otros la inhiben (Niemi *et al.*, 2009) y otros no tienen efectos sobre ella (Crouzet *et al.*, 2010).

Se ha descrito que las sulfonilureas, pertenecientes al grupo de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS, provocan escasos efectos en la microflora del suelo cuando son aplicados en cantidades equivalentes a la dosis recomendada en campo, mientras que dosis superiores sí ejercen un efecto inhibitorio en la biomasa microbiana y en sus actividades bioquímicas (Sofa *et al.*, 2012). Tampoco se han detectado efectos adversos en los procesos microbiológicos del suelo tras la aplicación del herbicida imazetapir, perteneciente a la familia de las imidazolinonas, utilizando dosis de campo, pero con dosis superiores se observa decrecimiento de la biomasa microbiana (Perucci y Scarponi, 1994, Zhang *et al.*, 2010). En una investigación desarrollada en sistema de microcosmos con suelo contaminado con imazamox se observaron inicialmente decrementos significativos en el contenido de biomasa en comparación con suelos no tratados, pero esta inhibición no excedió el 25% y la biomasa microbiana volvió a los valores iniciales en diferentes momentos del estudio, dependiendo de las condiciones de incubación (Vischetti *et al.*, 2002).

La tolerancia de especies de *Rhizobium* frente a herbicidas es variable, dependiendo del tipo de herbicida y de la especie de que se trate, por ejemplo, muchas especies han mostrado tolerancia a atrazina o dicamba (Drouin *et al.*, 2010), otras son sensibles al glifosato o al linuron (Zobiolo *et al.*, 2010, Khan *et al.*, 2006) e incluso algunas especies son capaces de degradar benzonitrilos (Holtze *et al.*, 2008). Con respecto a los herbicidas inhibidores de la AHAS, también se ha encontrado una gran variabilidad en las respuestas de los rizobios, así, en experimentos realizados con suspensiones de *Bradyrhizobium japonicum* se comprobó que el imazaquín inhibe el crecimiento de las cepas ensayadas (Arruda *et al.*, 2001) y esta reducción llega a ser del 40% cuando se aplica imazetapir, (Procópio, 2004). Por el contrario, se ha demostrado que otras especies de

Rhizobium son tolerantes a altas dosis de inhibidores de la enzima AHAS, como *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* frente a clorsulfurón, un herbicida perteneciente a la familia de las sulfonilureas (Martensson y Nilsson, 1989), o *Sinorhizobium meliloti* que es capaz de crecer con altas concentraciones de imazamox (Blažinkov *et al.*, 2009).

En este trabajo se comprobó que en general las 4 cepas empleadas presentaron alta tolerancia al imazamox (Fig. 1.2 y 1.6) coincidiendo con los trabajos de Santos *et al.* (2006), en el que se describe baja toxicidad para *R. tropici* cuando esta especie es tratada con imazamox y de Gonzalez *et al.* (1996), donde se señala la tolerancia de *R. leguminosarum* biovar *viciae* al herbicida imazetapir.

En la figura 1.2 se comprueba que la cepa de *R. tropici* presentó mayor tolerancia al herbicida que la cepa de *R. etli*, pues la población de la primera se inhibió en menor proporción que la de la segunda. *R. tropici* se ha catalogado como un nodulante oportunista de judía con un amplio rango de hospedador (Hernández-Lucas *et al.*, 1995) y se ha señalado que, en general, las cepas de *R. tropici*, y en concreto la CIAT899, son muy eficientes en la fijación simbiótica de N₂ (Hungria y Franco, 1993), siendo más competitivas que las cepas de *R. etli* en ciertas condiciones (Vlassak *et al.*, 1996); de hecho son más exitosas en la nodulación de judía en condiciones ácidas (Graham *et al.*, 1994), son más tolerantes a altas temperaturas (Martínez-Romero *et al.*, 1991, Hungria y Franco, 1993, Michiels *et al.*, 1994, Mostasso *et al.*, 2002) y algunas cepas están bien adaptadas a suelos arenosos (Acosta-Duran y Martínez-Romero, 2002). Con respecto a las cepas de *R.l. viciae*, no se ha encontrado en la literatura ningún estudio comparativo entre las cepas VF39 y UPM791. En este trabajo se encontró que la cepa VF39 mantuvo un mayor porcentaje de población en el microcosmos al cabo de 14 días de experimentación que la cepa UPM791 (Fig. 1.5). También en cierta medida las determinaciones de actividad AHAS en suspensiones bacterianas incubadas con el herbicida indicaron una mayor tolerancia de las cepas CIAT899 y VF39 (Fig. 1.3 y 1.7).

Las diferencias en las respuestas de las distintas cepas pueden venir dadas por diversos factores o por la combinación de varios de ellos. En los casos en los que el herbicida provocó inhibición de la población de los microcosmos es posible que **a)** el herbicida alcanzara la enzima AHAS, inhibiendo de esta forma la ruta de síntesis de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina o **b)** la inhibición del crecimiento se debiera a la toxicidad de algún ingrediente de la formulación del producto.

a) En bibliografía se ha documentado la inhibición de la actividad AHAS de bacterias por imidazolinonas, de hecho, el modo de acción de esta clase de herbicidas se dilucidó precisamente en estudios con *Salmonella typhimurium* en un

trabajo de Larossa y Schloss (1984) donde se identificó la enzima AHAS como diana de estos compuestos. La inhibición del crecimiento provocada por imazamox puede por tanto estar relacionada con una interferencia en la síntesis de aminoácidos ramificados, cuando los niveles de éstos no pueden sostener más crecimiento (Shaner *et al.*, 1984) o cuando el nivel de un intermediario de la ruta de síntesis, como el cetobutirato, alcanza valores críticos, lo que puede resultar tóxico para la bacteria (Larossa *et al.*, 1987).

b) Según Malkomes (2000) los excipientes presentes en las formulaciones comerciales de los agroquímicos, tales como coadyuvantes o aditivos pueden afectar a los microorganismos y en ciertos casos hasta modificar el efecto de los propios agroquímicos, de hecho en muchos casos el daño inducido por las formulaciones comerciales es superior al ejercido por sus principios activos, lo que sugiere la presencia de componentes nocivos en los excipientes con un efecto citotóxico aditivo (Stark y Walthall, 2003), así por ejemplo, se ha observado que la formulación comercial del glifosato aumenta su efecto tóxico en bacterias comparado con el ácido puro equivalente (Santos *et al.*, 2006). La formulación comercial del imazamox, Pulsar® 40, contiene Tween20, un surfactante no iónico. Se ha descrito que los surfactantes, al modificar la dispersión y biodisponibilidad de las sustancias químicas presentes en los compuestos comerciales, pueden modificar en forma significativa la toxicidad de estos productos (Mann y Bidwell, 2001). Sin detrimento de esta posibilidad, los análisis de actividad *in vivo* demuestran que el herbicida produce cambios en la actividad AHAS de las bacterias (Fig. 1.3 y 1.7).

En los casos en que las cepas se mostraron tolerantes al herbicida pudo suceder que: **a)** el herbicida no alcanzara las células, porque éstas presentan mayor impermeabilidad a estos compuestos (Burnet y Hodgson, 1991) o bien porque activasen una bomba para expulsar el herbicida de la célula (Bugg *et al.*, 2000) **b)** las bacterias fueran capaces de degradar el herbicida, sin embargo esta capacidad está restringida a sólo unos pocos organismos y no se ha documentado en la literatura ninguna especie de *Rhizobium* que degrade imidazolinonas, aunque sí se ha documentado la degradación de imazetapir por *Pseudomonas* sp. (Huang *et al.*, 2009) **c)** el tipo de enzima AHAS de la cepa tolerante no se viera afectada por el herbicida, cuestión que se desarrolla con cierta extensión un poco más adelante **d)** las cepas presentaran diferencias cuantitativas notables en la actividad AHAS específica, posibilidad que también se analiza a continuación **e)** las bacterias más tolerantes tuvieran mejores mecanismos de compensación para reparar el desequilibrio producido por la carencia de aminoácidos libres.

Con respecto a la idea de que las cepas tolerantes posean menor sensibilidad de la enzima diana, cabría la posibilidad en primer lugar de que presenten isoenzimas distintas o incluso posean varias de ellas. Se han identificado

tres isoenzimas de AHAS en bacterias: AHASI, AHASII, y AHASIII, que se diferencian en sus propiedades cinéticas, especificidad de sustrato y sensibilidad a la inhibición por el producto final (McCourt y Duggleby, 2006). Para los organismos con más de una isoenzima, el efecto del herbicida en el crecimiento dependerá de la contribución relativa que cada isoenzima hace a la cantidad total de aminoácidos ramificados disponibles para la célula, sin embargo los resultados de un estudio realizado con un amplio rango de microorganismos aislados del suelo, demostró que aunque algunas bacterias poseen varias isoenzimas de AHAS (Epelbaum *et al.*, 1998), la mayoría de bacterias del suelo sólo poseen un tipo de AHAS que además es susceptible a la inhibición por herbicidas (Nelson y Duxbury, 2008).

Otra posibilidad sería que aun teniendo el mismo tipo de isoenzima, la de unas cepas sea menos sensible al imazamox que la de otras. Forlani *et al.* (1995) argumentaron que la distinta tolerancia de la actividad AHAS de algunas rizobacterias frente a sulfonilureas e imidazolinonas está relacionada con una sensibilidad diferente de la AHAS, sin embargo un trabajo de Royuela *et al.* (1998) concluye que la alta tolerancia a imazetapir encontrada en *Rhizobium* se debe a una elevada actividad específica y sólo marginalmente a una reducida sensibilidad de la enzima.

En las cepas estudiadas en este trabajo no se encontraron diferencias de sensibilidad frente al herbicida, como muestran los datos de los ensayos de la actividad AHAS *in vitro*, realizados en extractos enzimáticos bacterianos incubados con imazamox, en los que se observa que el herbicida sólo inhibió el 15% la actividad de CIAT899, el 25% la de CFN42 (Fig. 1.4), y alrededor del 20% en las dos cepas de *R.l. viciae* (Fig. 1.8). También se evidencia analizando los valores de los controles que las cepas no presentaron diferencias cuantitativas notables en la actividad AHAS específica.

En cualquier caso, la interacción enzima-imidazolinona *in vivo* es diferente de la interacción *in vitro* (Stidham y Shaner, 1990) pues, como se ha indicado, la bacteria cuando está viva puede utilizar diversos mecanismos para paliar los efectos producidos por el xenobiótico. Los estudios de inhibición *in vitro* de la AHAS de bacterias han descrito esta inhibición como dependiente del tiempo y bifásica, con una fase de inhibición rápida y una fase de meseta debida a una isomerización del complejo enzima-inhibidor a una forma con un enlace más fuerte que conduce a la inactivación irreversible de la enzima (Hawkes *et al.*, 1989) sin embargo, en los resultados aquí presentados no se observan estas dos fases (Fig. 1.4 y 1.8).

Royuela *et al.* (1998) pusieron de manifiesto que en el caso de *R.l. viciae* la tasa de conversión de la forma inicial del complejo herbicida-enzima a la final

depende de la concentración de herbicida, ocurriendo los cambios más rápidamente con mayores concentraciones de inhibidor. En su estudio, la actividad AHAS mostró una inhibición del 30% al cabo de una hora con 0.1 mM de imazetapir y se necesitó 0.6 mM para obtener una inhibición del 50%, mientras que para las cepas de *R.l. viciae* aquí estudiadas la dosis mayor empleada (0.5 mM) sólo inhibió la actividad entre el 10 y el 15% al cabo de una hora (Fig. 1.8) y no se superó el 30% de inhibición con respecto al control en todo el tiempo de experimentación (24 h) para ninguna de las cepas estudiadas (Fig. 1.4 y 1.8), lo que indica que el imazamox es menos tóxico que el imazetapir, o que las cepas empleadas aquí son más tolerantes, o una combinación de ambos factores.

Es interesante destacar que aunque la concentración más elevada de imazamox produjo cierta inhibición del crecimiento y de la actividad AHAS de las cepas, las concentraciones aplicadas en estos experimentos, teniendo en cuenta la superficie de cada microcosmos, equivalen aproximadamente a 120, 1200 y 12000 g·ha⁻¹, mientras que las dosis de imazamox recomendadas para aplicar en campo según el fabricante del producto (BASF company) son de 60 g·ha⁻¹, es decir, se utilizaron concentraciones 2, 20 y 200 veces mayores a la que probablemente se podrían encontrar en un suelo agrícola. Atendiendo a este análisis, las 4 cepas de *Rhizobium* podrían desarrollarse en suelos contaminados por imazamox.

Finalmente, el estudio de la tolerancia de las cepas mediante siembra en placa con diferentes concentraciones de imazamox, paraquat y ácido 2 -metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) (Tablas 1.4, 1.5, 1.6), señaló que la cepa de *R. tropici* CIAT899 es la más tolerante de las estudiadas pues es capaz de crecer en presencia de concentraciones más altas de los herbicidas ensayados, mientras que de las cepas de *R.l. viciae*, la VF39 tolera mayores concentraciones de imazamox y MCPA.

El hecho de que una cepa sea tolerante a un herbicida en un medio de cultivo no garantiza necesariamente la supervivencia de ésta en un suelo en condiciones comparables y aún más incierta es la correlación entre la capacidad del rizobio de persistir en estos suelos y la de expresar su fenotipo simbiótico en tales condiciones, aunque puede servir como aproximación, pues se podría asumir que cuanto más metabólicamente activo es un rizobio en estas condiciones, mayor será su habilidad para adaptarse a la condición ambiental desfavorable (Del Papa *et al.*, 2003). Por otro lado, como se ha visto, es muy improbable que un suelo agrícola se alcance las concentraciones de herbicidas empleadas en este ensayo.

Los resultados de este ensayo en placa coinciden a grandes rasgos con los de Del Papa *et al.* (2003) que en un trabajo realizado con cepas de *R. tropici* en medio suplementado con imazamox y paraquat encontraron que el imazamox no

causó reducciones significativas, en cambio el paraquat provocó inhibición del crecimiento. La mayor toxicidad del paraquat presentada en las cepas de *Rhizobium* puede estar relacionada con su mecanismo de acción, el cual consiste en la captura de electrones provenientes de la respiración formando radicales libres inestables que rápidamente se oxidan, produciéndose durante este proceso radicales superóxido y peróxido de hidrógeno que reaccionan produciendo radical hidroxilo y oxígeno singlete (Weller y Warren, 1995), sustancias que juntas provocan degradación en las membranas (peroxidación de lípidos) ocasionando la muerte de la célula.

En cuanto a la obtención de la cepa *R. tropici* CIAT899 BphK^{LB400}, todos los parámetros analizados (Fig. 1.9 y Tablas 1.1 y 1.2) parecen indicar que la transformación se llevó a cabo con éxito, además los resultados de la digestión de las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *Sau3AI* (Fig. 1.11 y 1.12) mostraron perfiles coincidentes para la cepa silvestre y la transformada, lo que permite suponer que son la misma especie, pues en bibliografía se recoge que dos cepas que presentan perfiles iguales de restricción para al menos dos enzimas poseen una similitud de más del 95% en sus secuencias del 16S (Moyer *et al.*, 1996).

Sin embargo, en el estudio de tolerancia a xenobióticos desarrollado en placa no se detectaron diferencias entre la cepa silvestre y la mutante, ni siquiera para el ácido 2 -metil-4-clorofenoxiacético, que es un herbicida clorado. Los estudios llevados a cabo por Brennan *et al.* (2009) con extractos de bacterias que expresan la proteína BphKLB400 indicaron una elevada actividad glutatión-s-transferasa frente a compuestos orgánicos clorados, por lo que se esperaba alta tolerancia frente a este tipo de herbicidas en aquellas bacterias que hubieran incorporado el gen *bphK*.

Para los experimentos posteriores se decidió utilizar la cepa silvestre, dado que está habitualmente disponible como inóculo comercial (Hungria *et al.*, 2003) y esto facilitaría su posible empleo en experimentos de campo en simbiosis con la planta hospedadora. No obstante, sería de gran interés continuar con el estudio de las posibilidades de esta bacteria mutante en futuras investigaciones.

2. Estudio de la respuesta a imazamox para la selección de variedades tolerantes de *P. vulgaris* y *V. sativa*

En bibliografía se ha descrito que la aplicación de herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) reduce el crecimiento de distintas plantas (Shaner, 1991), así en experimentos de campo Ulbrich *et al.* (2005) observaron que la exposición de plantas de judía a imazetapir, herbicida perteneciente al mismo grupo que el imazamox, disminuía el crecimiento. También se ha descrito que el imazetapir reduce el crecimiento de otras leguminosas como la soja (Bohm *et al.*, 2009) y el guisante (Gaston *et al.*, 2002). Por el contrario, la combinación de los herbicidas imazamox y bentazón, en experimentos de campo con judía, no tuvo efectos en el peso seco de la parte aérea (Hekmat *et al.*, 2008). En nuestro experimento realizado con plantas de judía se observó que la aplicación del herbicida imazamox a la solución nutritiva del cultivo redujo los parámetros de crecimiento en las tres variedades estudiadas (Bush Plaja, Coco Blanc y Borloto), siendo más drástica con la dosis más elevada (100 μ M, Tabla 2.1). Hay que destacar que aunque el herbicida disminuyó los parámetros de crecimiento en las tres variedades estudiadas de leguminosa grano, la Coco Blanc fue la menos afectada. En otras investigaciones también se ha indicado que la respuesta de las plantas de judía a herbicidas cambia de una variedad a otra (Renner and Powell, 1992; Sikkema *et al.*, 2004; Soltani *et al.*, 2006).

Por otro lado el comportamiento de las dos variedades de veza frente al herbicida imazamox fue distinto, de hecho los parámetros de crecimiento no cambiaron de forma significativa en Corina, mientras que en Látigo estos parámetros se redujeron notablemente (Tabla 2.3). En estudios realizados en otra leguminosa forrajera como *Medicago*, el tratamiento de imazamox disminuyó el crecimiento (Grichar and Ocumpaugh, 2009), sin embargo, hay pocos trabajos sobre el efecto de los inhibidores de la actividad AHAS en veza. Alonso-Prados *et al.* (2002), estudiaron los efectos de restos de una sulfonilurea en *Vicia sativa*, y se comprobó que este herbicida no produjo efectos nocivos en esta especie.

La relación raíz/parte aérea (RPA), considerada como un índice de crecimiento entre los dos órganos, y por tanto de equilibrio entre raíz y parte aérea, reflejó cambios inducidos por el herbicida en las dos especies estudiadas, evidenciándose una mayor sensibilidad de la raíz al imazamox en judía, al menos en la variedad Borloto, mientras que en veza la parte aérea mostró más sensibilidad, ya que la RPA aumentó en las dos variedades. En un experimento realizado con dos variedades de *Helianthus annuus*, una tolerante y otra sensible a imazetapir, se observó que la variedad sensible reducía drásticamente el crecimiento de las raíces, mientras que la tolerante desarrollaba el sistema radical (Vega *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha descrito que algunos herbicidas estimulan

el crecimiento de la raíz, así Cedergreen (2008) demostró que los herbicidas glifosato, MCPA y terbutilazina aumentan la relación raíz/parte aérea en cebada.

El contenido de pigmentos fotosintéticos es un parámetro efectivo para evaluar el estado fisiológico general de la planta cuando ésta ha sido expuesta a un estrés (Rabe and Kreeb, 1980; Kumar and Rao, 2008). En general, el tratamiento de imazamox no redujo el contenido de pigmentos en las variedades de leguminosa grano Coco Blanc y Borloto, sino que incluso, con algunas dosis, lo incrementó (Tabla 2.2). Estos resultados son similares a los descritos en plantas de *Eclipta prostrata* y *Echinochloa cruz-galli*, que no experimentaron cambios significativos en el contenido de clorofilas cuando fueron tratadas con un inhibidor de la actividad AHAS (Shim *et al.*, 2003). También se ha demostrado que el imazamox no influye en la eficiencia fotosintética en *Spartina densiflora* (Mateos-Naranjo *et al.*, 2009). Por el contrario, en la variedad de judía Bush Plaja (Tabla 2.2) y en las dos variedades de veza (Tabla 2.4) los contenidos de pigmentos se redujeron con el imazamox, coincidiendo con los resultados de Riethmuller-Haage *et al.* (2006), quienes encontraron una reducción significativa en el contenido de clorofilas totales de plantas de *Solanum nigrum* tratadas con metsulfuron, otro herbicida inhibidor de la AHAS.

Es interesante resaltar que en la leguminosa forrajera, el contenido de clorofila b incrementó con el imazamox (Tabla 2.4). El estudio de Riethmuller-Haage *et al.* (2006) mencionado anteriormente, describe un aumento de la relación clorofila b/clorofila a, que podría deberse al intento de mantener el balance de complejos pigmento-proteína y la función entre los fotosistemas, por lo que la pérdida de clorofila en las hojas no es un proceso descontrolado y catastrófico, sino más bien la consecuencia de una descomposición bien organizada de sus componentes. La pérdida de pigmentos puede ser una consecuencia producida por la limitación de la fotosíntesis, que se cree que está mediada por un cierre estomático (Bhatti *et al.*, 1998; Zabalza *et al.*, 2004). La inhibición de la fotosíntesis producida por esta clase de herbicidas, como se ha dicho, no es una respuesta directa sino secundaria de la inhibición de la AHAS, se han observado alteraciones de los parámetros fotosintéticos en varios estudios: cambios en la fluorescencia de cebada tratada con imazaquín (Judy *et al.*, 1991) y de trigo tras la aplicación de imazamethaben (Percival and Baker, 1991), y la disminución de la tasa de fotosíntesis neta en plantas de guisante tratadas con imazetapir (Zabalza *et al.*, 2004). También se ha demostrado que muchos inhibidores de procesos metabólicos que no están directamente involucrados en el metabolismo fotosintético pueden producir modificaciones en la cinética de la fluorescencia (Barbagallo *et al.*, 2003).

La enzima acetohidroxiácido sintasa, encargada de la síntesis de aminoácidos ramificados, se considera la enzima diana de distintos herbicidas y su

inhibición por imidazolinonas es compleja (Duggleby *et al.*, 2008). En nuestro experimento la actividad AHAS foliar respondió al tratamiento de imazamox de forma opuesta en las dos leguminosas estudiadas, en las tres variedades de judía la AHAS se incrementó (Fig. 2.1), mientras que en las de veza se inhibió por el tratamiento herbicida (Fig. 2.6).

La principal acción del imazamox consiste en la inhibición de la actividad AHAS (Brady *et al.*, 1998), por lo que los resultados en la leguminosa forrajera fueron los esperables, coincidiendo con varios trabajos en los que se ha documentado la inhibición de la AHAS en leguminosas tratadas con imidazolinonas (Scarponi *et al.*, 1997; Royuela *et al.*, 2000; Bukun *et al.*, 2012). Sin embargo, aunque también se ha documentado la tolerancia de varias especies de leguminosas a inhibidores de la AHAS (Bauer *et al.*, 1995; Baerg and Barrett, 1996; Tan *et al.*, 2005), el aumento de actividad AHAS en las variedades de judía resultó inesperado y contrario a lo descrito en bibliografía. Hay que señalar que la actividad AHAS en judía se determinó en hojas del último trifolio totalmente expandido (considerado como el más cercano al ápice), por lo que es plausible que el herbicida se transportara prioritariamente a otras partes del vegetal, donde sí se podría estar produciendo una inhibición de la enzima. Shim *et al.* (2003) demostraron que las hojas jóvenes son el principal lugar de síntesis de aminoácidos ramificados, y Zhang *et al.* (2009) confirmaron que existe una amplia variación en esta actividad entre los distintos órganos de la planta, cotiledones, hojas nuevas y viejas, y raíz en experimentos realizados en *Hordeum vulgare*, *Brassica napus* y *Malachium aquaticum* con un herbicida inhibidor de la actividad AHAS. Es interesante señalar que con algunos herbicidas, a dosis bajas, en la planta se produce un reparto de biomasa hacia las zonas de la planta afectadas por el tratamiento (Cedergreen, 2008).

En varios trabajos se ha demostrado que la aplicación de herbicidas de la familia de las imidazolinonas provoca una reducción del contenido de proteína soluble total y un aumento de los aminoácidos libres (Devine, 1989; Shaner and Singh, 1997). Este efecto se ha detectado en experimentos realizados concretamente con imazamox en plántulas de *Zea mays* (Scarponi *et al.*, 2001), y con otras imidazolinonas, como imazetapir, en leguminosas como *Glycine max* (Scarponi *et al.*, 1995), *Vicia faba* (Scarponi *et al.*, 1997) y *Pisum sativum* (Gaston *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2006). Nuestros resultados en las tres variedades de judía coinciden con lo expuesto anteriormente (Fig 2.2), mientras que en veza ambos parámetros descendieron con el imazamox en las dos variedades (Fig. 2.7). En relación a esto, hay que destacar que en la leguminosa grano Coco Blanc se encontró una correlación negativa entre los contenidos de proteínas solubles totales (PST) y de aminoácidos libres (Tabla 2.6), y en Borloto entre la actividad AHAS y la concentración de PST (Tabla 2.7). Se ha propuesto que las plantas responden

rápidamente a los inhibidores de la actividad AHAS, manteniendo el nivel de aminoácidos ramificados mediante el aumento de la tasa de renovación de proteínas, y de esta forma obteniendo por degradación de proteínas pre-existentes los aminoácidos que se requieren para la síntesis de nuevas proteínas, necesarias para mantener el metabolismo (Rhodes *et al.*, 1987). Por esta respuesta de la planta, la inhibición de la actividad AHAS no afectaría a la síntesis de proteínas (Wittenbach and Abell, 1999; Royuela *et al.*, 2000), y explicaría el incremento del contenido de aminoácidos libres. En el caso de la veza, donde se observó un incremento de los aminoácidos libres, es posible que este mecanismo no se pusiera en marcha, o bien que los aminoácidos liberados por proteólisis fueran transportados a otras zonas más necesitadas de la planta, como los meristemas apicales.

Determinados tipos de estrés como sequía, salinidad o temperaturas extremas pueden provocar cambios en el metabolismo carbonado de las plantas, produciendo la acumulación de altas concentraciones de azúcares que actúan como solutos compatibles (Korn *et al.*, 2008). La acumulación de estas moléculas no solamente se relaciona con el mantenimiento del ajuste osmótico y del turgor celular (Yamchi *et al.*, 2007), sino que también se ha documentado su papel protector frente al estrés como estabilizadores de estructuras celulares (Rhodes *et al.*, 2002) o como moléculas transductoras en cascadas de señalización que activan mecanismos de defensa específicos (Ramel *et al.*, 2012). También se ha descrito la acumulación de azúcares solubles totales (AST) en hojas de plantas tratadas con herbicidas inhibidores de la actividad AHAS (Shaner and Reider, 1986; Bestman *et al.*, 1990; Chao *et al.*, 1994; Wittenbach and Abell, 1999). Ese comportamiento coincide con los resultados expuestos en esta memoria en las variedades de veza (Fig. 2.8), y dos de judía, Bush Plaja y Borloto (Fig. 2.3), así como el de hojas de plantas de guisante tratadas con imazetapir (Zabalza *et al.*, 2004; Orcaray *et al.*, 2010).

Algunos autores consideran que el incremento de AST en hojas de plantas tratadas con inhibidores de la actividad AHAS se debe a un descenso en el transporte de fotoasimilados hacia las zonas en crecimiento de la planta (Devine, 1989; Bestman *et al.*, 1990; Shaner, 1991). Estas alteraciones serían parte del mecanismo de letalidad del herbicida, ya que a la larga se produce una carencia de carbono en los tejidos meristemáticos (Bestman *et al.*, 1990; Shaner, 1991; Kim and VandenBorn, 1997). Por otro lado, se ha planteado otra posible explicación basada en el hecho de que en plantas tratadas con imazetapir se incrementa el contenido de AST tanto en hoja como en raíz (Gaston *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2004). Esta respuesta podría ser debida a la disminución de la fuerza del sumidero, ya que el incremento de sacarosa y almidón en las raíces indica que los carbohidratos se transportan desde la parte aérea hasta las raíces, de forma más

rápida de lo que estas son capaces de usar, y por lo tanto el transporte a larga distancia se suprime, inhibiéndose la carga al floema.

Junto a esta alteración del balance de los azúcares, también se ha descrito una inducción del metabolismo fermentativo en raíz, desencadenado por la inhibición de la actividad AHAS en condiciones normales de oxígeno (Gaston *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2005). Según estos autores la inhibición de la actividad AHAS conduce a la acumulación de altos niveles de sus sustratos (piruvato y α -cetobutirato), desencadenando un notable incremento de las actividades fermentativas que utilizan el piruvato, lo que se relacionaría con el decremento del uso de carbohidratos en raíz (Zabalza *et al.*, 2011).

Esta bien documentado que la mayoría de herbicidas provocan estrés oxidativo en las plantas, ocasionando daños por el incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROs), incluido el peróxido de hidrogeno. Los herbicidas auxínicos (McCarthy-Suarez *et al.*, 2011), los bipyridilos (Donahue *et al.*, 1997) o algunos inhibidores de la síntesis de los aminoácidos aromáticos como el glifosato (Ahsan *et al.*, 2008) entre otros, han sido señalados como productores de EROs. En nuestro experimento se observó un incremento en el contenido de peróxido de hidrógeno en las variedades de judía Coco Blanc y Borloto (Fig. 2.4) y en ambas variedades de veza (Fig. 2.9). Como se ha comentado anteriormente los herbicidas pueden incrementar las EROs y provocar un daño oxidativo, aunque no parezca ser el caso de los inhibidores de la actividad AHAS (Zabalza *et al.*, 2007). Por otra parte, el peróxido de hidrógeno interviene como molécula señal en diversos procesos fisiológicos del vegetal tales como senescencia, fotorrespiración, ciclo celular o movimiento estomático (Quan *et al.*, 2008) y mecanismos de defensa frente a estrés biótico y abiótico (Hung *et al.*, 2005), recientemente también se ha relacionado esta molécula con la disminución de la toxicidad del herbicida glifosato en plantas (Tyagi *et al.*, 2012).

El daño oxidativo a lípidos, determinado como peroxidación lipídica, afecta gravemente a la funcionalidad y la integridad de las membranas celulares, cambiando su fluidez y estabilidad (Dayan and Watson, 2011). Este parámetro, utilizado como un indicador de daño, incrementó en las variedades de judía Bush Plaja y en Borloto, y en las dos de veza, pero en la de judía Coco Blanc no se observó daño oxidativo con ninguna dosis de imazamox (Fig. 2.4). Esta respuesta, junto con la menor inhibición del crecimiento puede indicar que la variedad Coco Blanc es la más tolerante de las 3 variedades de judía estudiadas.

Como consecuencia del daño oxidativo a lípidos y el aumento del contenido de EROs, se activan los sistemas antioxidantes en la planta, de hecho en judía, en general las cuatro actividades antioxidantes estudiadas (SOD, CAT, APX y GPX) aumentan con el tratamiento de imazamox (Fig. 2.5), en cambio en veza la

tendencia varía según la enzima y la variedad estudiada (Fig. 2.10). En un estudio con plantas de guisante tratadas con imazetapir, Zabalza *et al.* (2007) describen que las actividades SOD, CAT y APX en hoja no cambian significativamente con la aplicación del herbicida y asumen que los ligeros cambios detectados en el estado antioxidante de las plantas son poco intensos, por lo que no pueden estar relacionados con la letalidad causada por el herbicida. A pesar de esto también describen un ligero aumento de la peroxidación lipídica y un incremento de la actividad GPX a partir de los 7 días de tratamiento en consonancia con nuestros resultados, donde la actividad GPX incrementó drásticamente en la variedad Bush Plaja (judía) y la Látigo (veza). En bibliografía se ha propuesto que la actividad GPX desempeña un papel importante en la respuesta rápida al estrés oxidativo (Savouré *et al.*, 1999), por lo que se podría usar como un indicador de estrés en la planta.

3. Estudio ontogénico de diferentes órganos de plantas de *P. vulgaris* y *V. sativa* tratadas con imazamox

Realizar un estudio en varios órganos de la planta durante la ontogenia del cultivo permite detectar respuestas de adaptación al herbicida en distintas etapas del crecimiento (vegetativo, floración, y fructificación), en los que varían los requerimientos energéticos, nutricionales y metabólicos, y establecer diferencias entre las diversas partes de la planta. En general, la susceptibilidad de las plantas es altamente dependiente de la etapa del crecimiento, siendo las plantas más jóvenes más sensibles a los herbicidas (Leah *et al.*, 1995, Shim *et al.*, 2003). En judía y veza se observó que el imazamox produjo una disminución del crecimiento a partir de los 7 días de tratamiento (Fig. 3.1 y 3.11), resultados que coinciden con los descritos en el capítulo 2 y con los de otras leguminosas tratadas con herbicidas análogos (Bohm *et al.*, 2009, Gaston *et al.*, 2002).

La actividad acetohidroxiácido sintasa (AHAS) en plantas control mostró mayor actividad en los órganos jóvenes de ambas leguminosas (Fig 3.2 y 3.12), resultados que concuerdan con los de Shim *et al.* (2003) quienes señalaron los tejidos jóvenes como el principal sitio de síntesis de aminoácidos ramificados, por lo que presentaban mayor actividad AHAS. En guisante se ha señalado que existe una respuesta diferente entre las hojas jóvenes y adultas de plantas expuestas al herbicida 2,4-D (Pazmiño *et al.*, 2011). En nuestros resultados se muestra que la actividad AHAS de judía y veza tiene distinta sensibilidad al imazamox según las partes estudiadas, inhibiéndose en los órganos jóvenes y activándose en los maduros. Zhang *et al.* (2009) también indicaron variaciones significativas de la actividad de esta enzima entre órganos diferentes de *Hordeum vulgare*, *Brassica napus* y *Malachium aquaticum*, y Shim *et al.* (2003) establecen que los órganos jóvenes son los más sensibles a la inhibición por imidazolinonas. La disminución de la actividad AHAS con el imazamox en los tejidos jóvenes podría indicar que el herbicida se transporta hasta las áreas en crecimiento donde la enzima es más sensible, mientras que en zonas más maduras, aunque inicialmente hay una leve inhibición, después la actividad se estimula. Por otra parte, si se comparan los valores de actividad enzimática al inicio y al final del tiempo de experimentación, en las plantas control se observa una disminución ligada a la maduración de la planta, respuesta que no se detecta en las hojas maduras de plantas tratadas con el imazamox, debido al efecto estimulante de este sobre la enzima.

Se ha descrito una ligera inhibición de la actividad AHAS en plantas de *Brassica napus* tratadas con un herbicida inhibidor de esta enzima, sin embargo después de cuatro semanas se produce una recuperación del estrés (Jin *et al.*, 2010). De igual forma, en las hojas jóvenes de judía se produjo una recuperación parcial de la actividad AHAS después de 14 días de tratamiento. Además de la probable puesta en marcha de mecanismos adaptativos en la planta, también hay que señalar

que al inicio del tratamiento las plantas se encontraban en el periodo de crecimiento vegetativo, mientras que a los 14 días estaban al inicio de fructificación, hecho que también puede tener trascendencia en los cambios de la actividad AHAS.

La aplicación de herbicidas de la familia de las imidazolinonas provoca un aumento del contenido de aminoácidos libres, respuesta descrita en el capítulo 2 y en bibliografía (Devine, 1989, Shaner y Singh, 1997, Scarponi *et al.*, 1997, Zabalza *et al.*, 2006). En el estudio de ontogenia, el imazamox indujo en los tejidos jóvenes de ambas leguminosas un incremento de los aminoácidos libres y una reducción de los ramificados (Fig. 3.4 y 3.14), este aumento se atribuye al aumento de la tasa de renovación de proteínas (Rhodes *et al.*, 1987). La proteólisis puede explicar que en meristemo apical de judía la reducción del porcentaje de aminoácidos ramificados libres no fuera tan notable como se debía esperar por la drástica inhibición de la actividad AHAS en ese órgano. También, probablemente se produjo un transporte de aminoácidos ramificados desde zonas maduras de la planta hacia las jóvenes. Esta última respuesta podría explicar la disminución de aminoácidos ramificados detectada en la última hoja expandida de la leguminosa grano, a pesar de que la actividad AHAS en este órgano era mayor que la de los controles.

Por el contrario, en hoja vieja de veza el porcentaje de aminoácidos ramificados disminuyó ligeramente al inicio, pero luego incrementó con respecto al control. Esta tendencia se correlaciona con el incremento de la actividad AHAS y la reducción de los aminoácidos libres totales. Aunque este comportamiento es opuesto al descrito en judía, en un estudio realizado por Orcaray *et al.* (2010) en hojas de guisante tratadas con imazetapir, observaron una disminución inicial del contenido de aminoácidos ramificados y un aumento posterior después de tres días de tratamiento con el herbicida. Este comportamiento diferente de las dos especies de leguminosas, indica que presentan distintas respuestas adaptativas al tratamiento con imazamox.

La síntesis de los tres aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) está estrechamente coordinada, ya que comparten cuatro enzimas en su ruta de biosíntesis, por lo que se esperaría que la inhibición de la actividad AHAS afectara por igual al contenido de los tres aminoácidos. En esta línea se ha descrito que en plantas de maíz tratadas con imazamox el contenido de valina, leucina e isoleucina se reduce (Scarponi *et al.*, 2001), resultados que coinciden con un estudio más reciente realizado en plantas de *Arabidopsis* tratadas con otro inhibidor de la actividad AHAS (Trenkamp *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestro trabajo no encontramos una tendencia clara en el contenido de valina y leucina en plantas de veza, sino que cambia según la dosis de imazamox aplicada, el tiempo de tratamiento y el órgano estudiado, mientras que la concentración de isoleucina incrementa en hoja joven y vieja con el imazamox (Fig. 3.15). En cambio, en judía

el contenido de valina y leucina sí se reduce con el imazamox en los tejidos jóvenes y maduros (meristemo y última hoja expandida), y por el contrario la isoleucina incrementa en general en ambos órganos con el herbicida (Fig. 3.5).

La disminución del contenido de valina e leucina en la última hoja expandida de judía, a pesar de la inhibición de la actividad AHAS, apoya la hipótesis del transporte de aminoácidos hacia otras partes de la planta para suplir esta carencia, además en meristemo la valina y la leucina disminuyeron menos de lo esperado teniendo en cuenta la drástica disminución de la actividad AHAS. En relación al aumento de la isoleucina con el imazamox, respuesta que se observó en las dos especies de leguminosas, se han descrito resultados similares en plantas de guisante tratadas con imazetapir, registrándose una reducción de los contenidos de valina y leucina, pero un aumento de isoleucina (Zabalza *et al.*, 2011).

Una posible explicación es que la enzima AHAS que queda activa en la planta (sin bloquear por el herbicida), desplazara su actividad hacia la producción de isoleucina, ya que tiene una mayor preferencia por el α -cetobutirato. En estas condiciones de estrés el balance piruvato/ α -cetobutirato podría cambiar, al desviarse el piruvato disponible hacia otras rutas, como se ha visto que ocurre en raíces de guisante tratadas con herbicida (Zabalza *et al.*, 2005), o bien aumentar el contenido de α -cetobutirato producido a partir los aminoácidos treonina y metionina, obtenidos por proteólisis (Jander y Joshi, 2010). De hecho, se ha demostrado que las rutas de regulación del metabolismo de treonina, metionina e isoleucina están interconectadas de manera muy eficiente en las plantas, la treonina desaminasa y la metionina gamma-liasa mantienen el equilibrio de isoleucina en plantas en condiciones de estrés (Joshi *et al.*, 2010).

Otras posibles causas que también pueden contribuir a estos cambios en el contenido de aminoácidos ramificados son que: **a)** las vías que regulan el metabolismo de aminoácidos son complejas y están muy interconectadas en las plantas como han indicado varios autores (Guyer *et al.*, 1995, Zhao *et al.*, 1998), incluso se ha establecido una relación entre la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada y aminoácidos aromáticos (Orcaray *et al.*, 2010); **b)** la composición de aminoácidos libres en condiciones de estrés es muy variada, dependiendo del papel desempeñado por estos, ya que pueden actuar como osmolitos, regular el transporte de iones, o actuar como moléculas reguladoras y de señalización (Rai, 2002); **c)** en plantas superiores, una compleja red de vías interfiere con la homeostasis de la valina, leucina e isoleucina (Binder *et al.*, 2007); **d)** recientemente se ha informado de un papel importante de la isoleucina bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, pues se conjuga con jasmonato y actúa como un importante regulador de la expresión génica y de la producción de metabolitos secundarios (Svoboda y Boland, 2010). Algunas de estas alteraciones pueden estar ocurriendo, enmascarando los cambios inducidos por imazamox.

Estudios realizados por Teclé *et al.* (1993) demostraron que el imazaquin y el imazetapir, herbicidas análogos al imazamox, son fácilmente absorbidos por las raíces y transportados a regiones meristemáticas dentro de las 72 horas siguientes a la aplicación del tratamiento. Además, Scarponi *et al.* (2001) detectaron una alta acumulación del imazamox en maíz durante las primeras horas tras su aplicación, alcanzándose los niveles máximos a las 24 horas. Ambas respuestas se observan en la leguminosa grano, donde a las 24 horas de tratamiento con herbicida, en las hojas jóvenes y maduras estudiadas se registra el valor más elevado para el contenido de imazamox, reduciéndose en los siguientes muestreos, a pesar que el herbicida se seguía aplicando en la solución de riego (Fig. 3.6). En consonancia con estos datos, los trabajos antes mencionados también describen una reducción de los niveles de herbicida a partir de las 72 horas de la aplicación del tratamiento (Teclé *et al.*, 1993, Scarponi *et al.*, 2001).

El comportamiento descrito en judía indica que se pusieron en marcha mecanismos para minimizar la acumulación del herbicida. En relación a esta respuesta Scarponi *et al.* (2001) señalaron que la acumulación inicial del compuesto indica que al principio la absorción del herbicida es más rápida que su degradación, pero a partir de las 72 horas la tasa de degradación prevalece, siendo bastante rápida y lo suficientemente eficaz como para mantener los residuos en un nivel subletal. Además, también se debieron de poner en marcha otros mecanismos de defensa tales como inmovilización del herbicida y sus metabolitos para que éstos no alcanzasen la parte aérea (Teclé *et al.*, 1993), la excreción del herbicida por las raíces (Schröder *et al.*, 2007), o la evitación del compuesto para que no penetrase en la planta. Esta última opción de evitación puede estar relacionada con el hecho observado de que las plantas que estaban siendo tratadas con imazamox absorbían menos cantidad de solución nutritiva que las plantas control.

Por el contrario, el contenido de imazamox en hoja joven y vieja de veza incrementó de forma proporcional al tiempo de exposición al herbicida, registrándose los valores más elevados en la última cosecha (Fig. 3.16), por lo que esta especie debe poseer otros mecanismos de adaptación al imazamox, ya que la actividad AHAS en hoja vieja no se inhibe a pesar de la presencia del herbicida en el tejido.

La glutatión S-transferasa (GST) es una enzima que cataliza la conjugación del tripéptido glutatión (GSH) a una variedad de sustratos (Mannervik y Danielson, 1988), induciéndose para proteger a la planta contra daños por ozono, metales pesados y xenobióticos (Mohsenzadeh *et al.*, 2011). La detoxificación de muchos herbicidas se realiza mediante la conjugación con el glutatión (Frear y Swanson, 1970, Marrs, 1996, Cummins *et al.*, 2011), entre ellas la del glifosato (Miteva *et al.*, 2010) y la de algunos inhibidores de la AHAS (Zhao *et al.*, 2012). Generalmente la conjugación con glutatión da lugar a un cambio en las propiedades

fisicoquímicas del compuesto que impide su difusión, por lo que la vida media del xenobiótico activo en la célula se reduce, así como el tiempo que el organismo se expone al mismo, y se evita una acumulación en los tejidos críticos (Schröder y Collins, 2002).

La actividad glutatión S-transferasa (GST) incrementó con el tratamiento de imazamox en cotiledones, última hoja expandida, hoja joven y raíz (Fig. 3.7 y 3.8), destacando principalmente la alta actividad observada en raíz. En relación a esto se ha informado que los tejidos de la raíz que están en contacto directo con los factores de estrés, muestran una fuerte inducción de proteínas de estrés y enzimas de detoxificación como la GST (Young *et al.*, 2001). Holmes *et al.* (2006) han observado la inducción de esta enzima en raíces de *Medicago truncatula* tratadas con un inhibidor de la actividad AHAS y Miteva *et al.* (2010) encontraron que la aplicación de glifosato a las hojas de guisante provoca un drástico aumento de la actividad GST foliar, mientras que su aplicación por raíz estimula la actividad de la enzima en las raíces. Todo ello podría indicar que esta enzima participa en la detoxificación del imazamox en judía, especialmente en la raíz.

En veza, al contrario de lo descrito en judía, en presencia del herbicida la actividad GST en hojas presentó valores notablemente mayores que en raíz (Fig. 3.17 y 3.18). Teniendo en cuenta esta respuesta y la descrita para la acumulación endógena del herbicida se puede pensar que el herbicida no es degradado en la raíz, donde la actividad GST es muy baja, por lo que se transporta hacia la parte aérea, incrementándose esta actividad y posiblemente la de otras enzimas detoxificantes.

Las peroxididasas participan en muchos procesos fisiológicos y en la respuesta a varios factores externos tales como interacciones con patógenos, heridas u otros estreses ambientales (Passardi *et al.*, 2004), promoviendo una defensa pasiva, mediante el estímulo del engrosamiento de las paredes celulares, o activa, controlando el daño oxidativo y/o participando en la degradación de compuestos tóxicos (Passardi *et al.*, 2005). En la leguminosa forrajera no se observa una tendencia clara de esta actividad, variando según la dosis de herbicida, el tiempo de exposición y el órgano estudiado (Fig. 3.19 y 3.20), por lo que no podemos relacionarla con los mecanismos de detoxificación del herbicida. Sin embargo, en judía la actividad peroxidasa incrementó con el imazamox en los diferentes órganos estudiados, observándose los valores más elevados en los tejidos jóvenes (Fig. 3.9 y 3.10), donde, el herbicida debía de estar siendo rápidamente degradado, ya que a partir de los dos días de tratamiento apenas se encontraron restos del mismo (Fig. 3.6). Aunque se ha descrito que las enzimas monooxigenasas P450 están implicadas en la tolerancia a imazamox (Kaspar *et al.*, 2011), lo cierto es que la gran mayoría de los contaminantes orgánicos en las plantas son oxidados por peroxididasas en la primera fase de la ruta de detoxificación (Kvesitadze *et al.*, 2009).

4. Respuestas inducidas por imazamox en las simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* CIAT899 y *Vicia sativa*-*Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* VF39

Los herbicidas inhibidores de la AHAS, como hemos visto en los capítulos anteriores y en la bibliografía mencionada, provocan la inhibición del crecimiento de las plantas, pero además se ha demostrado que también pueden reducir la nodulación y la fijación de nitrógeno en algunas especies de leguminosas (Koopman *et al.*, 1995). En muchos trabajos se considera que las imidazolinonas afectan fundamentalmente a la capacidad para formar simbiosis efectivas (Anderson *et al.*, 2004, Zabalza *et al.*, 2004, Drew *et al.*, 2007), pero en nuestro experimento el imazamox se aplicó en periodo vegetativo, cuando la simbiosis estaba establecida. No obstante, la magnitud de los efectos depende del tipo de herbicida, de la dosis y de la duración de la exposición, así como de la edad de la planta y en gran medida de la especie vegetal (Abd-Alla *et al.*, 2000). En base a esto, en los trabajos consultados encontramos que los herbicidas imazaquin e imazetapir no afectan al crecimiento y nodulación de soja (Gonzalez *et al.*, 1999), mientras que estos parámetros se reducen en plantas de guisantes tratadas con imazetapir (Royuela *et al.*, 2000, Gonzalez *et al.*, 1996, Drew *et al.*, 2007), en soja con clorimuron etil (Zawoznik y Tomaro, 2005) y en garbanzo con clorsulfurón (Anderson *et al.*, 2004). Las dos leguminosas estudiadas mostraron un comportamiento diferente en los parámetros de crecimiento al ser tratadas con imazamox, de hecho en judía el peso seco de nódulo (PSN) no cambió significativamente con el tratamiento, mientras que el resto de parámetros se redujo (Tabla 4.1), y en veza se redujo el PSN a la mitad y el peso seco de la parte aérea, mientras que el peso seco de raíz aumentó (Tabla 4.5). Es difícil diferenciar si la disminución del peso seco de nódulo es un efecto directo del herbicida, que contribuye a la reducción del crecimiento al disminuir la fijación de nitrógeno, o si, por el contrario, la disminución del crecimiento, provocada por el herbicida mediante otros procesos, es la causa de una menor demanda de nitrógeno por parte de la planta, lo que conduce a una disminución de la actividad nitrogenasa, número de nódulos etc., como indican algunos autores (Hartwig y Trommler, 2001, Zabalza *et al.*, 2006).

Se ha descrito que inhibidores de la AHAS como el imazetapir alteran profundamente el metabolismo del nitrógeno (Zabalza *et al.*, 2006, Bohm *et al.*, 2009, Zabalza *et al.*, 2011), disminuyendo tanto la absorción y reducción de nitrato (Scarponi *et al.*, 1997, Keutgen *et al.*, 2000, Zabalza *et al.*, 2006), como la asimilación de amonio (Scarponi *et al.*, 1995, Scarponi *et al.*, 1997, Holmes *et al.*, 2006). Además, en varios trabajos se ha observado una inhibición de la fijación simbiótica de nitrógeno por esta clase de herbicidas (Martensson y Nilsson, 1989, Sawicka *et al.*, 1996, Royuela *et al.*, 2000). En relación a esto, nosotros detectamos

una reducción del nitrógeno total por planta en ambas simbiosis estudiadas, donde la única fuente de nitrógeno es la que proviene de la fijación biológica de nitrógeno (Tabla 4.3 y 4.7). Es probable que existan varios mecanismos por los cuales los herbicidas inhibidores de la AHAS afectan a la fijación de nitrógeno, dados los múltiples efectos bioquímicos y morfológicos que estos provocan y las numerosas formas en que la fijación de nitrógeno puede regularse. Una de las explicaciones que se ha propuesto es que se produce conjuntamente una disminución en el crecimiento y en la demanda de nitrógeno, es decir, el cese del crecimiento de la planta causado por la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, en combinación con una perturbación simultánea de aminoácidos libres, puede provocar una menor demanda de nitrógeno, lo que reduce la absorción de nitrato y/o la fijación de nitrógeno, y de la translocación de nitrógeno a la parte aérea (Hartwig y Trommler, 2001, Zabalza *et al.*, 2006, Holmes *et al.*, 2006). Que la reducción del crecimiento y de la demanda de nitrógeno sean concomitantes puede explicar que en ocasiones no haya disminución del porcentaje de nitrógeno o incluso esta proporción aumente ligeramente, lo que podría enmascarar una inhibición del funcionamiento de los nódulos (Royuela *et al.*, 2000, Zawoznik y Tomaro, 2005). Con respecto a otras alteraciones en el metabolismo del nitrógeno hay añadir que se producen varias perturbaciones de los compuestos nitrogenados de la planta, notablemente cambios en el conjunto de aminoácidos libres y proteínas, como se ha visto también en capítulos anteriores.

En cuanto al metabolismo del carbono, el mecanismo de estos herbicidas no se relaciona directamente con una inhibición de la fotosíntesis, pero la altera levemente como efecto secundario, por lo que el flujo de carbono puede estar ligeramente disminuido, como se aprecia en los resultados de porcentaje de carbono en parte aérea (Tablas 4.3 y 4.7). En cambio, en raíz los fotoasimilados se suelen acumular como consecuencia de una disminución de la tasa de utilización de los mismos (Zabalza *et al.*, 2004), tal vez por ello no se apreciaron grandes cambios en el porcentaje de carbono en las raíces de judía y veza.

Royuela *et al.* (1998) han descrito una elevada actividad AHAS en los rizobios en vida libre y en bacteroides, relacionando esto con la tolerancia al imazetapir de los rizobios y de las plantas de guisante en simbiosis, de hecho encontraron que la actividad AHAS nodular triplicaba a las de raíz y hoja. Coincidiendo con estos resultados, detectamos que el nódulo es el órgano que mayor actividad AHAS presenta en ambas simbiosis, incluso en presencia del imazamox (Fig. 4.1 y 4.6). Estos resultados contrastan con los de Zawoznik y Tomaro (2005), donde en plantas de soja tratadas con clorimurón etil, otro inhibidor de la AHAS, la mayor actividad de esta enzima se halló en raíz y la más baja en nódulo. En el trabajo de Royuela *et al.* (1998) mencionado anteriormente, proponen que la alta actividad AHAS de los bacteroides debe de proporcionar a las

plantas noduladas una fuente adicional de aminoácidos ramificados, que la pueden proteger frente a herbicidas inhibidores de esta enzima, hipótesis también sostenida por Zawoznik y Tomaro (2005). No obstante, parece poco probable que la AHAS nodular pueda compensar la falta de aminoácidos ramificados del resto de tejidos de la planta después de la aplicación de imazamox, dada su elevada sensibilidad al herbicida, además recientemente se ha confirmado que los bacteroides se vuelven dependientes de la planta para obtener los aminoácidos ramificados (Prell *et al.*, 2010), por lo que la elevada actividad AHAS del nódulo debe provenir de las células vegetales.

Por otro lado, se ha descrito que la actividad AHAS en el resto de tejidos de la planta, a parte del nódulo, tiene una respuesta similar tanto en plantas noduladas como en no noduladas (Royuela *et al.*, 1998). En contraste con esto, en nuestro experimento observamos que con el imazamox la AHAS disminuye en todos los órganos estudiados de judía y veza en simbiosis, y además, en la raíz de las plantas de judía y veza noduladas esta actividad es inferior a la de los experimentos de capítulos anteriores en los que las plantas no se inocularon. Esto sugiere que o bien las plantas en simbiosis fueron menos tolerantes al herbicida, o bien la estrategia de defensa y las prioridades en las plantas noduladas son diferentes.

Como se ha comentado en los capítulos previos, la inhibición de la AHAS suele ir seguida de un incremento del contenido total de aminoácidos libres (Shaner y Reider, 1986), provocado por un aumento de la proteólisis (Rhodes *et al.*, 1987). Esto coincide con los resultados obtenidos en los órganos de judía (Fig. 4.2), donde también las cantidades de los aminoácidos ramificados disminuyeron, a excepción de la isoleucina, que aumentó en todos los órganos. El incremento de isoleucina también se detectó en los experimentos anteriores y las posibles causas de este desequilibrio ya han sido discutidas.

El hecho de que en el nódulo de judía apenas se produjeran cambios en las cantidades de valina y leucina, a pesar de la drástica inhibición de la actividad AHAS, no puede ser exclusivamente explicado por el aumento de la proteólisis, sino que de nuevo cabría suponer un transporte de aminoácidos desde otras zonas. Esta cuestión es aún más evidente en el caso de las plantas de veza, donde a pesar de la inhibición de AHAS en el nódulo, en este órgano no se produjeron cambios significativos en el contenido de aminoácidos libres totales, porcentaje de aminoácidos ramificados, y de valina, leucina e isoleucina. Pero esta actividad en raíz aumentó con el tratamiento de imazamox y la cantidad de aminoácidos libres totales se incrementó también notablemente. Además, la actividad AHAS en raíz se correlacionó positivamente con el porcentaje de aminoácidos ramificados en nódulo. Estos resultados coinciden con los de Royuela *et al.* (1998), quienes

encontraron que la aplicación de imazetapir en plantas noduladas de guisante no produjo un descenso del conjunto de aminoácidos ramificados en nódulo.

En relación a las respuestas descritas anteriormente, parece que en ambas leguminosas se establece el mantenimiento de aminoácidos ramificados del nódulo como una prioridad, lo que es coherente con la teoría de la auxotrofia simbiótica de los bacteroides específica para aminoácidos ramificados (Prell *et al.*, 2009). Esta hipótesis sostiene que los bacteroides se hacen dependientes de la planta para el suministro de aminoácidos ramificados y de esta forma éstas regulan el desarrollo y persistencia de aquéllos, llegando a controlarlos como si se tratara de orgánulos (Prell *et al.*, 2010, Oldroyd *et al.*, 2011). Esto hace que sea un punto crítico de control para la regulación de la simbiosis y por tanto de la fijación de N₂ efectiva. Se ha demostrado que esto es así para *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* en simbiosis con guisante (Prell *et al.*, 2009), *Sinorhizobium meliloti* en simbiosis con alfalfa (Capela *et al.*, 2006, Barnett *et al.*, 2004), y *Bradyrhizobium japonicum* en simbiosis con soja (Pessi *et al.*, 2007).

En judía el imazamox se acumuló principalmente en raíz y nódulo (Fig. 4.3), mientras que en veza lo hizo en la parte aérea de la planta (Fig. 4.8). Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en experimentos anteriores, en los que se apreciaba que en judía quedaban pocos restos de herbicida tras 7 días de tratamiento, mientras que en veza, por el contrario, el imazamox parecía acumularse con el tiempo (Fig. 3.6 y 3.16). El hecho de que en judía el herbicida se acumule en las raíces y el nódulo confirma que la planta pone en marcha tanto mecanismos de degradación como de inmovilización del herbicida para que no alcance la parte aérea. Estos mecanismos que evitan en lo posible el transporte del herbicida a la aérea, ya han sido descritos en otra leguminosa como la soja (Teclé *et al.*, 1993). Probablemente en raíz y nódulo, al estar en contacto directo con el imazamox, la tasa de degradación no supere a la de absorción y esta sea la razón por la que el herbicida se acumula e inhibe en gran proporción la actividad AHAS de nódulo. Por el contrario, en veza el imazamox se transporta hacia la parte aérea de la planta, por lo que parece confirmar que el compuesto apenas se degrada en esta especie, y por lo tanto se almacenará en la vacuola para que no interfiera con la actividad AHAS. Es interesante comentar que el imazamox se acumuló en mucha mayor proporción en el experimento de plantas de veza en simbiosis que en el experimento sin inoculación.

En general, el imazamox induce la actividad GST en los cuatro órganos estudiados de ambas simbiosis (Fig. 4.4 y 4.9), observándose una actividad mayor en raíz de ambas leguminosas en condiciones control. La tendencia a una mayor actividad GST en raíz, ya se describió en experimentos anteriores, coincidiendo con lo descrito por otros autores (Young *et al.*, 2001, Holmes *et al.*, 2006). En judía, donde hemos señalado anteriormente que hay poco imazamox en la parte

aérea, pensábamos que se podría relacionar con una elevada degradación de este, sin embargo, la GST está estimulada pero no en la medida que cabría esperar, por lo que en la degradación del herbicida en judía deben participar otras enzimas en mayor proporción que la GST o que simplemente el herbicida no se transloque a la parte aérea y quede retenido en las raíces. Por otra parte, en veza el incremento de esta actividad con el imazamox fue más drástico en la parte aérea, especialmente en hoja joven, justamente la parte de la planta donde el herbicida alcanzó mayor concentración. Es posible que la GST realice una función de “marcado” de la molécula de herbicida, lo que permita a la planta almacenarla, ya que se ha descrito que con frecuencia el glutatión funciona como una señal en una molécula que indica que debe ser “secuestrada” en la vacuola (Schröder y Collins, 2002, Cummins *et al.*, 2011, Pang *et al.*, 2012).

Los niveles de EROs y la defensa antioxidante juegan un papel crucial en la simbiosis entre leguminosas y rizobios. La homeostasis redox es importante tanto en el desarrollo de los nódulos (D'Haese *et al.*, 2003, Peleg-Grossman *et al.*, 2007, Cardenas *et al.*, 2008) como en el control del metabolismo de los nódulos ya establecidos (Chang *et al.*, 2009, Marino *et al.*, 2009). En concreto existen ciertas isoformas de FeMnSOD que intervienen en la regulación del proceso de fijación de nitrógeno, al menos en nódulos determinados (Asensio *et al.*, 2012). Las superóxido dismutasa (SOD) son una barrera antioxidante primaria contra las especies reactivas de oxígeno (EROs) debido a su capacidad para dismutar el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (Rubio *et al.*, 2007). A pesar de lo postulado por Zabalza *et al.* (2007), donde indican que los herbicidas inhibidores de la AHAS no inducen estrés oxidativo y por lo tanto no desencadenan una respuesta antioxidante, en nuestro experimento detectamos que en ambas leguminosas en simbiosis incrementó la SOD en hoja y raíz, sin embargo, en nódulo esta actividad no cambió significativamente o disminuyó (Fig. 4.5 y 4.10). El incremento de esta actividad puede estar relacionada con un cierto estrés oxidativo desencadenado por el herbicida, o bien con las cascadas de señalización implicadas en las respuestas de adaptación a estrés, en las que se ha descrito que participan las moléculas de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 (Dat *et al.*, 2000, Brosche *et al.*, 2010). La disminución de enzimas antioxidantes se ha observado en nódulos de leguminosas, tanto durante la senescencia natural como en condiciones de estrés ambiental, y se correlaciona con una alteración de la eficiencia de la fijación de nitrógeno (Escuredo *et al.*, 1996, Jamet *et al.*, 2003, Loscos *et al.*, 2008), aunque en salinidad se ha observado un incremento de la actividad SOD en nódulos de *P. vulgaris* (Tejera *et al.*, 2004, Jebara *et al.*, 2005).

En condiciones control encontramos diferentes respuestas de la GPX en las dos leguminosas, así en judía la mayor actividad enzimática se registró en raíz y nódulo, mientras que en veza fue en la parte aérea, mientras que en presencia de

imazamox la GPX presenta la misma respuesta en ambas leguminosas, induciéndose en hoja, resultados que coinciden con lo descrito por Zabalza *et al.* (2007), e inhibiéndose en nódulo y raíz (Fig. 4.5 y 4.10). Las peroxidadas participan en diversas funciones fisiológicas, incluyendo la participación en la detoxificación de xenobióticos, la elongación celular o la reticulación de los componentes de la pared celular (Passardi *et al.*, 2004), y en cada especie y órgano podrían tener funciones diferentes. Es interesante recordar que en los experimentos del capítulo 2 los mayores incrementos de GPX se produjeron en las variedades sensibles.

Conclusiones

1. Las cepas *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* VF39 presentan mayor tolerancia a imazamox. Estas bacterias no alteran significativamente la actividad AHAS con el tratamiento del herbicida y muestran mejor supervivencia durante la incubación en sistema de microcosmos edáficos.
2. La aplicación de imazamox en el cultivo de las leguminosas judía y veza reduce el crecimiento vegetal y el contenido de pigmentos fotosintéticos, y aumenta los azúcares solubles totales y la peroxidación lipídica en hojas. En base a estos parámetros y las dosis utilizadas, las variedades Coco Blanc y Corina, de judía y veza respectivamente, pueden considerarse tolerantes.
3. El estudio ontogénico de ambas especies se evidencia que el herbicida, al inicio del tratamiento, se transporta a los tejidos jóvenes. En éstos, la actividad AHAS es más sensible al imazamox comparado con tejidos maduros. Los aminoácidos ramificados podrían ser transportados desde los tejidos menos afectados para compensar la inhibición de actividad producida en tejidos jóvenes.
4. Las estrategias de tolerancia a imazamox son diferentes en judía y veza. En la primera el herbicida se acumula en raíz y nódulo, mientras que en parte aérea probablemente se degrade con el concurso de las actividades GST y GPX. En la segunda se produce una acumulación creciente del xenobiótico en parte aérea, pudiendo ser almacenado en vacuola.
5. En el nódulo el tratamiento de imazamox disminuye la actividad AHAS, pero no altera el contenido de aminoácidos ramificados. En condiciones de simbiosis, la homeostasis de valina, leucina e isoleucina de este órgano constituye una prioridad para la planta, ya que es un punto crítico para el control de la fijación de nitrógeno.

Conclusiones

Bibliografía

- Abd-Alla MH, Omar SA, Karanxha S** (2000) The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology* 14: 191-200
- Acosta-Duran C, Martínez-Romero E** (2002) Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Archives of Microbiology* 178: 161-164
- Aebi H** (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126
- Ahsan N, Lee DG, Lee KW, Alam I, Lee SH, Bahk JD, Lee BH** (2008) Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 1062-1070
- Aichele TM, Penner D** (2005) Adsorption, desorption, and degradation of imidazolinones in soil. *Weed Technology* 19: 154-159
- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A** (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2: 1-12
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E** (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment* 24: 1337-1344
- Alonso-Prados JL, Hernandez-Sevillano E, Llanos S, Villarroja M, Garcia-Baudin JM** (2002) Effects of sulfosulfuron soil residues on barley (*Hordeum vulgare*), sunflower (*Helianthus annuus*) and common vetch (*Vicia sativa*). *Crop Protection* 21: 1061-1066
- Amarger N, Macheret V, Laguerre G** (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 996-1006
- Anderson A, Baldock JA, Rogers SL, Bellotti W, Gill G** (2004) Influence of chlorsulfuron on rhizobial growth, nodule formation, and nitrogen fixation with chickpea. *Australian Journal of Agricultural Research* 55: 1059-1070
- Arias-Estevéz M, Lopez-Periágo E, Martínez-Carballo E, Simal-Gandara J, Mejuto JC, García-Río L** (2008) The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture Ecosystems and Environment* 123: 247-260
- Arruda JS, Lopes NF, Moura AB** (2001) Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. *Planta Daninha* 19: 111-117
- Asensio AC, Gil-Monreal M, Pires L, Gogorcena Y, Aparicio-Tejo PM, Moran JF** (2012) Two Fe-superoxide dismutase families respond differently to stress and senescence in legumes. *Journal of Plant Physiology* 169: 1253-1260
- Aubert S, Bligny R, Day DA, Whelan J, Douce R** (1997) Induction of alternative oxidase synthesis by herbicides inhibiting branched-chain amino acid synthesis. *Plant Journal* 11: 649-657
- Badri DV, Vivanco JM** (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment* 32: 666-681
- Baerg RJ, Barrett M** (1996) The basis of imazethapyr tolerance in cowpea (*Vigna sinensis*). *Weed Science* 44: 769-775
- Barak Z, Chipman DM, Gollop N** (1987) Physiological implications of the specificity of acetohydroxy acid synthase isozymes of enteric bacteria. *Journal of Bacteriology* 169: 3750-3756
- Barbagallo RP, Oxborough K, Pallett KE, Baker NR** (2003) Rapid, non-invasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132: 485-493
- Barea JM, Azcon R, Azcon-Aguilar C** (2002) Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 343-351

- Barnett MJ, Tolman CJ, Fisher RF, Long SR** (2004) A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 16636-16641
- Battaglin WA, Furlong ET, Burkhardt MR, Peter CJ** (2000) Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States. *Science of The Total Environment* 248: 123-133
- Bauer TA, Renner KA, Penner D, Kelly JD** (1995) Pinto bean (*Phaseolus vulgaris*) varietal tolerance to imazethapyr. *Weed Science* 43: 417-424
- Benachour N, Moslemi S, Sipahutar H, Seralini GE** (2007) Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222: 129-140
- Beringer JE** (1974) R Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84: 188-198
- Bestman HD, Devine MD, Vandeborn WH** (1990) Herbicide chlorsulfuron decreases assimilate transport out of treated leaves of field pennycress (*Thlaspi arvense* L.). *Plant Physiology* 93: 1441-1448
- Beyer WF, Fridovich I** (1987) Assaying for superoxide dismutase activity. Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161: 559-566
- Bhatti MA, Felsot AS, Parker R, Mink G** (1998) Leaf photosynthesis, stomatal resistance, and growth of wine grapes (*Vitis vinifera* L.) after exposure to simulated chlorsulfuron drift. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 33: 67-81
- Binder S** (2010) Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book*, American Society of Plant Biologists 8: e0137-e0137
- Binder S, Knill T, Schuster J** (2007) Branched-chain amino acid metabolism in higher plants. *Physiologia Plantarum* 129: 68-78
- Blackshaw RE, Saindon G** (1996) Dry bean (*Phaseolus vulgaris*) tolerance to imazethapyr. *Canadian Journal of Plant Science* 76: 915-919
- Blair AM, Martin TD** (1988) A review of the activity, fate, and mode of action of sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science* 22: 195-219
- Blažinkov M, Sudarević I, Barić K, Sikora S, Redžepović S** (2009) The effects of herbicides on the growth of *S. meliloti* strains. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56: 1
- Bohm GMB, Alves BJR, Urquiaga S, Boddey RM, Xavier GR, Hax F, Rombaldi CV** (2009) Glyphosate- and imazethapyr-induced effects on yield, nodule mass and biological nitrogen fixation in field-grown glyphosate-resistant soybean. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 420-422
- Bonfante P, Anca IA** (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63: 363-383
- Brady TM, Cross B, Doehner RF, Finn J, Ladner DL**, (1998) The discovery of imazamox, a new broad-spectrum imidazolinone herbicide. En: *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals V*, Brady TM, Ladner DL (eds), pp 30–37. American Chemical Society, Princeton, New Jersey, USA
- Brazier-Hicks M, Edwards LA, Edwards R** (2007) Selection of plants for roles in phytoremediation: the importance of glucosylation. *Plant Biotechnology Journal* 5: 627-635
- Brennan E, McGuinness M, Dowling DN** (2009) Bioinformatic analysis and in vitro site-directed mutagenesis of conserved amino acids in BphK(LB400), a specific bacterial glutathione transferase. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63: 928-932

- Brosche M, Overmyer K, Wrzaczek M, Kangasjarvi J, Kangasjarvi S.** (2010) Stress signaling III: reactive oxygen species (ROS). En: Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation, Pareek A, Sopory SK, Bohnert HJ, Govindjee X (eds), pp 91-102. Springer, Dordrecht, The Netherland
- Broughton WJ, Zhang F, Perret X, Staehelin C** (2003) Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil* 252: 129-137
- Brown CD, Van Beinum W** (2009) Pesticide transport via sub-surface drains in Europe. *Environmental Pollution* 157: 3314-3324
- Bugg T, Foght JM, Pickard MA, Gray MR** (2000) Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5387-5392
- Bukun B, Nissen SJ, Shaner DL, Vassios JD** (2012) Imazamox absorption, translocation, and metabolism in red lentil and dry bean. *Weed Science* 60: 350-354
- Bunemann EK, Schwenke GD, Van Zwieten L** (2006) Impact of agricultural inputs on soil organisms : a review. *Australian Journal of Soil Research* 44: 379-406
- Burnet M, Hodgson B** (1991) Differential effects of the sulfonylurea herbicides chlorsulfuron and sulfometuron methyl on microorganisms. *Archives of Microbiology* 155: 521-525
- Capela D, Filipe C, Bobilk C, Batut J, Bruand C** (2006) *Sinorhizobium meliloti* differentiation during symbiosis with alfalfa: a transcriptomic dissection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 363-372
- Cárdenas L, Martínez A, Sánchez F, Quinto C** (2008) Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant Journal* 56: 802-813
- Cedergreen N** (2008) Herbicides can stimulate plant growth. *Weed Research* 48: 429-438
- Cedergreen N, Andersen L, Olesen CF, Spliid HH, Streibig JC** (2005) Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on K_{ow} or mode of action? *Aquatic Toxicology* 71: 261-271
- Centro de Protección Vegetal,** (2010). Herbicidas autorizados en España http://www.unavarra.es/servicio/herbario/hm/control_quimico_03.htm
- Compant S, Clément C, Sessitsch A** (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 669-678
- Cottam C, Higgins E** (1946) DDT and its effect on fish and wildlife. *Journal of Economic Entomology* 39: 44-52
- Crouzet O, Batisson I, Besse-Hoggan P, Bonnemoy F, Bardot C, Poly F, Bohatier J, Mallet C** (2010) Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 193-202
- Cummins I, Dixon DP, Freitag-Pohl S, Skipsey M, Edwards R** (2011) Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metabolism Reviews* 43: 266-280
- Chang AK, Duggleby RG** (1997) Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochemical Journal* 327: 161-169
- Chang C, Damiani I, Puppo A, Frendo P** (2009) Redox changes during the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Molecular Plant* 2: 370-377
- Chao JF, Quick WA, Hsiao AI, Xie HS** (1994) Effect of imazamethabenz on histology and histochemistry of polysaccharides in the main shoot of wild oat (*Avena fatua*). *Weed Science* 42: 345-352

- Chipman D, Barak ZA, Schloss JV** (1998) Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1385: 401-419
- Chipman DM, Duggleby RG, Tittmann K** (2005) Mechanisms of acetohydroxyacid synthases. *Current Opinion in Chemical Biology* 9: 475-481
- Chowdhury A, Pradhan S, Saha M, Sanyal N** (2008) Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology* 48: 114-127
- D'haeze W, De Rycke R, Mathis R, Goormachtig S, Pagnotta S, Verplancke C, Capoen W, Holsters M** (2003) Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 11789-11794
- Dailey FE, Cronan JE** (1986) Acetohydroxy acid synthase I, a required enzyme for isoleucine and valine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12 during growth on acetate as the sole carbon source. *Journal of Bacteriology* 165: 453-460
- Dary M, Chamber-Perez MA, Palomares AJ, Pajuelo E** (2010) "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials* 177: 323-330
- Dashti N, Khanafer M, El-Nemr I, Sorkhoh N, Ali N, Radwan S** (2009) The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere* 74: 1354-1359
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779-795
- Davies J, Honegger JL, Tencalla FG, Meregalli G, Brain P, Newman JR, Pitchford HF** (2003) Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron, a case study. *Pest Management Science* 59: 231-237
- Dayan FE, Watson SB** (2011) Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101: 182-190
- Del Papa MF, Pistorio M, Balague LJ, Draghi WO, Wegener C, Perticari A, Niehaus K, Lagares A** (2003) A microcosm study on the influence of pH and the host-plant on the soil persistence of two alfalfa-nodulating rhizobia with different saprophytic and symbiotic characteristics. *Biology and Fertility of Soils* 39: 112-116
- Devine MD** (1989) Phloem translocation of herbicides. *Weed Science* 4: 191-214
- Dijkgraaf E, Vollebergh HRJ** (2004) Burn or bury? A social cost comparison of final waste disposal methods. *Ecological Economics* 50: 233-247
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F** (2009) Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell and Environment* 32: 1682-1694
- Donahue JL, Okpodu CM, Cramer CL, Grabau EA, Alscher RG** (1997) Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiology* 113: 249-257
- Dorigo U, Leboulanger C, Berard A, Bouchez A, Humbert J-F, Montuelle B** (2007) Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquatic Microbial Ecology* 50: 91-102
- Dowling DN, Doty SL** (2009) Improving phytoremediation through biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 204-206
- Doyle JJ, Luckow MA** (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131: 900-910

- Drew EA, Gupta VVSR, Roget DK** (2007) Herbicide use, productivity, and nitrogen fixation in field pea (*Pisum sativum*). *Australian Journal of Agricultural Research* 58: 1204-1214
- Drouin P, Sellami M, Prevost D, Fortin J, Antoun H** (2010) Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of *Rhizobiaceae*. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 45: 757-765
- Du S-T, Zhang Y-S, Lin X-Y** (2007) Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. *Agricultural Sciences in China* 6: 1246-1255
- Duggleby RG** (2006) Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Accounts of Chemical Research* 39: 550-557
- Duggleby RG, Mccourt JA, Guddat LW** (2008) Structure and mechanism of inhibition of plant acetoxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 309-324
- Duggleby RG, Pang SS** (2000) Acetoxyacid synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 33: 1-36
- Dzantor EK, Chekol T, Vough LR** (2000) Feasibility of using forage grasses and legumes for phytoremediation of organic pollutants. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 35: 1645-1661
- Dzantor EK, Felsot AS** (1991) Microbial responses to large concentrations of herbicides in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 649-655
- Edwards CA** (1989) Impact of herbicides on soil ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 8: 221-257
- Ellerstrom M, Josefsson LG, Rask L, Ronne H** (1992) Cloning of a cDNA for rape chloroplast 3-isopropylmalate dehydrogenase by genetic complementation in yeast. *Plant Molecular Biology* 18: 557-566
- Ellgehausen H, Guth JA, Esser HO** (1980) Factors determining the bioaccumulation potential of pesticides in the individual compartments of aquatic food chains. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 4: 134-157
- Eoyang L, Silverman PM** (1984) Purification and subunit composition of acetoxyacid synthase I from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 157: 184-189
- Epelbaum S, Larossa RA, Vandyk TK, Elkayam T, Chipman DM, Barak Z** (1998) Branched-chain amino acid biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: a quantitative analysis. *Journal of Bacteriology* 180: 4056-4067
- Escuredo PR, Minchin FR, Gogorcena Y, Iturbe-Ormaetxe I, Klucas RV, Becana M** (1996) Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiology* 110: 1187-1195
- Faller A, Schleifer KH** (1981) Modified oxidase and benzidine tests for separation of *staphylococci* from *micrococci*. *Journal of Clinical Microbiology* 13: 1031-1035
- Fang LY, Gross PR, Chen CH, Lillis M** (1992) Sequence of two acetoxyacid synthase genes from *Zea mays*. *Plant Molecular Biology* 18: 1185-1187
- FAO** (2008) FAO Hunger Portal www.fao.org/hunger/en/
- Farmer JJ, Fanning GR, Huntley Carter GP, Holmes B, Hickman FW, Richard C, Brenner DJ** (1981) *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 13: 919-933
- Ferguson NM, Ghani AC, Donnelly CA, Hagenaars TJ, Anderson RM** (2002) Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. *Nature* 415: 420-424

- Fletcher J** (2006) Phytoremediation and rhizoremediation: theoretical background. En: Focus on biotechnology, Mackova M, Dowling D, Macek T (eds), pp 1-3. Springer, Dordrecht, Netherlands
- Flury M** (1996) Experimental evidence of transport of pesticides through field soils: a review. *Journal of Environmental Quality* 25: 25-45
- Forlani G, Mantelli M, Branzoni M, Nielsen E, Favilli F** (1995) Differential sensitivity of plant-associated bacteria to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Plant and Soil* 176: 243-253
- Frear DS, Swanson HR** (1970) Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazine) glutathione: partial purification and properties of glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9: 2123-2132
- Garcinuno RM, Fernandez-Hernando P, Camara C** (2003) Evaluation of pesticide uptake by *Lupinus* seeds. *Water Research* 37: 3481-3489
- Garland JL, Mills AL** (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2351-2359
- Gaston S, Ribas-Carbo M, Busquets S, Berry JA, Zabalza A, Royuela M** (2003) Changes in mitochondrial electron partitioning in response to herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis in soybean. *Plant Physiology* 133: 1351-1359
- Gaston S, Zabalza A, Gonzalez EM, Arrese-Igor C, Aparicio-Tejo PM, Royuela M** (2002) Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. *Physiologia Plantarum* 114: 524-532
- George JL, Frear DEH** (1966) Pesticides in the Antarctic. *Journal of Applied Ecology* 3: 155-167
- Georghiou GP**, (1990) Overview of insecticide resistance. En: Managing Resistance to Agrochemicals, Green MB, Lebaron HM, Moberg WK (eds), pp 18-41. American Chemical Society, Washington, USA
- Gepts P** (1990) Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* beans. *Economic Botany* 44: 28-38
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND** (2005) Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiology* 137: 1228-1235
- Gerhardt KE, Huang X-D, Glick BR, Greenberg BM** (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science* 176: 20-30
- Germaine KJ, Keogh E, Ryan D, Dowling DN** (2009) Bacterial endophyte-mediated naphthalene phytoprotection and phytoremediation. *FEMS Microbiology Letters* 296: 226-234
- Gevao B, Semple KT, Jones KC** (2000) Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution* 108: 3-14
- Giardina MC, Carosi S** (1990) Effects of chlorsulfuron on polyamine content in maize seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36: 229-236
- Gil Y, Sinfort C** (2005) Emission of pesticides to the air during sprayer application: a bibliographic review. *Atmospheric Environment* 39: 5183-5193
- Glick BR** (2010) Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28: 367-374
- Gollop N, Damri B, Barak Z, Chipman DM** (1989) Kinetics and mechanism of acetohydroxy acid synthase isozyme III from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 28: 6310-6317

- Gómez E, Ferreras L, Lovotti L, Fernandez E** (2009) Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology* 45: 163-167
- González-López J, Martínez-Toledo MV, Pozo C, Rodelas B, Gómez MA, Hontoria E** (2004) Pesticides and denitrifying microbiota. *Trends in Soil Science* 3: 91-97
- González A, Gonzalezmurua C, Royuela M** (1996) Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with pea (*Pisum sativum*). *Weed Science* 44: 31-37
- González N, Eyherabide JJ, Barcelonna MI, Gaspari A, Sanmartino S** (1999) Effect of soil interacting herbicides on soybean nodulation in Balcarce, Argentina. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34: 1167-1173
- Graham PH, Draeger KJ, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martinez E, Aarons SR, Quinto C** (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology* 40: 198-207
- Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872-877
- Grichar WJ, Ocumpaugh WR** (2009) Response of three annual medic species to postemergence herbicides. *Weed Technology* 23: 412-415
- Grimminger H, Umbarger HE** (1979) Acetohydroxy acid synthase I of *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of Bacteriology* 137: 846-853
- Guardiola J, De Felice M, Iaccarino M** (1974) Mutant of *Escherichia coli* K-12 missing acetolactate synthase activity. *Journal of Bacteriology* 120: 536-538
- Gupta AK, Dwivedi S, Sinha S, Tripathi RD, Rai UN, Singh SN** (2007) Metal accumulation and growth performance of *Phaseolus vulgaris* grown in fly ash amended soil. *Bioresource Technology* 98: 3404-3407
- Guyer D, Patton D, Ward E** (1995) Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4997-5000
- Habig WH, Jakoby WB** (1981) Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology* 77: 398-405
- Harrison JWE, Rees EW** (1946) 2,4-D toxicity; toxicity towards certain species of fish. *American Journal of Pharmacy and the Sciences Supporting Public Health* 118: 422-425
- Hartwig UA, Trommler J** (2001) Increase in the concentrations of amino acids in the vascular tissue of white clover and white lupin after defoliation: an indication of a N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation. *Agronomie* 21: 615-620
- Hawkes TR, Howard JL, Pontin SE**, (1989) Herbicides that inhibit the biosynthesis of branched-chain amino acids. En: *Herbicides and Plant Metabolism*, Dodge AD (eds), pp 113-137. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Hekmat S, Soltani N, Shropshire C, Sikkema PH** (2008) Effect of imazamox plus bentazon on dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Protection* 27: 1491-1494
- Hernández-Lucas I, Pardo MA, Segovia L, Miranda J, Martinezromero E** (1995) *Rhizobium tropici* chromosomal citrate synthase gene. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3992-3997
- Herrera-Cervera JA, Caballero-Mellado J, Laguerre G, Tichy HV, Requena N, Amarger N, Martínez-Romero E, Olivares J, Sanjuan J** (1999) At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *Fems Microbiology Ecology* 30: 87-97

- Hill CM, Pang SS, Duggleby RG** (1997) Purification of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and reconstitution of active enzyme from its individual pure subunits. *Biochemical Journal* 327: 891-898
- Holmes P, Farquharson R, Hall PJ, Rolfe BG** (2006) Proteomic analysis of root meristems and the effects of acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicides in the root of *Medicago truncatula*. *Journal of Proteome Research* 5: 2309-2316
- Holtze MS, Sorensen SR, Sorensen J, Aamand J** (2008) Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments. Insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms. *Environmental Pollution* 154: 155-168
- Hossain MA, Asada K** (1984) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology* 25: 1285-1295
- Huang X, Pan J, Liang B, Sun J, Zhao Y, Li S** (2009) Isolation, characterization of a strain capable of degrading imazethapyr and its use in degradation of the herbicide in soil. *Current Microbiology* 59: 363-367
- Hung SH, Yu CW, Lin CH** (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46: 1-10
- Hungria M, Campo RJ, Mendes IC** (2003) Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils* 39: 88-93
- Hungria M, Franco AA** (1993) Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* 149: 95-102
- Huston PL, Pignatello JJ** (1999) Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction. *Water Research* 33: 1238-1246
- Igarashi RY, Seefeldt LC** (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38: 351-384
- Ike A, Sriprang R, Ono H, Murooka Y, Yamashita M** (2007) Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the MTL4 and the PCS genes. *Chemosphere* 66: 1670-1676
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanchezdiaz M** (1992) Water-stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 84: 55-60
- Isenring R**, (2010) Pesticides and the loss of biodiversity. Isenring R (ed), Pesticide Action Network Europe, London, UK
- Jamet A, Sigaud S, Van De Sype G, Puppo A, Herouart D** (2003) Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 217-225
- Jander G, Joshi V** (2010) Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. *Molecular Plant* 3: 54-65
- Jebara S, Jebara M, Limam F, Aouani ME** (2005) Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 929-936
- Jensen E, Peoples M, Boddey R, Gresshoff P, Hauggaard-Nielsen H, J.R. Alves B, Morrison M** (2012) Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 329-364

- Jin J, Wang Z, Ran S** (2006) Solid waste management in Macao: practices and challenges. *Waste Management* 26: 1045-1051
- Jin ZL, Zhang F, Ahmed ZI, Rasheed M, Naeem MS, Ye QF, Zhou WJ** (2010) Differential morphological and physiological responses of two oilseed *Brassica* species to a new herbicide ZJ0273 used in rapeseed fields. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98: 1-8
- Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V, Sorensen J** (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils: a review. *Biology and Fertility of Soils* 33: 443-453
- Johnson ES, Choi KM** (2012) Lung cancer risk in workers in the meat and poultry industries: a review. *Zoonoses and Public Health* 59: 303-313
- Joshi V, Joung J-G, Fei Z, Jander G** (2010) Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* 39: 933-947
- Judy BM, Lower WR, Miles CD, Thomas MW, Krause GF**, (1991) Chlorophyll fluorescence of higher plants as an assay for toxicity assessment of soil and water. En: *Plants Phytotoxicity Assessment*, Wang W, Gorsuch JW, Lower WR (eds), pp 308-318. ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania, USA
- Kaplan L**, (2008) Legumes in the history of human nutrition. En: *The world of soy*, Du Bois CM, Tan CB, Mintz SW (eds), pp 27-45. NUS Press, Singapore
- Kaspar M, Grondona M, Leon A, Zambelli A** (2011) Selection of a sunflower line with multiple herbicide tolerance that is reversed by the P450 inhibitor Malathion. *Weed Science* 59: 232-237
- Katerova ZI, Miteva LPE**, (2010) Glutathione and herbicide resistance in plants En: *Ascorbate-Glutathione pathway and stress tolerance in plants*, Anjum NA, Chan MT, Umar S (eds), pp 191-207. Springer, Dordrecht, The Netherlands
- Kato M, Shimizu S** (1987) Chlorophyll metabolism in higher plants VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: phenolic dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany* 65: 729-735
- Kawahigashi H** (2009) Transgenic plants for phytoremediation of herbicides. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 225-230
- Keeler SJ, Sanders P, Smith JK, Mazur BJ** (1993) Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression. *Plant Physiology* 102: 1009-1018
- Kempa ES** (1997) Hazardous wastes and economic risk reduction: case study, Poland. *International Journal of Environment and Pollution* 7: 221-248
- Keutgen N, Matsushashi S, Minghong J, Mizuniwa C, Ito T, Fujimura T, Hashimoto S, Ishioka NS, Watanabe S, Osa A, Sekine T, Uchida H, Jia MH** (2000) Nitrogen metabolism in soybean (*Glycine max* L.) as affected by metsulfuron-methyl. *Acta Horticulturae* 531: 175-179
- Khan MS, Zaidi A, Rizvi PQ** (2006) Biotoxic effects of herbicides on growth, nodulation, nitrogenase activity, and seed production in chickpeas. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 37: 1783-1793
- Kim S, Vandeborn WH** (1996) Chlorsulfuron decreases both assimilate export by source leaves and import by sink leaves in canola (*Brassica napus* L) seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 56: 141-148
- Kim S, Vandeborn WH** (1997) Carbon allocation and translocation in chlorsulfuron-treated canola (*Brassica napus*). *Weed Science* 45: 466-469
- Koehne JM, Koehne S, Simunek J** (2009) A review of model applications for structured soils: pesticide transport. *Journal of Contaminant Hydrology* 104: 36-60

- Koopman DJ, Tow PG, Reeves TG, Gibson AH** (1995) Soil acidification, chlorsulfuron application and *Rhizobium meliloti* as factors in lucerne yield decline. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 673-677
- Korn M, Peterek S, Mock H-P, Heyer AG, Hinch DK** (2008) Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between *Arabidopsis thaliana* accessions of widely varying freezing tolerance. *Plant Cell and Environment* 31: 813-827
- Korte F, Kvesitadze G, Ugrehelidze D, Gordeziani M, Khatisashvili G, Buadze O, Zaalishvili G, Coulston F** (2000) Organic toxicants and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47: 1-26
- Koskinen WC, Cox L, Yen PY** (2001) Changes in sorption/bioavailability of imidacloprid metabolites in soil with incubation time. *Biology and Fertility of Soils* 33: 546-550
- Kramer U** (2005) Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 133-141
- Kumar KA, Rao AVB** (2008) Physiological responses to fluoride in two cultivars of mulberry. *World Journal of Agricultural Sciences* 4: 463-466
- Kvesitadze E, Sadunishvili T, Kvesitadze G** (2009) Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 55: 458-468
- Labrada R, Caseley J, Parker C**, (1994) Weed management for developing countries. En: FAO plant production and protection papers, Labrada R, Caseley J, Parker C (eds), pp 199. FAO, Roma, Italia
- Larossa RA, Schloss JV** (1984) The sulfonyleurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry* 259: 8753-8757
- Larossa RA, Vandyk TK** (1987) Metabolic mayhem caused by 2-ketoacid imbalances. *Bioessays* 7: 125-130
- Larossa RA, Vandyk TK, Smulski DR** (1987) Toxic accumulation of alpha-ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 169: 1372-1378
- Lawther RP, Wek RC, Lopes JM, Pereira R, Taillon BE, Hatfield GW** (1987) The complete nucleotide sequence of the ilvGMEDA operon of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 15: 2137-2155
- Leah JM, Caseley JC, Riches CR, Valverde B** (1995) Age-related mechanisms of propanil tolerance in jungle-rice, *Echinochloa colona*. *Pesticide Science* 43: 347-354
- Lee M, Yang M** (2010) Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. vulgaris) to remediate uranium contaminated groundwater. *Journal of Hazardous Materials* 173: 589-596
- Lee YP, Puddey IB, Hodgson JM** (2008) Protein, fibre and blood pressure: potential benefit of legumes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35: 473-476
- Lee YT, Duggleby RG** (2001) Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetoxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. *Biochemistry* 40: 6836-6844
- Leonard LT** (1943) A simple assembly for use in the testing of cultures of *Rhizobia*. *Journal of Bacteriology* 45: 523-527
- Leyva A, Palacios JM, Mozo T, Ruizargueso T** (1987) Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology* 169: 4929-4934

- Lo CC** (2010) Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 45: 348-359
- Los M**, (1984) o-(5-oxo-2-imidazolin-2-yl)arylcarboxylates: a new class of herbicides. En: *Pesticide synthesis through rational approaches*, Magee PS, Kohn GK, Menn JJ (eds), pp 29-44. American Chemical Society, New York, USA
- Loscos J, Matamoros MA, Becana M** (2008) Ascorbate and homogluthathione metabolism in common bean nodules under stress conditions and during natural senescence. *Plant Physiology* 146: 1282-1292
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275
- Lugtenberg B, Kamilova F** (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63: 541-556
- Lupwayi NZ, Harker KN, Clayton GW, Turkington TK, Rice WA, O'donovan JT** (2004) Soil microbial biomass and diversity after herbicide application. *Canadian Journal of Plant Science* 84: 677-685
- Macconkey A** (1905) Lactose-fermenting bacteria in faeces. *Journal of Hygiene* 5: 333-379
- Malkomes HP** (2000) Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities: a review. *Journal of Plant Diseases and Protection* 17: 781-789
- Mann RM, Bidwell JR** (2001) The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environmental Pollution* 114: 195-205
- Mannervik B, Danielson UH** (1988) Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 23: 283-337
- Mansour M, Feicht EA** (1994) Transformation of chemical contaminants by biotic and abiotic processes in water and soil. *Chemosphere* 28: 323-332
- Marino D, Pucciariello C, Puppo A, Frendo P** (2009) The redox state, a referee of the legume-rhizobia symbiotic game. *Advances in Botanical Research* 52: 115-151
- Markwell MaK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE** (1978) Modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87: 206-210
- Marrs KA** (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 127-158
- Martensson AM, Nilsson AK** (1989) Effects of chlorsulfuron on *Rhizobium* grown in pure culture and in symbiosis with alfalfa (*Medicago sativa*) and red clover (*Trifolium pratense*) *Weed Science* 37: 445-450
- Martínez-Romero E** (2003) Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil* 252: 11-23
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA** (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp* trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 417-426
- Martínez J, Dabert P, Barrington S, Burton C** (2009) Livestock waste treatment systems for environmental quality, food safety, and sustainability. *Bioresource Technology* 100: 5527-5536
- Massa D, Krenz B, Gerhards R** (2011) Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. *Weed Research* 51: 294-303

- Mateos-Naranjo E, Redondo-Gomez S, Cox L, Cornejo J, Figueroa ME** (2009) Effectiveness of glyphosate and imazamox on the control of the invasive cordgrass *Spartina densiflora*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1694-1700
- Matocha MA, Grichar WJ, Senseman SA, Gerngross CA, Brecke BJ, Vencill WK** (2003) The persistence of imazapic in peanut (*Arachis hypogaea*) crop rotations. *Weed Technology* 17: 325-329
- Mawdsley JL, Bardgett RD, Merry RJ, Pain BF, Theodorou MK** (1995) Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Applied Soil Ecology* 2: 1-15
- Maxted N, Bennett SJ**, (2001) Legume diversity in the Mediterranean region. En: *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean*, Maxted N, Bennett SJ (eds), pp 51-65. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands
- Mccarthy-Suarez I, Gomez M, Del Rio LA, Palma JM** (2011) Organ-specific effects of the auxin herbicide 2,4-D on the oxidative stress and senescence-related parameters of the stems of pea plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 2239-2247
- Mcclain D, Lee WH** (1988) Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 71: 660-664
- Mccourt JA, Duggleby RG** (2006) Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids* 31: 173-210
- Mccourt JA, Pang SS, King-Scott J, Guddat LW, Duggleby RG** (2006) Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 569-573
- Mcguinness M, Ivory C, Gilmartin N, Dowling DN** (2006) Investigation of substrate specificity of wildtype and mutant BphK(LB400) (a glutathione S-transferase) from *Burkholderia* LB400. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58: 203-208
- Meers E, Samson R, Tack FMG, Ruttens A, Vandegheuchte M, Vangronsveld J, Verloo MG** (2007) Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 60: 385-396
- Michiels J, Verreth C, Vanderleyden J** (1994) Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1206-1212
- Miltner RJ, Baker DB, Speth TF, Fronk CA** (1989) Treatment of seasonal pesticides in surface waters. *American Water Works Association Journal* 81: 43-52
- Miller JH**, (1972) *Experiments in molecular genetics*. Miller JH (ed), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
- Miteva LPE, Ivanov SV, Alexieva VS** (2010) Alterations in glutathione pool and some related enzymes in leaves and roots of pea plants treated with the herbicide glyphosate. *Russian Journal of Plant Physiology* 57: 131-136
- Mohsenzadeh S, Esmaili M, Moosavi F, Shahrtash M, Saffari B, Mohabatkar H** (2011) Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. *African Journal of Biotechnology* 10: 8160-8165
- Moorman TB, Jayackandran K, Reungsang A** (2001) Adsorption and desorption of atrazine in soils and subsurface sediments. *Soil Science* 166: 921-929
- Mostasso L, Mostasso FL, Dias BG, Vargas MaT, Hungria M** (2002) Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research* 73: 121-132
- Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM** (1996) A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric

restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature? Applied and Environmental Microbiology 62: 2501-2507

Moyer JR, Coen G, Dunn R, Smith AM (2010) Effects of landscape position, rainfall, and tillage on residual herbicides. Weed Technology 24: 361-368

Nadal S, Moreno MT, Cubero JI, (2004a) La judía (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Las leguminosas grano en la agricultura moderna, Mundi-Prensa (eds), pp 130-142. Mundi-Prensa, Madrid, Barcelona, México

Nadal S, Moreno MT, Cubero JI, (2004b) Veza común (*Vicia sativa* L.). En: Las leguminosas grano en la agricultura moderna, Mundi-Prensa (eds), pp 249-257. Mundi-Prensa, Madrid, Barcelona, México

Nelson DR, Duxbury T (2008) The distribution of acetohydroxyacid synthase in soil bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 93: 123-132

Newhouse K, Singh B, Shaner D, Stidham M (1991) Mutations in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides. Theoretical and Applied Genetics 83: 65-70

Niemi RM, Heiskanen I, Ahtiainen JH, Rahkonen A, Mantykoski K, Welling L, Laitinen P, Ruuttunen P (2009) Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. Applied Soil Ecology 41: 293-304

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 95: 351-358

Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. Annual Review Genetics 45: 119-144

ONU (2011) As world passes 7 billion milestone, UN urges action to meet key challenges <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=40257#.UFnqo1H7CeY>

Orcaray L, Igal M, Marino D, Zabalza A, Royuela M (2010) The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. Pest Management Science 66: 262-269

Orcaray L, Zulet A, Zabalza A, Royuela M (2012) Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. Journal of Plant Physiology 169: 27-33

Ormad MP, Miguel N, Claver A, Matesanz JM, Ovelleiro JL (2008) Pesticides removal in the process of drinking water production. Chemosphere 71: 97-106

Owen MDK, Zelaya IA (2005) Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. Pest Management Science 61: 301-311

Pampulha ME, Ferreira MaSS, Oliveira A (2007) Effects of a phosphinothricin based herbicide on selected groups of soil microorganisms. Journal of Basic Microbiology 47: 325-331

Pang S, Duan L, Liu Z, Song X, Li X, Wang C (2012) Co-induction of a glutathione-S-transferase, a glutathione transporter and an ABC transporter in maize by xenobiotics. Plos One 7

Pang SS, Duggleby RG, Schowen RL, Guddat LW (2004) The crystal structures of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase with enzyme-bound cofactor and with an unusual intermediate. Journal of Biological Chemistry 279: 2242-2253

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Reports 24: 255-265

Passardi F, Penel C, Dunand C (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. Trends in Plant Science 9: 534-540

- Pazmiño DM, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Archilla-Ruiz A, Del Río LA, Sandalio LM** (2011) Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. *Plant Cell and Environment* 34: 1874-1889
- Pečiulytė D, Repečkienė J, Levinskaitė L, Lugauskas A, Motuzas A, Prosyčėvas I** (2006) Growth and metal accumulation ability of plants in soil polluted with Cu, Zn and Pb. *Ekologija* 1: 48-52
- Peleg-Grossman S, Volpin H, Levine A** (2007) Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *Journal of Experimental Botany* 58: 1637-1649
- Peoples MB, Brockwell J, Herridge DF, Rochester IJ, Alves BJR, Urquiaga S, Boddey RM, Dakora FD, Bhattarai S, Maskey SL, Sampet C, Rerkasem B, Khan DF, Hauggaard-Nielsen H, Jensen ES** (2009) The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* 48: 1-17
- Percival MP, Baker NR** (1991) Herbicides and photosynthesis. En: Herbicides, Percival MP, Baker NR (eds), pp 1-26. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
- Pérez E, Garrido P, Laca M** (2008) Microbiological indicators as markers of soil contamination and recovery after being polluted with kerosene. *Ecosistemas* 17: 133-138
- Perucci P, Scarponi L** (1994) Effects of the herbicide imazethapyr on soil microbial biomass and various soil enzyme activities. *Biology and Fertility of Soils* 17: 237-240
- Pessi G, Ahrens CH, Rehrauer H, Lindemann A, Hauser F, Fischer H-M, Hennecke H** (2007) Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1353-1363
- Peterson GE** (1967) The discovery and development of 2, 4-D. *Agricultural history* 41: 243-254
- Piechalak A, Malecka A, Baralkiewicz D, Tomaszewska B** (2008) Lead uptake, toxicity and accumulation in *Phaseolus vulgaris* plants. *Biologia Plantarum* 52: 565-568
- Pieper DH, Reineke W** (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 262-270
- Pilon-Smits E** (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39
- Pimentel D, Pimentel M** (2003) Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 660S-663S
- Piñero D, Martínez E, Selander RK** (1988) Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2825-2832
- Prell J, Bourdes A, Kumar S, Lodwig E, Hosie A, Kinghorn S, White J, Poole P** (2010) Role of symbiotic auxotrophy in the *Rhizobium*-legume symbioses. *Plos One* 5
- Prell J, White JP, Bourdes A, Bunnell S, Bongaerts RJ, Poole PS** (2009) Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 12477-12482
- Preston C, Wakelin AM, Dolman FC, Bostamam Y, Boutsalis P** (2009) A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. *Weed Science* 57: 435-441
- Priefer UB** (1989) Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. *Journal of Bacteriology* 171: 6161-6168
- Přikryl Z, Vančura V** (1980) Root exudates of plants. *Plant and Soil* 57: 69-83

- Procópio SO** (2004) Crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium* sob influência dos herbicidas glyphosate potássico, fomesafen, imazethapyr e carfentrazone-ethyl. *Revista Ceres* 51: 179-188
- Quan L-J, Zhang B, Shi W-W, Li H-Y** (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 2-18
- Rabe R, Kreeb KH** (1980) Bioindication of air pollution by chlorophyll destruction in plant leaves. *Oikos* 34: 163-167
- Radhakrishnan AN, Snell EE** (1960) Biosynthesis of valine and isoleucine II. Formation of α -acetolactate and α -aceto- α -hydroxybutyrate in *Neurospora crassa* and *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 235: 2316-2321
- Radwan SS, Dashti N, El-Nemr IM** (2005) Enhancing the growth of *Vicia faba* plants by microbial inoculation to improve their phytoremediation potential for oily desert areas. *International Journal of Phytoremediation* 7: 19-32
- Rahman A, James TK, Trollove MR, Dowsett C** (2011) Factors affecting the persistence of some residual herbicides in maize silage fields. *New Zealand Plant Protection* 64: 125-132
- Rai VK** (2002) Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum* 45: 481-487
- Ramel F, Sulmon C, Serra A-A, Gouesbet G, Couee I** (2012) Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 63: 3999-4014
- Rattner BA** (2009) History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology* 18: 773-783
- Reichman SM** (2007) The potential use of the legume-*Rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2587-2593
- Renner KA, Powell GE** (1992) Responses of navy bean (*Phaseolus vulgaris*) and wheat (*Triticum aestivum*) grown in rotation to clomazone, imazethapyr, bentazon, and acifluorfen. *Weed Science* 40: 127-133
- Rhodes D, Hogan AL, Deal L, Jamieson GC, Haworth P** (1987) Amino acid metabolism of *Lemna minor* L. Responses to chlorsulfuron. *Plant Physiology* 84: 775-780
- Rhodes D, Nadolska-Orczyk A, Rich PJ**, (2004) Salinity, osmolytes and compatible solutes En: *Salinity: Environment-Plants-Molecules*, Läuchli A, Lüttge U (eds), pp 181-204. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands
- Richter ED**, (2002) Acute human poisonings. En: *Encyclopedia of pest management*, Pimentel D (ed), pp 3-6. Dekker, New York, USA
- Riethmuller-Haage I, Bastiaans L, Harbinson J, Kempenaar C, Kropff MJ** (2006) Influence of the acetolactate synthase inhibitor metsulfuron-methyl on the operation, regulation and organisation of photosynthesis in *Solanum nigrum*. *Photosynthesis Research* 88: 331-341
- Rigaud J, Puppo A** (1975) Indole-3-acetic-acid catabolism by soybean bacteroids. *Journal of General Microbiology* 88: 223-228
- Robertson BK, Aman P, Darvill AG, Mcneil M, Albersheim P** (1981) Host-symbiont interactions V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiology* 67: 389-400
- Rost T, Gladish D, Steffen J, Robbins J** (1990) Is there a relationship between branched amino acid pool size and cell cycle inhibition in roots treated with imidazolinone herbicides? *Journal of Plant Growth Regulation* 9: 227-232
- Rost TL** (1984) The comparative cell cycle and metabolic effects of chemical treatments on root tip meristems III. Chlorsulfuron. *Journal of Plant Growth Regulation* 3: 51-63
- Rovira A** (1969) Plant root exudates. *The Botanical Review* 35: 35-57

- Royuela M, Gonzalez A, Arrese-Igor C, Aparicio-Tejo PM, Gonzalez-Murua C** (1998) Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. *Pesticide Science* 52: 372-380
- Royuela M, Gonzalez A, Gonzalez EM, Arrese-Igor C, Aparicio-Tejo PM, Gonzalez-Murua C** (2000) Physiological consequences of continuous, sublethal imazethapyr supply to pea plants. *Journal of Plant Physiology* 157: 345-354
- Rubio MC, Becana M, Sato S, James EK, Tabata S, Spaik HP** (2007) Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 262-275
- Saari LL, Cotterman JC, Thill DC**, (1994) Resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. En: *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*, Powles SB, Holtum JaM (eds), pp 83-139. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA
- Safarpour H, Asiaie R, Katz S** (2004) Quantitative analysis of imazamox herbicide in environmental water samples by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1036: 217-222
- Sakaliene O, Papiernik SK, Koskinen WC, Spokas KA** (2007) Sorption and predicted mobility of herbicides in Baltic soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 42: 641-647
- Salt DE, Smith RD, Raskin I** (1998) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 643-668
- Sambrook J, Russell DW**, (2001) Agarose gel electrophoresis. En: *Molecular cloning: A laboratory manual*, Sambrook J (eds), pp 5-4. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Sandermann H** (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver"concept. *Pharmacogenetics* 4: 225-241
- Santos JB, Silva AA, Costa MB, Jakelaitis A, Vivian R, Santos EA** (2006) Herbicide action on the growth of *Rhizobium tropici* strains. *Planta Daninha* 24: 457-465
- Savouré A, Thorin D, Davey M, Hua XJ, Mauro S, Van Montagu M, Inze D, Verbruggen N** (1999) NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Cell and Environment* 22: 387-396
- Sawicka A, Skrzypczak G, Blecharczyk A** (1996) Influence of imazethapyr and linuron on soil microorganisms under legume crops. *Second International Weed Control Congress - Proceedings* 1-4: 361-368
- Scarponi L, Alla MMN, Martinetti L** (1995) Consequences on nitrogen metabolism in soybean (*Glycine max* L.) as a result of imazethapyr action on acetohydroxy acid synthase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 809-814
- Scarponi L, Quagliarini E, Del Buono D** (2006) Induction of wheat and maize glutathione S-transferase by some herbicide safeners and their effect on enzyme activity against butachlor and terbuthylazine. *Pest Management Science* 62: 927-932
- Scarponi L, Viscetti C, Del Buono D** (2001) Imazamox in maize: uptake, persistence and interference on protein and carbohydrate formation. *Italian Journal of Food Science* 13: 213-219
- Scarponi L, Younis ME, Standardi A, Hassan NM, Martinetti L** (1997) Effects of chlorimuron-ethyl, imazethapyr, and propachlor on free amino acids and protein formation in *Vicia faba* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3652-3658
- Schröder P, Collins C** (2002) Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *International Journal of Phytoremediation* 4: 247-265

- Schröder P, Scheer CE, Diekmann F, Stampfl A** (2007) How plants cope with foreign compounds: translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environmental Science and Pollution Research* 14: 114-122
- Shaner DL**, (1991) Physiological effects of the imidazolinone herbicides. En: *The Imidazolinone Herbicides*, Shaner DL, O'connor SL (eds), pp 129-138. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- Shaner DL, Anderson PC, Stidham MA** (1984) Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology* 76: 545-546
- Shaner DL, Reider ML** (1986) Physiological-responses of corn (*Zea mays*) to AC 243,997 in combination with valine, leucine, and isoleucine. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 25: 248-257
- Shaner DL, Singh BK** (1993) Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-aminobutyrate. *Plant Physiology* 103: 1221-1226
- Shaner DL, Singh BK**, (1997) Acetohydroxyacid synthase inhibitors. En: *Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology*, Roe M, Burton JD, Kuhr RJ (eds), pp 69-110. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands
- Shim SI, Lee BM, Ryu EI, Kang BH** (2003) Response of leaf acetolactate synthase from different leaf positions and seedling ages to sulfonylurea herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 75: 39-46
- Shukla KP, Singh NK, Sharma S** (2010) Bioremediation: developments, current practices and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal* 3: 1-20
- Sidari M, Pusino A, Gessa C, Cacco G** (1998) Effect of imazamethabenz-methyl on nitrate uptake in wheat (*Triticum durum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 2800-2803
- Sikkema PH, Soltani N, Shropshire C, Cowan T** (2004) Tolerance of white beans to postemergence broadleaf herbicides. *Weed Technology* 18: 893-901
- Singh BK**, (1999a) Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine. En: *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*, Singh BK (ed), pp 227-247. Marcel Dekker, New York, USA
- Singh BK, Shaner DL** (1995) Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. *Plant Cell* 7: 935-944
- Singh BK, Stidham MA, Shaner DL** (1988) Assay of acetohydroxyacid synthase. *Analytical Biochemistry* 171: 173-179
- Singh PB, Singh V** (2008) Pesticide bioaccumulation and plasma sex steroids in fishes during breeding phase from north India. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25: 342-350
- Singh SP**, (1999b) Common bean improvement in the twenty-first century, Singh PB (ed), Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherland
- Smil V** (2002) Worldwide transformation of diets, burdens of meat production and opportunities for novel food proteins. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 305-311
- Sofo A, Scopa A, Dumontet S, Mazzatura A, Pasquale V** (2012) Toxic effects of four sulphonylureas herbicides on soil microbial biomass. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 47: 653-659
- Soltani N, Shropshire C, Sikkema PH** (2006) Effects of post-emergence application of bentazon and fomesafen on eight market classes of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Protection* 25: 826-830
- Sprent JI, James EK** (2007) Legume evolution: Where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology* 144: 575-581

- Sriprang R, Hayashi M, Yamashita M, Ono H, Saeki K, Murooka Y** (2002) A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *Journal of Biotechnology* 99: 279-293
- Stark JD, Walthall WK** (2003) Agricultural adjuvants: acute mortality and effects on population growth rate of *Daphnia pulex* after chronic exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 3056-3061
- Stiborova M, Anzenbacher P** (1991) What are the principal enzymes oxidizing the xenobiotics in plants: cytochrome P-450 or peroxidase? *General Physiology and Biophysics* 10: 209-216
- Stidham MA, Shaner DL** (1990) Imidazolinone inhibition of acetohydroxyacid synthase *in vitro* and *in vivo*. *Pesticide Science* 29: 335-340
- Størmer FC, Umbarger HE** (1964) The requirement for flavine adenine dinucleotide in the formation of acetolactate by *Salmonella typhimurium* extracts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 17: 587-592
- Susarla S, Medina VF, Mccutcheon SC** (2002) Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18: 647-658
- Suttle JC, Schreiner DR** (1982) Effects of DPX-4189 (2-chloro-N-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)aminocarbonyl)benzenesulfonamide) on anthocyanin synthesis, phenylalanine ammonia lyase activity, and ethylene production in soybean hypocotyls. *Canadian Journal of Botany* 60: 741-745
- Svoboda J, Boland W** (2010) Plant defense elicitors: Analogues of jasmonoyl-isoleucine conjugate. *Phytochemistry* 71: 1445-1449
- Tan S, Evans R, Singh B** (2006) Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 30: 195-204
- Tan SY, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL** (2005) Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 61: 246-257
- Teclé B, Dacunha A, Shaner DL** (1993) Differential routes of metabolism of imidazolinones: basis for soybean (*Glycine max*) selectivity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 46: 120-130
- Tejera NA, Campos R, Sanjuan J, Lluch C** (2004) Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 161: 329-338
- Timmons FL** (2005) A history of weed control in the United States and Canada. *Weed Science* 53: 748-761
- Tittmann K, Golbik R, Uhlemann K, Khailova L, Schneider G, Patel M, Jordan F, Chipman DM, Duggleby RG, Hubner G** (2003) NMR analysis of covalent intermediates in thiamin diphosphate enzymes. *Biochemistry* 42: 7885-7891
- Tranel PJ, Wright TR** (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* 50: 700-712
- Trapp S, Uecisik AS, Romano D, Larsen M**, (2007) The role of plants and bacteria in phytoremediation: kinetic aspects. En: *Bioremediation of Soils Contaminated with Aromatic Compounds*, Heipieper HJ (eds), pp 41-49. Springer, Dordrecht, The Netherlands
- Trenkamp S, Eckes P, Busch M, Fernie AR** (2009) Temporally resolved GC-MS-based metabolic profiling of herbicide treated plants reveals that changes in polar primary metabolites alone can distinguish herbicides of differing mode of action. *Metabolomics* 5: 277-291
- Trevors JT** (1996) Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* 26: 53-59

- Tully RE, Hanson AD, Nelsen CE** (1979) Proline accumulation in water stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget. *Plant Physiology* 63: 518-523
- Tyagi S, Banke J, Chawda R, Kumar A** (2012) Suppression of glyphosate toxicity in plants following peroxide treatment. *Toxicological and Environmental Chemistry* 97: 1331-1341
- Ulbrich AV, Souza JRP, Shaner D** (2005) Persistence and carryover effect of imazapic and imazapyr in Brazilian cropping systems. *Weed Technology* 19: 986-991
- Umbarger HE, Brown B** (1958) Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VIII. Formation of acetolactate. *Journal of Biological Chemistry* 233: 1156-1160
- Valavanidis A, Vlachogianni T** (2011) Agricultural pesticides: ecotoxicological studies and environmental risk assessment. *Science advances on Environment, Toxicology and Ecotoxicology issues* <http://chem-tox-ecotox.org/wp/?p=645>
- Vazquez S, Agha R, Granado A, Sarro MJ, Esteban E, Penalosa JM, Carpena RO** (2006) Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water Air and Soil Pollution* 177: 349-365
- Vega T, Breccia G, Nestares G, Mayor ML, Zorzoli R, Picardi L** (2009) Soil-less bioassays for early screening for resistance to imazapyr in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pest Management Science* 65: 991-995
- Velazquez E, R. Silva L, Peix A** (2010) Legumes: a healthy and ecological source of flavonoids. *Current Nutrition and Food Science* 6: 109-144
- Verkleij JaC, Golan-Goldhirsh A, Antosiewisz DM, Schwitzguebel JP, Schroeder P** (2009) Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany* 67: 10-22
- Villeneuve A, Larroudé S, Humbert JF**, (2011) Herbicide contamination of freshwater ecosystems: impact on microbial communities. En: *Pesticides: formulations, effects, fate*, Stoytcheva M (eds), pp 285-319. InTech, Rijeka, Croatia
- Vischetti C, Casucci C, Perucci P** (2002) Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and benfluralin degradation. *Biology and Fertility of Soils* 35: 13-17
- Vlassak K, Vanderleyden J, Franco A** (1996) Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. *Biology and Fertility of Soils* 21: 61-68
- Vyazmensky M, Sella C, Barak Z, Chipman DM** (1996) Isolation and characterization of subunits of acetohydroxy acid synthase isozyme III and reconstitution of the holoenzyme. *Biochemistry* 35: 10339-10346
- Warren GF** (1998) Spectacular increases in crop yields in the United States in the twentieth century. *Weed Technology* 12: 752-760
- Wehtje G, Walker RH, Shaw JN** (2000) Pesticide retention by inorganic soil amendments. *Weed Science* 48: 248-254
- Wei G, Yu J, Zhu Y, Chen W, Wang L** (2008) Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopterus* in mining tailing region. *Journal of Hazardous Materials* 151: 111-117
- Weinstock O, Sella C, Chipman DM, Barak Z** (1992) Properties of subcloned subunits of bacterial acetohydroxy acid synthases. *Journal of Bacteriology* 174: 5560-5566
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ** (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703

- Weller SC, Warren GF**, (1995) Superoxide generators and protoporphyrinogen oxidase inhibitors (Paraquat and Diquat). En: *Herbicide action course*, Weller SC, Warren GF (eds), pp 787. Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA
- Westerfeld WW** (1945) A colorimetric determination of blood acetoin. *Journal of Biological Chemistry* 161: 495-502
- Weyens N, Van Der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J** (2009a) Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology* 27: 591-598
- Weyens N, Van Der Lelie D, Taghavi S, Vangronsveld J** (2009b) Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 248-254
- Wittenbach VA, Abell LM**, (1999) Inhibition of valine, leucine e isoleucine biosynthesis. En: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*, Singh BK (eds), pp 385-416. Dekker, New York, USA
- Wolfenden J, Robinson DC, Cape JN, Paterson IS, Francis BJ, Mehlhorn H, Wellburn AR** (1988) Use of carotenoid ratios, ethylene emissions and buffer capacities for the early diagnosis of forest decline. *New Phytologist* 109: 85-95
- Woodard G, Ofner RR, Montgomery CM** (1945) Accumulation of DDT in the body fat and its appearance in the milk of dogs. *Science* 102: 177-178
- Xu L, Teng Y, Li Z-G, Norton JM, Luo Y-M** (2010) Enhanced removal of polychlorinated biphenyls from alfalfa rhizosphere soil in a field study: the impact of a rhizobial inoculum. *Science of The Total Environment* 408: 1007-1013
- Yamchi A, Jazii FR, Mousavi A, Karkhane AA** (2007) Proline accumulation in transgenic tobacco as a result of expression of *Arabidopsis* δ -(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during osmotic stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 16: 9-15
- Yao Y, Harner T, Blanchard P, Tuduri L, Waite D, Poissant L, Murphy C, Belzer W, Aulagnier F, Sverko E** (2008) Pesticides in the atmosphere across Canadian agricultural regions. *Environmental Science and Technology* 42: 5931-5937
- Yemm EW, Cocking EC** (1955) The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* 80: 209-213
- Young TE, Ling J, Geisler-Lee CJ, Tanguay RL, Caldwell C, Gallie DR** (2001) Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiology* 127: 777-791
- Zabalza A, Gaston S, Maria Sandalio L, Alfonso Del Rio L, Royuela M** (2007) Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. *Environmental and Experimental Botany* 59: 150-159
- Zabalza A, Gaston S, Ribas-Carbo M, Orcaray L, Igal M, Royuela M** (2006) Nitrogen assimilation studies using N-15 in soybean plants treated with imazethapyr, an inhibitor of branched-chain amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8818-8823
- Zabalza A, Gonzalez EM, Arrese-Igor C, Royuela M** (2005) Fermentative metabolism is induced by inhibiting different enzymes of the branched-chain amino acid biosynthesis pathway in pea plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7486-7493
- Zabalza A, Orcaray L, Gaston S, Royuela M** (2004) Carbohydrate accumulation in leaves of plants treated with the herbicide chlorsulfuron or imazethapyr is due to a decrease in sink strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7601-7606
- Zabalza A, Orcaray L, Igal M, Schauer N, Fernie AR, Geigenberger P, Van Dongen JT, Royuela M** (2011) Unraveling the role of fermentation in the mode of action of acetolactate synthase inhibitors by metabolic profiling. *Journal of Plant Physiology* 168: 1568-1575

- Zawoznik MS, Tomaro ML** (2005) Effect of chlorimuron-ethyl on *Bradyrhizobium japonicum* and its symbiosis with soybean. *Pest Management Science* 61: 1003-1008
- Zhang C, Xu J, Liu X, Dong F, Kong Z, Sheng Y, Zheng Y** (2010) Impact of imazethapyr on the microbial community structure in agricultural soils. *Chemosphere* 81: 800-806
- Zhang F, Jin ZL, Naeem MS, Ahmed ZI, Gong HJ, Lu L, Ye QF, Zhou WJ** (2009) Spatial and temporal changes in acetolactate synthase activity as affected by new herbicide ZJ0273 in rapeseed, barley and water chickweed. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95: 63-71
- Zhang WJ, Jiang FB, Ou JF** (2011) Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 1: 125-144
- Zhao JM, Williams CC, Last RL** (1998) Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. *Plant Cell* 10: 359-370
- Zhao LX, Liu CG, Fu Y, Xing ZY, Ye F, Gao S** (2012) Induction of maize glutathione S-transferase by herbicide safener and their effect on enzyme activity against chlorsulfuron. *Advanced Materials Research* 518 - 523: 5480-5483
- Zhou Q, Liu W, Zhang Y, Liu KK** (2007) Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89: 89-96
- Zobiole LHS, Oliveira RS, Jr., Kremer RJ, Constantin J, Yamada T, Castro C, Oliveira FA, Oliveira A** (2010) Effect of glyphosate on symbiotic N₂ fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. *Applied Soil Ecology* 44: 176-180
- Zohary D, Hopf M**, (2000) Common vetch. En: *Domestication of plants in the Old World*, Zohary D, Hopf M, Weiss E (eds), pp 119. University Press, Oxford, UK
- Zúñiga D** (1997). Contribución relativa de los simbioses en la fijación de nitrógeno por *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino. Tesis Doctoral Granada: Universidad de Granada.
- Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, Van Wijk KJ** (2008) Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *Plos One* 3



GRUPO DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA

