

Aktivnost ALS enzima kod *Xanthium strumarium* L. i *Helianthus annuus* L. pod uticajem nikosulfurona

Dragana Božić^{1*}, Sava Vrbničanin¹, Miroljub Barać¹, Marija Sarić-Krsmanović²

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Beograd-Zemun, Srbija; ²Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Banatska 31b, 11080 Beograd-Zemun, Srbija

*e-mail:dbozic@agrif.bg.ac.rs

REZIME

Aktivnost ALS enzima ekstrahovanog iz listova populacija *Xanthium strumarium* L. (XS1, XS2) i *Helianthus annuus* L. (HA1, HA2, HA3) je ispitivana *in vitro* u prisustvu različitih koncentracija (0; 0,01; 0,1; 1; 10, 100 μ M) nikosulfurona. Ova aktivnost je određena na osnovu akumulacije acetoina po mg proteina u toku vremenskog perioda od 1 min (nmol acetoin/min/mg protein).

Nikosulfuron je redukovao aktivnost ALS enzima u svim ispitivanim populacijama, pri čemu je nivo redukcije zavisio od populacije i koncentracije herbicida. Potvrđeno je da razlike u osetljivosti populacija *X. strumarium* na nikosulfuron nisu posledica izmenjene aktivnosti ALS enzima, dok se razlike u osetljivosti populacija *H. annuus* mogu dovesti u vezu sa njegovom izmenjenom aktivnošću.

Ključne reči: *Xanthium strumarium* L.; *Helianthus annuus* L.; aktivnost ALS enzima; acetoin; nikosulfuron.

UVOD

Acetolaktat sintetaza (ALS), tj. acetohidroksi-kisela sintetaza (AHAS) je prvi zajednički enzim u biosintezi aminokiselina valina, leucina i izoleucina, koji katalizuje dve paralelne reakcije: (1) kondezaciju dva molekula piruvata u acetolaktat i (2) jednog molekula piruvata sa jednim molekulom 2-oksibutirata u acetohidroksibutirat (Singh et al., 1988). Acetolaktat je prekursor u sintezi valina i leucina, dok je acetohidroksibutirat prekursor u sintezi izoleucina. Herbicidi ALS inhibitori sprečavaju sintezu ove tri aminokiseline u osetljivim biljkama tako

što onemogućavaju ALS enzim da katalizuje navedene reakcije, usled čega se zaustavlja sinteza proteina i smanjuje translokacija produkata fotosinteze u meristeme. Kao posledica toga, dolazi do brzog prestanka ćelijske deobe u meristemskim tkivima i zaustavljanja rasta biljaka. Takođe, utvrđeno je da dolazi i do inhibicije sinteze DNA i povećanja sadržaja slobodnih aminokiselina. Navedene promene kod osetljivih biljaka prouzrokuju oštećenja u vidu nekroze apikalnih meristema, što u slučaju primene ovih herbicida preko zemljišta zaustavlja rast biljaka, a u slučaju folijarne primene dovodi do pojave ljubičaste boje duž središnjeg lisnog nerva.

Mnoge gajene i korovske vrste su tolerantne na herbicide ALS inhibitore, pri čemu se prirodna tolerantnost gajenih i korovskih vrsta na ovu grupu herbicida objašnjava njihovom brзом detoksikacijom. Nasuprot tome, tolerantnost hibrida suncokreta na herbicide ALS inhibitore (imazetapir, imazamoks, tribenuron-metil) je zasnovana na smanjenoj osetljivosti ALS enzima (Vrbničanin i sar., 2008; Božić i sar., 2012). Takođe, u većini slučajeva rezistentnost korova na ovu grupu herbicida se pripisuje izmenjenoj formi ALS enzima koja je neosetljiva na herbicide (Hanson et al., 2004; Park and Mallory-Smith, 2004) što rezistentnim populacijama omogućava da prežive njihovu primenu, dok je povećani metabolizam herbicida u biljkama znatno ređi mehanizam rezistentnosti (Fischer et al., 2000; Osuna et al., 2002).

Ispitivanje aktivnosti ALS enzima je metoda koja se, sa raznim modifikacijama, veoma često koristi za detekciju rezistentnih biotipova korova na herbicide ALS inhibitore, pri čemu se aktivnosti ALS enzima može odrediti primenom dva različita metoda postupka. Naime, uticaj herbicida ALS inhibitora na aktivnost ALS enzima je moguće analizirati *in vitro*, tj. nakon njegove ekstrakcije iz biljnog materijala (Fischer et al., 2000; Rashid et al., 2003) i *in vivo*, tj. pre njegove ekstrakcije iz biljnog materijala (Lovell et al., 1996; Hanson et al., 2004). Obe navedene metode su zasnovane na praćenju akumulacije acetoina pod uticajem ALS inhibitora.

Nikosulfuron je selektivni herbicid iz grupe sulfonilurea koji efikasno suzbija jednogodišnje i višegodišnje travne i neke širokolisne korove u kukuruзу. Kada su u pitanju širokolisne korovske vrste, *Amaranthus retroflexus* L. i *Polygonum pensylvanicum* L. su izrazito osetljivi na ovaj herbicid, dok je njegova efikasnost za *Chenopodium album* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., *Abutilon theophrasti* Medik., *Xanthium strumarium* L. i *Solanum ptycanthum* L. veoma slaba (Lueschen et al., 1992). Ipak, Božić i sar. (2013) su utvrdili da nikosulfuron značajno redukuje biološku produkciju *X. strumarium*, pri čemu ispoljava veći uticaj na vegetativne parametre nego na produkciju plodova. Takođe, Božić i sar. (2011) su potvrdili različite reakcije ove vrste i korovske forme *H. annuus* na nikosulfuron koje su zavisile od populacije, količine primene herbicida i parametra koji je analiziran. S obzirom da su u njihovom istraživanju reakcije ove dve vrste ispitivane na nivou vegetativnih parametara, cilj istraživanja u ovom radu je bio da se ispita uticaj nikosulfurona na aktivnost ALS enzima ekstrahovanog iz biljaka ovih vrsta.

MATERIJAL I METODE

Semena 2 populacije *X. strumarium* (XS1, XS2) i 3 populacije korovske forme *H. annuus* (HA1, HA2, HA3) su prikupljena tokom jeseni 2005. godine na lokalitetima Oplanić, Padinska Skela i Surčin. Populacije XS1 i HA1 potiču sa površina koje nikada nisu bile izložene primeni herbicida, dok su ostale populacije bile izložene višegodišnjoj (XS2 i HA2 – 6 godina; HA3 – 3 godine) primeni herbicida ALS inhibitora. Sakupljeno semen je posejano u komercijalni supstrat (Flora Gard TKS1, Germany) u plastične saksije površine 38cm². Saksije su držane u fitotronu pri sledećim uslovima: fotoperiod 16h/8h, temperatura 24°C, vlažnost 60-70% i intenzitet svetlosti 300 µE/m²s i redovno zalivane kako bi se održala zadovoljavajuća vlažnost zemljišta.

Aktivnost ALS enzima *in vitro* je ispitivana po proceduri koju su opisali Ray (1984) i Singh (1988) uz izvesne modifikacije. U fazi dva para razvijenih listova sveži listovi su ubrani sa biljaka i enzim je ekstrahovan u ledu, kako bi se izbegla njegova aktivnost u tom periodu. Po 2 g lisnog tkiva je homogenizovano u 6 ml hladnog ekstrakcionog pufera (K₂HPO₄, 0,1 M, pH 7,5; natrijum piruvat, 1 mM; tiamin pirofosfat, 0,5 mM; MgCl₂, 0,5 mM; flavin adenin dinukleotid (FAD), 10 µM i glicerol, 100 ml l⁻¹), a zatim je homogenat filtriran kroz gazu i centrifugiran 25 minuta na 14000 g. Taloženje enzima iz supernatanta je obavljeno dodavanjem (NH₄)₂SO₄ (0,33 mg ml⁻¹) uz blago mućkanje, nakon čega je supernatant ostavljen 20 minuta na sobnoj temperaturi. Rastvor je zatim centrifugiran 25 minuta na 14000 g. Nakon odbacivanja supernatanta, talog je rastvoren u 2,5 ml resuspenzionog pufera (K₂HPO₄, 0,12 M, pH 7,0; natrijum piruvat, 20 mM i MgCl₂, 0,5 mM) i deo rastvora (2 x 100 µl) je odvojen za određivanje koncentracije proteina.

Aktivnost ALS je ispitivana u reakcionoj mešavini zapremine 0,5 ml koja je dobijena od 0,1 ml pripremljenog rastvora enzima i reakcionog pufera (K₂HPO₄, 20 mM, pH 7,0; natrijum piruvat, 20 mM; tiamin pirofosfat, 0,5 mM; MgCl₂, 0,5 mM; flavin adenin dinukleotid (FAD), 10 µM) koji je sadržao različite koncentracije (0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µM) nikosulfurona. Navedena mešavina je inkubirana 1h na 30°C, nakon čega je reakcija zaustavljena dodavanjem 0,05 ml H₂SO₄ (6N). Zatim je dodato 0,5 ml kreatina (5g l⁻¹ vode) i rastvor je inkubiran 15 minuta na 60°C. Dodata sumporna kiselina je zaustavila reakciju, a inkubacija na 60°C je dovela do dekarboksilacije acetolaktata (produkta ALS enzima) u acetoin. Acetoin je detektovan kao obojeni kompleks (A_{525nm}) koji se formira nakon dodatka 0,5 ml α-naftola (50 g l⁻¹ sveže pripremljenog u 2,5 N NaOH) i inkubacije 15 minuta na 60°C. Vrednosti absorbanci koje su očitane pri talasnoj dužini od 525 nm u sadržaj acetoina su prevedene pomoću standardne krive, za čije dobijanje je korišćen komercijalni acetoin (Alfa Aesar, UK).

Sadržaj ALS enzima određen je metodom po Bradford-u (1976), tako što je Coomassie brilliant blue G-250 koji ima dve forme (crvenu i plavu) dodat rastvoru proteina (u ovom slučaju ALS enzima). Usled njegovog vezivanja za protein crvena forma (maksimum apsorpcije 465 nm) se konvertuje u plavu, pri čemu se maksimum apsorpcije pomera na 595 nm. Kompleks protein-boja se obrazuje nakon 2 minuta, a stabilan je u rastvoru do 60 minuta, a apsorbanca reakcione meše zavisi od koncentracije proteina u rastvoru.

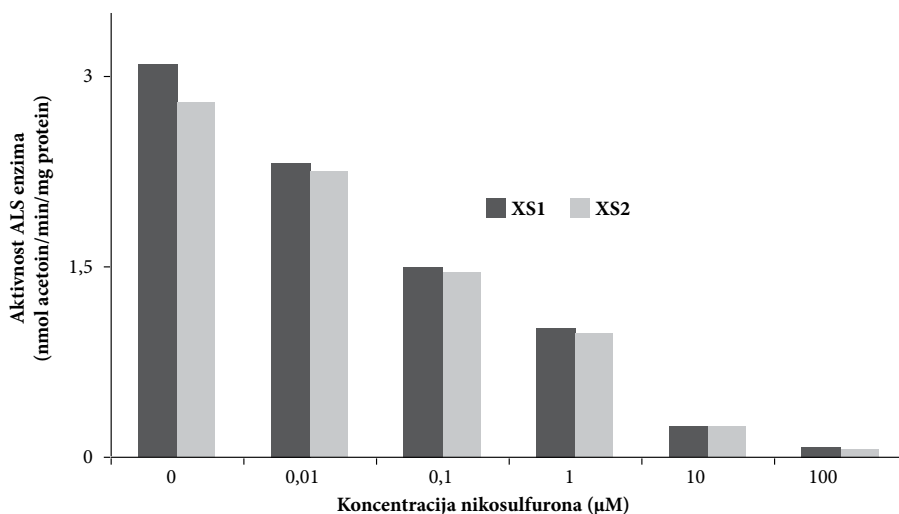
Rastvori ALS enzima za utvrđivanje njegovog sadržaja pripremljeni su za ispitivanje aktivnosti enzima po napred opisanoj proceduri, pri čemu je deo tih rastvora (2 x 100 µl) od svakog uzorka korišćen za analizu. Standardna kriva je napravljena na osnovu apsorbanci pet rastvora različitih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA): 0 µg ml⁻¹, 50 µg ml⁻¹, 100 µg ml⁻¹, 200 µg ml⁻¹, 300 µg ml⁻¹ u fosfatnom puferu (K₂HPO₄, 0,1 M, pH 7,0). U sve probe (uzorci ispitivanog enzima i rastvori BSA) je dodato po 5 ml rastvora Coomasie brilliant blue G-250. Ovaj rastvor je unapred pripremljen rastvaranjem 100 mg Coomasie brilliant blue G-250 u 50ml 95% etanola, uz dodatak 100 ml 85% (konc. H₃PO₄). Nakon dodatka rastvora Coomasie brilliant blue G-250 probe su izmešane, a zatim ostavljene na sobnoj temperaturi 25 minuta. Nakon razvijanja boje, na 595 nm je merena apsorbancia pomoću spektrofotometra. Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbanci za rastvore BSA konstruisana je standardna kriva na osnovu koje je izračunat sadržaj ALS enzima u rastvoru.

Aktivnost ALS enzima za svaku populaciju je ispitivana u četiri ponavljanja za svaku od napred navedenih koncentracija herbicida. Dobijeni podaci su statistički obrađeni pomoću LSD i t-testa u softverskom paketu STATISTIKA*5.0. I₅₀ vrednosti i indeksi rezistentnosti (IR) su izračunati u „R“ softveru i „drc“ paketu (<http://mirrors.dotsrc.org/cran>).

REZULTATI I DISKUSIJA

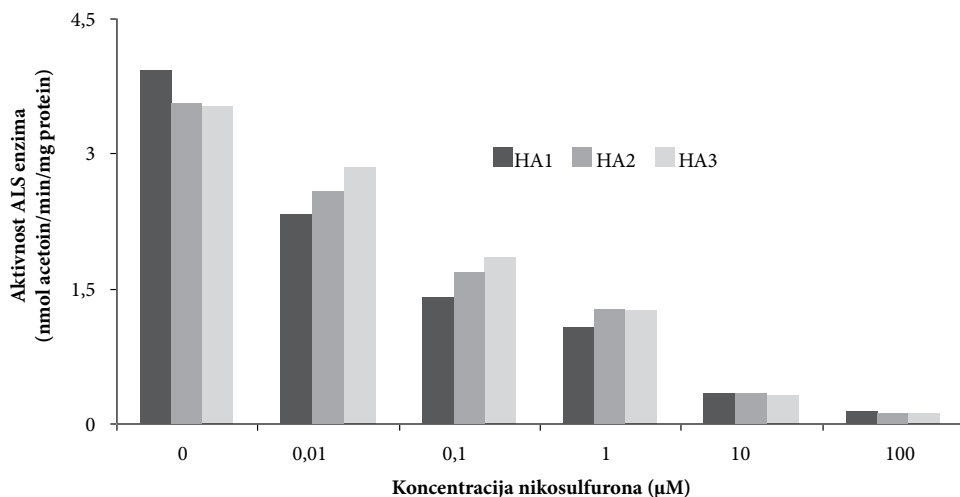
Aktivnost ALS enzima u prisustvu različitih koncentracija nikosulfurona *in vitro* određena je na osnovu akumulirane količine acetoina po mg proteina u toku vremenskog perioda od 1 min (nmol acetoin/min/mg protein). Naime, aktivnost ALS enzima pod uticajem nikosulfurona je analizirana kako bi se utvrdilo da li su razlike u reakcijama populacija *X. strumarium* (XS1, XS2) i korovske forme *H. annuus* (HA1, HA2, HA3) na ovaj herbicid utvrđene u odnosu na svežu i suhu masu biljaka i površinu listova (Božić i sar., 2011) povezane sa razlikama u aktivnosti ovog enzima. Inače, ispitivanje aktivnosti ovog enzima je znatno osetljivija metoda od praćenja morfoloških parametara, ali je validna samo u slučaju kada je mehanizam rezistentnosti smanjena osetljivost ALS enzima prema herbicidima ALS inhibitorima.

Na osnovu rezultata (Grafikon 1) koji se odnose na aktivnost ALS enzima ekstrahovanog iz listova populacija XS1 i XS2 *X. strumarium* u prisustvu različitih koncentracija nikosulfurona (0,01; 0,1; 1; 10; 100 µM) jasno je uočljivo da je u svim tretmanima aktivnost ovog enzima bila neznatno veća kod populacije XS1 nego kod populacije XS2. Osim toga, produkcija acetoina, odnosno aktivnost ALS enzima kod obe populacije se smanjivala sa povećanjem koncentracije herbicida. Naime, aktivnost enzima kod populacije XS1 je inhibirana za 24,79-97,44%, a kod populacije XS2 za 19,49-97,39% u zavisnosti od tretmana, pri čemu su za obe populacije pomoću LSD testa utvrđene statistički veoma značajne razlike (P<0,01) između svih analiziranih tretmana (uključujući i kontrolni). Međusobnim poređenjem populacija XS1 i XS2 pomoću t-testa, utvrđeno je da se aktivnost ALS enzima ovih populacija statistički veoma značajno (P<0,01) prazlikuje u odsustvu herbicida, dok u tretmanima koji sadrže različite koncentracije nikosulfurona nije bilo značajnih razlika (P>0,05).



Grafikon 1. Aktivnost ALS enzima populacija *X. strumarium* u prisustvu različitih koncentracija nikosulfurona

Aktivnost ALS enzima iz listova tri populacije *H. annuus* (HA1, HA2, HA3) u odsustvu nikosulfurona je bila manja od aktivnosti ovog enzima ekstrahovanog iz listova *X. strumarium*. Ipak, kao i u slučaju *X. strumarium*, aktivnost ALS enzima iz sve tri populacije *H. annuus* je opadala sa povećanjem koncentracije nikosulfurona. Naime, različite koncentracije ovog herbicida (0,01; 0,1; 1; 10; 100 µM) veoma značajno ($P < 0,01$) su inhibirale aktivnost ALS enzima izolovanog iz listova navedenih populacija (Grafikon 2). Aktivnost enzima ekstrahovanog iz listova populacije HA1 je bila smanjena za 40,69-96,39% (u zavisnosti od koncentracije herbicida) u odnosu na kontrolu, dok se inhibicija aktivnosti enzima u populaciji HA2 kretala od 27,74 do 96,47%, a u populaciji HA3 od 19,33 do 96,51%. Poređenjem aktivnosti enzima u prisustvu različitih koncentracija nikosulfurona utvrđeno je da se kod sve tri populacije tretmani koji sadrže herbicid međusobno razlikuju veoma značajno ($P < 0,01$). Poređenjem pomoću t-testa očekivano rezistentnih populacija (HA2, HA3) sa osetljivom (HA1) utvrđeno je da se navedene populacije u pojedinim tretmanima razlikuju, a u pojedinim ne razlikuju u odnosu na aktivnost ALS enzima. Dakle, u kontroli i tretmanima koji sadrže 0,1 i 1 µM nikosulfurona aktivnost ovog enzima ekstrahovanog iz listova populacija HA2 i HA1 se razlikovala veoma značajno ($P < 0,01$), dok u ostalim tretmanima značajnih razlika ($P > 0,05$) nije bilo. Međusobnim poređenjem aktivnosti enzima iz listova populacija HA3 i HA1 potvrđena je statistički značajna razlika ($P = 0,012$) za tretman koji sadrži 1 µM nikosulfurona, a statistički veoma značajna razlika ($P < 0,01$) za kontrolni i tretmane koji sadrže 0,01 i 0,1 µM ovog herbicida, dok značajnih razlika između ostalih tretmana nije bilo.



Grafikon 2. Aktivnost ALS enzima populacija *H. annuus* u prisustvu različitih koncentracija nikosulfurona

Kada su u pitanju indeksi rezistentnosti (Tabela 1), poređenjem I_{50} vrednosti utvrđeno je da je ALS enzim populacije XS2 1,33 puta manje osetljiv na dejstvo nikosulfurona od ovog enzima ekstrahovanog iz listova populacije XS1. Nasuprot tome, Sprague et al. (1997) su za 5 pretpostavljeno rezistentnih populacija *X.strumarium* utvrdili znatno viši nivo rezistentnosti (>390 puta) prema imazetapiru na osnovu vizuelne ocene fitotoksičnosti. Takođe, isti istraživači tvrde da je rezistentnost *X.strumarium* prema imazetapiru zasnovana na izmenjenoj aktivnosti enzima, pri čemu je ova aktivnost *in vivo* bila 210-1200 puta veća kod rezistentnih u odnosu na osetljive populacije. Suprotno ovome, Lee and Owen (2000) su ukazali na znatno niži nivo rezistentnosti (IR=1,00-12,00) populacija iste vrste prema imidazolinonima na osnovu aktivnosti ALS enzima *in vivo*. U slučaju *H. annuus* se pokazalo da je ALS enzim ekstrahovan iz populacije HA2 3,80, a iz populacije HA3 6,13 puta manje osetljiv na nikosulfuron od enzima iz populacije HA1. Mada je vrednosti ovog indeksa obično znatno veća za aktivnosti ALS enzima nego za morfološke parametre (Sibony et al., 2001; Hanson et al., 2004; Maertens et al., 2004), IR u odnosu na aktivnosti ALS enzima *in vitro* kod populacija XS2 je bio niži nego IR koje su Božić i sar. (2011) za istu populaciju utvrdili u odnosu na morfološke parametre (sveža masa: 1,81; suva masa: 2,78; površina listova: 2,70). Slično tome, Hanson et al. (2004) su utvrdili da se osetljivost dve populacije *Camelina microcarpa* Andrzej prema hlorsulfuronu u odnosu na suhu masu razlikuje 10 000 puta, a u odnosu na aktivnost ALS enzima *in vivo* 111 puta. Takođe, rezistentna populacija *Conyza albida* Willd. je bila 300 puta manje osetljiva prema imazapiru od osetljive u odnosu na svežu masu, a u odnosu na aktivnost ALS enzima *in vitro* 4 puta (Osuna and

De Prado, 2003). S druge strane, ima slučajeva da su IR za morfološke parametre i za aktivnost ALS enzima imali sličnu vrednost (Sibony et al., 2001). Takav slučaj je bio i sa populacijama *H. annuus* čiji indeksi rezistentnosti određeni u odnosu na aktivnost ALS enzima (HA2: 3,80; HA3: 6,13) su imali neznatno veće vrednosti nego IR za morfološke parametre (0,81-2,55; Božić i sar., 2011). Dakle, bez obzira na to što IR za populacije *H. annuus* imaju niske vrednosti, razlike u osetljivosti prema nikosulfuronu između pretpostavljeno rezistentnih i osetljive populacije se mogu dovesti u vezu sa smanjenom osetljivošću ALS enzima, što je najčešći mehanizam rezistentnosti u odnosu na ovu grupu herbicida (Merotto et al., 2009; Osuna and De Prado, 2003; Park and Mallory-Smith, 2004).

Tabela 1. Reakcije populacija *X. strumarium* i *H. annuus* (I_{50} i IR) na nikosulfuron u odnosu na aktivnost ALS enzima

Vrsta	Populacija	$I_{50} \pm SE (\mu M)$	IR
<i>X. strumarium</i>	XS1	0,12±0,02	
	XS2	0,16 ±0,03	1,33
	HA1	0,03±0,01	
<i>H. annuus</i>	HA2	0,11±0,02	3,80
	HA3	0,17±0,03	6,13

Mada je više istraživača potvrdilo da je mehanizam rezistentnosti *X.strumarium* prema herbicidima ALS inhibitorima smanjena osetljivost ALS enzima (Bernasconi et al., 1995; Sprague et al., 1997), to nije potvrđeno u ovim istraživanjima. Naime, u slučaju vrste *X.strumarium* nisu utvrđene značajnije razlike u aktivnosti ALS enzima u prisustvu nikosulfurona između pretpostavljeno rezistentne i osetljive populacije (IR=1,33), što ukazuje da razlike u osetljivosti prema nikosulfuronu između navedenih populacija utvrđene na osnovu morfoloških parametara (Božić i sar., 2011) nisu posledica izmenjene aktivnosti ALS enzima, već nekog drugog mehanizma rezistentnosti. Slično tome, Park and Mallory-Smith (2004) su utvrdili da je rezistentnost jedne populacije *Bromus tectorum* L. prema različitim ALS inhibitorima zasnovana na izmenjenoj aktivnosti ALS enzima, dok u slučaju druge populacije rezistentnost prema istim herbicidima nije bila zasnovana na istom mehanizmu. U tom slučaju indeksi rezistentnosti te populacije (prema različitim ALS inhibitorima) u odnosu na suhu masu su iznosili 9-40, a u odnosu na aktivnost ALS enzima 0,7-1,4.

ZAKLJUČAK

Aktivnost ALS enzima ekstrahovanog iz različitih populacija *X. strumarium* (XS1, XS2) i korovske forme *H. annuus* (HA1, HA2, HA3) je redukovana pod uticajem nikosulfurona, pri čemu je nivo redukcije zavisio od populacije i koncentracije herbicida. U slučaju populacija *X. strumarium* se pokazalo da razlike u osetljivosti ovih populacija na nikosulfuron nisu posledica izmenjene aktivnosti ALS enzima, dok se razlike u osetljivosti populacija *H. annuus* mogu dovesti u vezu sa razlikama u osetljivosti ovog enzima.

ZAHVALNICA

Publikovanje ovih rezultata podržali su projekti III 46008 i EU FP7-REGPOT-AREA.

LITERATURA

- Bernasconi, P., Woodworth, R.A., Rosen, B.A., Subramanian, M.V., Siehl, D.L.:** A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 17381-17385, 1995.
- Božić, D., Sarić, M., Malidza, G., Ritz, C., Vrbnicanin, S.:** Resistance of sunflower hybrids to imazamox and tribenuron-methyl. *Crop Protection*, 39, 1-10, 2012.
- Božić, D., Sarić, M., Elezović, I., Vrbnicanin, S.:** Reakcije populacija *Xanthium strumarium* L. i *Helianthus annuus* L. na nikosulfuron. *Acta herbologica*, 20, 15-24, 2011.
- Božić, D., Sarić-Krsmanović, M., Pavlović, D., Vrbnicanin, S.:** Effect of nicosulfuron on plant traits of *Xanthium strumarium*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120, 233–237, 2013.
- Bradford, M.M.:** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein–Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 255-260, 1976.
- Fischer, A.J., Bayer, D.E., Carriere, M.D., Ateh, C.N., Yim K.-O.:** Mechanisms of Resistance to Bispyribac- Sodium in an *Echinochloa phyllopogon* accession. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68, 156-165, 2000.
- Hanson, B.D., Park, K.W., Mallory-Smith, C.A., Till, D.C.:** Resistance of *Camelina microcarpa* to acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Weed Research*, 44, 187-194, 2004.
- <http://mirrors.dotsrc.org/cran>
- Lee, M.L., Owen, M.D.K.:** Comparison of acetolactate synthase enzyme inhibition among resistant and susceptible *Xanthium strumarium* biotypes. *Weed Science*, 48, 286-290, 2000.
- Lovell, S.T., Wax, L.M., Simpson, D.M., McGlamery, M.:** Using the in Vivo Acetolactate Synthase (ALS) Assay for Identifying Herbicide-Resistant Weeds. *Weed Technology*, 10, 936- 942, 1996.
- Lueschen, W.E., Hoverstad, T.R., Gonsolus, J.L.:** Wild-proso millet control in corn in 1992. *Research Report North Central Weed Science Society*, 49,122-123, 1992.
- Maertens, K.D., Sprague, C.L., Tranel, P.J., Hines, R.A.:** *Amaranthus hybridus* populations resistant to triazine and acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Research*, 44, 21-26, 2004.
- Merotto, A.Jr., Jasieniuk, M., Osuna, M.D., Vidotto, F., Ferrero, A., Fischer, A.J.:** Cross-Resistance to Herbicides of Five ALS-Inhibiting Groups and Sequencing of the ALS Gene in *Cyperus difformis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1389–1398, 2009.
- Osuna, M.D., De Prado, R.:** *Conyza albida*: a new biotype with ALS inhibitor resistance. *Weed Research*, 43, 221-226, 2003.

- Osuna, M.D., Vidotto, F., Fischer, A.J., Bayer, D.E., Prado, R.D., Ferrero, A.:** Cross- resistance to Bispyribac-sodium and bensulfuron- methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 73, 9-17, 2002.
- Park, K.W., Mallory-Smith, C.A.:** Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotypes. Weed Research 44, 71-77, 2004.
- Rashid A., Newman, J.C., O' Donovan, J.T., Robinson, D., Maurices, D., Poisson, D., Hall, L.M.:** Sulfonylurea herbicide resistance in *Sonchus asper* biotypes in Alberta, Canada. Weed Research, 43, 214-220, 2003.
- Ray, T.B.:** Site of Action of Chlorsulfuron. Plant Physiology, 75, 827-831, 1984.
- Sibony, M., Michel, A., Haas, H.U., Rubin, B., Hurle, K.:** Sulfometuron- resistant *Amaranthus retroflexus*: cross-resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase- inhibiting herbicides. Weed Research, 41, 509- 522, 2001.
- Singh, B.K., Stidham, M.A., Shaner, D.L.:** Assay of Acetohydroxyacid Synthase. Analytical Biochemistry, 171, 173-179, 1988.
- Sprague, C.L., Stoller, E.W., Wax, L.M.:** Common Cocklebur (*Xanthium strumarium*) Resistance to Selected ALS-Inhibiting Herbicides. Weed Technology, 11, 241-247, 1997.
- Vrbničanin, S., Božić, D., Malidža, G., Dušanić, N., Pavlović, D., Barać, M.:** Tolerance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to imazethapyr. Helia, 31, 85-94, 2008.

ALS enzyme activity of *Xanthium strumarium* L. and *Helianthus annuus* L. influenced by nicosulfuron

SUMMARY

Activity of ALS enzyme extracted from leaves of *Xanthium strumarium* L. (XS1, XS2) and *Helianthus annuus* L. (HA1, HA2, HA3) populations were studied *in vitro* in the presence of different nicosulfuron concentrations (0; 0,01; 0,1; 1; 10, 100 μ M). This activity was recorded based on accumulation of acetoin per mg of protein during time interval of 1 min (nmol acetoin/min/mg protein).

Nicosulfuron was reduced ALS enzyme activity in all studied populations, wherein the level of reduction depended on population and herbicide concentration. It was confirmed that differences in susceptibility of *X. strumarium* populations to nicosulfuron were not consequence of altered ALS enzyme activity, while differences in susceptibility of *H. annuus* populations can be in relation with its altered activity.

Keywords: *Xanthium strumarium* L.; *Helianthus annuus* L.; ALS enzyme activity; acetoin; nicosulfuron