

## LA RESISTENCIA A GLIFOSATO EN *Echinochloa colona* DEL NORTE DE CALIFORNIA ESTARIA ASOCIADA A MUTACIONES Y A ALTA ACTIVIDAD DE LA EPSPS

GARCIA, M. A. (INIA LE, Uruguay – magarcia@inia.org.uy), DAYAN, F. (USDA-ARS, OleMiss – Mississippi/USA - franck.dayan@ars.usda.gov), WATSON, S. (USDA-ARS, OleMiss – Mississippi/USA - susan.watson@ars.usda.gov), ALARCON-REVERTE, R. (UC Davis, California/USA - ralarconreverte@ucdavis.edu), FISCHER, A. (UC Davis, California/USA - ajfischer@ucdavis.edu)

**RESUMEN:** Tres líneas de *E. colona* resistente a glifosato (R) (EHCOL1, EHCOL2A, EHCOL2B) fueron seleccionadas de poblaciones originadas en una chacra de maíz R y un monte de almendras en el Norte de California (CA). El glifosato había sido usado como la principal herramienta para controlar malezas en ambas situaciones por al menos 6 años. Los objetivos de este trabajo fueron los de confirmar la resistencia a glifosato en las líneas seleccionadas y determinar en las mismas: la actividad de la EPSPS y la presencia o ausencia de mutaciones en el gen *EPSPS* que pudieran afectar el acople del glifosato. Mutaciones puntuales en la posición 106 del gen *EPSPS*, que han sido relacionadas a resistencia a glifosato en otros biotipos de malezas, fueron encontradas en las líneas EHCOL1, EHCOL2A. Mientras que EHCOL1 y EHCOL2B también exhibieron una mayor actividad específica de la EPSPS comparadas con el testigo susceptible a glifosato (S). La actividad de la EPSPS en todas las líneas R fue inhibida en menor grado por el glifosato comparativamente con la actividad de la EPSPS del testigo S. Nuestros resultados indican que mutaciones puntuales en el gen *EPSPS* son el mecanismo primario que confiere resistencia a glifosato en poblaciones de *E. colona* del norte de CA. Sin embargo, una mayor actividad específica de la enzima EPSPS también contribuye en cierta medida a la resistencia.

**Palabras clave:** Resistencia a glifosato, actividad de la EPSPS, mutaciones en el gen *EPSPS*.

### INTRODUCCION

Desde su introducción en 1974, el glifosato ha contribuido significativamente como herramienta para la producción mundial de comida. El glifosato inhibe la enzima 5-enolpyruvylshikimato-3-fosfato-sintasa (EPSPS, por su sigla en inglés), la quinta enzima en la ruta del ácido shikímico. Su eficacia herbicida de amplio espectro, su favorable perfil toxicológico y ambiental, así como su comparativamente menor costo con respecto a otras opciones herbicidas han llevado a denominarlo el herbicida más importante del mundo (DUKE

et al., 2008). Sin embargo, la masiva adopción de glifosato, su uso repetido y la poca rotación con otras opciones herbicidas han llevado a la selección de un número creciente de poblaciones de malezas resistentes a este herbicida (HEAP, 2013), amenazando la eficacia a largo plazo del mismo (DUKE et al., 2009). Entender los mecanismos de resistencia en plantas es por lo tanto un requerimiento prioritario para minimizar la selección de biotipos resistentes, y diseñar e implementar medidas de manejo para controlar estos biotipos; prolongando así el uso sustentable de esta herramienta (GE et al., 2010).

*Echinochloa colona* (L.) Link es una vigorosa gramínea anual C4 y una importante maleza en los principales cultivos irrigados y de secano en más de 60 países (OSTEN et al., 2007; VALVERDE et al., 2000; WIDDERICK et al., 2013). En California (CA), *E. colona* infesta varios cultivos anuales y perennes donde el glifosato es usado regularmente como la principal herramienta para controlar malezas (CADPR, 2009). Poblaciones de *E. colona* resistente a glifosato (R) han sido reportadas en California (ALARCON-REVERTE et al., 2012), Australia (DOLMAN et al., 2009; GAINES et al., 2012; THAI et al., 2012) y Argentina (HEAP, 2013). Sin embargo, los mecanismos de resistencia a glifosato en esta especie aún no están claros.

Los objetivos de este trabajo fueron los de confirmar la resistencia a glifosato en las líneas seleccionadas y determinar en las mismas: la actividad de la EPSPS y la presencia o ausencia de mutaciones en el gen *EPSPS* que pudieran afectar el acople del glifosato.

## MATERIALES Y METODOS

**Material Vegetal.** Tres líneas autofecundadas (EHCOL1, EHCOL2A, EHCOL2B) que fueron seleccionadas de 2 poblaciones colectadas en una chacra donde se había plantado maíz R durante 6 años y un monte frutal de 30 años de edad en el norte de CA. El glifosato había sido usado como la principal herramienta para controlar malezas en ambas situaciones hasta que se comenzaron a detectar fallas en el control de *E. colona*. Una población de *E. colona* susceptible a glifosato (S) colectada a 40 km del monte frutal se utilizó como control (EHCOL4).

**Ensayos de dosis-respuesta.** Las plantas R fueron tratadas con 0, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.8 and 1.6; y las S con 0, 0.02, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 kg ae ha<sup>-1</sup> de glifosato, respectivamente, a comienzo de macollaje (1 a 2 macollos). La mortalidad y peso seco de las plantas fue determinada 21 días post tratamiento (DPT) con glifosato.

**Ensayos de actividad de la EPSPS.** La actividad específica de la EPSPS de las líneas R y la línea S fue determinada en presencia y ausencia de glifosato a través de un ensayo donde se determinó la liberación continua de fosforo inorgánico siguiendo el protocolo descrito por SALAS et al. (2012).

El análisis de los datos de los ensayos de dosis-respuesta y el ensayo de actividad enzimática fueron ajustados según un modelo log-logístico de 3 parámetros (RITZ et al., 2005)

que permitió estimar la dosis de glifosato que causó 50% de reducción de crecimiento ( $GR_{50}$ ), 50% de mortalidad ( $LD_{50}$ ) o 50% de inhibición en la actividad de la EPSPS ( $I_{50}$ ) con respecto a los controles sin tratar.

**Secuenciación del gen *EPSPS*.** Un fragmento de ADN por cada uno de los genomas (A y B) de plantas tetraploides de *E. colona* conteniendo el codón prolina 106 (Pro106) fue amplificado partiendo de ADN genómico y directamente secuenciado. El primer AW1 (Wakelin and Preston, 2006) y el primer homólogo-específico EC1R1 (GGCACTACGCAAGAAAATCC) fueron usados para amplificar un fragmento de 650 pb del *EPSPS* homólogo 1 (genoma A), mientras que los primers dCAPSC-B-F (AACCAGCACTGAAAGGTTTCATC) and EC2R1 (CCATGAAGGTTTTTCTGCGACT) fueron usados para amplificar un fragmento de 880 pb del *EPSPS* homólogo 2 (genoma B). Los primers genoma-específicos EC1R1, dCAPSC-B-F y EC2R1 fueron diseñados en base a polimorfismos dentro de intrones a partir de secuencias de *E. colona* clonadas en un estudio paralelo llevado a cabo en nuestro laboratorio (Alarcón-Reverte et al., manuscrito en preparación).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los ensayos de dosis-respuesta confirmaron claramente la resistencia a glifosato de las líneas R (EHCOL1, EHCOL2A, EHCOL2B) (Figura 1a y 1b).

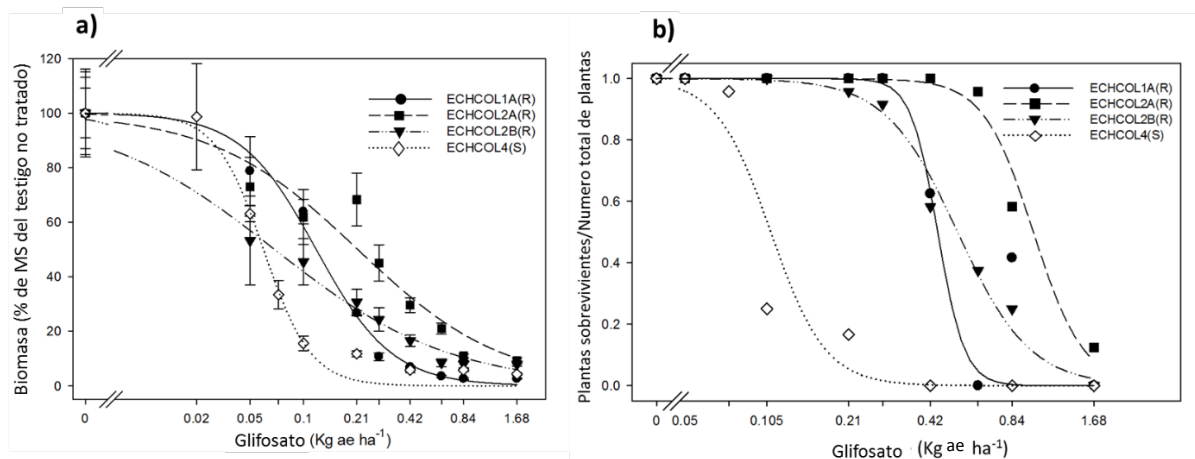


Figure 1. Respuesta a dosis crecientes de glifosato de tres líneas R (EHCOL1A; EHCOL2A; EHCOL2B) y una línea S (EHCOL4) medida como peso seco de la parte aérea (a) y sobrevivencia de las plantas (b). **a)** los símbolos y las barras representan el valor de la media de cada tratamiento  $\pm$  ES de la media ( $n = 6$ ) respectivamente. **b)** los símbolos representan la proporción de individuos que sobrevivieron al tratamiento correspondiente ( $n = 24$ ). Las líneas en ambas figuras representan el crecimiento (a) o la mortalidad (b) predichos de acuerdo a una ecuación log-logística de 3 parámetros.

Los resultados de la secuenciación de un fragmento del gen *EPSPS* indicaron que dos de las líneas R (EHCOL1 y EHCOL2A) presentan una mutación en la posición 106 del gen (Pro106) (Figura 2).

La actividad de la EPSPS de todas las líneas fue inhibida por el glifosato pero la sensibilidad de la enzima de las líneas R y S al herbicida fue diferente (Figura 3). En la ausencia de glifosato las líneas presentaron diferentes niveles basales de actividad de la enzima EPSPS (Figura 4).

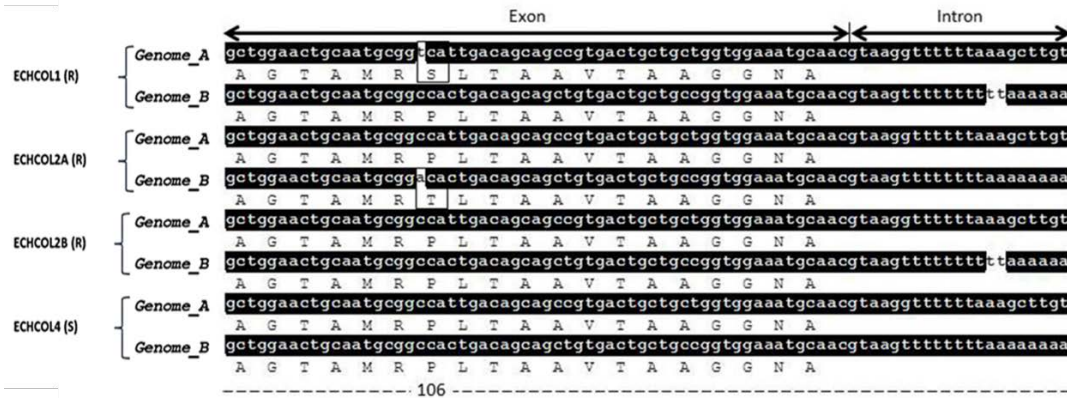


Figura 2. Secuencias de código y aminoácidos de una región conservada del gen EPSPS aislada de ambos genomas (A y B) de líneas R y S de *E. colona* tetraploide de CA. La región amplificada contiene la posición Pro106 (correspondiente a la secuencia del gen EPSPS de *Arabidopsis thaliana*) donde mutaciones puntuales han sido relacionadas a resistencia a glifosato en otros biotipos de malezas.

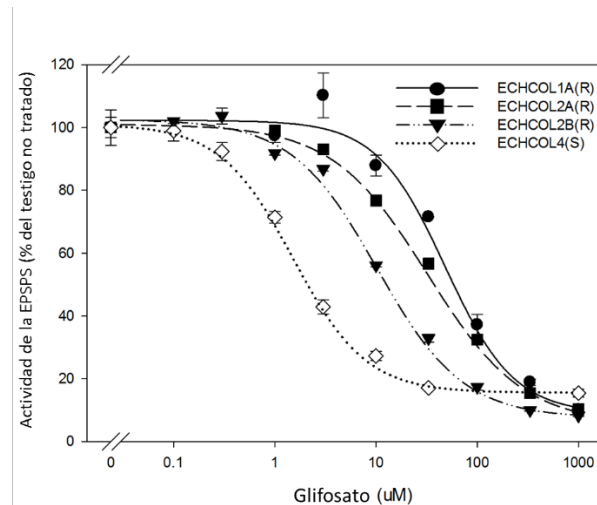


Figure 3. Actividad de la enzima EPSPS expresada como % del testigo sin tratar en extracto de hojas de plantas de tres poblaciones R (ECHCOL1A; ECHCOL2A; ECHCOL2B) y una población S (ECHCOL4) de *E. colona* incubadas en presencia de varias concentraciones de glifosato. Los símbolos y las barras representan medias de los tratamientos  $\pm$  ES de la media ( $n = 3$ ) respectivamente. Las líneas representan la actividad enzimática predicha de acuerdo a una ecuación log-logística de 3 parámetros.

Tomados en conjunto estos resultados indican que la susceptibilidad a glifosato del sitio activo (SA) en estas líneas está afectada por mutaciones en la posición Pro106 del gen EPSPS y por una mayor actividad enzimática basal. Estos mecanismos han sido relacionados individualmente con resistencia a glifosato en otros estudios (JASIENIUK et al., 2008; SALAS

et al., 2012) pero a nuestro entender este es el primer reporte de estos dos mecanismos de resistencia de SA actuando de manera conjunta en un mismo genotipo (EHCOL1).

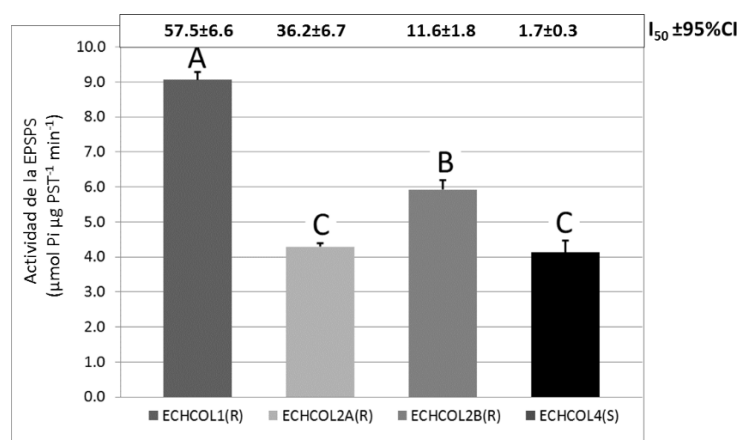


Figura 4. Actividad basal de la EPSPS en extractos de hojas de *E. colona* de 3 líneas R (EHCOL1A; EHCOL2A; EHCOL2B) y una línea S (EHCOL4). Los histogramas representan la media de tres repeticiones por tratamiento y las barras  $\pm$  DE de la media. Los histogramas con la misma letra no son estadísticamente diferente de acuerdo a la DSH de Tukey. Los valores de  $I_{50} \pm 95\%CI$  son presentados arriba de cada histograma.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que mutaciones puntuales en el gen *EPSPS* son el mecanismo primario confiriendo resistencia a glifosato en poblaciones de *E. colona* del norte de CA de plantas R. Sin embargo, una mayor actividad específica de la enzima EPSPS también contribuye en cierta medida a la resistencia.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la junta directiva de investigación en arroz de California por la financiación parcial de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS

ALARCON-REVERTE, R. et al. Resistance to Glyphosate in Junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science** v.61, n.1, p.48-54, 2012.

ALARCON-REVERTE, R. et al. Concerted action of target-site mutations and high EPSPS activity in glyphosate-resistant junglerice (*Echinochloa colona*) from California. Manuscrito en preparación.

CALIFORNIA DEPARTMENT OF PESTICIDE REGULATION (CADPR). Pesticide use reporting 2009. [http://www.cdpr.ca.gov/docs/pur/pur09rep/09\\_pur.htm](http://www.cdpr.ca.gov/docs/pur/pur09rep/09_pur.htm). Revisado 2 de junio de 2014.

DOLMAN, F. et al. Mechanisms of glyphosate resistance in *Echinochloa colona* from Australia. Conferencia de la Weed Science Society of America, 2009. Abstract 49:286.

DUKE, S. O. et al. Glyphosate-resistant crops and weeds: Now and in the future. **AgBioForum** v.12, n.3-4, p.346-357, 2009.

DUKE, S. O. et al. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science** v.64, n.4, p.319-325, 2008.

GAINES, T. A. et al. Evolved Resistance to Glyphosate in Junglerice (*Echinochloa colona*) from the Tropical Ord River Region in Australia. **Weed Technology** v.26, n.3, p.480-484, 2012.

GE, X. et al. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science** v.66, n.4, p.345-348, 2010.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org>. Revisado: 10 de octubre de 2013.

JASIENIUK, M. et al. Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: Distribution, Response to Glyphosate, and Molecular Evidence for an Altered Target Enzyme. **Weed Science** v.56, n.4, p.496-502, 2008.

OSTEN, V. A. et al. Survey of weed flora and management relative to cropping practices in the north-eastern grain region of Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture** v.47, n.1, p.57-70, 2007.

RITZ, C. et al. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistic Software** v.12, n.12, p.1-22, 2005.

SALAS, R. A. et al. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. **Pest Management Science** v.68, n.9, p.1223-1230, 2012.

THAI, H. N. et al. Glyphosate resistance in barnyard grass (*Echinochloa colona*). Proceedings of the 18th Australasian Weeds Conference (2012). Melbourne, Victoria, Australia. p. 237-240, 2012.

VALVERDE, B. E. et al. Prevention and Management of Herbicide Resistant Weeds in Rice: Experiences from Central America with *Echinochloa Colona*. Cámara de Insumos Agropecuarios, Costa Rica, 123 p, 2000. [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org). Revisado: 10 de octubre de 2013.

WAKELIN, A. M. et al. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research** 46: 432-440, 2006.

WIDDERICK, M. J. Control by glyphosate and its alternatives of glyphosate-susceptible and glyphosate-resistant *Echinochloa colona* in the fallow phase of crop rotations in subtropical Australia. **Weed Biology and Management** v.13, n.3, p.89-97, 2013.