

# ***Lolium multiflorum* resistente a glifosato en la Provincia de Buenos Aires: Presentación del Proyecto de estudio**

**Diez de Ulzurrun, Patricia<sup>1</sup>; Gabriela Massa<sup>2</sup>; Feingold, Sergio<sup>2</sup> y María Inés Leaden<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Mar del Plata – Facultad de Ciencias Agrarias – Ruta 226 Km 73,5 - Argentina

<sup>2</sup> Estación Experimental de INTA-Balcarce - Laboratorio de Biotecnología Agrícola - Ruta 226 Km 73,5 - Argentina

## **RESUMEN**

Las variedades de soja RR se liberaron al mercado argentino en 1996, a partir de entonces la superficie sembrada con dicho cultivo creció exponencialmente, junto con el uso del herbicida glifosato. Se sabe que el uso repetido del mismo herbicida provoca una presión de selección sobre las poblaciones vegetales que puede generar resistencia. En el año 2006 se registraron fallas de control a campo de la maleza *Lolium multiflorum* con dicho herbicida en la provincia de Buenos Aires. En varias especies se ha confirmado que variaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos que codifican para la enzima EPSPS confieren resistencia a glifosato. En este trabajo se evaluará la secuencia nucleotídica de amplificaciones en regiones específicas de la enzima EPSPS.

**Palabras clave: EPSPS, glifosato, *Lolium multiflorum*, resistencia.**

## **ABSTRACT**

Glyphosate resistant soybean cultivars were released in Argentina in 1996. Since then the area sowed with it grew exponentially, and, accordingly glyphosate use. The repeated use of a unique herbicide generates a pressure of selection on weed populations and could lead to the appearance of resistant genotypes. In Buenos Aires province (Argentina), in 2006 there were deficient control in some field applications of *Lolium multiflorum* by the herbicide glyphosate. In this work will be evaluated the sequence of the specific region of EPSPS enzyme.

**Keywords: EPSPS, glyphosate, *Lolium multiflorum*, resistance.**

## Introducción

En 1996, se liberó en Argentina, la primera variedad de soja resistente al glifosato (soja RR). El incremento en la superficie sembrada de la misma desde entonces, generó también un creciente uso de glifosato, ya que el control de malezas en estos sistemas se lleva a cabo principalmente con dicho herbicida (Deluchi, 2005).

El glifosato es un herbicida no selectivo de amplio espectro, que ha sido utilizado ampliamente en el control de malezas en cultivos extensivos. Su modo de acción es a través de la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpyruvylshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS). La inhibición de EPSPS previene la formación de enolpyruvyl shikimato-fosfato e impide la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano) los cuales son precursores de importantes metabolitos secundarios como lignina, flavonoides y alcaloides (Perez Jones *et al.*, 2005).

El desarrollo de resistencia a herbicidas involucra un proceso de selección. Se asume que cualquier población de malezas puede contener biotipos resistentes en baja frecuencia, debido a mutaciones que ocurren naturalmente. Así, el uso repetido de un mismo herbicida, expone a la población a una presión de selección que conduce a un aumento del número de individuos resistentes (Valverde, 2000).

Se ha confirmado en varias especies que variaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos que codifican para la enzima EPSPS confieren resistencia a glifosato. Así, en *Eleusine indica* y *Lolium rigidum* se verificó que la sustitución de aminoácidos en la posición 106 genera resistencia a glifosato. En tanto, en *Lolium multiflorum* se verificó la sustitución del aminoácido de la posición 106 solo en una población resistente proveniente de Chile, no así en una población resistente de USA (Perez Jones *et al.*, 2007). Asimismo, se ha reportado la existencia de otra sustitución que confiere resistencia a dicho herbicida en la posición 101 de la secuencia aminoacídica, tal cambio se produce por la sustitución de glicina por alanina (Perez Jones, *et al.*, 2005).

En Argentina el primer caso de resistencia a glifosato fue identificado en la Provincia de Salta en la especie *Sorghum halepense* (Heap, 2006). En 2006 en el Partido de Coronel Dorrego, en la Provincia de Buenos Aires, se reportaron plantas de *Lolium multiflorum* que resistieron las dosis de control habituales con glifosato.

El mecanismo de resistencia se desconoce en este evento particular. El primer candidato a ser evaluado es la enzima EPSPS, ya que se ha confirmado en varias especies que la resistencia esta acompañada de cambios en dicha enzima. El objetivo del presente trabajo es investigar los mecanismos de resistencia a glifosato en tres poblaciones de *Lolium multiflorum*, explorando el gen que codifica para la enzima EPSPS.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se evaluaron dos poblaciones de *Lolium multiflorum* colectadas en dos sitios: Parajes “El zorro” y “El Perdido”, Partido de Coronel Dorrego (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Los lotes en los cuales se detectaron las plantas tenían un historial de aplicaciones de glifosato en los últimos 5-7 años. Las semillas fueron colectadas sólo en aquellos grupos de plantas que sobrevivieron a las aplicaciones de campo con glifosato.

La población susceptible fue obtenida desde una banquina cercana, la misma no tuvo aplicaciones de glifosato.

Una vez colectadas las semillas, las mismas fueron sembradas y se mantuvieron en cabinas cuarentenarias. En el estadio de macollaje fueron pulverizadas con una dosis de glifosato de 1,5 litros (0,36 kg e. a. L<sup>-1</sup>). Las plantas que sobrevivieron a la aplicación fueron utilizadas en los ensayos posteriores.

### **Secuencia del gen que codifica para la enzima EPSPS**

Se extrajo ADN genómico de cada una de las poblaciones, utilizando el protocolo descrito por Haymes (1996). Se amplificó el ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando iniciadores específicos de un segmento del gen que codifica para la enzima EPSPS. Los iniciadores fueron diseñados en base a la secuencia de ARN del gen EPSPS (DQ153168). Los mismos fueron diseñados en dos secuencias exónicas distintas amplificando dos secuencias intrónicas (F-5´GTGGAAGCAGACAAAGTTGC-3´, R-5´-GTCCCAGCTATCAGAATGCT- 3´). La longitud de los segmentos amplificados fue calculada con el Programa Fast PCR mediante una PCR *in silico* (860 pb) en base a la secuencia del gen EPSPS de *Oryza sativa*, ya que no se posee secuencia de ADN genómico del género *Lolium*.

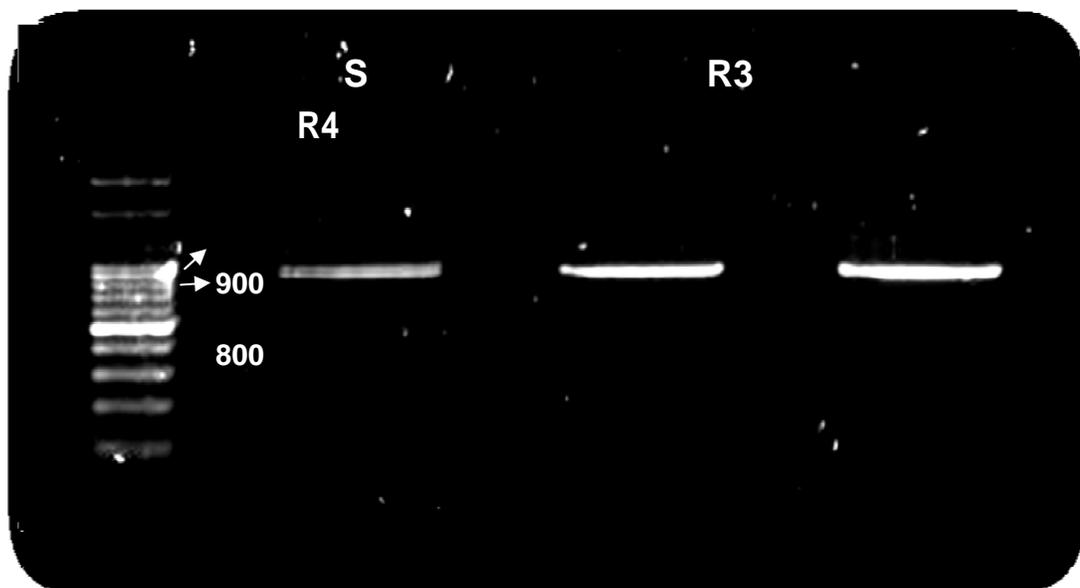
La reacción en cadena de la Polimerasa se realizó en un volumen de 30  $\mu\text{l}$  usando un termociclador Apollo (CLP, Tools for Molecular Biology, USA) la mezcla de reacción contenía buffer de PCR 1x, 2.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Mg}^{+2}$ , 0.2  $\mu\text{M}$  de cada primer, 0.2  $\mu\text{M}$  de deoxinucleótidos, y 0.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, USA) y 50 ng de molde de ADN. El programa de ciclado consistió en un paso de desnaturalización de 3 minutos a 94  $^{\circ}\text{C}$ , 35 ciclos de 30 segundos a 94 $^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a 57 $^{\circ}\text{C}$ , y 1 minuto a 72 $^{\circ}\text{C}$ , seguido por un paso de extensión de 10 minutos a 72  $^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente el producto de PCR fue visualizado en geles de agarosa con bromuro de etidio, se verificó que las bandas tuvieran el tamaño previsto. Posteriormente se precipitó dicho producto con PEG ([www.uga.edu/srel/DNA\\_Lab/PEG\\_Precip'00.rtf](http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip'00.rtf)), el propósito de este protocolo es remover los dNTPs y los iniciadores no utilizados durante la reacción. Se llevo a cabo la reacción de secuencia con 4  $\mu\text{l}$  de mix para reacción de secuencia, 0.5  $\mu\text{l}$  de iniciador 10  $\mu\text{M}$  (forward y reverse), 2-5  $\mu\text{l}$  de molde (según la concentración del molde), y se llevó a 10  $\mu\text{l}$  de volumen final con agua destilada estéril.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Secuencia del gen que codifica para la enzima EPSPS

El producto de la amplificación obtenido fue del tamaño esperado ya que las bandas se encontraban entre 800 y 900 pares de bases (Fig. 1).



**Figura 1:** Producto de amplificación de la enzima EPSPS en biotipos susceptibles (S) y resistentes ( $R_3$  y  $R_4$ ).

La secuencia de los biotipos de *Lolium multiflorum* resistentes y susceptibles no presentó cambios en el amino ácido 106 (Fig. 2). Si bien hubo una variación en el amino ácido 109 de la población R<sub>4</sub>, este representó un cambio silencioso (gct-gca), ya que en ambos biotipos el codón codifica para el amino ácido alanina.

S	GGA	ACT	GCG	ATG	CGG	<b>CCA</b>	TTG	ACG	GCT	GCT	GTA	GTA	GCT	GCT	GGT	GGA	AAT	GCA	ACG	TAT	GTT	65
	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	V	A	A	G	G	N	A	T	Y	V	20
R3	GGA	ACT	GCG	ATG	CGG	<b>CCA</b>	TTG	ACG	GCT	GCT	GTA	GTA	GCT	GCT	GGT	GGA	AAT	GCA	ACG	TAT	GTT	65
	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	V	A	A	G	G	N	A	T	Y	V	20
R4	GGA	ACT	GCG	ATG	CGG	<b>CCA</b>	TTG	ACG	GCA	GCT	GTA	GTA	GCT	GCT	GGT	GGA	AAT	GCA	ACG	TAT	GTT	65
	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	V	A	A	G	G	N	A	T	Y	V	20
						<b>106</b>					<b>109</b>											

**Figura 2:** Secuencia parcial de amino ácidos del gen que codifica para la enzima EPSPS en biotipos susceptibles (S) y resistentes (R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub>).

Si bien no se detectaron cambios en el amino ácido 106, donde se han detectado cambios en la mayoría de los biotipos resistentes a glifosato (ver Perez Jones *et al.*, 2007), no se descarta que en secuencias completas de la enzima puedan llegar a detectarse variaciones que generen un mejor comportamiento frente al herbicida.

Asimismo, se plantea para futuros ensayos amplificar la totalidad de la enzima, así como realizar cuantificaciones del nivel de expresión de la misma.

No debería descartarse otros mecanismos de resistencia como variaciones en la traslocación del herbicida, barreras a la entrada del mismo, y/o secuestro.

## LITERATURA CITADA

- DELUCHI, J. E. Situación de los cultivos RR en la Argentina. Seminario Iberoamericano, Resistencia a Herbicidas y cultivos transgénicos. 6-8 diciembre 2005. Colonia del Sacramento, Uruguay. 2005.
- HEAP, I. M. International survey of herbicide resistant weeds. Available at <http://www.weedscience.com> [Consultado 13/6/07]. 2006.

PEREZ JONES, A.; PARK, K. W.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C. A.; SHANER, D. 2005. Identification of glyphosate-resistant ryegrass (*Lolium multiflorum* ) in Oregon. **Weed Sci.** v.53, p. 775-779. 2005.

PEREZ JONES, A.; POLGE, PARK, K. W.; N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C. A. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in *lolium multiflorum*. **Planta.** v. 226, n. 2, p. 395-404. 2007.

VALVERDE, B.E.; RICHES, C.R. Y CASELEY, J.C. Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona*. San José, C. R. Cámara de Insumos Agropecuarios. 1ra ed. 136 p. 2000.