

Rápido método de selección de plantas resistentes a herbicidas

Larran, A.S.; Perotti, V.P.; Palmieri, V.P.; Permingeat, H.R.

Laboratorio de Biología Molecular

Facultad de Ciencias Agrarias – UNR

Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario

IICAR-CONICET

larran@iicar-conicet.gob.ar

Introducción

La resistencia a herbicidas en malezas es hoy uno de los problemas más importantes que enfrentan los sistemas agropecuarios en todo el mundo.¹ La rápida evolución de múltiples mecanismos de resistencia en las últimas décadas ha reafirmado la necesidad de adoptar estrategias de manejo integradas que no se basen exclusivamente en el control químico (aplicación de herbicidas).²

Hoy en día, luego del glifosato, los inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) son uno de los más utilizados para combatir las pérdidas de rendimiento ocasionadas por malezas que compiten con cultivos comerciales por recursos tales como la luz solar, el agua y los nutrientes del suelo. Entre los principales motivos de su utilización encontramos el control de malezas de amplio espectro a dosis muy bajas, la baja toxicidad en mamíferos y la amplia selectividad de cultivos.³

Amaranthus palmeri S. Wats., originaria de Estados Unidos y detectada por primera vez en nuestro país en 2013,^{4,5} representa hoy una de las especies más problemáticas a nivel mundial, habiendo desarrollado resistencia a 6 sitios de acción de herbicidas diferentes hasta el momento.⁶ Por ello, resulta relevante caracterizar las resistencias reportadas a campo e intensificar los estudios sobre las bases moleculares de dichas resistencias. Esta información es de mucha utilidad para el diseño de estrategias de control que permitan a los productores entender, prevenir y eventualmente superar el problema de resistencia en malezas, sin crear un problema similar a largo plazo.

Tradicionalmente, luego de una primera etapa de confirmación del fenotipo de resistencia de una población mediante ensayos de dosis-respuesta, los investigadores suelen realizar caracterizaciones bioquími-

cas y moleculares de la enzima *target* del herbicida y del gen que codifica para la misma, con el objetivo de ensayar la hipótesis de una resistencia producida por cambios en el ADN que alteren la expresión o la estructura de dicha enzima. Así, la metodología convencional y más adoptada que precede a los estudios moleculares consiste en los siguientes pasos: estratificación de las semillas, germinación en placa, transplante a macetas, crecimiento hasta el estadio de aplicación, aplicación propiamente dicha, registro del daño y clasificación resistente/susceptible (R/S), toma de tejido para los análisis moleculares.⁷

En estudios previos, caracterizamos la resistencia cruzada a inhibidores ALS de una población de *Amaranthus palmeri* encontrada en la localidad de Vicuña Mackenna (R1), en contraste con una población susceptible de la provincia de Tucumán (S1).⁸ En este trabajo, proponemos una metodología alternativa al esquema convencional, intentando reducir el tiempo, el espacio y el equipamiento necesarios para la clasificación de las plantas y la selección de individuos resistentes.

Materiales y Métodos

Semillas provenientes de las poblaciones R1 y S1 fueron desinfectadas superficialmente. El procedimiento consistió en un lavado con etanol 70% V/V durante un minuto, seguido de un lavado con hipoclorito de sodio 1% V/V durante 20 minutos. Luego de 5 lavados con agua ultrapura estéril, 12 semillas de cada población fueron sembradas en 3 placas de Petri conteniendo medios artificiales MS (Murashige and Skoog) suplementados o no con imazetapir 2 μ M. Una curva de calibración preliminar nos permitió determinar que dicha concentración de principio activo era letal para las plantas de la población S1. Las placas fueron incubadas a 4 °C en oscuridad durante 2 días y luego en cámara de cultivo a 24 °C bajo un fotoperíodo 16:8 durante 10 días.

Concurrido dicho plazo, las placas fueron fotografiadas registrándose porcentaje de germinación y número de plantas sobrevivientes en cada condición. Posteriormente, las plantas sobrevivientes fueron transferidas a macetas con tierra y crecidas durante 10 días, para ser utilizadas como fuente de tejido foliar para la extracción de ADN genómico y la medición de actividad acetolactato sintasa.

Resultados

En la Figura 1, puede observarse que el desarrollo de las plantas de la población S1 se ve inhibido en el medio suplementado con imazetapir, no siendo este efecto tan marcado para las plantas de la población R1. Así, es posible apreciar un crecimiento diferencial de los individuos de las poblaciones R1 y S1 en el medio selectivo a los 10 días de incubación.

Algunas plántulas de la población R1 presentan un crecimiento pobre, similar al de las plantas de la población S1, por lo cual podemos presumirlas como susceptibles, ya que al tratarse de una resistencia de carácter dominante y de herencia mendeliana⁹ sabemos que aproximadamente $\frac{1}{4}$ de la progenie sería homocigota recesiva para el carácter que otorga resistencia.

Además, resulta interesante resaltar que la tasa de germinación para ambas poblaciones superó el 50 % en todas las repeticiones (67 % \pm 11 para la población S1 y 54 % \pm 6 para la población R1), lo cual representa un buen valor considerando el corto período de estratificación de las semillas.

En la Tabla 1, se puede observar una comparación detallada de cada uno de los pasos de la metodología convencional y de la metodología propuesta. Los tiempos del procedimiento podrían reducirse en un 50 % empleando la nueva metodología, principal-

Figura 1. Germinación y selección en placa de plantas de las poblaciones S1 y R1. Las semillas fueron sembradas en medios no selectivos y selectivos (imagen izquierda y derecha, respectivamente). Las plantas sobrevivientes fueron transplantadas a macetas y utilizadas para ensayos de actividad ALS y extracción de ADN genómico.



mente al prescindir de un extenso período de estratificación y al realizar una germinación y selección simultánea de las plantas en los medios artificiales.

Si bien ésta metodología tiene como desventaja que debe ser ajustada para cada especie y para cada principio activo, puede resultar una alternativa conveniente en casos donde el tiempo es un factor limitante, o donde el lugar de trabajo carece de la infraestructura necesaria para efectuar la metodología convencional.

Conclusiones

Se desarrolló un método rápido y simple que permite seleccionar plantas resistentes a herbicidas para ser utilizadas en estudios bioquímicos y moleculares, reduciendo los

tiempos empleados por métodos convencionales y evitando la presencia de plantas segregantes que provocarían interferencias en las determinaciones para la población resistente. Además, esta metodología es factible de aplicar en laboratorios que no disponen de cámaras de aplicación ni de espacios destinados para tal fin.

Es importante destacar que cada especie, cada población y cada principio activo, requerirá de la construcción de una curva de calibración con distintas concentraciones del agente de selección. De esta manera, se podrá establecer una concentración basal de herbicida para lograr la diferenciación de las plantas según su fenotipo de resistencia.

Bibliografía

Heap I; (2014); *Herbicide resistant weeds*, in

Integrated Pest Management, ed. by Pimentel D and Peshin R, Vol. 3, Springer, Netherlands, pp. 281-301.

Owen MD; (2016); "*Diverse approaches to herbicide-resistant weed management*"; *Weed Science*; 64; pp. 570-584.

Yu Q, Powles SB; (2014); "*Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding*"; *Pest management science*; 70; pp. 1340-1350.

Berger S, Madeira PT, Ferrell J, Gettys L, Morichetti S, Cantero JJ, Nuñez C; (2016); "*Palmer amaranth (Amaranthus palmeri) identification and documentation of ALS resistance in Argentina*"; *Weed Science*; 64; pp. 312-320.

Tabla 1: Comparación de los pasos y tiempos entre el método propuesto y el método convencional.

Método propuesto		Método convencional	
Germinación	Desinfección	(1 hora)	Desinfección (1 hora)
	Siembra en placa Estratificación	(1 hora)	Estratificación (7 días)
Selección		(2 días)	Germinación en placa (4 días)
	Crecimiento en medio selectivo y clasificación S/R	(10 días)	Transplante a maceta (1 hora)
			Crecimiento hasta estadio de aplicación (14 días)
			Aplicación del agente de selección (1 hora)
Obtención del material	Transplante a maceta	(1 hora)	Crecimiento hasta clasificación S/R (15 días)
	Crecimiento	(7 días)	
Tiempo total		20 días	40 días

Morichetti S, Cantero JJ, Núñez C, Barboza GE, Amuchastegui A, Ferrell J; (2013); "On the presence of *Amaranthus palmeri* (*Amaranthaceae*) in Argentina". Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica; 48; pp. 347-353.

Heap I; *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*. Online. Internet. Monday, July 31, 2017. Available www.weedscience.org

Beckie HJ, Heap IM, Smeda RJ, Hall LM; (2000); "Screening for herbicide resistance in weeds"; *Weed technology*; 14; pp. 428-445.

Larran A, Palmieri V, Perotti V, Lieber L, Tuesca D, Permingeat HR; (2017); "Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in

Amaranthus palmeri from Argentina"; *Pest Management Science*; doi: 10.1002/ps.4662.

Ferguson GM, Hamill AS, Tardif FJ; (2001); "ALS inhibitor resistance in populations of *Powell amaranth* and *redroot pigweed*"; *Weed Science*; 49; pp. 448-453.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



El entorno en el que se encuentra nuestra Facultad; ubicada en el corazón de un parque de 100 has en la localidad de Zavalla, sin dudas transmite la tranquilidad y armonía necesaria para desarrollar de manera placentera las actividades académicas, facilitando el estudio y la creación.

La Planta Docente de Nuestra Facultad esta conformada por profesionales especialistas en permanente capacitación, quienes en su mayoría se dedican en forma exclusiva a las actividades académicas garantizando la actualización permanente de los contenidos ofrecidos a nuestros alumnos

Hemos desarrollado los Planes de Estudios de las carreras con una visión integradora implementando las prácticas - preprofesionales, trabajos a campo y prácticas de laboratorio como requisitos curriculares obligatorios con el fin de insertar en el medio, graduados con un alto conocimiento real de las problemáticas del mismo.

Ejes fundamentales de la Facultad:



DOCENCIA

Su objeto es la formación de profesionales con excelentes capacidades y conocimientos en las áreas básicas y aplicadas, que promueva el desarrollo del espíritu crítico y que cuente con herramientas para resolver situaciones en escenarios con multiplicidad de variables



INVESTIGACIÓN

Una actividad generadora de nuevos conocimientos, que actúa enriqueciendo en forma continua la formación de futuros profesionales y estimula la capacidad de diseñar, proyectar dar soluciones alternativas para el desarrollo regional y nacional.



EXTENSIÓN

Aspiramos a contribuir con el desarrollo regional y nacional promoviendo la aplicación del conocimiento en acciones concretas que involucren activamente a la comunidad en el análisis y solución de sus problemas.

Medio siglo formando profesionales con compromiso social.

50 ANIVERSARIO
... 1967 · 2017 ...