

Distribución de poblaciones resistentes de *Echinochloa* spp. a herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa en Extremadura

Yolanda Romano¹, Fátima Mendoza¹, José Antonio Palmerín², José María Quiles³,
Ignacio Amaro¹, María Dolores Osuna¹✉

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Guadajira (Badajoz)

²Servicio de Sanidad Vegetal (Junta de Extremadura), Don Benito (Badajoz)

³Servicio de Producción Agraria (Junta de Extremadura), Don Benito (Badajoz)

✉ mariadolores.osuna@juntaex.es

Resumen: Existen bastantes casos de resistencia en *Echinochloa* spp. descritos a nivel mundial en arroz. En los últimos 2 años se han realizado muestreos periódicos en campos de arroz en Extremadura, en lugares donde se sospecha resistencia. Con estas semillas se han realizado tanto ensayos en invernadero para confirmación de las resistencias, como estudios de mecanismos de resistencia a nivel de sitio de acción (secuenciación de genes ALS y ACCasa). Hasta ahora, de las muestras analizadas, se han encontrado 37 poblaciones con resistencia confirmada (con mutaciones en el sitio de acción) a nivel de ALS y 2 con resistencia a nivel de ACCasa. También se han encontrado poblaciones donde ambas mutaciones (gen ALS y ACCasa) están presentes. Estas poblaciones están distribuidas en distintas zonas arroceras de la región extremeña. El estudio del mecanismo responsable de la resistencia es básico para el diseño de un programa de control integrado.

Palabras clave: *Echinochloa*, arroz, resistencia, mutación, gen ALS, gen ACCasa, sitio de acción.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Echinochloa* incluye las especies más problemáticas de arroz a nivel mundial (Holm et al., 1977). En la actualidad no existe un acuerdo completo sobre las especies que constituyen este género. Puede incluir entre veinte y cincuenta especies que están ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y templadas del mundo. Se ha observado que entre las distintas especies del género *Echinochloa* existe un alto grado de autogamia, pero el grado de cruzamiento es suficiente para que exista intercambio de genes entre poblaciones (Maun and Barrett, 1986). En la actualidad, la mayoría de los herbicidas autorizados en arroz pertenecen a dos grupos de herbicidas: inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) e inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS). El uso repetido y continuado de herbicidas con el mismo modo de acción, conlleva la aparición de resistencias. Hoy en día, en el cultivo del arroz han sido descritas a nivel mundial cincuenta especies de malas hierbas resistentes, siendo el tercer cultivo (después del trigo y el maíz) con más casos de resistencia descritos. Dentro de estas resistencias, la mayoría de casos descritos (56) pertenecen al género *Echinochloa* (Heap, 2017). En la mayoría de los casos, cuando está descrito, el mecanismo/s responsable de esta resistencia es una mutación en el sitio de acción del herbicida (gen ALS y/o ACCasa).

El objetivo de este trabajo fue la identificación de resistencias a herbicidas inhibidores de la ALS y/o ACCasa, debido a mutaciones en el sitio de acción en poblaciones de *Echinochloa* spp. recogidas en campos de arroz de Extremadura, donde se ha sospechado falta de eficacia por dichos herbicidas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Germinación de las semillas. Para poder extraer el ADN las semillas de *Echinochloa* spp recolectadas en los campos de arroz de Extremadura, se hicieron germinar en placas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada (8-10 ml) y selladas con parafilm. Se colocaron en una cámara de germinación con una temperatura día-noche de 25°C y un fotoperiodo de 16 horas (350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y un 80% de humedad relativa. Una vez germinadas, se procedía a la extracción del ADN. En ocasiones, la semilla no germinó con lo que la extracción se hizo de la propia semilla hidratada.

2.2. Extracción del ADN y amplificación por PCR de dominios de genes ALS y ACCasa. Para la extracción del ADN se utilizó el kit de extracción de ADN para plantas de BIOTOOLS siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído, se cuantificó utilizando el NANODROP 1000 (Thermo Scientific) para asegurarnos que estaba en las condiciones adecuadas de concentración y pureza. A continuación, se hicieron diluciones a 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$, que es la concentración utilizada en las posteriores PCR.

Los cebadores utilizados para amplificar ambos genes están en Osuna et al. (comunicación personal). Para el estudio molecular de la ACCasa se utilizaron dos parejas de cebadores: la CRUSS-F/CRUSS-R que amplifica la región que contiene el sitio Ile1781 dando un fragmento de 474bp; la segunda pareja se denominó AC6F/AC6R que amplifica el resto de las regiones donde se han descrito mutaciones que dan lugar a resistencias (trp1999, trp2027, Ile2041, asp2078, lys2080, ser2088 y gly2096) dando un fragmento de 496bp. Para el estudio de la ALS también se utilizaron dos parejas de cebadores: una de ellas fue la BE1/BE2, que amplifica la región conteniendo los dominios BE (trp574 y ser653) de la ALS, dando un tamaño de banda de 594bp; la segunda pareja que amplifica la región conteniendo los dominios CAD (ala122, pro197 y ala205) de la ALS fue UP02/DOWN02 dando un fragmento de 634bp. La mezcla de los reactivos utilizada para llevar a cabo la reacción de PCR fue: 10pmol/ μl de cada primer, 2.5mM de la mezcla de dNTP, Buffer 10X, de Taq polimerasa (5U/ μl) y se completó con agua de PCR hasta un volumen final de 20 μl . El ciclo de PCR llevado a cabo para las dos parejas de cebadores CRUSS-F/ CRUSS-R y AC-6F/AC-6R fue el mismo: 95°C 5min (x1); 95°C 30seg, 57°C 30seg, 72°C 1min (x35) y 72°C 5min (x1), manteniéndose a 4°C al final del ciclo. Para la pareja de cebadores BE1/BE2 fue: 95°C 5min (x1); 95°C 30seg, 61°C 30seg, 72°C 1min (x35) y 72°C 5min (x1), manteniéndose a 4°C al final del ciclo. Y para la pareja de cebadores UP02/DOWN02 fue: 95°C 5min (x1); 95°C 45 seg, 60°C 45seg, 72°C 1min (x35) y 72°C 5min (x1), manteniéndose a 4°C al final del ciclo.

Los productos de ADN amplificados mediante la técnica de PCR explicada en el apartado anterior, fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.3% y visualizados mediante el transiluminador Alpha Innotech. El gel de agarosa fue teñido con Gel Red 10000X (Biotium). Las bandas esperadas se cortaron y purificaron utilizando para esto último el Kit de Purificación de ADN de BIOTOOLS.

2.3. Secuenciación de fragmentos. Una vez amplificadas y purificadas las muestras, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, fueron secuenciadas mediante el STAB (Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia) de la Universidad de Extremadura. Los resultados de las secuenciaciones fueron visualizados utilizando el programa CHROMAS. Posteriormente, dichas

secuencias eran alineadas utilizando para ello el programa CLUSTAL OMEGA. Asimismo, se estudió con sumo cuidado los cromatogramas de las secuencias obtenidas debido a que, en ocasiones, se apreció la existencia de un solapamiento de los picos de las bases en los tripletes de interés, lo cual dotaría de cierto grado de resistencia a la planta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad se han tomado un total de 287 poblaciones de *Echinochloa* spp. en campos de Extremadura donde se nos había comunicado, por parte de agricultores, técnicos de ATRIAS o personal de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura, que había una falta de control con herbicidas. Todas las muestras fueron referenciadas y se conocía el historial de la parcela en los años previos. Todas las muestras fueron sometidas a un screening en invernadero (utilizando la dosis recomendada de campo), un ensayo de dosis-respuesta y un ensayo a nivel molecular para determinar la especie a la que pertenecía (datos no mostrados). En este trabajo se ha estudiado el mecanismo responsable de la resistencia (a nivel de secuencia de ADN) de 87 de estas poblaciones. En la tabla 1 se resumen las mutaciones encontradas tanto a nivel de ALS como de ACCasa que se han encontrado: 37 en el gen de la ALS y 2 en el gen ACCasa. Estas últimas 2 poblaciones poseen mutaciones tanto a nivel de ALS como de ACCasa (en la misma planta).

En la figura 1 se muestra la distribución de dichas muestras en los campos de arroz de Extremadura, mostrando esta distribución que están repartidas por varias zonas arroceras dentro de la región. A través de la georreferenciación de las muestras (datos no mostrados) se ha comprobado que existen casos donde poblaciones con la misma mutación se han encontrado en campos vecinos, con lo cual se sospecha que la semilla de la malas hierba resistente pasó de un campo a otro.



Figura 1. Distribución de muestras de *Echinochloa* confirmadas resistentes en los campos de arroz de Extremadura.

Tabla 1. Mutaciones encontradas en poblaciones de *Echinochloa* spp. encontradas en Extremadura. Se especifica aquellas donde hay solapamiento de picos en los cromatogramas y aquellos casos en los que el cambio nucleótido es del 100% (en cursiva)

	ALS		ACCasa	
	Dominio BE	Dominio CAD	1781	1999-2027-2041-2078-2088-2096
ech20-09	no mutación	pro/ser197 (CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech26-09	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech30-09	no mutación	pro/ser197(CCT/T--)(1/3)	no mutación	no mutación
ech34-09	no mutación	pro/ser197(CCT/T--)(1/3)	no mutación	no mutación
ech35-09	no mutación	pro/ser197 (CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech36-09	no mutación	pro/ser197 (CCT/T-) (1/2)	no mutación	no mutación
ech15-10	no mutación	pro/ser197(CCT/T--)(1/3)	no mutación	no mutación
ech31-10	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(2/3)	no mutación	no mutación
ech70-10	no mutación	pro/ser197(CCT/T--)(1/3)	no mutación	no mutación
ech71-10	no mutación	pro/ser197(CCT/T--)(1/3)	no mutación	no mutación
ech107-10	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(2/3)	no mutación	no mutación
ech112-10	no mutación	pro/ser197(CCT/T--)(1/3)	no mutación	no mutación
ech113-10	no mutación	pro/ser197(CCT/T--)(1/3)	no mutación	no mutación
ech114-10	no mutación	pro/ser 197(CCT/T-)(1/3)	<i>ile/leu1781 (100%)</i>	no mutación
ech115-10	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech116-10	no mutación	pro/ser197 (CCT/T-)(1/3)	<i>ile/leu1781 (100%)</i>	no mutación
ech130-10	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech1-11	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech2-11	no mutación	pro/ser197(CCT/T--)(1/3)	no mutación	no mutación
ech3-11	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech7-11	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech8-11	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech9-11	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech11-11	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(1/3)	no mutación	no mutación
ech7-12	no mutación	pro/thr197(CCC/TCC)(1/3)	no mutación	no mutación
ech10-13	no mutación	<i>pro/ser 197 (CCT/T-)(100%)</i>	no mutación	no mutación
ech2-14	no mutación	pro/ser197(CCT/T-)(3/4)	no mutación	no mutación
ech3-14	no mutación	<i>pro/ser 197 (CCT/T-)(100%)</i>	no mutación	no mutación
ech4-14	no mutación	pro/thr197(CCC/TCC)(1/2)	no mutación	no mutación
ech5-14	no mutación	<i>pro/ser 197 (CCT/T-)(100%)</i>	no mutación	no mutación
ech6-14	no mutación	<i>pro/ser 197 (CCT/T-)(100%)</i>	no mutación	no mutación
ech7-14	no mutación	<i>pro/ser 197 (CCT/T-)(100%)</i>	no mutación	no mutación
ech1-15	no mutación	<i>pro/ser 197 (CCT/T-)(100%)</i>	no mutación	no mutación
ech2-15	no mutación	pro/ser197 (CCT/T-)(2/3)	no mutación	no mutación
ech3-15	no mutación	pro/ser197 (CCT/T-)(2/3)	no mutación	no mutación
ech4-15	no mutación	<i>pro/ser 197 (CCT/T-)(100%)</i>	no mutación	no mutación
ech1-16	no mutación	<i>pro/ser 197 (CCT/T-)(100%)</i>	no mutación	no mutación

Es de destacar que, como podemos observar en la tabla 1, en la mayoría de los casos se ha detectado un solapamiento en los picos; estas muestras se están siguiendo en las siguientes generaciones para detectar la evolución de la mutación presente, así como su respuesta a herbicidas.

El arroz es uno de los cultivos con mayor escasez de materias activas disponibles y, además, la gran mayoría pertenecen a dos grupos según su modo de acción. Esto conlleva un alto riesgo de resistencia, como ya ha sido confirmado en diferentes zonas arroceras a nivel mundial, entre ellas Extremadura. Un control integrado de *Echinochloa* spp. es necesario para evitar la aparición de resistencias. Para ello es necesario un uso adecuado de los herbicidas disponibles, favoreciendo la alternancia entre los diferentes modos de acción e intentar apoyarse, cuando sea posible, en las medidas culturales aplicables en cada región, como podría ser la rotación con otros cultivos en ciertas zonas de Extremadura. Además, con los resultados mostrados en este trabajo, evitar la propagación de semillas entre parcelas (con limpieza de maquinaria) es clave para evitar propagación de resistencias, como se sospecha que ha podido ocurrir en campos de la región de Extremadura.

4. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el proyecto INIA RTA-2014-00033-C03-01, por la ayuda a Grupos de Investigación de la Junta de Extremadura GR15112 y por el proyecto AGROS (CCESAGROS), fondos FEDER.

5. REFERENCIAS

- Heap, I (2017). The international survey of herbicide resistant weeds. Online. Internet. Available www.weedscience.com.
- Holm LG, Pancho JV, Herberger JP, Plucknett DL (1977). The world's worst weeds. Honolulu, HI: University press of Hawaii, p. 1129.
- Maun MA, Barrett SCH (1986). The biology of Canadian weeds. 77. *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. *Can. J. Plant Sci*, 66: 739-759.

Distribution of resistant populations of *Echinochloa* spp. to ALS and ACCase inhibitors herbicides in Extremadura

Summary: The genus *Echinochloa* spp. includes the most problematic species in rice worldwide, and in particular in rice fields in Extremadura. The herbicides authorized in Spain at present to control this weed in rice belong mainly to 2 modes of action: ALS inhibitors and ACCase inhibitors. Repeated and continuous use of herbicides with the same mode of action may lead to the appearance of resistance. In the last 2 years, periodic sampling has been carried out in rice fields in Extremadura, in places where resistance is suspected. We have a set of internal assays for confirmation of resistance, such as studies of mechanisms of resistance to a target site-level (ALS and ACCase gene sequencing). So far, 37 populations were resistant (with mutations at the site of action) to ALS inhibitors and 2 to ACCase inhibitors. These populations are distributed in different areas of the Extremadura region. The study of the mechanism responsible for the resistance is basic for the design of an integrated control program.

Keywords: *Echinochloa*, rice, resistance, mutation, ALS gene, ACCase gene, target site.