

DETECCIÓN DE MUTACIONES RELACIONADAS CON RESISTENCIA A HERBICIDA EN AVENA SILVESTRE (*Avena Fatua* L.)^{*}

DETECTION OF MUTATIONS RELATED TO HERBICIDE RESISTANCE IN WILD OAT (*Avena Fatua* L.)

Homero Tovar Hernández¹, Manuel Cruz Villegas^{2§}, Francisco Ponce Medina², Raquel Muñiz Salazar², Leonel Avendaño Reyes², Onésimo Grimaldo Juárez² y Gerardo Medina Basulto³

¹Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California, SAGARPA, Baja California, Mexicali, B. C. ²Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California. ³Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California. [§]Autor para correspondencia: cruz@uabc.mx

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar dos grupos de oligonucleótidos para la detección de dos mutaciones puntuales en el gen de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) de *Avena fatua* L., durante el período 2005-2006, las cuales están relacionadas con la resistencia a herbicidas que inhiben la síntesis de ácidos grasos. Se seleccionaron cuatro poblaciones de avena silvestre (M5r y M28r) resistentes a la aplicación en campo del herbicida clodinafop propargil y dos poblaciones susceptibles (M25s y M43s). Se desarrollaron dos grupos de oligonucleótidos con base en la secuencia del gen de la ACCasa de la avena silvestre (Gene Bank No. de acceso AF231334). El primer grupo de oligonucleótidos, VSE11GM, VRE11RGM, ACVII11GM y ACVII11RGM, se diseñaron para detectar el cambio de timina (T) por adenina (A) en la posición 1 322 del gen descrito y originando el cambio de isoleucina (ATT) por asparagina (AAT). El segundo grupo de oligonucleótidos, VRD1CGM, VRD1TRGM, ACVRG1GM y ACVRG1RGM, se diseñaron para detectar el cambio de timina (T) o citosina (C) por adenina (A) en la posición 541 del mismo gen y originando el cambio de isoleucina (ATA) por leucina (CTA o TTA). No se logró diferenciar las poblaciones que presentaron resistencia en campo de las que fueron susceptibles, lo que causaría el cambio de isoleucina por leucina en posición 541 del gen para ambas mutaciones. La ausencia de la amplificación del fragmento de 480 pb para la población

resistente M5r, con el primer grupo de oligonucleótidos, así como la ausencia de la amplificación de los fragmentos de 496 pb y 330 pb en las cuatro poblaciones con el segundo grupo de oligonucleótidos, indica la probabilidad de que sea una sustitución diferente la que le confiere resistencia a la avena silvestre hacia este grupo de herbicidas.

Palabras clave: Acetil-CoA carboxilasa, herbicidas, mutación, resistencia, síntesis de ácidos grasos.

ABSTRACT

Two oligonucleotide groups were evaluated in order to detect two punctual mutations of the gene acetyl-CoA carboxylase (ACCase) in *Avena fatua* L., which are related to the resistance to herbicides that inhibit fatty acid synthesis. Four populations of wild oat, two resistant (M5r and M28r) and two susceptible (M25s and M43s), to field application of clodinafop propargil were selected. Two groups of oligonucleotids were developed based on the sequence of the gene of the ACCasa from wild oat (GeneBank access number AF231334). The first group, VSE11GM, VRE11RGM, ACVII11GM and ACVII11RGM, was designed to detect the change of timine (T) by adenine (A) in position 1 322 of the described gene and which originated the change of

* Recibido: Enero de 2007
Aceptado: Febrero de 2008

isoleucine (ATT) by asparagine (AAT). The second group of oligonucleotids, VRDICGM, VRDITRGM, ACVRG1GM and ACVRG1RGM, was designed to detect the change of cytosine or thymine (T or C) by adenine (A) in position 541 of the same gene, and which originated the change of isoleucine (ATA) by leucine (CTA or TTA). Consequently, it was not possible to differentiate the populations that offered resistance in field from those which were susceptible and which would cause the change of isoleucine by leucine in the position 541 of the gene for both mutations. The absence of amplification of the fragment of 480 pb for the resistant population M5r, with the first group of oligonucleotids, as well as the absence of the amplification of the fragments 496 pb and 330 pb in the four populations with the second group of oligonucleotids, indicated the probability that it is a different substitution the one that confers resistance to the wild oat toward this group of herbicides.

Key words: Acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthesis, herbicides, mutation, resistance.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de trigo en el Valle de Mexicali, Baja California, México, es el más importante en cuanto a superficie sembrada en esta región. Sin embargo, uno de los mayores problemas para su producción es la presencia de maleza y dentro de éstas, la avena silvestre (*Avena fatua* L.) se ha convertido en una cuestión fitosanitaria desde hace al menos 6 años. Este problema se ha intensificado en la zona sur del Valle de Mexicali, en donde algunos agricultores reportan un control no satisfactorio con el herbicida fenoxaprop-p-etil y el clodinafop-propargil (Tafuya, 2004). Estudios muestran que la avena silvestre puede ser resistente a herbicidas del grupo de los aryloxyphenoxypropionatos (APP's), aunque no a los cyclohexanedionas (CHD's). La Acetil-Coenzima A Carboxilasa (ACCase) es una enzima clave en la biosíntesis de los ácidos grasos en eucariontes y procariontes (Harwood, 1988). La avena silvestre comúnmente es controlada con herbicidas que inhiben la acción de la enzima ACCase, por lo que el uso continuo de ellos puede ocasionar resistencia (Heap, 1997). La resistencia es el factor que disminuye considerablemente la eficiencia del tratamiento con herbicidas. El diagnóstico de la resistencia en poblaciones de malezas requiere de un método rápido y preciso para identificar los biotipos resistentes (Délye *et al.*, 2002a).

En países como Australia, Sudáfrica, Israel y Canadá, se ha reportado resistencia múltiple en avena silvestre y alpistillo (*Phalaris minor* Retz.) entre varios tipos de herbicidas, sobre todo entre los que inhiben la enzima Acetolactato Sintetasa (ALS) y los que inhiben la enzima ACCase (Heap, 1997). En México, la resistencia se ha reportado en varias regiones. En la región del Bajío, Callejas (2004) confirma la resistencia para los herbicidas APP's y CHD's. En poaceae, la ACCase plastídica es el blanco de éstas dos clases distintas de inhibidores (APP's y CHD's). Estos químicos inhiben la transferencia del grupo carboxil hacia la acetil-CoA (Rendina *et al.*, 1990; Barton *et al.*, 1991). Actualmente, en nuestro país existen varios estudios dirigidos hacia la confirmación y la detección de la resistencia de la avena silvestre (*Avena fatua* L.) con estos dos grupos de herbicidas.

En ellos se menciona la existencia de biotipos que poseen diferente grado de resistencia a su aplicación (Callejas, 2004). Para el Valle de Mexicali, en 2003 se reportó una disminución de hasta 34% en el rendimiento de grano de trigo en tratamientos con clodinafop-propargil, donde se confirmó la presencia de un biotipo de avena silvestre resistente a este herbicida (Cruz, 2004). Sin embargo, no se ha determinado por métodos moleculares la existencia de mutaciones que pudieran conferir esta resistencia y, consecuentemente, diagnosticarlas de manera oportuna. El objetivo de este estudio fue la evaluación de oligonucleótidos que permita detectar las mutaciones puntuales del gen de la ACCase de la *A. fatua* L. relacionadas con la resistencia a herbicidas inhibidores de la síntesis de ácidos grasos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo de septiembre de 2005 a diciembre de 2006, en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, de la Universidad Autónoma de Baja California. Se seleccionaron cuatro poblaciones de avena silvestre (*A. fatua* L.) que presentaron resistencia y susceptibilidad a la aplicación de un herbicida inhibidor de la ACCase. Las muestras fueron colectadas después de que las poblaciones fueron evaluadas en campo respecto a su sensibilidad al clodinafop-propargil (Cruz, 2004). Las poblaciones se identificaron como M5r, M25s, M28r y M43s. Las poblaciones M5r y M28r se comportaron como resistentes durante el estudio en campo y las poblaciones M25s y M43s como susceptibles a la aplicación.

Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)

La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) de las muestras se realizó tomando como base el método descrito por Délye *et al.* (2002a), el cual se describe a continuación: de las plántulas se tomaron 2 cm lineales de hoja; se colocaron en tubos de 1.5 ml para microcentrífuga y se adicionaron 300 μ l de agua destilada durante 24 h a 4 °C. Transcurrido el tiempo se decantó el agua y se añadieron 150 μ l de buffer de extracción (Tris-HCl, 100 mM pH 9.5; KCl 1 M; EDTA 10 mM). Las muestras fueron maceradas con pistilo y se incubaron a 95 °C durante 6 min. Con ayuda de una puntilla estéril se extrajeron los restos de fibra de cada uno de los tubos. Se colocaron en hielo durante 5 min. La precipitación y limpieza del ADN se realizó al añadirles 0.25 de volumen de acetato de amonio 10M + 3 veces el volumen de etanol al 100% a -20 °C. Se mezclaron por inversión 8 veces y se centrifugaron a 14 000 g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y se adicionaron 400 μ l de alcohol isopropílico y 500 μ l de etanol al 75%. En ambos casos se centrifugaron a 14 000 g y se mezclaron por inversión 8 veces, para el alcohol isopropílico durante 6 y 3 min para el etanol, respectivamente. Se extrajo el resto del etanol con micropipeta. Las muestras se secaron a 37 °C durante 15 min. Se les agregaron 100 μ l de agua destilada para finalmente colocarlos en baño maría a 65 °C durante 30 min. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 14 000 g por 30 s. El sobrenadante se cambió de tubo, se aforó a 100 μ l y se conservó a -20 °C.

Amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN)

Se diseñaron dos grupos de oligonucleótidos con base a la secuencia del gen de la ACCasa de la avena silvestre (GeneBank No. de acceso AF231334). El primer grupo estuvo conformado por los oligonucleótidos VSE11GM, VRE11RGM, ACVII11GM y ACVII11RGM (Cuadro I), diseñados para detectar el cambio de timina (T) por adenina (A) en la posición 1 322 del gen descrito y originando el cambio de isoleucina (ATT) por asparagina (AAT) en la estructura molecular de la ACCasa de la avena silvestre.

Los oligonucleótidos ACVII11GM y ACVII11RGM amplifican un fragmento de 1090 pb común para todas las poblaciones (usado como control positivo interno). Los oligonucleótidos ACVIII11GM y VREL11RGM amplifican un fragmento de 480 pb detectando la mutación y los oligonucleótidos ACVII11RGM y VSE11GM amplifican un fragmento de 651 pb indicando la ausencia de la mutación.

El segundo grupo de oligonucleótidos VRDICGM (5' GGA CTA GGT GTG GAG AAC C 3') y VRDITRGM (5' CAA TAG CAG CAC TTC CAT GTAA 3'), detectan el cambio en la secuencia de C o T por A en posición 541 del mismo gen, generando una sustitución de isoleucina (ATA) por leucina (CTA o TTA).

Estos fueron utilizados junto con los oligonucleótidos ACVRG1GM (5' AAT GGG TCG TGG GGC ACT CCT ATA GTT CC 3') y ACVRG1RGM (5' ACT GAG CCA CCT CAA TAT ATT AGA AAC ACC 3') en la misma reacción. Los oligonucleótidos ACVRG1GM y ACVRG1RGM amplifican un fragmento común de 786 pb común para todas las poblaciones (usado como control positivo interno). Los oligonucleótidos ACVRG1GM y VRDITRGM indican la presencia de un alelo con T en la posición 541 del gen descrito amplificando un fragmento de 496 pb corroborando la mutación; los oligonucleótidos ACVRG1RGM y VRDICGM indican la presencia de un alelo con C en la misma posición, amplificando un fragmento de 330 pb que corrobora la mutación.

La mezcla y las concentraciones de los componentes para la PCR se hicieron como sigue: 1 μ l de dNTP's Mix 10mM, 5 μ l de PCR Rxn Buffer 10X, 2 μ l a 25 pM/ μ l de cada oligonucleótido, 2 μ l de MgCl₂ 50mM, 0.5 μ l de DNATaq polimerasa 5 000U/ml., 31.5 μ l de H₂O destilada y 2 μ l de ADN de la muestra. El programa del termociclador consistió de un paso de primera desnaturalización a 95 °C por 4 min seguido de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Previo a este programa se corrió uno de gradientes para la Tm desde 55 hasta 60 °C con intervalos de un grado.

Así mismo, se realizaron variaciones para la concentración de MgCl₂, además de la sustitución de la DNATaq polimerasa por TliDNA Polymerase 5 U/ μ l (Promega) de alta fidelidad y la utilización de Enhanser para AGSGold DNA Pol. (Roche) a razón de 5 μ l/50 μ l de reacción. La detección de los productos amplificados de la PCR (Figura 1 y 2) se llevó a cabo por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando TBE 1X y teñido con 1.5 μ l de bromuro de etidio 10 mg/ml (Invitrogen) por cada 30 ml de gel; se aplicó una carga de 100 V durante 50 min y fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta. Se cargaron 5 μ l de marcador (Bio Ladder 100 pb 150 Lanes, CLP) y 15 μ l de producto de PCR de cada una de las muestras.

Cuadro 1. Oligonucleótidos diseñados con base a la secuencia del gen de la enzima Acetil-Coenzima A Carboxilasa (ACCase) de la avena silvestre (*Avena fatua* L.) (Gene Bank No. de acceso AF231334).

Oligonucleótidos	Secuencia
Grupo uno	
VSE11GM	GCA AAG AGA GAC CTT TTT GAA GGA AT
VSE11RGM	TTG ATC CAG CCT GCA GAT
ACVIII1GM	CTG CTA ACA TTG GTG GAC CTC TTC CTA TTA C
ACVIII1RGM	CAG TCA GTG CTT CCT GCT TCA GCT G
VRDICGM	GGA CTA GGT GTG GAG AAC C
Grupo dos	
VRDITRGM	CAA TAG CAG CAC TTC CAT GTA A
ACVRG1GM	AAT GGG TCG TGG GGC ACT CCT ATA GTT CC
ACVRG1RGM	ACT GAG CCA CCT CAA TAT ATT AGA AAC ACC

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el primer grupo de oligonucleótidos se amplificaron dos fragmentos comunes tanto para las poblaciones resistentes (M5r y M28r) y susceptibles (M25s y M43s) de 1090 pb y 651 pb, indicando la ausencia de la mutación (Figura 1). Por otro lado, se obtuvo el fragmento de 480 pb únicamente para la población M28r. Esto indica la presencia de la mutación al ocurrir la sustitución de isoleucina por asparagina, la cual se relaciona con la presencia de resistencia a herbicidas del grupo de los APP's y no a los CHD's (Délye *et al.*, 2003). La ausencia de la amplificación de este fragmento de 480 pb para la población M5r sugiere la existencia de otros sitios con mutaciones que confieren resistencia a este grupo de herbicidas, como sucede con *Alopecurus myosuroides* Hunds., en la cual Délye *et al.* (2005) reportan que de una población de 50 individuos, 16 de ellos no contenían la mutación, pero que en campo resultaron resistentes a los herbicidas fenoxaprop, clodinafop y haloxyfop, y que por otro lado habían resultado susceptibles a la aplicación de

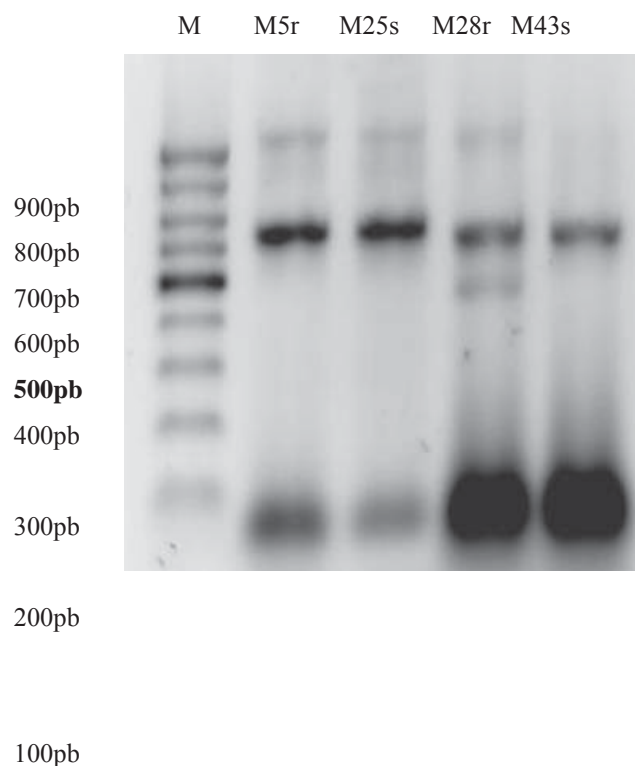


Figura 1. Detección de los productos de la PCR correspondientes con el primer grupo de oligonucleótidos (VSE11GM, VRE11RGM, ACVIII1GM y ACVIII1RGM).

cycloxiidim y clethodim. Por su parte, Cocker *et al.* (2000) señalan que la resistencia de ACCasas a APP's pareciera deberse a la existencia de una o más mutaciones diferentes. Para el segundo grupo de oligonucleótidos (Figura 2) no se logró, después de varias pruebas y variaciones de la concentración y sustitución de los componentes de la PCR, diferenciar las poblaciones que presentaron resistencia en campo de las que no lo presentaron, por lo que no se pudo determinar si la sustitución de isoleucina por leucina está o no ligado con la presencia de resistencia, ya que a través de todas estas variaciones no se logró amplificar el fragmento de 330 pb que indicarían la sustitución de C por A originando un codón CTA.

Tampoco se logró amplificar el fragmento de 496 pb que detecta la sustitución de T por A, la cual origina un codón TTA. En este sentido, Délye *et al.* (2002b) indican la existencia de estas dos mutaciones no sinónimas para la

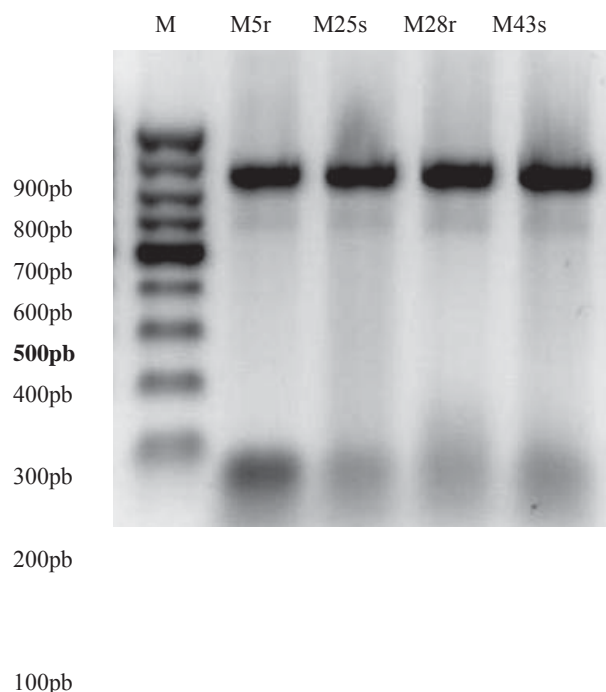


Figura 2. Detección de los productos de la PCR correspondientes con el segundo grupo de oligonucleótidos (VRDICGM, VRDITRGM, ACVRG1GM y ACVRG1RGM).

posición en 5 341 dentro del codón 1 781 causando el cambio de un codón ATA (isoleucina) por un codón TTA o CTA (leucina). A su vez, Christoffers *et al.* (2002) señalan que la sustitución isoleucina por leucina dada por una mutación no sinónima es la responsable de la resistencia a herbicidas que inhiben la acción de la acetil-CoA carboxilasa en avena silvestre UM1.

De acuerdo con Murray *et al.* (1996) sugieren que aunque la sustitución de isoleucina por leucina pareciera conferir mayormente resistencia a herbicidas a la forma ACCasa en la avena silvestre UM1, esta mutación específica probablemente no es la responsable de la resistencia en todas las avenas silvestres. Así mismo, Cocker *et al.*, (2000) refieren que es probable que la resistencia de algunos biotipos de avena silvestre se deba al metabolismo del herbicida y no a cambios dentro de su ACCasa plasmática. Por lo anterior, es importante la continuación de este tipo de estudios para conocer el número y la posición de todas las sustituciones de bases que generan cambios en la estructura molecular de la ACCasa para el desarrollo de oligonucleótidos que nos permitan diferenciar eficientemente el total de individuos resistentes de susceptibles dentro de una población heterogénea.

CONCLUSIONES

Los oligonucleótidos VRDICGM, VRDITRGM, ACVRG1GM y ACVRG1RGM descritos en este estudio detectaron la mutación de la ACCasa de la *Avena fatua* L., que origina la sustitución de isoleucina por asparagina.

Es factible el uso de esta técnica molecular para determinar la presencia de mutaciones en biotipos de avena silvestre (*Avena fatua* L.) relacionadas con la resistencia a herbicidas inhibidores de la síntesis de ácidos grasos.

LITERATURA CITADA

- Barton, D. L.; Thill, D. C. and Shofii, B. 1991. Integrated wild oat (*Avena fatua* L.) management affects spring barley (*Hordeum vulgare* L.) yield and economics. *Weed Technology*. 6:129-135.
- Callejas-Moreno, A. y Arriaga-Bayardi, R. 2004. Eficacia biológica del Everest 70 wdg (flucarbazone sódico) para el control de maleza gramínea resistente a herbicidas de acetil coacarboxilase (ACCCase) en el cultivo de trigo en el Bajío. XXV Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza. Universidad Autónoma de Guadalajara, México.
- Christoffers, M. J.; Berg, M. L. and Messersmith, C. G. 2002. An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat. *Genome* 45 (6)1049-1056.
- Cocker, K. M.; Coleman, J. O. D.; Blair, A. M.; Clarke, J. H. and Moss, S. R. 2000. Biochemical mechanism of cross-resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanodione herbicides in populations of *Avena* spp. *Weed Res.* 40:323-334.
- Cruz-Villegas, M.; Avendaño-Reyes, L.; Partida-Ruvalcaba, L. y López-Lugo, F. 2004. Determinación de la eficacia del clodinafop-propargil en el control de avena (*Avena fatua* L.) y alpiste (*Phalaris minor* retz) en trigo en el Valle de Mexicali, B. C. ciclo OI 2002-03. XXV Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza. Universidad Autónoma de Guadalajara, México.
- Délye, C.; Calmés, É. and Matějček, A. 2002a. SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA-carboxylase inhibiting herbicides. *Theor Appl. Genet.* 104:1114-1120.

- Délye, C.; Matějček, A. and Gasquez, J. 2002b. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest Manag. Sci.* 58:474-478.
- Délye, C.; Zhang X-Q.; Chalopin, C.; Michel, S. and Powles, S. B. 2003. An isoleucine residue within the carboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-CoA carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to cyclohexanodione inhibitors. *Plant Physiol.* 132:1716-1723.
- Délye, C.; Xiao-Qi, Z.; Séverine, M.; Matějček, A. and Powles, S. B. 2005. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiol.* 137:794-806.
- Harwood, J. L. 1988. Fatty acid metabolism. *Annual Rev. Plant Physiol.* 39:101-138.
- Heap, I. M. 1997. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science*, 51:235-243.
- Murray, B. G.; Brûlé-Babel, A. L. and Morrison, I. N. 1996. Two distinct alleles encode for acetyl-CoA carboxylase inhibitor resistance in wild oat (*Avena fatua*). *Weed Sci.* 44:476-481.
- Rendina, A. R.; Craig-Kennard, A. C.; Beaudoin, J. D. and Breen, M. K. 1990. Inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by two classes of grass-selective herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 38:1282-1287.
- Tafoya, R. A. 2004. Resistencia a herbicidas de dos poblaciones de *Avena fatua* L. del Valle de Mexicali. XXV Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza. Universidad Autónoma de Guadalajara, México.