

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A IMIDAZOLINONAS EN ARROZ MALEZA (*Oryza sativa* L.) DEL NORESTE URUGUAYO POR KASP SNPs

Juan E. Rosas¹; Fernando Pérez de Vida²; Victoria Bonnacarrère³

Palabras-clave: arroz vermelho, resistência sitio específica, fluxo gênico, marcadores moleculares, sistema Clearfield[®],

INTRODUCCIÓN

La cadena arrocerera en Uruguay es netamente exportadora, requiriendo para ello una producción de alta calidad y competitividad (BATELLO, 2008). La infestación por arroz rojo o maleza (AM, *Oryza sativa*) es un problema creciente en el país (DIEA, 2009). El AM es una variante dañina que por ser de la misma especie que el arroz cultivado (AC, *O. sativa*) no puede combatirse eficientemente con herbicidas selectivos. Una respuesta comercial a este problema es el Sistema de Producción de Arroz Clearfield[®] (SPACL), de reciente adopción en Uruguay. Este sistema de producción combina el uso de herbicidas imidazolinonas (IMI) con variedades de AC no transgénico con resistencia a IMI (ACRI). Esta resistencia se debe a una mutación puntual en la enzima blanco (acetolactato sintasa) que les otorga resistencia al herbicida. Las mutaciones presentes en cultivares ACRI son S₆₅₃E, G₆₅₄E o A₁₂₂T. Éstas pueden incorporarse a poblaciones de AM por flujo génico desde ACRI, lo que ha sido reportado como principal fuente de resistencia a IMI en AM en EEUU (SHIVRAIN et al. 2010) y Brasil (ROSO et al. 2010). El uso sostenido de IMI selecciona híbridos resistentes y eventuales mutantes espontáneos, generando poblaciones de arroz maleza resistente a IMI (AMRI) que limitan fuertemente la utilidad de la tecnología SPACL.

En Uruguay no existen estudios de flujo de genes desde variedades ACRI a AM. Este estudio utiliza marcadores moleculares tipo KASP SNPs (KBIOSCIENCES, 2011) para caracterizar la resistencia a IMI en AM proveniente de una chacra de arroz con 3 años de uso continuo de SPACL. Se obtuvieron las primeras evidencias de flujo de genes de resistencia desde variedades ACRI a AM en el país, que avalan la importancia de reforzar las recomendaciones para un uso responsable del SPACL.

MATERIALES Y MÉTODOS

SITUACIÓN DE CAMPO Y MATERIAL VEGETAL

El AM fue colectado en una chacra de arroz en el depto. de Cerro Largo (NE del país), con cuatro sectores con 0, 1, 2 y 3 años de uso de SPACL (sectores A, B, C y D, respectivamente (tabla 1).

SECTOR	A	B	C	D
SUP (ha)	4	8	9	8
AÑO 1	INIA Olimar	INIA Olimar	INIA Olimar	CL 161
AÑO 2	INIA Olimar	INIA Olimar	INTA Puitá-CL	CL 161+INTA Puitá-CL
AÑO 3	INIA Olimar	INTA Puitá-CL	INTA Puitá-CL	INTA Puitá-CL

Tabla 1. Sectores con los cultivares sembrados en los 3 años estudiados.

¹ Lic., MSc en Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Uruguay. Ruta 8 Km 281, Treinta y Tres. CP 33000. E-mail: jrosas@tyt.inia.org.uy.

² Ing. Agr., PhD. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Uruguay. E-mail: fperez@tyt.inia.org.uy.

³ Ing. Agr., Lic. BQ, MSc. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Uruguay. E-mail: vbonnecarrere@lb.inia.org.uy.

Los cultivares sembrados fueron: INIA Olimar (susceptible a IMI); INTA Puitá-CL (mutación A₁₂₂T) y CL-161 (mutación S₆₅₃D). Se identificaron 24, 29, 31 y 48 sitios de alta concentración de AM en cada sector, respectivamente. De cada sitio se colectó por separado la semilla de una panícula por cada individuo con fenotipo de AM. Se muestrearon 101 plantas en el sector A, 74 en el B, 75 en el C y 90 en el D.

TAMIZADO POR APLICACIÓN DE KiFix®

Se sembraron en almacigueras más de 15000 semillas colectadas de 340 individuos de AM identificados en el campo (1 hilera con la semilla de cada individuo), así como hileras con variedades testigo susceptible (INIA Olimar) y resistente (INTA Puitá-CL) en cada almaciguera. Emergieron 12075 plantas de AM, que junto con las variedades testigo, recibieron dos aplicaciones secuenciales de herbicida KiFix®, BASF (Imazapic 17.50% w/w, Imazapir 52.50% w/w + coadyuvante tensioactivo no iónico Plurafac® al 0.25%) a dosis letales (200 g/há), a los 15 y 30 días post-emergencia (figura 13). Se conservaron a -20 °C muestras de tejido de una planta por cada hilera con más de 50% de sobrevivientes.

DETECCIÓN POR KASP DE MUTACIONES DE RESISTENCIA

MATERIAL VEGETAL ANALIZADO:

De cada hilera con más del 50% de plantas sobrevivientes (correspondiendo cada hilera a la descendencia de una panícula por planta identificada en el campo), un individuo fue analizado por técnicas moleculares para determinar la presencia de mutaciones de resistencia. En cada corrida se incluyeron controles con ADN de cultivares con genotipo conocido homocigota resistente, homocigota susceptible y heterocigota para la mutación a determinar, así como controles sin ADN.

EXTRACCIÓN DE ADN:

Se empleó el método CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) adaptado al procesamiento simultáneo de 96 muestras, de acuerdo al siguiente protocolo: Se colocaron aproximadamente 0,2 g de tejido verde de cada planta a analizar en un tubo de 1,2 mL (n° cat. 409010 Deltalab, España), agregando una munición de acero de 5/32" a cada tubo. Se pulverizó el tejido congelándolo con N líquido y sometándolo a agitación intensa durante 2 min en un dispositivo mecánico diseñado a tales efectos. Se incubó en 500 µL de buffer CTAB (Sigma) por 20 min a 65°C en baño de agua, agitando cada 5 min. Se dejó recuperar la TA, agregando 500 µL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 v/v (Amresco) y mezclando suavemente. Se centrifugó 20 min a 4000 rpm utilizando rotor para placas (Centrifuga Sigma 2-16 P, Sartorius Stedim Biotech, Alemania), transfiriéndose la fase acuosa a un tubo nuevo. Se agregaron 300 µL de isopropanol (Dorwil) a 4°C. Se incubó a 4°C durante al menos 30 min, centrifugando a 4000 rpm durante 5 min. Se realizaron 2 lavados con etanol 70° (Bionova), dejando evaporar a TA de 3 a 16 h. El ADN extraído se resuspendió en 100 µL de agua MilliRO estéril (Direct-Q 3, Millipore, EEUU).

Se determinó la concentración de ADN obtenido midiendo absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, EEUU). Se llevaron las concentraciones de ADN de las muestras y controles a 100 ng/µL.

KASP PARA MUTACIONES S₆₅₃D y A₁₂₂T:

El análisis por KASP para las mutaciones S₆₅₃D y A₁₂₂T se realizó a un total de 168 individuos, 1 del sector A, 6 del sector B, 72 del sector C y 89 del sector D. No se analizaron muestras para la presencia de la mutación G₆₅₄E, por no haber cultivares ACRI portadores de ese alelo en las situaciones de campo estudiadas.

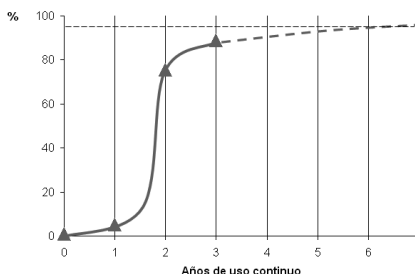
La mezcla de amplificación se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante,

con 5 μL de *KASP reaction mix* (conteniendo Taq ADN polimerasa, buffer de amplificación, dNTPs, MgCl_2 , colorante ROX y cassettes FRET), 5 ng de ADN de la muestra a analizar, y 0,14 μL de Assay (conteniendo cebadores alelo-específicos para una concentración final en la mezcla de reacción de 12 μM y cebador común antisentido para una concentración final de 30 μM). Las condiciones de ciclado para $S_{653}\text{D}$ fueron: 15 min a 94°C; 10 ciclos con touchdown de 10 s a 94°C y 60 s a 65 °C, con una caída de 0,8 °C/ciclo, llegando a una temperatura de annealing final de 57 °C; y 40 ciclos de 10 s a 94°C y 60 s a 57°C. Para $A_{122}\text{T}$ los ciclados fueron: 15 min a 94 °C; 12 ciclos con touchdown de 15 s a 94 °C y 60 s a 68°C, con una caída de 0,5 °C/ciclo, llegando a una temperatura de annealing final de 62 °C; y 40 ciclos de 10 s a 94 °C y 60 s a 57 °C. Se amplificó en un termociclador con gradiente Corbett Palm-CyclerTM, y la detección se hizo adquiriendo señal de fluorescencia durante 2 min a 25 °C en un termociclador de tiempo real Corbett Rotor-GeneTM 6000 (ambos equipos de Corbett Life science, Mortlake, Australia)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SOBREVIVENCIA A KiFix[®]

A partir de las cantidades de plantas con descendencia mayoritariamente sobreviviente a herbicida en cada sector se obtuvo una curva de crecimiento de la población de AMRI a partir de la semilla sobreviviente a KiFix[®], en un escenario de uso ininterrumpido de SPACL en la situación de campo estudiada (gráfica 1). Los datos obtenidos en este estudio coincidieron con las proyecciones de un modelo teórico descrito por Gealy et al. (2003).

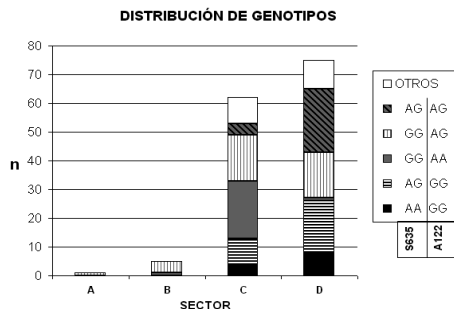


Gráfica 1. Proyección de crecimiento del porcentaje de AMRI en base a los datos de campo. La línea punteada horizontal indica el 95% de individuos resistentes en la población, nivel que se alcanzaría en seis años.

DETECCIÓN DE MUTACIONES $S_{653}\text{D}$ Y $A_{122}\text{T}$ POR KASP

En la gráfica 2 se presentan los genotipos para las mutaciones $S_{653}\text{D}$ y $A_{122}\text{T}$ determinadas por el método KASP. La resistencia a IMI en los sectores A y B está dada exclusivamente por la mutación $A_{122}\text{T}$, la que predomina también en el sector C, tanto en homocigotas como heterocigotas, mientras que en el D hay mayor presencia de la mutación $S_{653}\text{D}$, especialmente en estado homocigota.

Esto muestra una correlación general entre la prevalencia de las mutaciones encontradas y las variedades sembradas en cada sector, indicando al flujo génico como principal fuente de resistencia a IMI en AM en la situación estudiada. Sin embargo, un 7% de las muestras (incluidas en "otros" en gráfica 2) resistieron a dosis letales de IMI sin presentar ninguna de las mutaciones interrogadas. Este tipo de resultados coincide con los de estudios similares a mayor escala (ROSO *et al.*, 2010). Por otra parte, la presencia de alelos mutantes en sectores donde las variedades donantes no fueron sembradas ($A_{122}\text{T}$ en sector A y $S_{653}\text{D}$ en sector B) es indicadora de eventos de dispersión de semilla. Esto puede corresponder al uso de semilla propia por parte del productor.



Gráfica 2. Resultados del genotipado por KASP en los loci S₆₅₃ y A₁₂₂. A = alelo de resistencia, G = alelo de susceptibilidad, Otros = no se detectaron las mutaciones interrogadas.

CONCLUSIÓN

Eventos de flujo genes de resistencia desde variedades ACRI a AM pueden ocurrir anualmente si las condiciones son propicias. Además, la dispersión de semilla resistente juega un rol importante en la expansión del AMRI. Los datos generados constituyen la primera evidencia molecular de estos eventos en Uruguay. Considerando las experiencias de regiones en las que el AM ha comprometido la competitividad como el sur de Brasil o en Arkansas, EEUU (VILLA *et al.*, 2006; BURGOS *et al.*, 2008) se hace imprescindible reforzar las recomendaciones para un uso responsable de SPACL, minimizando los eventos de flujo de genes de resistencia y la dispersión de híbridos resistentes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se enmarcó en el proyecto financiado por FONTAGRO *Impacto ambiental de la adopción del arroz resistente a las imidazolinonas en sistemas productivos contrastantes de América Latina*. El primer autor recibió una beca de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) de Uruguay. Se agradece el apoyo del personal de INIA Téc. Agr. Daniel Ramírez, Id. Agr. Adriana López, Sr. Wilson Ferreira y Br. Leticia Quintana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Batello C (2008) El arroz en Uruguay. *Arroz* (Publicación de la Asociación de Cultivadores de Arroz del Uruguay), 53:34-40
- BASF Argentina SA (2008) Arroz Clearfield®. Folleto disponible en: www.agro.basf.com.ar
- Burgos NR, Norsworthy JK, Scott RC, Smith KL (2008) Red Rice (*Oryza sativa*) Status after 5 Years of Imidazolinone-Resistant Rice Technology in Arkansas. *Weed Technology*, 22:200-208.
- DIEA (2009) Estadísticas Básicas del Sector Arrocerero, Período 1998-2009. *Publicación de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca*.
- Gealy DR, Mitten DH, Rutger N (2003) Gene Flow Between Red Rice (*Oryza sativa*) and Herbicide-Resistant Rice (*O. sativa*): Implications for Weed Management. *Weed Technology*, 17:627-645.
- KBiosciences (2011) KBiosciences: Genotyping Chemistry. <http://www.kbioscience.co.uk>
- Roso AC, Merotto Jr A, Delatorre CA, Menezes VG (2010) Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. *Field Crops Research*, 119:175-182.
- Shivrain VK, Burgos NR, Sales MA, Kuk YI (2010) Polymorphisms in the ALS gene of weedy rice (*Oryza sativa* L.) accessions with differential tolerance to imazethapyr. *Crop Protection*, 29:336-341.
- Villa SCC, Marchezan E, Avila LA, Massoni PFS, Telo GV, Machado SLO, Camargo ER (2006) Arroz Tolerante a Imidazolinonas: Controle do Arroz-Vermelho, Fluxo Gênico e Efeito Residual do Herbicida em Culturas Sucessoras Não-Tolerantes. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, 24:761-768.