

Estudio comparativo entre individuos de *Chenopodium album* L. resistentes y sensibles a simazina, detectados en cultivos de Galicia (NO España)

M.C. SILVEIRA *, E. SAHUQUILLO* & M.I. FRAGA**

*Departamento de Biología Animal, Biología Vexetal e Ecoloxía. Facultade de Ciencias Universidade A Coruña. 15071 A Coruña

**Departamento de Biología Vexetal. Facultade de Biología. Universidade de Santiago de Compostela. 15706 Santiago de Compostela

(Recibido, diciembre de 2000. Aceptado, abril 2001)

Resumen

SILVEIRA, M.C., SAHUQUILLO, E. & FRAGA, M.I. (2001). Estudio comparativo entre individuos de *Chenopodium album* L. resistentes y sensibles a simazina, detectados en cultivos de Galicia (NO España). *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 11:

Se han identificado individuos de *Chenopodium album* resistentes y sensibles a simazina en cultivos de Galicia, mediante análisis de emisión de fluorescencia cloroflica en hojas enteras. Los resultados del análisis de cpADN mostraron que las plantas resistentes presentaban una mutación en el codon 264 del gen *psbA*, consistente en un cambio de serina (AGT) por glicina (GGT) que provoca un cambio en la estructura de la proteína D1. Fragmentos de cpADN fueron amplificados mediante PCR y digeridos con el enzima de restricción *MaeI*. Como resultado de la digestión se observaron 2 bandas de 338 y 75 pb en las plantas con dicha mutación y 3 bandas de 218, 120 y 75 pb en las sensibles. Asimismo, el análisis de la estructura foliar mostró diferencias entre ambos tipos de plantas. Las resistentes presentaban los espacios intercelulares del parénquima en empalizada de mayor tamaño que las sensibles.

Palabras clave: Resistencia, sensibilidad, simazina, *Chenopodium album* L., Galicia.

Abstract

SILVEIRA, M.C., SAHUQUILLO, E. & FRAGA, M.I. (2001). A comparative study between resistant and susceptible plants of *Chenopodium album* L. to simazine, recorded in crops from Galicia (NW Spain). *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 11:

Resistant and susceptible *Chenopodium album* plants to simazine from Galician crops were identified by chlorophyll fluorescence analysis of intact leaves. The results of the cpDNA analysis showed that the resistant plants had a Ser 264 (AGT) Gly (GGT) mutation in the *psbA* gene, which is responsible for an amino acid substitution in the D1 protein sequence. cpDNA fragments were amplified by PCR and digested with restriction enzyme *MaeI*. Two restriction bands of 338 and 75 bp were recorded in plants with the target mutation, while three bands (218, 120 and 75 bp) were present in susceptible plants. Moreover, anatomical leaf comparative analyses showed differences between both types of plants. Resistant plants had bigger intercellular spaces of the palisade parenchyma than the susceptible plants.

Key words: Resistance, susceptibility, simazine, *Chenopodium album* L., Galicia.

INTRODUCCIÓN

La detección y caracterización de biotipos resistentes a herbicidas es un punto de partida necesario a la hora de plantearse una estrategia de control de las malas hierbas. Esta necesidad se ha visto incrementada por el aumento que los métodos de escarda química han tenido desde mediados del siglo XX, sobre todo en aquellos países donde los cultivos extensivos son una práctica habitual y, en concreto, en las últimas décadas en Galicia, donde su agricultura intensiva y el abandono del campo han llevado a un uso más indiscriminado de los herbicidas.

La simazina (2-cloro-4,6-bis(etilamino)-s-triazina) pertenece a una familia de herbicidas que actúan inhibiendo la fotosíntesis (DODGE, 1991). Actualmente se conocen alrededor de 60 especies que presentan biotipos resistentes a este tipo de herbicidas y dentro de este grupo, en la Península Ibérica han sido detectados 21 taxones que presentaron resistencias a la simazina en: Andalucía (DE PRADO *et al.*, 1989, 1997), Aragón (LÓPEZ *et al.*, 1993), Cataluña (TABERNER *et al.*, 1995) y Galicia (FRAGA *et al.*, 1999).

Con respecto a *Chenopodium album* es ampliamente conocida la existencia de biotipos de esta especie resistentes a triazinas, aunque sólo han sido detectados algunos casos de resistencia a simazina en Gran Bretaña (CLAY, 1987; HEAP, 1999) y en Galicia (FRAGA *et al.*, 1999).

Se conocen tres mecanismos generales responsables de la aparición de resistencias a herbicidas que son resultado de modificaciones en el lugar de acción o de tipo metabólico o fisiológico. Para herbicidas del grupo de las triazinas se ha comprobado en algunas especies la existencia de una mutación en la proteína de enlace D1 del fotosistema II (PSII) que provoca una reducción en la afinidad del herbicida por su sitio de acción. Esta mutación se produce en el gen cloroplástico *psbA*, gen bastante conservado, que presenta un alto grado de homología secuencial en diferentes especies (ZURAWSKI *et al.*, 1982; HIRSCHBERG & McINTOSH, 1983). Entre las especies en que esta mutación ha sido detectada se encuentra *Chenopodium album* (BETTINI *et al.*, 1987;

GADAMSKI *et al.*, 1996). Este comportamiento no siempre es generalizable a todas las especies, puesto que en algunos casos pueden producirse otras mutaciones (SCHWENGER *et al.*, 1993).

Los otros dos mecanismos plantean por un lado, un aumento en el metabolismo que permita la degradación del herbicida (LOPEZ MARTINEZ *et al.*, 1995; TABERNER *et al.*, 1995) y, por otro lado, la translocación o compartimentación del herbicida, aunque este último mecanismo todavía no se ha relacionado con herbicidas triazínicos.

La alteración de la capacidad fotosintética que presentan los biotipos resistentes a herbicidas en algunos casos (LEMOINE *et al.*, 1986; HOLT & GOFFNER, 1985) se ha correlacionado con modificaciones en la anatomía foliar y con un menor rango de crecimiento, por lo que estos biotipos se encontrarían peor adaptados a condiciones ambientales desfavorables.

La detección de biotipos resistentes a inhibidores fotosintéticos, se realiza normalmente mediante técnicas de inducción de fluorescencia siendo menor el número de trabajos que profundizan en la caracterización genética y molecular de los mismos ya que esto requiere una metodología más compleja, cuya utilización, en la actualidad, se ha visto favorecida por el desarrollo y aplicación de técnicas moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar este estudio se analizaron ejemplares de *Chenopodium album* recogidos en un viñedo (O Rosal, Pontevedra) y 7 maizales localizados en otros tantos municipios de la provincia de A Coruña. Dichos cultivos habían sido tratados con simazina de forma regular durante los últimos 5 años. Todas las plantas que presentaban, aparentemente, buen aspecto después de los tratamientos se llevaron al laboratorio con suficiente sustrato y humedad para mantenerlas en buen estado. Posteriormente, fueron transplantadas a invernadero.

Para la detección de posibles resistencias se procedió al análisis de fluorescencia clorofílica en hojas enteras. Para las pruebas de inducción

de fluorescencia se siguió el método de DUCRET & GASQUEZ (1978) con las siguientes modificaciones: las hojas una vez separadas de la planta madre se colocaban en placas Petri con una solución de 40ppm de simazina y se dejaban en cámara con iluminación y temperatura de 20 ± 1 °C durante toda la noche, al lado de placas testigo que contenían hojas en agua destilada. A la mañana siguiente se medía la emisión de fluorescencia, después de mantener las hojas durante al menos 30 minutos en oscuridad, con las modificaciones desarrolladas por FRAGA *et al.* (1999). Las curvas de inducción de fluorescencia rápida se obtuvieron mediante un espectrofluorímetro Hansatech (P02.003). La información recogida fue transferida a un ordenador y analizada mediante el programa PEA (Plant Efficiency Analyser).

La extracción de DNA total se realizó siguiendo la técnica de DOYLE & DOYLE (1991) en la que se realizaron algunas modificaciones para mejorar la calidad del DNA extraído. Estas modificaciones consistieron en utilizar fenol: cloroformo:isoamino alcohol (PCIA) en vez de cloroformo:isoamino alcohol y en que la suspensión final de DNA fue tratada con etanol al 96% durante toda la noche a -20°C y sometida, posteriormente a centrifugación (5min., a 12000rpm) provocando su precipitación. La cantidad y calidad del DNA se determinó mediante espectrofotometría (UV-Visible Spectrophotometer, Cary 3E-Varain) y por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para detectar la resistencia a nivel molecular se amplificó un fragmento del gen *psbA* de 413 pares de bases según el método propuesto por GADAMSKI *et al.* (1996). La amplificación se realizó con un termociclador (Gene Cycler Thermal Cycler) de Bio-Rad, utilizando Taq polimerasa de Boehringer y la técnica "Tooch-down". El programa consistió en: 6 ciclos a 94°C durante 1 minuto (desnaturalización), 58°C - 1°C /ciclos durante 1,5 minutos (anillamiento), 73°C durante 1,5 minutos (elongación) y 30 ciclos a: 94°C durante 1 minuto, 52°C durante 1,5 minutos (anillamiento), 72°C durante 1,5 minutos.

El producto de cada amplificación fue purificado antes de realizar las digestiones enzimáticas, para ello, se precipitó el producto de la PCR (50 ml) con etanol al 96% y acetato sódico 3M(1/10 vol.) manteniéndolo toda la noche a -20°C . Posteriormente, se centrifugó y lavó con etanol frío al 70% y se resuspendió en agua destilada. Por último, se estimó su concentración mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Para la detección de la mutación se utilizaron dos enzimas de restricción, la primera *BstXI* (Boehringer) cuya región de reconocimiento es la secuencia 5'-CCA(N)5/NTGG-3' que aparece en aquellos biotipos que han sufrido una mutación en la posición 264 del gen *psbA* (GADAMSKI *et al.*, 1996) y la segunda *MaeI* (Boehringer), cuya secuencia de reconocimiento es 5'-C TAG-3' que aparece en aquellas plantas que no han sufrido dicha mutación (BETTINI *et al.*, 1987). Para la digestión se siguió el protocolo específico de cada enzima y los productos de la digestión se analizaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2%.

Para la caracterización anatómica de la hoja y el estudio de la ultraestructura de los cloroplastos se fijaron las hojas de plantas sensibles y resistentes de *Chenopodium album* en una mezcla de glutaraldehído (4%) en tampón fosfato 0,05M (ph=7,4) y sacarosa 0,4M durante 16 horas y post-fijadas en OsO₄ (1%) durante 12h a 4°C . Posteriormente, se deshidrataron en gradiente creciente de acetona, realizándose la tinción en bloque de las muestras con acetato de uranilo (2%) en acetona (70%). Las muestras deshidratadas fueron incluidas en resina de Spurr y polimerizadas a 65°C durante 8h. Por último, los bloques fueron seccionados en un ultramicrotomo Reichert.-Jung para obtener cortes semifinos (0,35 μ) y ultrafinos (70nm). Los semifinos se tiñeron con azul de toluidina y los ultrafinos contrastados en acetato de uranilo y citrato de plomo. Para observar y fotografiar los cortes se utilizaron un microscopio óptico Olympus BX 50 y un microscopio electrónico de transmisión Zeiss.

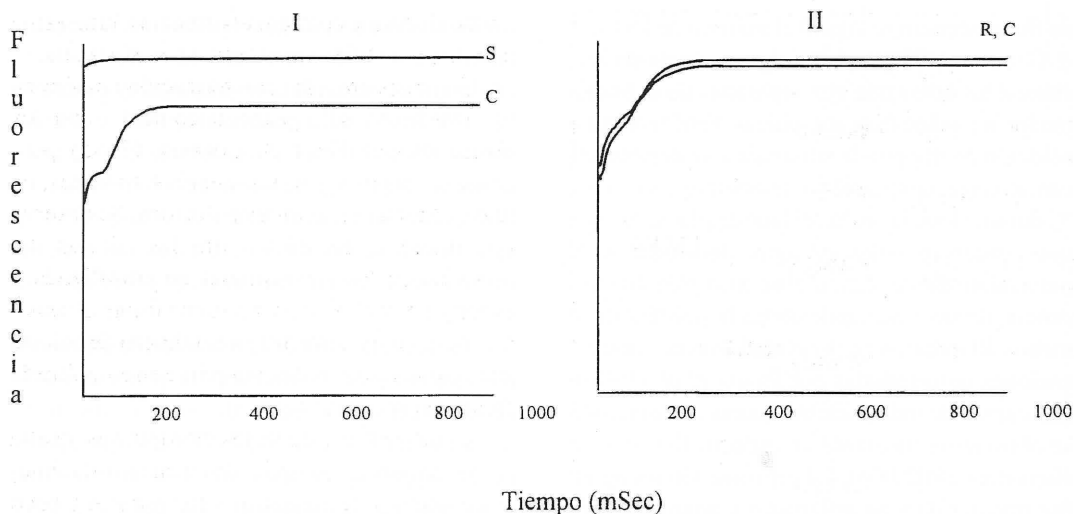


Fig. 1. Patrón de inducción de fluorescencia observado en *Chenopodium album*. I) biotipo sensible (S) frente al control (C). II) biotipo resistente (R) frente al control (C).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número total de individuos analizados fue de 124 de los que 16 eran resistentes a la simazina según el patrón presentado de inducción de fluorescencia. Sólo en dos localidades se detectaron resistencias, 5 plantas en un maizal y 11 en el viñedo.

La cinética observada en biotipos sensibles se caracteriza por presentar un ascenso rápido hasta alcanzar un máximo que se mantiene debido al bloqueo total del fotosistema II (PSII). En los biotipos resistentes la curva de inducción presenta una fase inicial de ascenso hasta que se produce una pequeña meseta debido al equilibrio entre ambos aceptores de electrones (Qa y Qb), para posteriormente, alcanzar un máximo debido a la saturación de ambos aceptores (Fig. 1).

La caracterización molecular de estos individuos se basó en que uno de los mecanismos responsables de la resistencias a herbicidas fotosintéticos como las atrazinas es la aparición de una mutación en el codon 264 del gen cloroplástico donde se produce un cambio de

serina (AGT) a glicina (GGT). La mutación que presenta este gen provoca un cambio en la estructura terciaria de la proteína D1 impidiendo así la unión al herbicida.

Los resultados obtenidos no son igualmente concluyentes con ambas enzimas. En el caso de *BstXI*, el producto amplificado y purificado se sometió a varias digestiones pero en ningún caso se observaron muestras de digestión, a pesar de confirmarse la actividad del enzima mediante un control.

Con respecto al enzima *MaeI*, el patrón de digestión presenta tres fragmentos de longitudes diferentes, aproximadamente de 218, 120 y 75 pb (Fig. 2) para los individuos sensibles, resultado de la existencia de dos dianas. En las plantas resistentes, este enzima presenta solo una diana que genera dos fragmentos de aproximadamente 338 y 75 pb (Fig. 2).

Estos resultados coinciden con lo publicado, hasta ahora, para atrazinas tanto en otras especies (GADAWSKI *et al.*, 1996) como para *Chenopodium album*, en ejemplares recogidos en Dijon-Francia (BETTINI *et al.*, 1987), lo que pone de manifiesto que, en este caso, es la misma

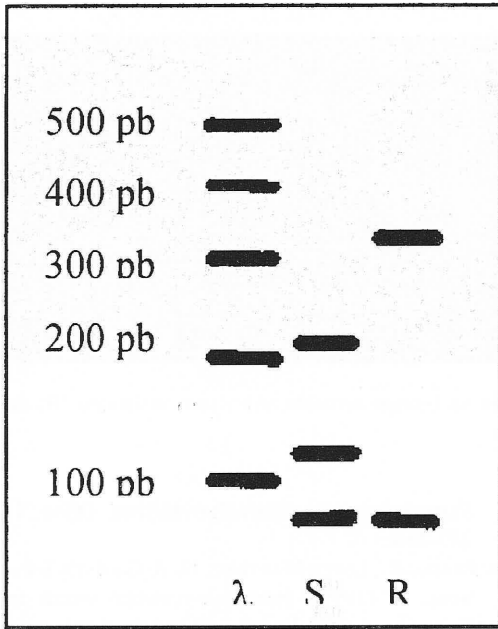


Fig. 2. Representación esquemática de los fragmentos de cpADN amplificados por PCR, dirigidos con el enzima *MaeI* y separados mediante electroforesis en gel de agarosa. λ: Marcador peso molecular, S: Individuos sensibles, R: Individuos resistentes.

mutación la que confiere resistencia a la atrazina que la que confiere resistencia a la simazina.

Con respecto a la caracterización anatómica los resultados sólo parecen coincidir con los obtenidos por HOLT & GOFFNER (1985) para *Senecio vulgaris* y su resistencia a triazinas, en uno de los tres criterios establecidos. Se observa una mayor separación entre las células del mesófilo en los parénquimas en empalizada y esponjoso en el biotipo resistente frente al sensible, pero no un aumento en el número de células y mayor volumen del parénquima en empalizada frente al esponjoso (Fig. 3).

La ultraestructura de los cloroplastos resulta coincidente con lo publicado en cuanto al número de granos de almidón que son escasos y poco aparentes en el biotipo resistente y numerosos en el sensible (Fig. 4), pero no sucede lo mismo con respecto a la organización lamelar, donde se ha observado una gran variabilidad dentro de la misma célula en diferentes cloroplastos. Esta variación se ha relacionado con el tamaño o la forma del cloroplasto, siendo menores estos apilamientos cuando el cloroplasto es alargado y mayores cuando este es más grueso (LEMOINE *et al.*, 1986). Debido a la variabilidad observada estos resultados no son concluyentes y deben ser analizados más detalladamente, aumentando el número de individuos estudiados e intentando correlacionar las variaciones existentes con las condiciones de crecimiento.

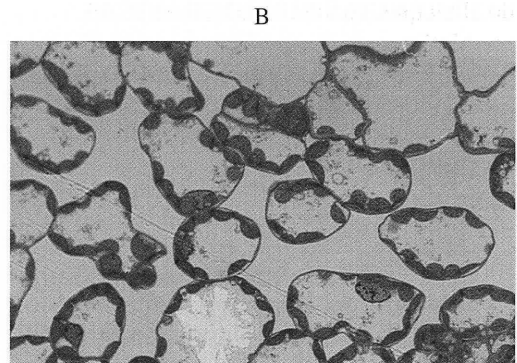
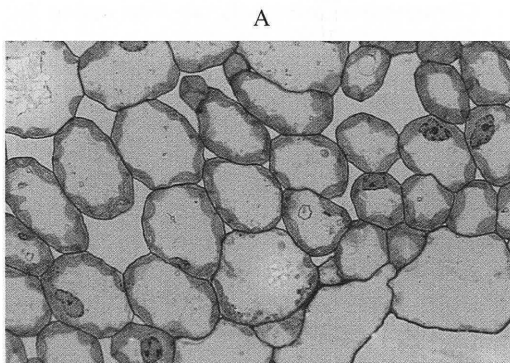


Fig. 3. Sección transversal de hoja de un biotipo sensible (A) y resistente (B) de *Chenopodium album*.

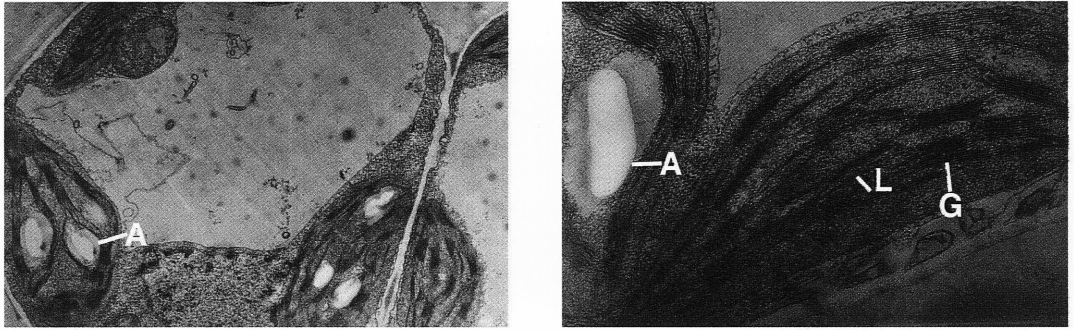


Fig. 4. Sección transversal de una célula parenquimática de un biotipo sensible (A) y otro resistente (B) de *Chenopodium album*. G=granum, L=tilacoide y A=almidón

CONCLUSIONES

Este trabajo ha permitido ampliar la información existente sobre los mecanismos que confieren resistencia a simazina en *Chenopodium album*. Desde un punto de vista genético hemos detectado una mutación cuya frecuencia en la naturaleza es muy baja, pero que ha sido correlacionada con la aparición de resistencias.

Además, el estudio de la anatomía foliar y la ultraestructura de los cloroplastos, confirmó la existencia de diferencias en la estructura foliar de los individuos resistentes en relación con los sensibles, especialmente con respecto a un aumento en el volumen de los espacios intercelulares del parénquima en empalizada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTINI, P., McNALLY, S., SEVIGNAC, M., DARMENCY, H., GASQUEZ, J. & DRON, M. (1987). Atrazine resistance in *Chenopodium album*. *Plant Physiology*, **84**: 1442-1446.
- CLAY, D.V. (1987). The response of simazine-resistant and susceptible biotypes of *Chamomilla suaveolens*, *Epilobium ciliatum* and *Senecio vulgaris* to other herbicides. *Proceedings British Crop Protection Conference, Weeds*: 925-932.
- DE PRADO, R., DOMÍNGUEZ, C. & TENA, M. (1989). Caracterización de triazina-resistente biotypes of *Amaranthus* spp. Found in Spain. *VIIIe Colloque International Sur la Biologie, L'Ecologie et la Systematique des Mauvaises Herbes. Dijon*, **1**: 247-256.
- DE PRADO, R., LÓPEZ-MARTÍNEZ, N. & GIMÉNEZ-ESPINOSA, R. (1997). Herbicide-resistant weeds in Europe: agricultural, physiological and biochemical aspects. In: De Prado, R., Jorrín, J. & García-Torres, L. (Eds.), *Weed and Crop Resistance to Herbicides*: 17-27. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- DODGE, A. (1991). Photosynthesis. In: Kirkwood, R.C.(Ed.), *Target sites of herbicide action*: 1-27. Plenum Press, New York.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. (1991). DNA protocols for plants. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. & Young, J.P.W. (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*: 101-115. NATO ASI Series H: Cell Biology, **57**, New York.
- DUCRET, J.M. & GASQUEZ, J. (1978). Observation sur la fluorescence sur feuille entière et mise en évidence de la résistance chloroplastique à l'atrazine chez *Chenopodium album* L. et *Poa annua* L. *Chemosphere*, **7**: 691-696.
- FRAGA, M.I., ARESES, M.L., BALEATO, J.C., DURÁN, M.V., GONZÁLEZ, M.L., REY, A., SAHUQUILLO, E. & TASENDE, M.G. (1999). Especies de malas hierbas con biotipos resistentes a simazina en cultivos de Galicia. *Actas Congreso 1999 de la SEMh*: 375-385. Logroño.
- GADAMSKI, G., CIARKA, D. & GAWROSKI, S. (1996). Molecular survey of polish resistant biotypes of weeds. *Proceeding of the International Symposium on weed and crop resistance to herbicides*, **2**: 547-550.
- HEAP, I. (1999). International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet: www.Weddscience.com.

- HIRSCHBERG, J. & MACINTOSH, L. (1983). Molecular basis of atrazine resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science*, **222**: 1346-1349.
- HOLT, S.J. & GOFFNER, D. (1985). Altered leaf structure function in triazine-resistant common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Plant Physiol.*, **79**: 699-705.
- LEMOINE, Y., DUBACQ, J., ZABULON, G. & DUCRUET, J. (1986). Organization of the photosynthetic apparatus from triazine-resistant and susceptible biotypes of several plants. *Can. J. Bot.*, **64**: 2999-3007.
- LÓPEZ, C., MURILLO, S., ZARAGOZA, C. & DE PRADO, R. (1993). Poblaciones de malas hierbas anuales resistentes a la atrazina en Aragón. *Congreso 1993 de la SEMh*: 249-253.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, N., HIDALGO, J., PUJADAS, A., MARSHALL, G. & DE PRADO, R. (1995). Resistance of *Echinochloa* spp. to atrazine and quinclorac. *Proceeding of the International Symposium on weed and crop resistance to herbicides*: 23-25. Córdoba.
- SCHWENGER-ERGGGER, C., THIEMANN, J., BARZ, W., JOHANNINGMEIE, R.V. & NABER, D. (1993). Metribuzin resistance in photoautotrophic *Chenopodium rubrum* cell cultures. *FEBS Lett.*, **329**: 43-46.
- TABERNER, A., MENÉNDEZ, J., DE PRADO, J.L. & DE PRADO, R. (1995). Herbicide resistance weeds in Catalonia. *Proceeding the International Symposium on Weed and Crop Resistance to herbicides*: 34-36. Córdoba.
- ZURAWSKI, G., BOHNERT, H.J., WHITFIELD, P.R. & BOTTOMLEY, W. (1982). Nucleotide sequence of the gene for the Mr 32,000 thylakoid membrane protein from *Spinacia oleracea* and *Nicotiana debneyi* predicts a totally conserved primary translation product of Mr 38,950. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6999-7703.