

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN PRO106 EN TRES BIOTIPOS
CHILENOS DE *Lolium multiflorum* RESISTENTES A GLIFOSATO,
DETERMINADOS POR ANÁLISIS DCAPS.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

Enrique Andrés Torres Reveco

TEMUCO – CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN EN LA POSICIÓN P106 EN TRES
BIOTIPOS CHILENOS DE *LOLIUM MULTIFLORUM* RESISTENTES A
GLIFOSATO, DETERMINADOS POR ANÁLISIS DCAPS.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

Enrique Andrés Torres Reveco
Profesor guía: Rafael Galdames G.
TEMUCO – CHILE

2012

FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN P106 EN TRES BIOTIPOS CHILENOS DE *Lolium multiflorum* RESISTENTES A GLIFOSATO, DETERMINADOS POR ANÁLISIS DCAPS.

PROFESOR GUIA:

RAFAEL EDUARDO GALDAMES GUTIÉRREZ

INGENIERO AGRONOMO, DOCTOR EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGIA EN PLANTAS.

UNIDAD DE BIOTECNOLOGIA, INIA-
CARILLANCA.

PROFESORES CONSEJEROS:

ALEJANDRA SANDOVAL ALVAREZ

DOCTORA EN CIENCIAS MENCIÓN
BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR
APLICADA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y FORESTALES, UNIVERSIDAD DE LA
FRONTERA

CALIFICACION PROMEDIO TESIS:

Dedicatorias.

A mis padres, Mariano Enrique Torres Quezada y Patricia Angélica Reveco Fuentealba.

Agradecimientos.

Me gustaría presentar mis agradecimientos a mi profesor guía Dr. Rafael Galdames, quien durante el año 2011 me encaminó en la preparación de mi proyecto tesis para poder optar al título de Biotecnólogo de la Universidad de La Frontera. Además agradecer a la institución INIA-Carrillanca por facilitar mi estadía en sus instalaciones para efectuar el trabajo.

INDICE

Capítulo		Página
1	RESUMEN	1
2	SUMMARY	2
3	INTRODUCCION	3
4	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
4.1	MALEZAS GRAMÍNEAS RESISTENTES A HERBICIDAS EN EL SUR DE CHILE	4
4.2	MÉTODOS DE DETECCIÓN DE POLIMORFISMO EN EL ADN	7
4.3	RESISTENCIA A HERBICIDAS	9
4.3.1	Mecanismos de resistencia	9
4.3.1.1	Resistencia de sitio activo	10
4.3.1.2	Resistencia fuera del sitio activo	11
4.3.1.2.1	Detoxificación metabólica	11
4.3.1.2.2	Complejo enzimático	11
4.3.1.2.3	Reducida absorción y translocación	12
4.3.1.3	Amplificación génica	12
4.4	GLIFOSATO: HISTORIA Y MODO DE ACCIÓN	13

4.5	RESISTENCIA A GLIFOSATO	16
5	HIPÓTESIS	19
6	OBJETIVO GENERAL	20
7	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
8	MATERIALES Y MÉTODOS	22
8.1	Material vegetal	22
8.2	Extracción de ADN	22
8.3	Análisis PCR-dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) de la mutación Pro106	23
9	RESULTADOS	24
9.1	Análisis PCR-dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) de la mutación Pro106	24
10	DISCUSIÓN	28
11	CONCLUSIONES	30
12	LITERATURA CITADA	31
13	ANEXO	38

1. RESUMEN

La presencia de biotipos de malezas resistentes a glifosato es un problema creciente en la agricultura de la zona sur de Chile. En este estudio se empleó el método PCR-dCAPS para detectar la mutación Pro106 en la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS) en tres biotipos de *Lolium multiflorum* seleccionados como biotipos resistentes. Se analizaron 15 plantas del biotipo Lm-RR, 14 del biotipo Lm-30 y 14 del biotipo Lm-33, detectándose un 53,3%; 50%; y 35,7% de individuos mutantes, respectivamente. Todas las mutaciones detectadas fueron de condición heterocigoto.

2. SUMMARY.

The presense in weed biotypes resistant to glyphosate is a growing problem in agriculture in the south on Chile. In this study we used PCR-dCAPS to detect the mutation Pro106 in the enzyme 5-enolpyruvilshikimate-3-phosphate (EPSPS) in three biotypes of *Lolium multiflorum* selected as resistant biotypes. 15 plants were analyzed Lm-RR biotype, 14 plants biotype Lm.30 and 14 plants biotype Lm.33, detected 53,35; 50%; and 35,7% of mutants individuals, respectively. All mutations detected were heterozygous conditions.

3. INTRODUCCIÓN.

El sur de Chile se caracteriza por ser la principal zona productora de cultivos extensivos como el trigo, el que se ha visto afectado seriamente en su producción por la aparición de malezas gramíneas que han desarrollado resistencia a herbicidas. En los últimos años se ha confirmado la aparición de biotipos de *Lolium multiflorum* resistentes al herbicida glifosato, siendo esta la maleza gramínea más importante en la zona sur debido a su mayor distribución y abundancia en cultivos extensivos, comprometiendo así una mayor superficie con biotipos resistentes. Esta visible resistencia ocurre generalmente en poblaciones de malezas como resultado de un proceso de selección impartido por el uso frecuente de uno o más herbicidas. El glifosato es un herbicida post-emergente, sistémico, no selectivo y de amplio espectro capaz de controlar malezas anuales y perennes. El modo de acción del glifosato es la inhibición competitiva de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3 fosfato sintasa (EPSPS). La EPSPS es la sexta enzima de la ruta biosintética del ácido shikímico, la cual es esencial para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano y tirosina, además es donde se origina la síntesis de ácido indolacético, lignina, plastoquinona y la de metabolitos secundarios que juegan un rol importante en la defensa contra agentes bióticos. Mutaciones en el sitio activo de la enzima EPSPS han sido asociadas a resistencia a glifosato e involucran la sustitución del aminoácido prolina en la posición 106 por serina, alanina, treonina y leucina y leucina de la EPSPS en *Eleusine indica*, *Lolium multiflorum* y *Lolium rigidum*. La identificación de estas mutaciones en poblaciones de *L. multiflorum* es esencial para implementar estrategias de manejo de malezas en cultivos, lo que conlleva a implementar un método de detección que pueda diferenciar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). El método dCAPS ha sido usado exitosamente para detectar mutaciones conocidas asociadas a resistencia a herbicidas por parte de malezas diferenciando alelos que presentan la mutación y alelos que no la presentan. El objetivo de este trabajo fue desarrollar e implementar un método de detección de la mutación Pro106 del gen que codifica para la enzima EPSPS, en biotipos de *Lolium multiflorum* del sur de Chile.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

4.1 MALEZAS GRAMÍNEAS RESISTENTES A HERBICIDAS EN EL SUR DE CHILE.

A partir de la década de los noventa en el sur de Chile la aparición de malezas gramíneas resistentes a herbicidas ha sido un proceso frecuente. Los primeros casos de resistencia se detectaron en *L. rigidum*, *L. multiflorum* y *A. fatua* a los herbicidas inhibidores de la ACCasa (Espinoza y Zapata, 2000; Espinoza *et al.*, 2003). La resistencia a partir de esta fecha se ha expandido a otras áreas y se han confirmado casos de resistencia en otras malezas, como es el caso de *Cynosurus echinatus* y a otros herbicidas, tales como inhibidores de la ALS y glifosato (Espinoza *et al.*, 2008). De las cuatro especies presentes en Chile que han presentado resistencia a herbicidas la de mayor importancia es *L. multiflorum*, debido a su mayor distribución y número de biotipos resistentes. Estas cuatro malezas corresponden a especies de gramíneas anuales de invierno, por lo que su presencia en época de verano es casi obligada. La numerosa presencia de estas malezas en los cultivos se debe a su gran producción de semillas las que se ven favorecidas por las condiciones edafoclimáticas de la zona sur del país. Se estima una producción de 1.700 semillas por planta de ballica (*L. multiflorum*), 600 semillas por planta de cola de zorro (*C. echinatus*) y 330 semillas por planta de avenilla (*A. fatua*). Tanto *L. multiflorum* y *L. rigidum* (Bosque *et al.*, 2002) y *A. fatua* presentan una amplia variabilidad genética lo que les condiciona una amplia capacidad de adaptación y supervivencia. Ambas especies de ballicas presentan polinización cruzada (Terrell, 1968), haciendo posible que la resistencia pueda transmitirse a través de semillas y mediante el polen (Wakelin, 2004). Esto no se da en avenilla y cola de zorro, las que presentan autofecundación.

Lolium multiflorum (gramínea) es una especie alógama muy difundida en Chile (principalmente la zona sur) en zonas de intensa actividad agrícola. A la fecha en Chile se han documentado siete biotipos resistentes a glifosato siendo todos ellos ballicas anuales de la especie *L. multiflorum*. Los primeros dos biotipos fueron detectados en viñedos de la zona

central (Pérez y Kogan, 2003), un biotipo en barbecho químico para cereales en la zona sur (Espinoza y Diaz, 2005) y cuatro en cultivos de trigo en la zona sur (Espinoza et al., 2008). De los biotipos detectados en el sur del país (tabla 1), el primero se identificó como Vil-1 y se detectó en la localidad de Vilcún, Región de la Araucanía, en un sitio de reiteradas aplicaciones de glifosato bajo condiciones de cero labranza. Los últimos biotipos de *L. multiflorum* resistentes a glifosato corresponden al LM-30, LM33, LM-45 y LM-54. El biotipo LM-30 fue detectado en cultivos de trigo en la localidad de Purranque, Región de los Lagos; LM-33 fue detectado en cultivos de trigo en la localidad de San Juan de la Costa, Región de los Lagos; LM-45 fue detectado en cultivos de cebada en la localidad de Perquenco, Región de la Araucanía; y finalmente LM-54 fue detectado en cultivo de trigo en la localidad de Lautaro, Región de la Araucanía. Estos biotipos presentan resistencia múltiple a glifosato y a herbicidas con otros mecanismos de acción, lo que les confiere atributos particulares, ya que en otros países no se han reportado (Heap, 2011). Las principales causas de la frecuente aparición de malezas resistentes a glifosato en el sur de Chile se debe particularmente al sistema de cultivo que se viene practicando por los agricultores hace más de dos décadas, la cual se ha caracterizado por el uso intensivo de cultivos anuales, tendencia al monocultivo de cereales, principalmente trigo y al sistema de siembra con cero labranza. Este sistema de cultivo ha generado una dependencia del herbicida glifosato para el control de malezas, incrementando su uso y en consecuencia produciéndose un proceso de presión de selección favorable hacia biotipos resistentes.

Tabla 1. Biotipos de *L. multiflorum* resistentes a glifosato en el sur de Chile.

Biotipo	Ubicación	Situación de colecta	Año de colecta	Año de confirmación	Índice de resistencia
Vil-1	Vilcún, Región de La Araucanía	Barbecho químico	2000	2002	4,6
LM-30	Purranque, Región de los Lagos	Trigo	2006	2008	> 68
LM-33	San Juan de la Costa, Región de Los Lagos	Trigo	2006	2008	22
LM-45	Perquenco, Región de La Araucanía	Cebada	2007	2008	9
LM-54	Lautaro, Región de La Araucanía	Trigo	2007	2008	9,2

4.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE POLIMORFISMO EN EL ADN.

Varios métodos han sido desarrollados para detectar polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs), el cual corresponde a uno de los tipos más comunes de polimorfismos en el ADN presentes en poblaciones naturales de plantas. Varios de éstos son dependientes de enzimas de restricción para detectar SNPs, pero que comúnmente no son utilizados. Dentro de estos se incluyen ensayos enzimáticos y químicos (Myers et al., 1985), PCR alelo-específicos (Newton et al., 1989; Wu et al., 1989), reacción en cadena de la ligasa (Barany, 1991), análisis de polimorfismo de conformación de cadena simple (Labruno *et al.*, 1991), ensayo de incorporación de nucleótido por partidores dirigidos (Kuppuswami *et al.*, 1991), huella digital dideoxi (Sarkar *et al.*, 1992) y ELISA en fase sólida basada en los ensayos de ligadura (Nikiforov *et al.*, 1994). Dentro de los métodos más utilizados en la detección de SNPs encontramos a fragment length polymorphism analysis (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980) y la versión basada en la técnica de PCR de esta técnica, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) (Konieczny y Ausubel, 1993). Estos métodos emplean tecnologías simples y utilizan reactivos y equipos comunes en un laboratorio de biología molecular. Sin embargo, estos métodos poseen limitaciones para detectar un SNPs cuando el sitio de reconocimiento para una enzima de restricción no está presente en la secuencia analizada. Todos los métodos nombrados anteriormente, se ven limitados al momento de ser utilizados por uno o más de los siguientes puntos: (i) se necesitan equipos especializados y/o caros, (ii) falta real o percibida de la fiabilidad y/o reproducibilidad, (iii) la necesidad de un sofisticado análisis cuantitativo para interpretar los SNPs como un polimorfismo codominante, y (iv) la necesidad de partidores de oligonucleótidos marcados relativamente caros u otro reactivo que se utilice. En la técnica CAPS se utilizan partidores específicos para amplificar una región del gen de interés el templado de ADN y los nucleótidos polimórficos son detectados según la presencia o ausencia del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción. Esta técnica se ve limitada por tener la necesidad de poseer un sitio de reconocimiento de la enzima dentro del SNPs que se quiere estudiar. Es por este motivo que se ha efectuado una variante del método CAPS para suplir con esta limitación, llamado derived cleaved amplified polymorphic

sequence (dCAPS). En el método dCAPS se crea un sitio de restricción mediante el diseño de partidores que contienen una o más diferencias con la secuencia blanco donde se encuentra la mutación de interés. Los partidores utilizados en esta técnica se diseñan a través del programa dCAPS Finder 2.0 (Neff et al., 2002). Para diseñar e implementar el método dCAPS es necesario tomar en cuenta las siguientes reglas: (1) los fragmentos originados por la técnica dCAPS deben tener una longitud de 150-300 pb, (2) el largo de los partidores dCAPS deben ser alrededor de 40 nucleótidos para facilitar la discriminación de los amplicones digeridos y no digeridos en la electroforesis en gel de agarosa, (3) los errores generados en los partidores dCAPS no deben estar presentes en los nucleótidos de la región 3', (4) los nucleótidos en el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción ubicados en la secuencia del partidador y en el codón de estudio podrían sufrir una variación lo que podría causar sustituciones aminoacídicas; y (5) en el amplicón no debe existir otro sitio de reconocimiento de la enzima de restricción utilizada. La técnica dCAPS es un método que ha sido usado exitosamente para detectar mutaciones conocidas asociadas a resistencia de malezas a herbicidas (Kaundun & Windass, 2006)

4.3 RESISTENCIA A HERBICIDAS.

La Sociedad Americana de la ciencia de malezas (WSSA por sus siglas en ingles) define la resistencia a herbicidas como “la habilidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse después de ser expuesta a una dosis de herbicida que normalmente sería letal para el tipo silvestre”. Todo desarrollo de resistencia a herbicidas involucra un proceso de selección ligado al de variabilidad intraespecífica, es decir, este proceso evolutivo ocurre cuando la frecuencia de genes dentro de una población cambia como resultado de un proceso de presión de selección impartido por el uso frecuente de uno o más herbicidas. Debe asumirse que en cualquier población de malezas pueden existir biotipos resistentes en una baja frecuencia, que resultan de mutaciones existentes que se dan al azar dentro de las poblaciones. Además de la ocurrencia de resistencia de manera natural, también es posible obtener plantas resistentes a herbicidas a través de técnicas, tales como, la ingeniería genética o la selección de tipos variantes en cultivo de tejidos o mutagénesis (De Prado y Cruz-Hipólito, 2005). Con el advenimiento de los cultivos Roundap Ready o cultivos resistentes a glifosato (CRGs) también se produjo la aparición de biotipos resistentes de malezas a través del flujo de genes por hibridación debido a la analogía existente entre estos cultivos y las malezas presentes en la naturaleza. La evolución de resistencia en una población es detectada cuando la proporción de biotipos resistentes incrementa gradualmente sobre la proporción de biotipos sensibles. Esta evolución incrementa su velocidad cuando la frecuencia inicial de genotipos resistentes es elevada, cuando la resistencia es heredada por un solo gen y si este es dominante al tratarse de una especie de fecundación cruzada.

4.3.1 Mecanismos de resistencia. Se han descrito tres grandes mecanismos que explican la resistencia a herbicidas por parte de malezas. 1) Los relacionados con el sitio activo del herbicida, 2) mecanismos fuera del sitio activo y 3) amplificación génica.

4.3.1.1 Resistencia de sitio activo. Corresponde a la pérdida de afinidad por el sitio de acción del herbicida. Estos sitios por lo general son enzimas específicas que tienen un papel fundamental en algún paso metabólico de la planta cuyo bloqueo resulta letal. Esta enzima es insensible o poco sensible, lo que se da como resultado a una mutación puntual en el gen que codifica para esa proteína. Esta mutación nucleotídica conlleva a un cambio aminocídico en la cadena peptídica de la proteína en un lugar crítico lo que provoca un cambio en su conformación estructural (sin afectar la funcionalidad biológica de la enzima en cuestión) alterando la afinidad de la molécula herbicida por el sitio de acción de la proteína objetivo. Así la molécula herbicida no puede efectuar la inhibición de la función enzimática al verse modificado el sitio de ligamiento específico. La resistencia de sitio activo para algunos herbicidas es bien conocida, existiendo herbicidas que son vulnerables, puesto que presentan varias mutaciones que confieren resistencia, incrementando frecuencia de biotipos resistentes incluso si antes nunca haber sido sometidas a selección por el herbicida. Este es el caso de la familia de herbicidas que inhiben la enzima acetolactato sintasa (ALS) que presenta seis lugares altamente conservados donde mutaciones puntuales confieren resistencia a herbicidas que inhiben esta enzima (Tranel y Wright, 2002; Whaley et al., 2007). Esto también ocurre con los graminicidas del grupo de herbicidas que inhiben la enzima acetilcoenzima A carboxilasa (ACCase), que con al menos seis mutaciones puntuales en el dominio carboxiltransferasa de la forma plastídica de la ACCase confieren resistencia. En tanto, la resistencia a glifosato también puede involucrar una alteración en el sitio activo, presentando una mutación puntual en la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), la cual es clave en la ruta biosintética de ácido shikímico.

4.3.1.2 Resistencia fuera del sitio activo. Muchos mecanismos confieren resistencia a herbicidas sin involucrar al sitio activo, lo cual refleja la plasticidad genética de las malezas (Yuan *et al.*, 2007). Dentro de los mecanismos que confieren resistencia fuera del sitio de acción a través de la eliminación de la acción fitotóxica del herbicida esta la detoxificación por metabolización, complejos enzimáticos y la reducción de absorción y translocación.

4.3.1.2.1 Detoxificación metabólica. Es el mecanismo que más se atribuye a las malezas para explicar su resistencia y es donde los biotipos resistentes tienen una mayor capacidad de degradar al herbicida hacia formas no tóxicas, comparados con biotipos sensibles de la misma especie. Este proceso en plantas puede dividirse en tres fases: conversión, conjugación y deposición. En la conversión los herbicidas que no poseen sustituyentes disponibles (grupos aminorio, hidroxilo, etc) para formar conjugados que son convertidos en metabolitos a través de reacciones químicas. El resultado de la conjugación son metabolitos finales involucrados en la detoxificación del herbicida y su naturaleza puede ser diversa (azúcares, aminoácidos, péptidos, lignina, etc). En la deposición los conjugados glicosídicos son depositados en la vacuola donde son almacenados. Los de origen aminoacídico son excretados a la pared celular donde son integrados en el componente de lignina de éstas, formando un compuesto insoluble.

4.3.1.2.2 Complejo enzimático. Estos mecanismos son diversos pero los principales involucran dos grandes grupos de isoenzimas, las citocromo P450 (P450) y las glutatión-s-transferasas (GST) que participan en el metabolismo de Fase I y Fase II, respectivamente (Yuan *et al.*, 2007). Estas enzimas cumplen un rol de gran importancia en la defensa de las plantas frente a situaciones de estrés causados por agentes bióticos y abióticos. En plantas este tipo de enzimas son abundantes y están involucradas en diversos procesos metabólicos, especialmente relacionados con metabolitos secundarios, lo que explica su rol en procesos de defensa.

4.3.1.2.3 Reducida absorción y translocación. La característica de este mecanismo es la reducción del movimiento del herbicida hacia el sitio de acción, permitiendo así que éste se mantenga funcional. La falta de movimiento del herbicida por parte de la planta corresponde en un principio a la reducción de la absorción y translocación del herbicida dentro de la planta. El modo de absorción depende de las características físicas y químicas de la molécula de herbicida, además de la forma de aplicación, ya sea, post-emergente (penetración foliar) o pre-emergente (penetración radicular). El proceso de translocación también depende del proceso de aplicación, en el caso de aplicación vía foliar el movimiento del herbicida puede realizarse por el floema o el xilema. A través del xilema el herbicida sigue el flujo de agua libremente hacia las zonas foliares y espacios intervasculares, mientras que el transporte por el floema depende de dos procesos: gradiente de concentración del herbicida entre las células floemáticas y mesofílicas, y la capacidad del herbicida de ser retenido por las células floemáticas durante su transporte.

4.3.1.3 Amplificación génica. La resistencia a herbicidas también puede involucrar elevados niveles de expresión o de la actividad enzimática sobre la cual se ejerce el efecto del herbicida. Este mecanismo confiere resistencia debido a la elevada expresión de la enzima, ya sea la que presenta una mutación puntual en el sitio activo o una elevada expresión de la enzima sensible (Gaines, et al. 2009)

4.4 GLIFOSATO: HISTORIA Y MODO DE ACCIÓN.

En 1970 Monsanto descubrió las propiedades del herbicida Glifosato [N (fosfometil)glicina]. En 1974 fue introducido al mercado bajo el nombre RoundapTM, y actualmente es considerado el herbicida más importante y de mayor uso a nivel mundial (Franz et al. 1997; Baylis 2000; Powles and Preston 2006). El glifosato es un herbicida post-emergente, sistémico, no selectivo y de amplio espectro capaz de controlar malezas anuales y perennes. Aunque en un principio este herbicida fue utilizado en plantaciones de frutales y viñedos (no-cultivos), su uso comúnmente está dirigido al control de malezas en cultivos anuales convencionales y cultivos transgénicos resistentes a glifosato (CRGs) o Roundap Ready (Baylis 2000; Shaner 2000, Woodburn 2000). El glifosato está formado por una molécula de glicina y otra de fosfometilo y puede formularse como diferentes sales (ej., isopropilamina y potasio). Su aplicación es en forma de rociado sobre la parte foliar, debido a que si bien se une a componentes del suelo su actividad herbicida es poca o casi nula. Las sales formuladas por el glifosato son moléculas altamente polares, solubles en agua con bajo carácter lipofílico, lo que hace probable la penetración de estas moléculas generalmente, a través de la cutícula, vía difusión hacia el apoplasto (Caseley and Coupland 1985; Hess 1985; Franz et al. 1997). En la fase inicial anteriormente señalada ocurre por lo general una rápida absorción, seguida de una fase de mayor duración en la que la absorción es lenta. La absorción de la fase inicial se ve acelerada a medida que la concentración de glifosato aplicado es mayor (Duke et al. 2003). La absorción del glifosato presente en el apoplasto a través de la membrana plasmática de las células de la planta es un proceso lento e involucra tanto mecanismos de difusión pasiva como mecanismos de difusión activa (Caseley and Coupland 1985; Sterling 1994; Franz et al. 1997). Así, el glifosato es translocado a la mayoría de los tejidos de la planta, entrando rápidamente al simplasto siendo extensivamente translocado a todas las partes de la planta vía floema siguiendo el mismo patrón de distribución de los fotoasimilados. A pesar de que la mayoría del transporte del glifosato se produce de manera simplástica, también hay transporte apoplástico a considerar, por lo que se reconoce un movimiento ambimóvil por parte del herbicida (Franz et al. 1997). El glifosato interrumpe una de las rutas bioquímicas más importante para el crecimiento y desarrollo de una planta, ya que a

través de esta ruta transita gran parte del carbono fijado en el proceso de fotosíntesis y además es donde se origina la síntesis de ácido indolacético, lignina, plastoquinona y la de metabolitos secundarios que juegan un rol importante en la defensa contra agentes bióticos. Esta ruta metabólica es la conocida ruta biosintética del ácido shikimico, en la cual los productos más relevantes son los tres aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina. Esta ruta se encuentra presente en bacterias hongos y plantas. En animales monogástricos la fenilalanina y triptofano, aminoácidos esenciales, son integrados a través de la dieta y la tirosina deriva directamente de la fenilalanina. Las bacterias utilizan más del 90% de su energía metabólica para la biosíntesis de proteínas, por lo que la vía del shikimato de las bacterias solo cubre la producción de aminoácidos aromáticos. En contraste, en plantas desarrolladas estos aminoácidos son utilizados además de la construcción de proteínas, para la formación de otros componentes de importancia anteriormente mencionados. La enzima clave en la ruta biosintética del ácido shikimico es 5-enolpyruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (AF413081). Los sustratos de esta enzima corresponden al shikimato-3-fosfato y al fosfoenol pirúvico (PEP), la que realiza su conversión a 5-enolpyruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) y fósforo inorgánico a través de una reacción reversible. La característica del glifosato que le permite interrumpir esta ruta es su analogía con PEP, convirtiéndose en un fuerte inhibidor de EPSPS (Steinrucken y Amrhein, 1980). Los tres aminoácidos aromáticos se ven inhibidos en el momento que el glifosato es tomado por la enzima EPSPS en lugar de PEP, dando como resultado inmediato una acumulación de shikimato-3-P que rápidamente es convertido a ácido shikimico (Devine et al., 1993). Esto tiene explicación debido a que con la fuerte inhibición de EPSPS se produce una disminución en los niveles de arogenato, el cual es el precursor de la fenilalanina y de la tirosina en esta ruta metabólica. Cuando no hay inhibición de EPSPS el arogenato se acumula y ejerce una presión alostérica sobre la enzima DAHP sintasa la cual es fundamental en el suministro de shikimato-3-P para este proceso. Una vez que la enzima EPSPS esta inhibida por el glifosato los niveles de arogenato tienden a disminuir liberando de esta presión alostérica a DAHP, desestabilizando la ruta y produciendo cantidades elevadas de shikimato-3-P (Shiel, 1997). Duke y Powles en el 2008, afirman que al existir una síntesis desordenada de ácido shikimico se produce una desviación y disminución del carbono fijado que transita por esta ruta (20-30%),

involucrado en la formación de compuestos intermediarios en otras rutas metabólicas esenciales (ej., intermediarios para el ciclo de Calvin C3). Esto podría ser una de las razones principales, además de la deficiencia de aminoácidos aromáticos, de la muerte de las plantas tratadas con glifosato.

4.5 RESISTENCIA A GLIFOSATO.

Hasta principio de la década de los noventa no existen reportes de biotipos de malezas resistentes a glifosato, a pesar de su uso generalizado durante un periodo de veinte años desde su integración al mercado en 1974 (Holt et al. 1993; Dyer 1994). La ausencia de biotipos resistentes se explicaba y atribuía a las propiedades únicas del herbicida, tales como su modo de acción, estructura química, falta de asimilación metabólica en plantas y su falta de actividad residual en el suelo (Bradshaw et al. 1997). No fue hasta 1996 que se informó de resistencia a glifosato en *Lolium rigidum* en Australia (Pratley et al. 1996). En la tabla 2 se indican las principales especies de malezas resistentes a glifosato. Hoy en día la resistencia a glifosato ha sido descrita en 21 especies de malezas con un total de 123 biotipos, distribuidos a lo largo de 17 países (Heap 2011). Dentro de las especies de malezas resistentes podemos destacar el reporte de *Lolium rigidum* en Australia (Powles et al. 1998; Pratley et al. 1999) y en EE.UU (Simarmata et al. 2003), *Eleusine indica* en Malaysia (Tran et al. 1999; Lee and Ngim 2000); *Conyza canadensis* en EE.UU (VanGessel 2001; Koger et al. 2004; Main et al. 2004); *Lolium multiflorum* en Chile (Perez and Kogan 2003) y Brasil (Heap 2007); *Conyza bonariensis* en Sudáfrica (Heap 2007) y España (Urbano et al. 2005); *Plantago lanceolata* en Sudáfrica (Heap 2007); *Euphorbia heterophylla* en Brasil (Heap 2007); *Sorghum halepense* en Argentina (Valverde et al. 2007); *Ambrosia artemisiifolia* (Sellers et al. 2005); *Amaranthus rudis* Sauer (Zelaya and Owen 2005); *A. palmeri* (Culpepper et al. 2006) en EE.UU. El primer mecanismo de resistencia a glifosato reportado en malezas y más común, consiste en una reducida translocación del herbicida hacia los tejidos meristemáticos y un mayor movimiento acropetal a la punta de las hojas detectado en una población de *L. rigidum* (Lorraine-Colwill., et al 2003). Este mecanismo de reducida translocación ha sido descrito en especies de *Lolium* spp. (Wakelin., et al 2004; Perez-Jones., et al 2007; y Yu., et al 2007) y *Conyza* spp. (Koger., et al 2005 y Dinelli., et al 2006). Este mecanismo otorga cambios en el nivel de resistencia a glifosato de 8 a 12 veces. Mutaciones en el gen que codifica para EPSPS cercanas al sitio activo también han sido asociadas a resistencia a glifosato, involucrando cambios en la posición aminoacídica 106 de EPSPS generando

sustituciones de Pro a Ser, Ala, Thre y Leu detectadas en *E. indica* (Baerson., et al 2002; Ng., et al 2003; Yuan., et al 2005; y Chong., et al 2008) y *Lolium* spp (Wakelin., et al 2006; Jasieniuk., et al 2008; y Simarmata., et al 2008). En poblaciones resistentes a glifosato de *E. indica* provenientes de Malasia se han encontrado dos mutaciones diferentes en el gen que codifica para EPSPS, tratándose de sustituciones en el aminoácido de posición 106 de Pro a Ser y de Pro a Thre (Baerson et al. 2002a; Ng et al. 2003). En poblaciones resistentes de *L. rigidum* provenientes de Australia y Sudáfrica se encontraron dos sustituciones en el aminoácido 106, una Pro a Thre y una Pro a Ala, respectivamente (Wakelin and Preston y 2006; Yu et al. 2007). Recientemente en poblaciones resistentes de *L. rigidum* provenientes de Sudáfrica se detectó la sustitución aminoacídica Pro a Leu (Kaundun., et al 2011). En este tipo de mecanismo el nivel de resistencia otorgado es relativamente bajo resultando un cambio de 2 a 4 veces por lo que su manejo en el campo ha sido cuestionado. Recientemente un tercer mecanismos de resistencia ha sido reportado en *Amaranthus palmeri* y consiste en la amplificación génica en múltiples cromosomas y la sobreexpresión simultánea de EPSPS (Gaines., et al 2009).

Tabla 2. Principales especies de malezas resistentes a glifosato en el mundo. (HEAP, 2011).

Especie	Número de biotipos resistentes.
<i>Amaranthus palmeri</i>	12
<i>Amaranthus. tuberculatus</i>	7
<i>Ambrosia artemisifolia</i>	7
<i>Ambrosia trifida</i>	12
<i>Chloris truncata</i>	1
<i>Conyza bonariensis</i>	10
<i>Conyza canadensis</i>	24
<i>Conyza sumatrensis</i>	1
<i>Digitaria insularis</i>	5
<i>Echinochloa colona</i>	4
<i>Eleusine indica</i>	4
<i>Euphorbia heterophylla</i>	1
<i>Kochia scoparia</i>	1
<i>Lolium multiflorum</i>	12
<i>Lolium perenne</i>	1
<i>Lolium rigidum</i>	13
<i>Parthenium hysterophorus</i>	1
<i>Plantago lanceolata</i>	1
<i>Poa annua</i>	1
<i>Sorghum halepense</i>	4
<i>Urochloa panicoides</i>	1

5. HIPÓTESIS.

A través del método PCR-dCAPS es posible determinar la frecuencia de la mutación en la posición aminoacídica P106 del gen que codifica para la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), además de identificar individuos mutantes homocigotos y heterocigotos.

6. OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar e implementar un método de detección de la mutación P106 del gen que codifica para la enzima EPSPS, en biotipos de *Lolium multiflorum* del sur de Chile.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar el método PCR-dCAPS sobre la base de su eficiencia y reproducibilidad en la detección de la mutación P106.
- Determinar la frecuencia de la mutación P106 en poblaciones de *Lolium multiflorum* resistentes.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1 Material vegetal.

Se estudiaron tres poblaciones de *L. multiflorum* LmRR, Lm30 y Lm33, las que provenían de localidades de la IX y X regiones con historial de resistencia al herbicida glifosato. Además se consideró un control negativo (CV Tama) y un control positivo (LmRR-RR) cuya resistencia había sido previamente confirmada. Las semillas empleadas son parte del banco de colección de biotipos resistentes del laboratorio de malherbología de INIA Carillanca. Las semillas fueron germinadas en placas Petri conteniendo papel humedecido en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad, para finalmente ser trasplantadas a maceteros de 1L de capacidad.

8.2 Extracción de ADN.

Tejido de plantas individuales (20-40 mg) fue macerado en nitrógeno líquido para luego ser sometido al proceso de extracción de ADN con el kit HP Plant DNA Kit™ (EZNA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvo ADN de un total de 45 plantas individuales pertenecientes a los biotipos LmRR (15), Lm30 (14), Lm33 (14), TAMA (1) y LmRR-RR (1). La concentración final del ADN para cada una de las muestras se ajustó visualmente a 40-60 ng/μl mediante electroforesis en geles de agarosa empleando un marcador molecular de peso a una concentración conocida.

8.3 Análisis PCR-dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) de la mutación Pro106.

Se realizaron dos reacciones de PCR más una reacción de digestión enzimática hasta su revelado e identificación. El PCR1 se realizó con los partidores EPSPS-L-UP (5'-AGCTGTAGTCGTTGGCTGTGGC-3') y EPSP-L-LOW (5'-CCGAACAGGTGGGCAGTCAGT-3'). La mezcla de reacción consistió en 2 µl de Buffer Taq 10X; 0,6 µl de MgCl₂ (1,5 mM); 1,6 µl dNTP's (0,2 mM); 1 µl de cada partidador (0,5 µM); 0,2 µl de Taq polimerasa (5U/µl) y 1 µl de ADNg (10-50 ng/µl) para un volumen final de 20 µl. La amplificación se realizó en un termociclador PTC-200 DNA Engine Cycler, programado de la siguiente manera: 94°C por 2 minutos; 31 ciclos de 94°C por 1 minuto, 69,1°C por 30 segundos y 72°C por 40 segundos; y una extensión final de 72°C por 7 minutos. El PCR2 de carácter semianidado, se realizó con los partidores EP-DCAPS-UP (5'-CTTCTTGGGCAACGCTGGAACTGCAATGTGG-3') y EPSP-L-LOW (5'-AGCTGTAGTCGTTGGCTGTGGC-3'). Los partidores dCAPS se generaron usando el software DCAPS Finder 2.0 (Neff et al., 2002). La amplificación se realizó en un termociclador PTC-200 DNA Engine Cycler, programado de la siguiente manera: 94°C por 30 segundos; 31 ciclos de 94°C por 10 segundos, 67°C por 10 segundos y 72°C por 15 segundos; y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos del PCR2 fueron digeridos con la enzima MscI de Fermentas que reconoce el sitio de restricción TGGCCA. La digestión de un volumen final de 20 µl contuvo 2 µl de Buffer R, 0,5µl de enzima MscI y 2 µl de producto PCR. Finalmente los productos digeridos fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 3% por 90 minutos a 80 V.

9. RESULTADOS.

9.1 Análisis PCR-dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) de la mutación Pro106.

El método PCR-dCAPS utilizado en este estudio permitió distinguir variantes alélicas del gen que difieren por un único nucleótido. Se analizaron 43 plantas individuales de *L. multiflorum* comprendiendo 15 plantas del biotipo LMRR, 14 plantas del biotipo LM30 y 14 plantas del biotipo LM33. Se añadió un control positivo (LMRR-RR) y un control negativo (Tama) para validar el método. De las 15 plantas individuales analizadas del biotipo LMRR, 8 plantas presentaron mutación en el codón 106 representando a un 53,3% de individuos mutantes. En el caso de las 14 plantas individuales analizadas para el biotipo LM30, 7 plantas presentaron mutación, representando un 50% de individuos mutantes. Finalmente de las 14 plantas del biotipo LM33, 5 plantas presentaron mutación, presentando un 35,7% de individuos mutantes. Para todos los casos la mutación fue de condición heterocigoto. En la tabla 4 se muestra un número representativo de plantas de cada biotipo donde se observan los amplicones que se obtuvieron en el PCR1 y PCR2. Los fragmentos obtenidos en el PCR1 (partidores EPSPS-L-UP y EPSPS-L-LOW) corresponden a la amplificación de un segmento del gen EPSPS que contiene la posición aminoacídica Pro106, sitio asociado a la resistencia a glifosato. Este fragmento incluye parte del exón 2 y 3 del gen EPSPS, incluyendo además las 98 pb del intrón número 2. Todas las muestras amplificadas en el PCR1 presentaron bandas de un tamaño aproximado de 350 pb y en algunos casos un fragmento extra alrededor de los 290 pb. El PCR2 se llevó a cabo con el partidor dCAPS EP-DCAP-UP (tabla 3) y el partidor EPSPS-L-LOW (utilizado también en el PCR1), haciendo de este segundo PCR un PCR de naturaleza semianidado. La función de este partidor fue insertar un sitio de restricción artificial para la enzima MscI. Este partidor fue diseñado con 1 error en su secuencia e inserta el sitio de restricción en el alelo silvestre, haciendo posible así la detección de la mutación diferenciando entre individuos con alelos mutantes homocigotos o heterocigotos. En el caso del PCR2 se obtuvo para todas las muestras un

fragmento de alrededor de 300 pb (efecto del PCR semianidado) y en algunos casos un fragmento extra de 200 pb.

Codón	Partidor	Secuencia (5'-3')	Tm (PCR)	Enzima de restricción y sitio de reconocimiento	Patrones dCAPS esperados (fragmentos ~pb)
P106	EP-DCAPS-UP	CTTCTTGGGCAACGCTGGAAGTCAATG T GG	67,1	MscI, TGGCCA	Banda mutante 300 Banda silvestre 270

Tabla 3. Características del partidor dCAPS utilizado en el método PCR-Dcaps.

Biotipos	Número de plantas analizadas	Individuos mutantes	Individuos homocigotos	Individuos heterocigotos	Frecuencia mutación P106 (%)
LMRR	15	8	0	8	53,3
LM30	14	7	0	7	50
LM33	14	5	0	5	35,7

Tabla 4 . Frecuencias de alelos mutantes heterocigotos detectados a través del método PCR-dCAPS.

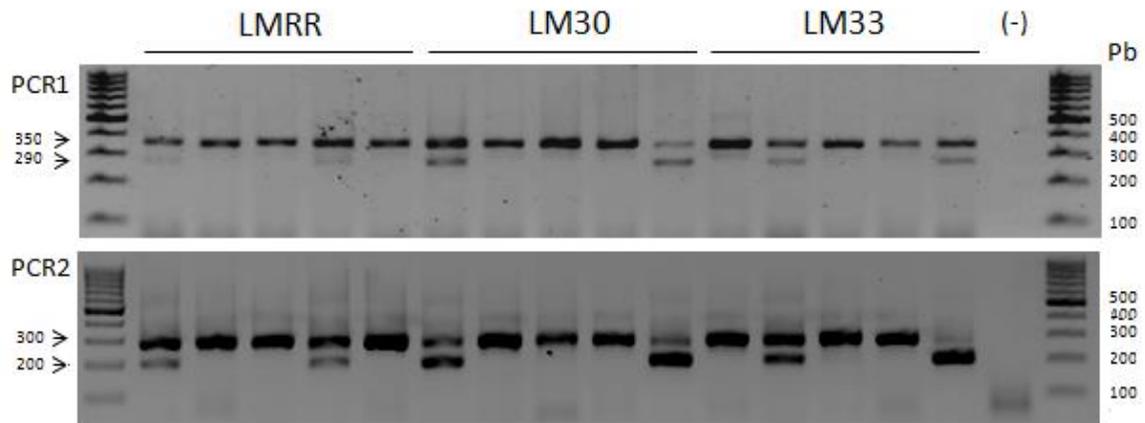


Figura 1. Fragmentos amplificados obtenidos en el PCR1 y PCR2. Se presentan 5 plantas de cada biotipo estudiado. PCR1 presenta fragmentos de 350 pb (en todas las muestras) y 290 pb (en algunas muestras). El PCR2 presenta fragmentos de 300 pb (en todas las muestras) y 290 pb (en algunas muestras).

Cabe señalar que las muestras que presentaron dos fragmentos en el PCR1 (aproximadamente 350 y 290 pb) vuelven a presentar dos fragmentos en el PCR2 (aproximadamente 300 y 200 pb) señalando patrones secuenciales fijos para esas muestras. En la figura 2, se presenta la digestión de cada individuo para los tres biotipos. Los patrones de restricción observados validan la finalidad del método para diferenciar individuos que presentan o no la mutación en el aminoácido Pro106 y diferenciar entre individuos homocigotos o heterocigotos en el caso de individuos con la mutación. Los controles utilizados respaldan los resultados obtenidos ya que al analizar sus patrones de restricción se observan los patrones esperados. Al momento de sintetizar el partidor dCAPS este fue diseñado para insertar el sitio de restricción en las secuencias que no presentaban la mutación, debido a las numerosas sustituciones que se han reportado en esa posición (Pro106 a Ser, Thre, Ala y Leu). Es debido a esto que los patrones de digestión

esperados diferencian a los individuos sin la mutación (fragmentos digeridos) y a los individuos con la mutación (fragmentos no digeridos). En el caso de los individuos heterocigotos el patrón de digestión presentaría un fragmento sin digerir (alelo mutante) y un fragmento digerido (alelo silvestre). Los controles que se utilizaron responden a la detección de la mutación en la posición Pro106. Se escogió un control negativo llamado Tama, que es un *L. multiflorum* comercial sensible a glifosato, el cual debería no presentar la mutación en la secuencia del gen EPSPS. El otro control escogido corresponde a un biotipo de *L. multiflorum* LMRR-RR el cual fue secuenciado previamente presentando condición heterocigoto para la mutación (dato no mostrado).

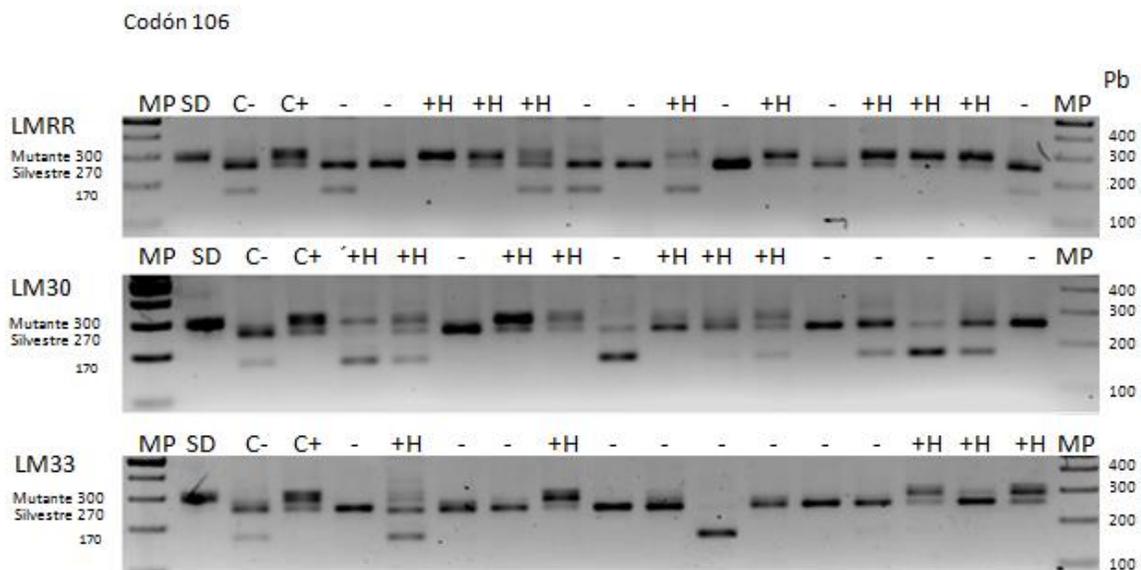


Figura 2. Patrones de digestión para los biotipos LMRR, LM30 y LM33. Digestión realizada con la enzima MscI que reconoce el sitio de restricción TGGCCA insertado en las secuencias silvestres por el partidor dCAPS EP-DCAP-UP.

10. DISCUSIÓN.

A contar de la década de los noventa en el sur de Chile ha sido frecuente la aparición de biotipos de malezas resistentes a herbicidas. Los biotipos de *L. multiflorum* resistentes a glifosato presentan una seria complicación debido a su amplia distribución. Uno de los mecanismos que confiere resistencia a glifosato es el mecanismo de sitio activo el cual corresponde a la mutación Pro106 en la enzima EPSPS. La detección de este polimorfismo dentro de una población se hace entonces de suma importancia, por lo que el objetivo principal de este estudio se centró en desarrollar e implementar un método adecuado que permitiera detectar y evaluar individuos según su condición genética. Varios métodos se han implementado para detectar polimorfismos de un solo nucleótido en plantas, tales como AFLP, CAPS y dCAPS (Botstein., *et al.*, 1980; Konieczny and Ausubel, 1993; y Neff., *et al* 1998). Debido a las ventajas que presenta el método dCAPS sobre los demás métodos, fue evaluado según su capacidad de cuantificar de manera rápida y reproducible la frecuencia con la que se presenta la mutación Pro106 en la enzima EPSPS. El método PCR-dCAPS fue utilizado en este estudio con el propósito de detectar la mutación en la posición aminoacídica Pro106, y permitió determinar que existe una alta frecuencia de ocurrencia de dicha mutación. El método dCAPS identifica polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) por la digestión de productos de PCR a través de enzimas de restricción. Este método explota la especificidad conocida de una enzima de restricción por su sitio de reconocimiento y puede ser utilizado para detectar particularmente cualquier SNPs. Una de las características destacadas de este método es que usa una tecnología de bajo costo y los reactivos son comúnmente encontrados en laboratorios de biología molecular. El método se ve facilitado con el programa dCAPS Finder haciendo posible su uso en una variedad de aplicaciones de análisis genéticos. De una población total de 43 plantas de *L. multiflorum* (LmRR, Lm30 y Lm33), se detectaron 20 plantas mutantes las que según el biotipo se detectaron frecuencias de la mutación de 53,3% (LmRR), 50% (Lm30) y 35,7% (Lm33), todas las mutaciones detectadas fueron de condición heterocigotos. La constante aplicación de glifosato a los predios de donde fueron obtenidos estos biotipos se ve reflejada en la evolución de las sustituciones aminoacídica

detectadas en ellos. Hasta la fecha las sustituciones aminoacídicas relacionadas con la evolución a resistencia natural a glifosato consisten en las sustituciones de Pro106Ser, Pro106Ala, Pro106Thre y Pro106Leu (Baerson., et al 2002; Ng., et al 2003; Yuan., et al 2005; Perez jones., et al 2007 Jasieniuk., et al 2008; Chong., et al 2008; y Kaundun., et al 2011). Se conoce muy bien la importancia de esas sustituciones involucradas en la eficacia del glifosato como es el caso de la sustitución Pro106Ser en *E. indica* (Ng., et al 2004 y Kaundun., et al 2008).

Se observaron 15 casos que presentaron dos productos de amplificación en todas las etapas del método (PCR1: 350 y 290 pb; PCR2: 300 y 200 pb) sugiriendo un patrón fijo para estas plantas. Es importante mencionar que ambos fragmentos fueron digeridos, indicando que el partidor dCAPS introdujo el sitio de restricción artificial en ambas secuencias. Kaundun., et al (2011) detectaron a través de la secuenciación parcial del gen EPSPS la existencia de al menos tres homólogos de esta enzima en *Lolium rigidum*. En la especie *Lolium spp* la enzima EPSPS existe como una pequeña familia de genes, pero a la vez es una enzima muy conservada de 8 exones y 9 intrones. El descubrimiento de la presencia de más de un homólogo en la especie *Lolium spp*, puede explicar los resultados obtenidos a través de esta técnica. El método PCR-dCAPS utilizado en estudios de mutaciones asociadas a conferir resistencia a herbicida (Delye y Boucansaud, 2007) ha logrado detectar y diferenciar individuos que presentan estas mutaciones puntuales. A pesar de que se logró el objetivo de identificar la mutación y a la vez la frecuencia de ésta en poblaciones de *L. multiflorum*, se observaron casos en los cuales los patrones de digestión dificultaron la interpretación. La utilización de este método se ve influenciada por las características genéticas de la especie en estudio pudiendo ser o no la más indicada para los fines de detección de polimorfismos de un solo nucleótido, denotando de esta manera limitaciones del método. El mecanismo de resistencia basado en el sitio activo alterado confiere bajos niveles de resistencia a glifosato los que se han estimado del orden de 2- a -4 veces en comparación con biotipos silvestres, lo que hace suponer que las mutaciones detectadas aunque no explican los altos índices de resistencia de estos biotipos, podrían estar operando simultáneamente junto a otros mecanismos conocidos.

11. CONCLUSIONES.

La implementación y aplicación del método dCAPS permitió detectar individuos en las tres poblaciones de ballicas estudiadas (LmRR, Lm30 y Lm33), que presentan sustituciones en Pro106. Todos los individuos positivos presentaron una condición heterocigótica para la mutación. Las frecuencias de las mutaciones fueron de 53.3, 50.0 y 35.7% para los biotipos LmRR, Lm30 y Lm33, respectivamente. La obtención de más de un amplicón del gen EPSPS con los partidores específicos (PCR1 y PCR2), sugiere la presencia de más de un homólogo de la EPSPS en el genoma de algunos individuos de las poblaciones estudiadas. Lo anterior dificulta la interpretación de los resultados y en consecuencia pasa a constituir una limitación del método PCR-dCAPS en la detección de mutaciones.

12. LITERATURA CITADA.

- Baerson, S. R.; Rodriguez, D. J.; Tran, M.; Feng, Y.; Biest, N. A.; Dill, G. M, 2002.** Glyphosate- Resistant Goosegrass. Identification Of A Mutation In The Target Enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase. *Plant Physiol.* 2002, 129, 1265–1275.
- Barany, F. (1991)** Genetic Disease Detection And DNA Amplification Using Cloned Thermostable Ligase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88, 189–193.
- Baylis, A. 2000.** Why Glyphosate Is A Global Herbicide: Strengths, Weaknesses And Prospects. *Pest Manag. Sci.* 56:299-308.
- Bosque, J.L.; Recasens, J.; Planes, J.; Taberner, A. (2002).** La Resistencia A Herbicidas En Poblaciones De Vallico (*Lolium Rigidum*) I: Tipología Y Distribución. *Phytoma España* (143):46-51.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnich, M. And Davis, R.W. (1980)** Construction Of A Genetic Linkage Map Of Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet.* 32, 314– 331.
- Caseley, J. C. And D. Coupland. 1985.** Environmental And Plant Factors Affecting Glyphosate Uptake, Movement And Activity. Pages 92-123 *In* E. Grossbard And D. Atkinson, Eds. *The Herbicide Glyphosate.* London, England: Butterworths.
- Chong, J. L.; Wickneswari, R.; Ismail, B. S.; Salmijah, S, 2008.** Nucleotide Variability In The 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase Gene From Eleusine Indica (L.) Gaertn. *Pak. J. Biol. Sci.* 2008, 11, 476–479.
- Culpepper, A.S., T. L. Grey, W. K. Vencill, J. M. Kichler, T. M. Webster, S. M. Brown, A. C. York, J. W. Davis, And W. W. Hanna. 2006.** Glyphosate Resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus Palmeri*) Confirmed In Georgia. *Weed Sci.* 54:620-626. DC USA.
- De Prado, R.; Cruz-Hipolito, H. 2005.** Mecanismos De Resistencia De Las Plantas A Los Herbicidas. www.inia.org.uy/Estaciones/La_Estanzuela/Webseminariomalezas/Articulos/Depradorafael.Pdf [22 De Octubre De 2008].
- Devine, M.; Duke, S.O.; Fedtke, C. 1993.** *Physiology Og Herbicidal Action.* Englewood Cliffs, NJ, Prenticehall. P. 251-294.

- Díaz, J., Espinoza, N., Galdames, R. (2006).** Malezas Resistentes A Herbicidas. I. Encuesta A Agricultores Entre La VIII Y X Regiones. 57° Congreso Agronómico De Chile. 17-20 Octubre De 2006. U. Santo Tomás, Santiago, Chile
- Duke, S.O., S.R. Baerson, And A. M. Rimando. 2003.** Glyphosate. Encyclopedia Of Agrochemicals. John Wiley & Sons, Inc. Article On Line. [Www.Interscience.Wiley.Com](http://www.interscience.wiley.com).
- Dyer, W. E. 1994.** Resistance To Glyphosate. Pages 229-242 *In* S. B. Powles And J. A. M. Holtum, Eds. Herbicide Resistance In Plants: Biology And Biochemistry. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. Sammons RD, Heering DC, Dinicola N, Glick H, Elmore GA (2007) Sustainability And Stewardship Of Glyphosate And Glyphosate-Resistant Crops. Weed Technol 21:347–354.
- Espinoza, N.; Conejeros, A.; Mera, M.; Rouanet, J.L. (2003).** Biotipo De Ballica (*Lolium Multiflorum* L.) Con Resistencia Cruzada A Herbicidas Accasa. En: XVI Congreso Latinoamericano De Malezas; XXIV Congreso Nacional De La Asociación Mexicana De La Ciencia De La Maleza. Manzanillo, Colima, México.
- Espinoza, N.; Díaz, J. (2005).** Situación De La Resistencia De Malezas A Herbicidas En Cultivos Anuales En Chile. Seminario-Taller Iberoamericano. Resistencia A Herbicidas Y Cultivos Transgénicos. Colonia Del Sacramento. Uruguay, 72-82.
- Espinoza, N.; Díaz, J.; Galdames, R.; De Prado, R.; Rodríguez, C.; Ruiz, E. (2008).** Resistencia Múltiple A Glifosato, Accasa Y ALS En Biotipos De *Lolium* Chilenos. En XVIII Congreso Latinoamericano De Malezas. XXVI Congreso Brasileiro Da Ciencia Das Plantas Daninhas. Ouro Preto, MG, Brasil.
- Espinoza, N.; Díaz, J.; Galdames, R.; De Prado, R.; Rodríguez, C.; Ruiz, E. (2008).** Resistencia Múltiple A Glifosato, Accasa Y ALS En Biotipos De *Lolium* Chilenos. En XVIII Congreso Latinoamericano De Malezas. XXVI Congreso Brasileiro Da Ciencia Das Plantas Daninhas. Ouro Preto, MG, Brasil.
- Espinoza, N.; Zapata, M. (2000).** Resistencia De Ballica Anual (*Lolium Rigidum*) Y Avenilla (*Avena Fatua*) A Herbicidas Graminidas En Las Zonas Centro-Sur Y Sur De Chile. Agricultura Técnica 60(1): 3-13.
- Franz, J. E., M. K. Mao, J. A. Sikorski. 1997.** Glyphosate: A Unique Global Herbicide ACS Monograph 189, American Chemical Society, Washington, DC USA.

- Gaines, T.; Zhang, W.; Wang, D.; Bukuna, B.; Chisholm, S.; Shaner, D.; Nissen, S.; Patzoldt, W.; Tranel, P.; Culpepper, A.; Grey, T.; Websterg, T.; Vencill, W.; Sammons, R.; Jiang, J; Prestoni, C; Leacha, J and Westra, P. 2009.** Gene amplification confers gluphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. October, 1-6. doi: 10.1073/pnas.0906649107.
- Heap I. 2011.** The International Survey Of Herbicide Resistant Weeds. URL <http://Www.Weedscience.Org>. (Accessed On September 5, 2011).
- Heap, I. 2007.** International Survey Of Herbicide-Resistant Weeds. Www.Weedscience.Org (Accessed February 2007).
- Hess, F. D. 1985.** Herbicide Absorption And Translocation And Their Relationship To Plant Tolerances And Susceptibility. Pages 191-214 *In* S. O. Duke, Ed. Weed Physiology. Vol II. Herbicide Physiology. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Holt, J. S., S. B. Powles, And J. A. M. Holtum. 1993.** Mechanisms And Agronomic Aspects Of Herbicide Resistance. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:203-229.
- Jasieniuk, M.; Ahmad, R.; Sherwood, A.; Firestone, J.; Perez- Jones, A.; Lanini, W.; Mallory-Smith, C. A.; Stednick, Z, 2008.** Glyphosateresistant Italian Ryegrass (*Lolium Multiflorum*) In California: Distribution, Response To Glyphosate And Molecular Evidence For An Altered Target Enzyme. *Weed Sci.* 2008, 56, 496–502.
- Kaundun Ss & Windass Jd (2006)** Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, A Simple Method To Detect A Key Point Mutation Conferring Acetyl Coa Carboxylase Inhibitor Herbicide Resistance In Grass Weeds. *Weed Research* 46, 34–39.
- Kaundun, S. S., Dale, R. P., Zelaya, I. A., Dinelli, G., Marotti, I., Mcindoe, E., Et Al. (2011).** Novel P106L Mutation In EPSPS And An Unknown Mechanism(S) Act Additively To Confer Resistance To Glyphosate In A South African *Lolium Rigidum* Population. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 59(7), 3227-33. Doi: 10.1021/Jf104934j.
- Koger, C. H., D. H. Poston, R. M. Hayes, And R. F. Montgomery. 2004.** Glyphosate-Resistant Horseweed In Mississippi. *Weed Technol.* 18:820-825.
- Koger, C. H.; Reddy, K. N, 2005.** Role Of Absorption And Translocation In The Mechanism Of Glyphosate Resistance In Horseweed (*Conyza Canadensis*). *Weed Sci.* 2005, 53, 84–89.
- Konieczny, A. And Ausubel, F.M. (1993)** A Procedure For Mapping Arabidopsis Mutations Using Co-Dominant Ecotype-Specific Markers. *Plantj.*4, 403–410.

- Kuppuswami, M.N., Hoffman, J.W., Kasper, C.K., Spitzer, S.G., Groce, S.L. And Bajaj, S.P. (1991)** Single Nucleotide Primer Extension To Detect Genetic Diseases: Experimental Application To Hemophilia B (Factor IX) And Cystic Fibrosis Genes. Proc .NatI Acad. Sci.USA, 88, 1143–1147.
- Labrune, P., Dominique, M. And Francoise, R. (1991)** Single-Strand Conformation Polymorphism For Detection Of Mutations And Base Substitutions In Phenylketonuria. Am.J.Hum.Genet., 48, 1115–1120.
- Lee, L. J. And J. Ngim. 2000.** A First Report Of Glyphosate-Resistant Goosegrass (*Eleusine Indica* (L) Gaertn) In Malaysia. Pest Manag. Sci. 56:336-339.
- Vangessel, M. J. 2001.** Glyphosate-Resistant Horseweed From Delaware. Weed Sci. 49:703-705.
- Lorraine-Colwill, D. F., S. B. Powles, T. R. Hawkes, P. H. Hollinshead, S. A. J. Warner, And C. Preston. 2003.** Investigations Into The Mechanism Of Glyphosate Resistance In *Lolium Rigidum*. Pestic. Biochem. Physiol. 74:62-72.
- Main, C. L., T. C. Mueller, R. M. Hayes, And J. B. Wilkerson. 2004.** Response Of Selected Horseweed (*Conyza Canadensis* (L.) Cronq.) Populations To Glyphosate. J. Agric. Food Chem. 52:879-883.
- Marzoca, A. 1976.** Manual De Malezas. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 564 P.
- Myers, R.M., Lumelsky, N., Lerman, L.S. And Maniatis, T. (1985).** Detection Of Single Base Substitutions In Total Genomic DNA. Nature, 313, 495–498.
- Neff Mm, Neff Jd, Chory J& Pepper Ae (1998)** Dcaps, A Simple Technique For The Genetic Analysis Of Single Nucleotide Polymorphisms: Experimental Applications In Arabidopsis Thaliana Genetics. The Plant Journal 14, 387–392.
- Neff Mm, Turk E& Kalishmann (2002)** Web-Based Primer Design For Single Nucleotide Polymorphism Analysis. Trends In Genetics 18, 613–615.
- Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C. And Marknam, A.F. (1989)** Analysis Of Any Point Mutation In DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). Nucl.Acidsres.17, 2503–2516.
- Ng, C. H.; Wickneswari, R.; Salmijah, S.; Teng, Y. T.; Ismail, B. S.** Gene Polymorphisms In Glyphosate-Resistant And –Susceptible Biotypes Of Eleusine Indica From Malaysia. Weed Res. 2003, 43, 108–115.

- Nikiforov, T.T., Rendle, R.B., Goelet, P., Rogers, Y.H., Kotewicz, M.L., Anderson, S., Trainor, G.L. And Knapp, M.R. (1994)** Automated DNA Diagnostics Using An ELISA-Based Oligonucleotide Ligation Assay. *Nucl.Acidsres.*22, 4167–4175.
- Perez, A. And M. Kogan. 2003.** Glyphosate-Resistant *Lolium Multiflorum* In Chilean Orchards. *Weed Res.* 43:12-19.
- Perez-Jones, A.; Park, K.-W.; Polge, N.; Colquhoun, J.; Mallory- Smith, C. A, 2007.** Investigating The Mechanisms Of Glyphosate Resistance In *Lolium Multiflorum*. *Planta*, 226, 395–404.
- Powles, S.B.; Preston, C. 2006.** Evolved Glyphosate Resistance In Plants: Biochemical And Genetic Basis Of Resistance1. *Weed Technology* 20 (2), 282-289
- Powles, S. B., D. F. Lorraine-Colwill, J. J. Dellow, And C. Preston. 1998.** Evolved Resistance To Glyphosate In Rigid Ryegrass (*Lolium Rigidum*) In Australia. *Weed Sci.* 46:604-607.
- Pratley, J., P. Baines, P. Eberbach, M. Incerti, And J. Broster. 1996.** Glyphosate Resistance In Annual Ryegrass. Page 126 *In* J. Virgona And D. Michalk, Eds. Proceedings Of The 11th Annual Conference Of The Grassland Society Of New South Wales. The Grassland Society Of New South Wales, Wagga Wagga, Australia.
- Preston, C.; Leach, J.; Westra, P.** Gene Amplification Confers Glyphosate Resistance In *Amaranthus Palmeri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009, 107, 1029–1034.
- Sarkar, G., Yoon, H.S. And Sommer, S.S. (1992)** Dideoxy Fingerprinting (Dde): A Rapid And Efficient Screen For The Presence Of Mutations. *Genomics*, 13, 441–443.
- Sellers, B. A., J. M. Pollard, And R. J. Smeda. 2005.** Two Common Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia*) Biotypes Differ In Biology And Response To Glyphosate. *Proc. Weed Sci. Soc.* 45:156.
- Siehl, D.L. 1997.** Inhibitors Of EPSPS Synthase, Glutamine Synthetase And Histidine Synthasis. *In* Roe, R.M., Et Al . Ed. *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry And Molecular Biology*. Amsterdam: IOS Press. P. 37-67.
- Simarmata, M., J. E. Kaufmann, And D. Penner. 2003.** Potential Basis Of Glyphosate Resistance In California Rigid Ryegrass (*Lolium Rigidum*). *Weed Sci.* 51:678-682.
- Simarmata, M.; Penner, D, 2008.** The Basis For Glyphosate Resistance In Rigid Ryegrass (*Lolium Rigidum*) From California. *Weed Sci.* 56, 181–188.

- Steinrücken, H. And N. Amrhein. 1980.** The Herbicide Glyphosate Is A Potent Inhibitor Of 5-Enolpyruvylshikimic Acid-3-Phosphate Synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94:1207-1212.
- Sterling, T. M. 1994.** Mechanisms Of Herbicide Absorption Across Plant Membranes And Accumulation In Plant Cells. *Weed Sci.* 42:263-276.
- Terrell, E.E. (1968).** A Taxonomic Revision Of The Genus *Lolium*. Technical Bulletin 1392, US Department Of Agriculture, Pp. 1–65.
- Tran, M., S. Baerson, R. Brinker, L. Casagrande, M. Faletti, Y. Feng, M. Nemeth, T. Reynolds, D. Rodriguez, D. Shaffer, D. Stalker, N. Taylor, Y. Teng, And G. Dill. 1999.** Characterization Of Glyphosate Resistant *Eleusine Indica* Biotypes From Malaysia. Pages 527-536 *In* Proceedings 1 (B) Of The 17th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. The Asian-Pacific Weed Science Society, Bangkok, Thailand.
- Tranel, P.J; Whright, T.R. 2002.** Resistance Of Weeds To ALS-Inhibiting Herbicides: What Have We Learned? *Weed Science* 50:700-712.
- Urbano, J. M., A. Borrego, V. Torres, C. Jimenez, J. M. Leon, And J. Barnes. 2005.** Glyphosate-Resistant Hairy Fleabane (*Conyza Bonariensis*) In Spain. *Proc. Weed Sci. Soc. Amer.* 45:394.
- Valverde, B. E., J. Gressel, S. Passalacqua, And J. C. Rodriguez. 2007.** The Emerging Problem Of Glyphosate-Resistant Johnsongrass (*Sorghum Halepense*) In Argentina: An Account Of Detection, Initial Spread And Collaborative Action For Its Prevention And Management. *Proc. Weed Sci. Soc. Amer.* 47:183.
- Wakelin A.M.; Lorraine-Colwill, D.F.;Preston, C. (2004).** Glyphosate Resistance In Four Diferent Populations Of *Lolium Rigidum* Is Associated With Reduced Translocation Of Glyphosate To Meristematic Zones. *Weed Research* 44:453–459.
- Wakelin, A. M., D. F. Lorraine-Colwill And C. Preston. 2004.** Glyphosate Resistance In Four Different Population Of *Lolium Rigidum* Is Associated With Reduced Translocation Of Glyphosate To Meristematic Zones. *Weed Res.* 44:453-459.
- Wakelin, A. M.; Preston, C. A, 2006.** Target-Site Mutation Is Present In A Glyphosate Resistant *Lolium Rigidum* Population. *Weed Res.*, 46, 432–440.
- Whaley, C.M.; Wilson, H.P.; Westwood, J.H. 2007.** A New Mutation In Plant ALS Confers Resistance To Five Classes Of ALS-Inhibiting Herbicides. *Weed Science* 55:83-90.

- Woodburn, A. T. 2000.** Glyphosate: Production, Pricing And Use Worldwide. *Pest Manag. Sci.* 56:309-312.
- Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K. And Wallace, R.B. (1989)** Allele- Specific Enzymatic Amplification Of B-Globin Genomic DNA For Diagnosis Of Sickle Cell Anemia. *Proc. Natl Acad. Sci.USA*, 86, 2757–2760.
- Yu, Q.; Cairns, A.; Powles, S. Glyphosate, Paraquat And Accase Multiple Herbicide Resistance Evolved In A Lolium Rigidum Biotpe. Planta 2007**, 225, 499–513.
Yuan, C.; Hsieh, Y.; Chiang, M. Glyphosate-Resistant Goosegrass In Taiwan: Cloning Of Target Enzyme (EPSPS) And Molecular Assay Of Field Populations. *Plant Prot. Bull.* 2005, 47, 251–261.
- Yuan, J.S.; Tranel, P.T.; Stewart, C.N. JR. 2007.** Non-Target-Site Herbicide Resistance: A Family Business. *Trends In Plant Science* 12:7-13.
- Zelaya, I. A. And M. D. K. Owen. 2005.** Differential Response Of *Amaranthus Tuberculatus* (Moq Ex DC) JD Sauer To Glyphosate. *Pest Manag. Sci.* 61:936- 950.

13. ANEXO.

Anexo 1. Listado material vegetal. Biotipos resistentes utilizados en el estudio.

LMRR	LM30	LM33
LMRR-1	LMRR-1	LMRR-1
LMRR-2	LMRR-2	LMRR-2
LMRR-3	LMRR-3	LMRR-3
LMRR-4	LMRR-4	LMRR-4
LMRR-5	LMRR-5	LMRR-5
LMRR-6	LMRR-6	LMRR-6
LMRR-7	LMRR-7	LMRR-7
LMRR-8	LMRR-8	LMRR-8
LMRR-9	LMRR-9	LMRR-9
LMRR-10	LMRR-10	LMRR-10
LMRR-11	LMRR-11	LMRR-11
LMRR-12	LMRR-12	LMRR-12
LMRR-13	LMRR-13	LMRR-13
LMRR-14	LMRR-14	LMRR-14
LMRR-15		

Anexo 2. Listado de partidores dCAPS evaluados en el método.

PARTIDOR	SECUENCIA PARTIDOR 5'-3'	Nº pb	TM
EPSPS DCAPS UP1	CTTCTTGGGCAACGCTGGAACTGCAATGTGG	31	67,1
EPSPS DCAPS UP2	TGGGCAACGCTGGAACTGCAATGTGG	26	66
EPSPS DCAPS UP3	GGGCAACGCTGGAACTGCAATGTGG	25	65,1
EPSPS DCAPS UP4	GGCAACGCTGGAACTGCAATGTGG	24	63,6
EPSPS DCAPS UP5	GCAACGCTGGAACTGCAATGTGG	23	61,9
EPSPS DCAPS UP6	CAACGCTGGAACTGCAATGTGG	22	59,5
EPSPS DCAPS UP7	AACGCTGGAACTGCAATGTGG	21	58,6
EPSPS DCAPS UP8	TGGAACTGCAATGTGG	16	48,5
EPSPS DCAPS UP9	CTGCAATGTGG	11	33,5
EPSPS UP	AGCTGTAGTCGTTGGCTGTGGC	22	61,7
EPSPSLOW	CCGAACAGGTGGGCAGTCAGT	21	63,0