

BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL ESTUDIO DE MALEZAS: identificación de especies y mecanismos de resistencia a herbicidas



Lic. Cecilia Monesiglio¹,
 Ing. Agr. PhD Tiago Kaspar^{2,3},
 Ing. Agr. PhD Alejandro García^{2,3},
 Lic. Biol. Dra. Monika Kavanová^{1,2}

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal INIA-LE; Área de Mejoramiento Genético y Biotecnología Vegetal

²Sistema Agrícola Ganadero

³Área de Pasturas y Forrajes

Este artículo tiene como objetivo describir las herramientas empleadas en el Laboratorio de Biotecnología de INIA La Estanzuela para estudios genéticos de malezas y los avances recientes en el uso de tecnologías moleculares y genómicas.

Las malezas representan una de las principales limitantes en los sistemas agrícolas, ya que afectan la productividad de los cultivos al competir por recursos esenciales como luz, agua y nutrientes. Estas limitantes se agravan cuando los mecanismos de control químico se ven amenazados por el surgimiento de resistencia genética o metabólica por parte de las malezas. Este es el caso de malezas como *Conyza* spp., *Amaranthus* spp., *Brassicas* spp. y *Lolium multiflorum*, que presentan una gran capacidad de adaptación y desarrollo de

resistencias a distintos herbicidas como el glifosato y los inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS). Esta evolución ha generado una creciente preocupación en el sector agrícola, ya que limita las estrategias de manejo químico tradicional, exigiendo el desarrollo de nuevas capacidades para la identificación y el manejo.

En este contexto, este artículo tiene como objetivo describir las herramientas empleadas en el Laboratorio de Biotecnología de La Estanzuela para estudios



Figura 1 - Resumen fotográfico de las actividades del laboratorio.

genéticos de malezas y los avances recientes en el uso de tecnologías moleculares y genómicas (Figura 1). Este laboratorio, mediante un equipo multidisciplinario, brinda apoyo en la concepción, optimización y ejecución de las actividades en proyectos de investigación en malezas y participa en la capacitación y entrenamiento de estudiantes de grado y posgrado del área (Figura 2).

BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL ESTUDIO DE MALEZAS RESISTENTES A HERBICIDAS: IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN GENES CLAVES INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA

La resistencia genética a herbicidas se da por mutaciones en genes que codifican las enzimas blanco de herbicidas, como es el caso de la EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) y la ALS (acetolactato sintasa), objetivos del glifosato y los inhibidores de la ALS (Imazetapir, diclosulam, clorimuron, etc), respectivamente. El uso de técnicas de biología molecular permite la identificación de estas mutaciones y ha sido una herramienta fundamental para entender la evolución de la resistencia en malezas. A partir de la secuenciación de la EPSPS fue posible determinar en algunos biotipos de *A. hybridus* colectados en campos uruguayos la presencia de una triple mutación en dicho gen, la que confiere elevados niveles de resistencia al glifosato (Figura 3). De manera similar, en *Conyza bonariensis* se detectó la presencia de una mutación (Pro197Arg) en el gen ALS, que está asociada a resistencia a los herbicidas diclosulam y clorimuron (Kaspary *et al.*, 2024). Estos estudios han aportado información de alta relevancia, ya que la identificación de estas mutaciones permite ajustar las estrategias de manejo químico, evitando el uso de herbicidas que han perdido efectividad para control de estas malezas.



Figura 2 - Estudiantes realizando diferentes técnicas en el laboratorio.

Las mutaciones pueden consistir en cambios de un solo nucleótido de la secuencia de ADN o SNP (del

El avance de la biotecnología ha permitido la exploración de diversas herramientas para comprender la biología y evolución de las malezas, así como el desarrollo de estrategias más eficaces para su mitigación.

inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*), o inserciones o deleciones de pequeñas secuencias que alteran la estructura y función de las enzimas blanco de los herbicidas, confiriendo resistencia. Para poder identificar las mutaciones se comparan secuencias de ADN de los genes claves. Para ello, es necesario amplificar este ADN mediante una reacción conocida como PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa). El procedimiento consiste en la colecta de tejido vegetal, extracción de ADN de las plantas a ser estudiadas y amplificación de la secuencia del gen por PCR. El producto de PCR puede seguir dos caminos: a) determinación de presencia y ausencia de bandas específicas en gel de agarosa (metodología por la cual se observa la longitud de una molécula de ADN) o b) secuenciación de una región o de todo el gen objetivo del estudio, realizada por laboratorios externos a INIA. Una vez obtenida la secuencia, se compara con secuencias de referencias reportadas o depositadas en base de datos internacionales, como el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para eso, se usan herramientas bioinformáticas como BLAST (*Basic Local*

Alignment Search Tool) o alineamientos múltiples con *software* especializados (ej. Clustal, MEGA) (Figura 3).

BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MALEZAS

Para un manejo integrado eficiente es esencial identificar correctamente las especies de malezas. Un ejemplo claro de la relevancia es la diferenciación entre las principales especies del género *Amaranthus*: *A. hybridus*, *A. palmeri* y *A. tuberculatus*. Distinguir entre las tres especies permite la selección adecuada de herramientas químicas, ya que su sensibilidad a los herbicidas varía significativamente. En particular, *A. palmeri* y *A. tuberculatus* presentan mayor tolerancia a auxinas sintéticas en comparación con *A. hybridus*, lo que impacta directamente en las estrategias de control. Sin embargo, en condiciones de campo, factores como el estrés abiótico pueden afectar características morfológicas distintivas de cada especie, dificultando su correcta identificación. Esto lleva al uso de términos genéricos, como “yuyo colorado”, para referirse a las especies sin diferenciarlas. Una situación similar ocurre con las “yerbas carniceras”, tratadas como una única especie, cuando en realidad se trata de por lo menos dos especies, *Conyza bonariensis* y *Conyza sumatrensis*, ambas con amplia distribución en diferentes zonas productivas del país.

En el laboratorio de biotecnología se validaron marcadores moleculares (Wright *et al.* 2016) con el objetivo de diferenciar las especies e híbridos de *Amaranthus* presentes en Uruguay. Los marcadores moleculares permiten detectar ciertas regiones de ADN que son específicas de cada especie, posibilitando así su diferenciación. La metodología utilizada es similar

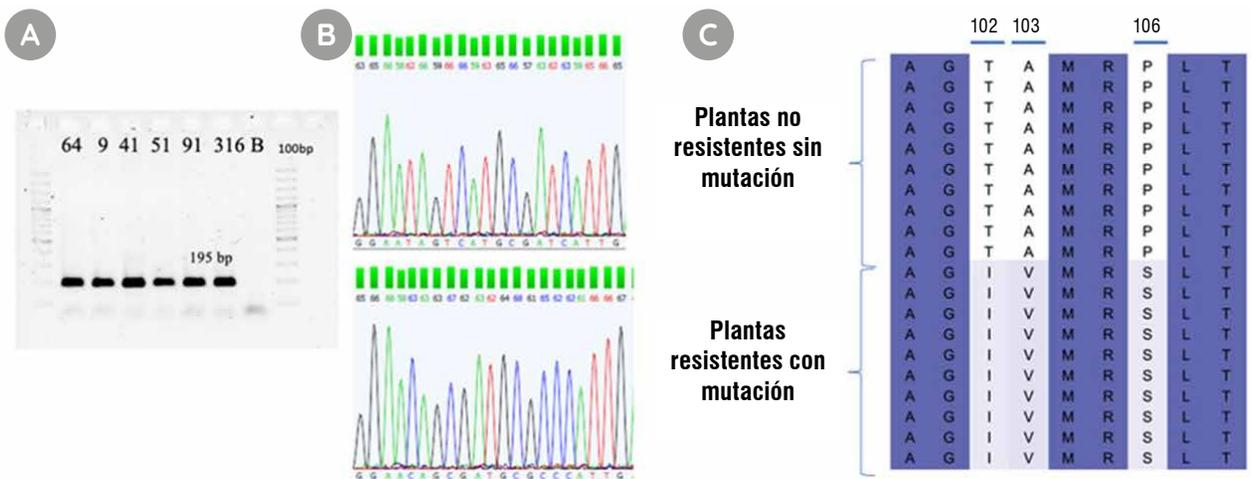


Figura 3 - Detección de mutaciones en EPSPS de *Amaranthus hybridus*. (A) Se amplificó por PCR un fragmento de 195 pb del gen EPSPS en muestras denominadas como 9, 64, 41, 51, 91 y 316 de *Amaranthus hybridus*. (B) El ADN amplificado es secuenciado por un método conocido como Sanger. (C) Las secuencias de nucleótidos obtenidas se alinearon usando el *software* MEGA con el algoritmo de MUSCLE y se tradujeron a aminoácidos para visualizar la mutación.

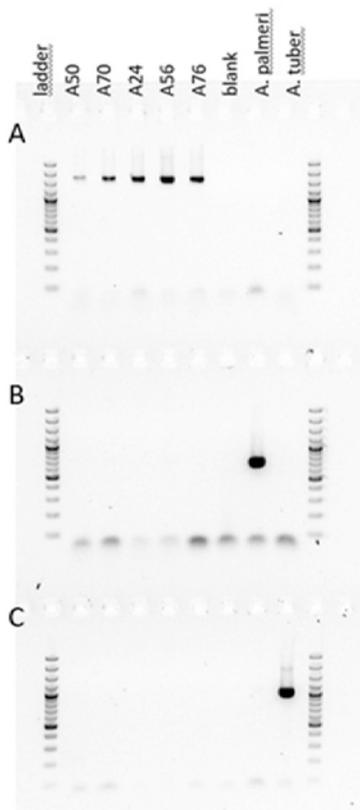
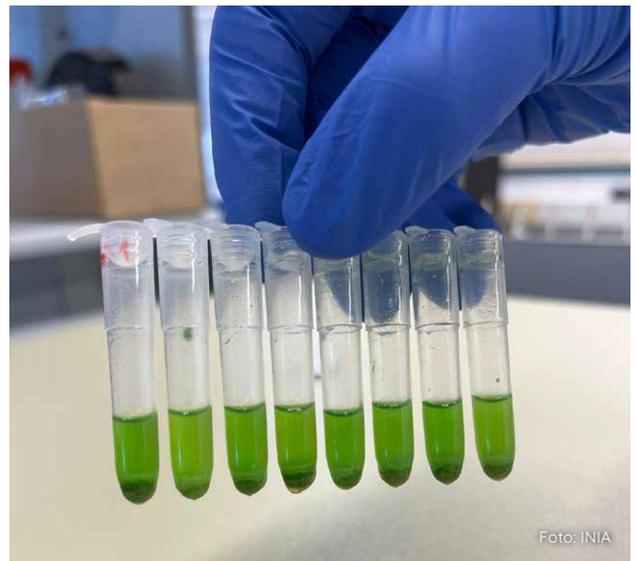


Figura 4 - Determinación de especies de *Amaranthus* mediante marcadores moleculares. Se corrieron PCR específicos para las especies (A) *A. hybridus*, (B) *A. palmeri* y (C) *A. tuberculatus* para confirmar la identificación de las poblaciones colectadas. Las poblaciones analizadas (A50, A70, A24, A56 y A76) pertenecen a la especie *Amaranthus hybridus*.

a la descrita en el caso anterior, pero el producto de amplificación de la PCR se visualiza en un gel de agarosa, separando la molécula amplificada por tamaño (Figura 4). Como desafío futuro, el equipo de laboratorio busca adaptar y validar nuevos marcadores moleculares que permitan la diferenciación de especies de *Conyza* spp. y *Brassica* spp., ampliando así las herramientas disponibles para la identificación de malezas de importancia agronómica en Uruguay.

La incorporación de herramientas biotecnológicas para la identificación precisa de especies resulta clave en el desarrollo de estrategias de control más efectivas y sostenibles.



Etapa durante la extracción de ADN manual por método CTAB 2%.

PERSPECTIVAS EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LAS MALEZAS

El estudio de malezas mediante herramientas biotecnológicas aún tiene un gran potencial de desarrollo y expansión. La utilización de marcadores moleculares será clave para la diferenciación precisa de *Brassicas* spp., *Echinochloa* spp., y otras especies de interés agronómico. Asimismo, la investigación de mutaciones en genes que codifican enzimas blanco de herbicidas podrá extenderse a estas y otras malezas todavía no estudiadas.

Futuros estudios de genómica poblacional y análisis de expresión génica, cuantificación en el número de copias génicas, y la detección de cambios en transportadores/secuestrantes y metabolizadores de herbicidas a nivel celular permitirán una comprensión más profunda de la evolución de las resistencias.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los estudiantes de posgrado Mauricio Waller y Evelyn Fernández, a los estudiantes de grado Soledad Hernández, Joaquín García, Othon Días dos Santos y a la laboratorista Martina Villero, por su valiosa colaboración en la recolección de material, asistencia en los experimentos y destacada contribución a las discusiones, ya que ha sido fundamental para la realización de estos estudios.

BIBLIOGRAFÍA

Kaspary, T., et al. (2024). Alteração na acetolactato sintase e metabolização conferem resistência cruzada de *Conyza bonariensis* a diclosulam e clorimurrom. En XXXIII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, Campinas, Brasil.

Wright, A. A., Molin, W. T., & Nandula, V. K. (2016). Distinguishing between weedy *Amaranthus* species based on intron 1 sequences from the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene. *Pest Management Science*, 72(12), 2347–2354. <https://doi.org/10.1002/ps.4280>