

# Primera dicotiledónea caracterizada en España con resistencia metabólica y de sitio de acción a inhibidores de la ALS: *Papaver rhoeas*

Jordi Rey-Caballero<sup>1,2✉</sup>, Julio Menéndez<sup>3</sup>, María Dolores Osuna<sup>4</sup>, Marisa Salas<sup>5</sup>, Joel Torra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Malherbología y Ecología Vegetal. Dpto HBJ. Agrotecnio, Universitat de Lleida. Avda. Rovira Roure 191, 25198-Lleida, España.

<sup>2</sup>FTS Agroconsulting, Pol. Ind. Argentum c/ Platino s/n, 41909-Salteras, Sevilla, España.

<sup>3</sup>Dpto de Ciencias Agroforestales, Escuela Politécnica Superior Campus de la Rábida.

Ctra. Huelva-Palos de la Frontera s/n, 21071 Palos de La Frontera, Huelva, España.

<sup>4</sup>«Finca La Orden-Valdesequera» Research Centre, Ctra. A-V, Km372, 06187 Guadajira Badajoz, España.

<sup>5</sup>DuPont de Nemours, Reu Delarivière Lefoullon, La Defense Cedex, Paris 92064, Francia.

✉ jrey@fts-spain.com

**Resumen:** Se han detectado seis sustituciones diferentes en la posición Pro197 en tres de los biotipos de *Papaver rhoeas* con resistencia múltiple. Estas sustituciones fueron responsables de la elevada resistencia a tribenurón-metil y algunas de ellas, de la resistencia cruzada a imazamox y florasulam. En aquellas plantas con resistencia múltiple y solo resistentes a 2,4-D, se observó una elevada movilidad del tribenurón-metil con respecto a las plantas sensibles. Los estudios de metabolismo confirmaron la presencia de un metabolito del imazamox en una de las poblaciones. La falta de correlación entre el genotipo y el fenotipo en plantas tratadas con imazamox y florasulam, la aparición de plantas no mutadas capaces de sobrevivir a imazamox, el patrón de translocación detectado en las poblaciones y, por último, la presencia de metabolismo aumentado son signos que evidencian la presencia de mecanismos de resistencia metabólica a inhibidores de la ALS en esta especie.

**Palabras clave:** imazamox, florasulam, metabolismo, mutación, resistencia múltiple, translocación, tribenurón-metil.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los resultados del presente trabajo fueron publicados el pasado mes de marzo en la revista *Pesticide Biochemistry and Physiology* (Vol. 138; 57-65). Dada la relevancia de este material, parece interesante integrar este trabajo dentro del presente congreso con el fin de hacer difusión de estos resultados y así advertir de la complejidad de la problemática de la resistencia a herbicidas. Como consecuencia del monocultivo de cereal y de una continuada aplicación de herbicidas para el control de amapola (*Papaver rhoeas* L.), se han seleccionado biotipos de esta especie resistentes a herbicidas. En España, en 1992 se detectaron los primeros problemas de control de *P. rhoeas* con 2,4-D, una auxina sintética (Taberner et al., 1992), y en 1998 la presencia de biotipos con resistencia múltiple a 2,4-D y tribenurón-metil, inhibidor de la acetolactato sintasa (ALS) (Claude et al., 1998). Pero esta especie no es solo un problema en nuestro país. Biotipos con resistencia a inhibidores de la ALS también han sido citados en Francia, Reino Unido, Alemania y Grecia, mientras que poblaciones de *P. rhoeas* con resistencia múltiple (2,4-D y tribenurón-metil) también han sido detectadas en Italia y Grecia (Heap, 2015). La resistencia de esta mala hierba a tribenurón-metil ha sido estudiada profundamente, y son diversos los trabajos que han encontrado diferentes tipos de mutaciones en la posición Pro197 de la enzima ALS (Kaloumenos et al., 2009; Délye et al., 2011). Las diversas sustituciones que se producen en esta posición del gen que codifica dicha proteína otorgan una resistencia fuerte a las sulfonilureas y resistencias intermedias a imidazolinonas y triazolopirimidinas (Délye et

al., 2011). Por otro lado, por lo que a los mecanismos de resistencia al 2,4-D se refiere, en un estudio previo se vio que las plantas resistentes no movilizan el herbicida de la misma manera que lo hacen los biotipos sensibles (Rey-Caballero et al., 2016). El objetivo de este trabajo es: (1) caracterizar la resistencia a tribenurón-metil y 2,4-D de algunos biotipos de *P. rhoeas* susceptibles, así como (2) estudiar los mecanismos de resistencia en el lugar de acción y fuera del lugar de acción (absorción, translocación y metabolismo) de algunos herbicidas inhibidores de la ALS en estos mismos biotipos.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

**2.1. Material vegetal.** Se recolectaron las semillas de cuatro poblaciones de amapola (R-213, R-313, R-114 y R-703) que sobrevivieron a la aplicación de diferentes inhibidores de la ALS o mezclas de estos con auxinas sintéticas (2,4-D + florasulam), todos estos biotipos proceden de campos de cereal localizados en el Noreste de España. Junto a estas poblaciones se incorporó un estándar sensible (S-013).

**2.2. Caracterización de la resistencia.** En estos biotipos se aplicó: tribenurón-metil (Granstar 50 SX, DuPont), florasulam (Nikos, Dow AgroSciences), imazamox (Pulsar 40, BASF España) y 2,4-D (Esteron 60, Dow AgroSciences) a 8 dosis diferentes (Tabla 1). Se emplearon un total de cuatro repeticiones (macetas) para cada una de las dosis con tres individuos por repetición. Cuatro semanas después de las aplicaciones se estimó el peso seco (65°C durante 48h.) por maceta y posteriormente se calculó el porcentaje de reducción de peso respecto el control no tratado. Los datos de este experimento fueron analizados con modelos de regresiones no lineales. La dosis de herbicida que causa el 50% de la reducción del peso seco ( $RD_{50}$ ) se calculó gracias a la curva Log-logistic de cuatro parámetros (Knezevic et al., 2007). A partir de la  $RD_{50}$  se calcularon los factores de resistencia (FR) para cada uno de los biotipos y productos.

**2.3. Genotipo vs fenotipo.** Un total de 51 plantas por biotipo fueron tratadas con tribenurón-metil, florasulam e imazamox (17 para cada uno de los productos). Una semana antes de las aplicaciones se extrajo un fragmento de hoja de cada una de las plantas tratadas para posteriormente enviarlo para su posterior análisis molecular (análisis de los dominios C, A, D del gen que codifica la ALS). Cuatro semanas después de los tratamientos se definió el fenotipo, aquellas plantas muertas fueron clasificadas como sensibles (S), las plantas que presentaron un rebrote en el centro de la roseta fueron caracterizadas como moderadamente resistentes (r) y las plantas que no murieron y no presentaron ningún síntoma fueron clasificadas como resistentes (R).

**2.4. Absorción y translocación.** Para los experimentos de absorción-translocación se empleó tribenurón-metil marcado con  $^{14}C$ . Cada una de las repeticiones recibió cuatro gotas (2  $\mu$ L) de la mezcla de herbicida marcado y herbicida comercial a la dosis de registro (18,7 g i.a.  $\cdot$ ha $^{-1}$ ). La absorción y translocación de estos productos se evaluó en cinco tiempos diferentes: 0, 12, 24, 48 y 96 horas después de la aplicación. Para cada tiempo y biotipo se emplearon 5 repeticiones (una planta por repetición). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), en aquellos casos en los que no se cumplieron las asunciones de normalidad se practicaron transformaciones (arcs  $[\sqrt{(x+0.5)}]$ ). Finalmente, las comparaciones entre biotipos se realizaron mediante un test post-hoc de Tukey ( $p=0,05$ ).

**2.5. Estudio de metabolismo a imazamox.** La metodología empleada para llevar a cabo este ensayo fue la descrita por Rojano-Delgado et al. (2014). El imazamox se aplicó a 100 g i.a.·ha<sup>-1</sup> (doble de la dosis de registro) y a dosis control. Las plantas control junto con las plantas tratadas fueron recolectadas 0, 24, 48 y 72 horas después de su aplicación y se almacenaron a -40°C hasta su posterior uso. El imazamox y sus metabolitos fueron identificados por cromatografía líquida DAD («diode array detector») y una columna de cromatografía líquida de interacción hidrofílica se empleó para separar el herbicida y sus metabolitos. Finalmente, se tomó una muestra de cada una de las plantas empleadas en este ensayo para su posterior secuenciación. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), cuando no se cumplieron las asunciones de normalidad se realizaron transformaciones ( $\arcsin[\sqrt{(x+0,5)}]$ ). Las comparaciones entre biotipos se efectuaron mediante un test post-hoc de Tukey ( $p=0,05$ ).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**3.1. Caracterización de la resistencia.** Las poblaciones R-213, R-313 y R-114 fueron 286, 695 y 351 veces más resistentes al tribenuron-metil que el biotipo sensible. Por lo que al florasulam se refiere, estos biotipos presentaron factor de resistencia (FR) del 24, 18 y 18 (en R-213, R-313 y R-114, respectivamente). Para el imazamox los FR para estas mismas poblaciones fueron de 30, 40 y 24 (R-213, R-313 y R-114 respectivamente). La población R-703 solo presentó resistencia al 2,4-D (FR de 15), las poblaciones R-213, R-313 y R-114 se confirmaron como poblaciones con resistencia múltiple al ser también resistentes al 2,4-D (FR que osciló de 12 a 18). Estos datos están en concordancia con lo observado en otros biotipos de amapola con resistencia múltiple (Kaloumenos et al., 2009).

**3.2. Genotipo vs fenotipo.** Ningunas de las plantas del biotipo sensible (S-013) presentó alteraciones en el aminoácido prolina en la posición 197 (Pro197), sin embargo, se identificaron seis sustituciones diferentes en esta posición (Ala, Arg, His, Leu, Ser y Thr) en las poblaciones R-213, R-313 y R-114. En la población R-703, únicamente una planta de las 51 analizadas presentó una mutación (Thr197). Los resultados de este trabajo demostraron que todas aquellas plantas que albergaban alguna mutación en la posición Pro197, presentaban una fuerte resistencia a la sulfonilurea tribenurón-metil. La mayoría de las plantas tratadas con florasulam fueron caracterizadas como r o S, pocas fueron caracterizadas como R. Todas aquellas plantas que presentaron una resistencia fuerte (R) al florasulam tenían una Ser en uno de los alelos mutados. La mayoría de las plantas tratadas con imazamox presentaron una respuesta R o r, muchas de las plantas con resistencia fuerte (R) albergaban un alelo Thr197 o Leu197. Resultados de la misma naturaleza fueron advertidos por Délye et al. (2011).

**3.3. Absorción y translocación de [<sup>14</sup>C]-tribenurón-metil.** No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en términos de absorción entre biotipos. Por lo que a la translocación de este producto se refiere, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre biotipos a partir de las 48 horas y estas fueron máximas a las 96 horas (Fig. 2). El tribenurón-metil marcado permaneció inmóvil en la hoja tratada de las plantas del estándar sensible, por el contrario, el resto de biotipos fueron capaces de movilizar de forma significativa este herbicida. De entre todas las poblaciones estudiadas, el biotipo R-313 presentó los porcentajes de movilidad más elevados (Fig. 2). Los datos de nuestro estudio están en concordancia con estudios anteriores

en los que se ha observado que los herbicidas inhibidores de la ALS afectan el transporte de asimilados en el floema de aquellas plantas sensibles (Zabalza et al., 2004). No obstante, el mismo comportamiento observado en la población solo resistente a 2,4-D podría indicar la presencia de un mecanismo de resistencia fuera del sitio de acción.

**3.4. Estudio de metabolismo a imazamox.** El patrón de metabolización y transporte del imazamox fue diferente entre plantas sensibles y resistentes a partir de las 48 horas (Fig. 3). El herbicida se movilizó a las raíces en las plantas sensibles a diferencia de las resistentes. Además, 72 horas después de la aplicación del herbicida se detectó la presencia de un metabolito hidroxilo del imazamox en las plantas del biotipo R-313 (19,8 y 0,9  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  planta en parte aérea y raíces, respectivamente). Los resultados moleculares de este ensayo corroboraron la presencia de plantas

Tabla 1. Herbicidas empleados en los experimentos dosis-respuesta y tratamientos sucesivos

Ingrediente activo	Producto comercial	Dosis recomendada (g i.a.·ha <sup>-1</sup> )	Ratio de dosis empleadas (g i.a.·ha <sup>-1</sup> )
Tribenurón-metil	Granstar 50 SX	18,7	R 1200; 600; 150; 75; 37,5; 18,7; 9,3; 4,6 y 0
			S 18,7; 9,3; 4,6; 2,3; 1,1; 0,5; 0,25 y 0
Florasulam	Nikos	7,5	R 480; 240; 60; 15; 7,5; 3,7; 1,8; 0,9 y 0
			S 7,5; 3,7; 1,8; 0,9; 0,4; 0,2; 0,1 y 0
Imazamox	Pulsar 40	50	R 3200; 1600; 400; 100; 50; 25; 12,5; 6,2 y 0
			S 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,5; 0,7 y 0
2,4-D	Esteron 60	600	R 4800; 1200; 600; 300; 150; 75 y 0
			S 600; 300; 150; 75; 37,5; 18,7; 9,3 y 0

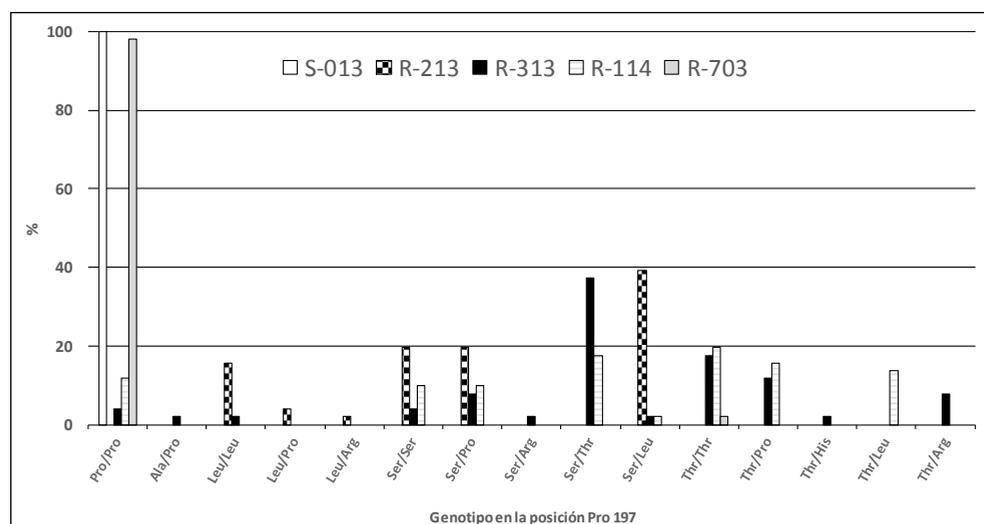


Figura 1. Genotipo detectado en la posición Por 197 del gen que codifica la ALS en 255 plantas de *P. rhoeas* (51 plantas analizadas por biotipo).

con mutaciones en los biotipos R-213 y R-313 (Ser/Ser, Pro/Ser y Thr/Pro); ninguna de las plantas empleadas en los biotipos R-703 y S-013 presentó alteraciones en la posición Pro197. De esta manera, se confirma por primera vez en *P. rhoeas* la co-existencia de mecanismos de resistencia en el sitio de acción y fuera del sitio de acción (metabolismo) en una misma planta de poblaciones con resistencia múltiple (Rey-Caballero et al., 2017).

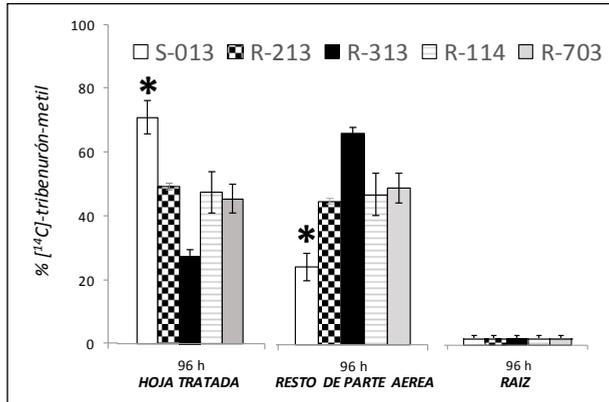


Figura 2. Porcentaje de translocación del [<sup>14</sup>C]-tribenurón-metil. Radioactividad medida en la hoja tratada, resto de la parte aérea y raíces de diferentes poblaciones de *P. rhoeas* a las 96 horas después de la aplicación. Las barras representan el error estándar de la media y \* indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre la población sensible (S-013) y el resto de poblaciones.

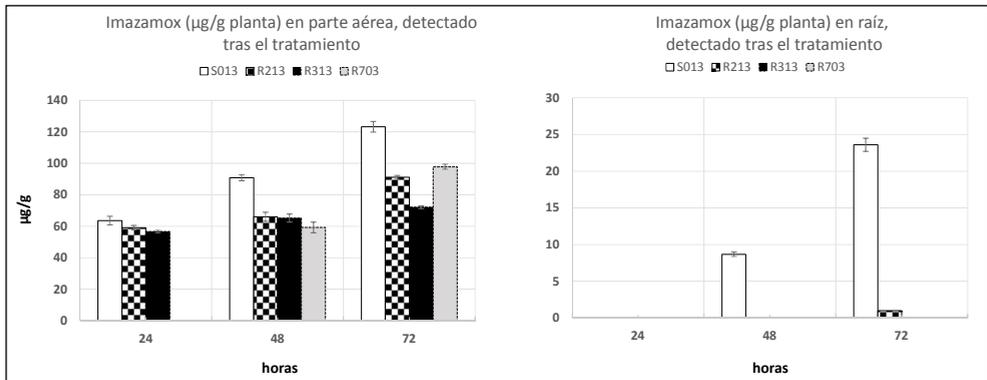


Figura 3. Cantidad de imazamox ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  planta,  $n = 3$  réplicas) detectada por cromatografía líquida DAD a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento.

#### 4. AGRADECIMIENTOS

Este estudio se ha realizado gracias a la financiación de Du Pont de Nemours (Francia). Además, los autores agradecemos la ayuda prestada por parte de J.S. Notter, Y. Romano, E. Edo y A.M. Rojano-Delgado en estos experimentos.

## 5. REFERENCIAS

- Claude JP, Gabard J, De Prado R and Taberner A (1998). An ALS-resistant population of *Papaver rhoeas* in Spain. Compte Rendu XVII Conference COLUMA, Journées Internationales sur la Lutte contre les Mauvaises Herbes, ANPP, pp. 141-147. Montpellier, France.
- Délye C, Pernin F and Scarabel L (2011). Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Science*. 180, 333-342.
- Heap I (2015). International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [http:// www.weedscience.org/in.asp](http://www.weedscience.org/in.asp). Accessed April 01, 2015.
- Kaloumenos NS, Dordas CA, Diamantidis GC and Eleftherohorinos IG (2009). Multiple Pro 197 substitutions in the acetolactate synthase of corn poppy (*Papaver rhoeas*) confer resistance to tribenuron. *Weed Science*. 57, 362-368.
- Knezevic SZ, Streibig JC and Ritz C (2007). Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology*. 21, 840-848.
- Rey-Caballero J, Menéndez J, Osuna MD, Salas M and Torra J (2017). Target-site and Non-target-site resistance mechanisms to ALS inhibiting herbicides in *Papaver rhoeas*. *Pest Biochemistry Physiology*. 138, 57-65.
- Rey-Caballero J, Menéndez J, Giné-Bordonaba J, Salas M, Alcántara R and Torra J (2016). Unravelling the resistance mechanisms to 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in corn poppy (*Papaver rhoeas*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 133, 67-72.
- Rojano-Delgado A.M, Priego-Capote F, De Prado R and Luque de Castro M.D (2014). Ultrasound-assisted extraction with LC–TOF/MS identification and LC–UV determination of imazamox and its metabolites in leaves of wheat plants. *Phytochemical Analyses*. 25 357-363.
- Taberner A, Estruch F and Sanmarti X (1992). Balance de 50 años de control de malas hierbas. Punto de vista del agricultor/aplicador. In: Proceedings of the 3rd Spanish Weed Science Congress. Spanish Weed Science Society. pp. 43-48. Lleida, Spain.
- Zabalza A, Orcaray L, Gaston S and Royuela M (2004). Carbohydrate accumulation in leaves of plants treated with the herbicide chlorsulfuron or imazethapyr is due to a decrease in sink strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 7601-6.

---

### First dicotyledonous in Spain with metabolic and target-site resistance to ALS inhibitors: *Papaver rhoeas*

**Summary:** Six different amino-acid replacements at the Pro197 have been found in three multiple resistant populations. These replacements were responsible for the high tribenuron-methyl resistance response, and some of them, especially Thr197 and Ser197, elucidated the cross-resistant pattern for imazamox and florasulam, respectively. Higher mobility of labeled tribenuron-methyl in plants with multiple resistance was, however, similar to plants with only 2,4-D resistance, indicating the presence of non-target-site resistance mechanisms (NTSR). Metabolism studies confirmed the presence of a hydroxy imazamox metabolite in one of the populations. Lack of correlation between phenotype and genotype in plants treated with florasulam or imazamox, non-mutated plants surviving imazamox, ALS inhibitors translocation patterns and the presence of enhanced metabolism revealed signs of the presence of NTSR mechanisms to ALS inhibitors in this species.

**Keywords:** imazamox, florasulam, metabolism, multiple resistance, mutation, tribenuron-methyl, translocation.