

# Metabolismo mediado por citocromo P450 en biotipos de *Papaver rhoeas* resistentes a auxinas sintéticas

Joel Torra<sup>1</sup>✉, Jordi Rey-Caballero<sup>1</sup>, Aritz Royo-Esna<sup>1</sup>, Marisa Salas<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>DuPont de Nemours, Reu Delarivière Lefoullon, La Defense Cedex, Paris 92064, Francia

✉ joel@hbj.udl.cat

**Resumen:** El objetivo de este trabajo es estudiar la presencia de metabolismo al 2,4-D con un experimento de curvas dosis-respuesta utilizando el insecticida malatión como inhibidor del citocromo P450. Se trataron tres biotipos (sensible, resistente a 2,4-D y resistente múltiple a 2,4-D e inhibidores de la ALS) a un rango de dosis de 2,4-D. La mitad de las macetas habían sido previamente tratadas con malatión. Se estimaron los porcentajes de supervivencia y reducción de peso seco en un diseño al azar con cuatro repeticiones. Los parámetros RS50 (supervivencia) y RC50 (peso seco) fueron estimados mediante un ajuste sigmoidal y comparados estadísticamente. Los resultados indican la presencia de metabolismo mediado por citocromo P450 al menos en el biotipo con resistencia solo a 2,4-D, mecanismo de resistencia que no ha sido descrito previamente.

**Palabras clave:** 2,4-D, curva dosis-respuesta, supervivencia, peso seco.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las auxinas sintéticas se comercializan desde los años cuarenta, pero se desconocen los modos de acción exactos (Grossmann, 2010). Por ello es complicado el estudio de los mecanismos de resistencia implicados, tanto en el lugar de acción como fuera del lugar de acción. La amapola (*Papaver rhoeas* L.) no es una excepción, y aunque se detectaron biotipos resistentes al 2,4-D en España ya en los noventa (Taberner et al., 1992), aún se sabe poco de los mecanismos de resistencia presentes. En un estudio previo se vio que las plantas resistentes no movilizan el herbicida, pero se necesitan más estudios para entender completamente los procesos moleculares y bioquímicos responsables (Rey-Caballero et al., 2016). En otras especies de malas hierbas con resistencia a auxinas sintéticas como *Galeopsis tetrahit* L., *Raphanus raphanistrum* L. y *Stellaria media* (L.) Vill., se ha demostrado que las plantas son capaces de metabolizar el herbicida (Coulpland et al., 1990; Goggin and Powles, 2014; Weinberg et al., 2016). Las monocotiledóneas tolerantes al 2,4-D lo metabolizan principalmente a través de una reacción de hidroxilación, mediada por la familia de enzimas del citocromo P450 (Hatzios et al., 2005), implicada en el metabolismo y degradación de diversas familias de herbicidas. Las especies de malas hierbas resistentes y los cultivos tolerantes presentan un transporte reducido probablemente como consecuencia de la capacidad de degradar las auxinas (Peterson et al., 2016).

El objetivo de este trabajo es aportar evidencias de la presencia de metabolismo al 2,4-D en *Papaver rhoeas* con un experimento de curvas dosis-respuesta utilizando el insecticida malatión como inhibidor del citocromo P450.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de dos biotipos de amapola, R-703 y R-213, previamente caracterizadas como resistentes a 2,4-D, y como resistentes a 2,4-D y tribenurón-metil, respectivamente

(Rey-Caballero et al., 2016). Estos biotipos proceden de fincas comerciales de cereal localizados en Noreste de España. Junto a estos biotipos, también se empleó un estándar sensible (HS). Las semillas de estos biotipos se colocaron en placas de Petri (1,4% agar complementado con 0,2% KNO<sub>3</sub> y 0,02% de ácido giberélico GA<sub>3</sub>) y éstas a su vez en cámaras de germinación (20/10°C y fotoperiodo 16/8 h). Catorce días más tarde las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 8x8x8 cm que contenían una mezcla de turba (55%), arena (30%) y perlita (15%) y fueron ubicadas en invernadero. Inicialmente se trasplantaron un total de cinco plántulas por maceta, y cuando las plantas alcanzaron la fenología apropiada se redujo su número a tres plantas por maceta. Cuando alcanzaron la fenología de seis-ocho hojas (5-6 centímetros) se aplicó el insecticida malatión (pro) a 2000 g i.a./ha a la mitad de las macetas. Al cabo de hora y media, se aplicó el 2,4-D a las dosis indicadas en la tabla 1.

**Tabla 1.** Ingrediente activo, producto comercial y dosis empleadas para las biotipos resistentes (R) y sensibles (S) de amapola

| Ingrediente activo | Producto             | Dosis empleadas (g i.a./ha) |                         |
|--------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 2,4-D              | Esteron 60 (60% p/v) | R                           | 2400, 600*, 150, 50 y 0 |
|                    |                      | S                           | 600, 300, 150, 50 y 0   |
| malatión           | Malathion 50% CE     | R                           | 2000                    |
|                    |                      | S                           |                         |

\* Dosis máxima registrada

Se emplearon un total de cuatro repeticiones para cada dosis. Tres semanas después de las aplicaciones se evaluó el porcentaje de supervivencia por maceta. Posteriormente, se estimó el peso seco (48 h a 65°C) de la parte aérea de las plantas de cada maceta, y finalmente se calculó el porcentaje de reducción de peso seco respecto al testigo no tratado. La dosis de herbicida que causa el 50% de la supervivencia (RS50) y el 50% reducción del peso seco (RC50) se calculó gracias a la curva Log-logistic de cuatro parámetros (1).

$$y = c + \frac{(d - c)}{1 + \text{EXP} [b(\log(x) - \log(RC50))]} \quad (1)$$

donde  $c$  era el límite inferior (fijado en cero),  $d$  era el límite superior (fijado en 100) y  $b$  la pendiente alrededor de RC50 o de RS50. La dosis de herbicida (g i.a./ha) era la variable independiente ( $x$ ) y el peso seco (% de reducción respecto al control no tratado) o el % de supervivencia las variables dependientes ( $y$ ). A partir de la RC50 se calcularon los factores de resistencia (FR) para cada uno de los biotipos y tratamientos. Los parámetros estimados RC50 y SC50 fueron comparados estadísticamente entre los biotipos sensible y resistentes, y entre los tratamientos con o sin previa aplicación de malatión, mediante el método Delta ( $P < 0.05$ ) que se basa en los intervalos de confianza.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El biotipo más resistente obtuvo un FR (para reducción del peso seco) de 13 (R-213) mientras que el otro biotipo (R-703) alcanzó un FR de 5 (Tabla 2).

**Tabla 2.** RS50, RC50, pendientes (y errores típicos), y factor de resistencia (FR\*) para tres biotipos de amapola, una sensible (HS) y dos resistentes (R-703 y R-213), tratadas previamente o no con malatión y después a diferentes dosis de 2,4-D. R-703: resistente a 2,4-D; R-213: resistente a 2,4-D y tribenurón-metil

| Biotipo | Tratamiento | % Supervivencia     |           | % reducción Peso seco* |           | FR** |
|---------|-------------|---------------------|-----------|------------------------|-----------|------|
|         |             | RS50<br>(g i.a./ha) | Pendiente | RC50<br>(g i.a./ha)    | Pendiente |      |
| HS      | - malatión  | 219 ± 21            | 4.9 ± 1.3 | 86 ± 23                | 1.4 ± 0.5 | 1    |
|         | + malatión  | 179 ± 39            | 3.1 ± 0.4 | 91 ± 19                | 1.2 ± 0.4 | 0.9  |
| R-703   | - malatión  | 568 ± 156           | 1.6 ± 0.5 | 415 ± 200              | 1.6 ± 1.1 | 5    |
|         | + malatión  | 182 ± 190           | 5.6 ± 30  | 140 ± 62               | 1.4 ± 0.7 | 2    |
| R-213   | - malatión  | 848 ± 53            | 7.8 ± 1.4 | 1102 ± 228             | 2.9 ± 0.9 | 13   |
|         | + malatión  | 190 ± 39            | 4.4 ± 7.8 | 721 ± 176              | 1.6 ± 0.5 | 8    |

\* Calculado respecto al testigo no tratado.

\*\*FR: factor de resistencia, RC50 resistente / RC50 sensible.

En todos estos biotipos la dosis de 2,4-D que causó en 100% de mortalidad fue 2400 g i.a./ha (Fig. 1). Los FR moderados están en el rango de los calculados para estas mismas biotipos en trabajos anteriores (Rey-Caballero et al., 2016), aunque fueron más bajos en el presente estudio, debido probablemente a un menor tamaño general de las plantas en el momento de realizar los tratamientos herbicidas.

Cuando se realizó una aplicación previa de malatión, los factores de resistencia estimados disminuyeron en los dos biotipos, R-213 y R-703, a 8 y 2, respectivamente. Para el biotipo sensible, se obtuvieron resultados parecidos con la aplicación previa o no del malatión, tanto para la supervivencia como para la reducción del peso seco respecto al testigo no tratado (diferencias no significativas), confirmando que este tratamiento no tiene ningún efecto nocivo sobre la amapola (Fig. 1).

Cuando se compararon estadísticamente RS50 y RC50 entre plantas tratadas o no previamente con malatión para los dos biotipos resistentes, las diferencias fueron significativas solo para el biotipo con resistencia únicamente al 2,4-D, tanto para el porcentaje de supervivencia como de reducción del peso seco (datos no mostrados). Al menos en este biotipo, el metabolismo mediado por citocromo P450 está implicado como mecanismo de resistencia. La figura 2 muestra el aspecto visual de los dos biotipos cuando fueron tratados a dosis de registro (600 g i.a./ha) y previamente con malatión o no. La mortalidad aumentó en el biotipo R-703 y no en el biotipo con resistencia múltiple (aunque presentó una clara reducción de tamaño). Esto pudo ser debido a que el metabolismo por citocromo P450 fuera más elevado en el biotipo R-703 que en el R-213. Además, en el momento de la aplicación la fenología de este biotipo era más retrasada, debido a

una germinación en cámara más lenta. Al recibir una cantidad relativa de malatión más elevada respecto al tamaño de las plantas en comparación con la biotipo R-213, se consiguió una mayor inhibición del citocromo P450.

La comparación visual de las pendientes de las curvas dosis-respuesta solo permite apuntar alguna hipótesis para la población solo resistente a 2,4-D (R-703). Para los datos de supervivencia, las pendientes de las curvas de la población sensible y la población R-703 con aplicación previa de malatión parecen iguales, pero diferentes sin la aplicación previa de malatión en la población resistente (Fig. 1). Esto indicaría la presencia de un mecanismo de resistencia diferente cuando se inhibe o no con el insecticida el metabolismo por citocromo P450. Además, este mecanismo sería predominante sobre la no translocación del herbicida, ya que parece necesario para poder obtener un fenotipo resistente. Sin embargo, esto no se observa para los datos de reducción de peso seco de esta población, ni tampoco para la población con resistencia múltiple (R-213).

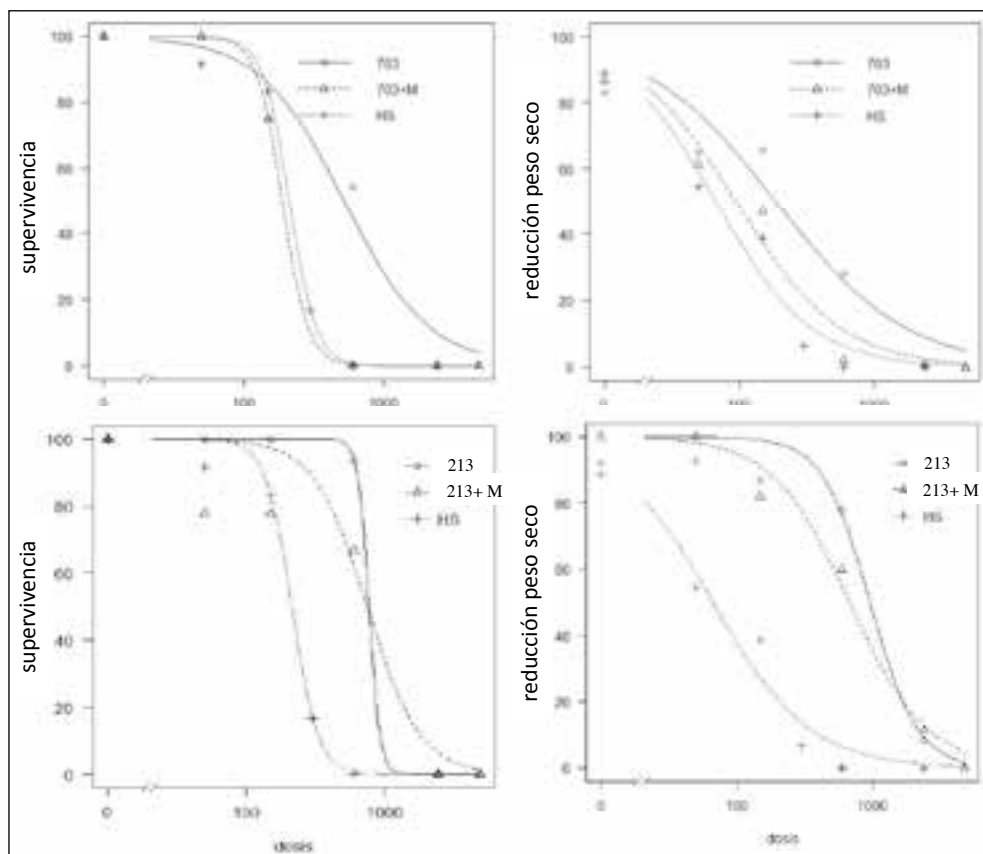


Figura 1. Curvas dosis-respuesta ajustadas para tres biotipos de amapola, una sensible (HS) y dos resistentes (R-703 y R-213), tratadas previamente o no con malatión y después a diferentes dosis de 2,4-D. R-703: resistente a 2,4-D (gráficas superiores); R-213: resistente a 2,4-D y tribenurón-metil (gráficas inferiores). A la izquierda, % de supervivencia; a la derecha, % de reducción del peso seco respecto al control no tratado.

Las evidencias de metabolismo por citocromo P450 encontradas en este trabajo concuerdan con trabajos previos para otras malas hierbas con resistencia a auxinas sintéticas. En otras especies se ha demostrado que son capaces de metabolizar el herbicida (Coupland et al., 1990; Goggin and Powles, 2014; Weinberg et al., 2016). Por ejemplo, en el caso de *S. media* también se apunta también al citocromo P450 en la degradación de este grupo de herbicidas (Yuan et al., 2007).



Figura 2. Plantas tratadas con 2,4-D (600 g i.a./ha) sin previa aplicación de malatión (izquierda) y con previa aplicación de malatión (derecha) para tres biotipos de amapola. 1a: biotipo sensible (HS); 1b: biotipo resistente a 2,4-D (R-703); 1c: biotipo resistente a 2,4-D y tribenurón-metil (R-213).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten apuntar la presencia de metabolismo de 2,4-D mediado por citocromo P450 como mecanismo de resistencia, al menos en uno de los biotipos estudiados. Futuros estudios deberían identificar cuáles son los principales metabolitos y establecer la relación entre este mecanismo y el transporte reducido de herbicida observado en las mismas biotipos en trabajos previos (Rey-Caballero et al., 2016).

#### 4. AGRADECIMIENTOS

Este estudio se ha realizado gracias a la financiación de Du Pont de Nemours (Francia). Además, se agradece la ayuda prestada por parte de María Tricas, Berta Singla, Maria Casamitjana y Jordi Recasens en estos experimentos.

#### 5. REFERENCIAS

- Coupland D, Lutman PJW and Heath C (1990). Uptake, translocation, and metabolism of mecoprop in a sensitive and a resistant biotype of *Stellaria media*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 36, 61-67.
- Goggin DE & Powles SB (2014). Detoxification of 2,4-D in resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Proceedings of the Weed Science Society of America Meetings*. Weed Science Society of America, p. 161. Lawrence, KS, EUA.
- Grossmann K (2010). Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, 66, 113-120.
- Hatzios K, Hock B and Elstner E (2005). Metabolism and elimination of toxicants. Páginas 469-518 in *Plant Toxicology*. 4th edn. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Peterson MA, McMaster SA, Riechers DE, Skelton J and Stahlman PW (2016). 2,4-D Past, Present, and Future: A Review. *Weed Technology*, 30, 303-345.
- Rey-Caballero J, Menendez J, Gine-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.

- Taberner A, Estruch F and Sanmarti X (1992). Balance de 50 años de control de malas hierbas. Punto de vista del agricultor/aplicador. *Proceedings of the 3rd Spanish Weed Science Congress*. Spanish Weed Science Society, pp. 43-48. Lleida, Spain.
- Weinberg T, Stephenson GR, McLean MD and Hall JC (2006). MCPA (4-chloro-2-ethylphenoxyacetate) resistance in hemp-nettle (*Galeopsis tetrahit* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9126-9134.
- Yuan JS, Tranel PJ, Stewart CN (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Science*, 12, 6-13.

---

### Metabolism by Cytochrome P450 in *Papaver rhoeas* populations resistant to synthetic auxins

**Summary:** The objective of the present study is to study the presence of 2,4-D metabolism with a dose-response experiment using the insecticide malathion as a cytochrome P450 inhibitor. Three populations were treated (susceptible, 2,4-D resistant and multiple resistant to 2,4-D and ALS inhibitors) with a range of 2,4-D doses. Half of the pots had been previously treated with malathion. Survival and dry weight were estimated in completely randomized block design with four repetitions. A four parameters log-logistic curve was fitted and the ED50 and GR50 were estimated and statistically compared. Results indicated the presence of enhanced metabolism by means of cytochrome P450, at least in the only 2,4-D resistant population. Therefore, in this population, the enhanced metabolism by cytochrome P450 is a resistance mechanism not previously described.

**Keywords:** 2,4-D, dose-response curve, survival, dry weight.