

ESTUDIO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA “NON-TARGET-SITE” EN BIOTIPOS DE *PAPAVER RHOEAS* L. CON RESISTENCIA MÚLTIPLE

Rey-Caballero J.^{1*}, Menéndez J.², Salas M.³, Torra J.¹

¹Malherbología y Ecología Vegetal, Dpto. HBJ, Agrotecnio, Universitat de Lleida, Avda. Rovira Roure 191, 25198 Lleida, España.

²Dpto. 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.

³DuPont de Nemours France SAS, 24 rue de Moulin, 68740 Nambenheim, France.

* jordi.rey@hbj.udl.cat

Resumen: Hasta el momento en España no se han desarrollado estudios a fin de evaluar los mecanismos de resistencia “Non-Target-Site” en *Papaver rhoeas*. Tras constatar la resistencia múltiple de los biotipos empleados en este ensayo, los resultados de absorción y translocación obtenidos para 2,4-D y tribenuron-metil parecen arrojar conclusiones interesantes. Sobre todo, en el caso de la auxina sintética, donde una destacada menor translocación detectada en biotipos resistentes respecto a los sensibles está en sintonía con las más recientes teorías de mecanismos de resistencia a herbicidas hormonales.

Palabras clave: Amapola, 2,4-D, tribenuron-metil, absorción y translocación.

Summary: *Non-Target-Site resistance mechanisms of Papaver rhoeas L. biotypes with multiple resistance.* So far in Spain studies to evaluate the mechanisms of resistance “Non-Target-Site” on *Papaver rhoeas* have not been done. After finding multiple resistance in the biotypes used in this trial, absorption and translocation results obtained for 2,4-D and tribenuron-methyl seem to throw interesting findings. Mainly in the case of the synthetic auxin, where a lack of translocation was detected in resistant biotypes compared to the sensitive one. This could be related with the latest theories of mechanisms of resistance to synthetic auxin.

Keywords: Corn poppy, 2,4-D, tribenuron-methyl, absorption and translocation.

INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del monocultivo de cereal y de una sistemática aplicación de herbicidas para el control de amapola (*Papaver rhoeas*), se han terminado seleccionando 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, Grecia, Bélgica y Polonia, mientras que poblaciones de *P. rhoeas* con resistencia múltiple (2,4-D y tribenuron-metil) también han sido detectadas en Italia (Heap, 2015). La resistencia de esta mala hierba a tribenuron-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 (Arg₁₉₇, His₁₉₇, Leu₁₉₇, Ser₁₉₇ y Thr₁₉₇) otorgan una resistencia fuerte a las sulfonilureas y resistencias intermedias a imidazolinonas y triazolopirimidinas (Délye et al., 2011). Por el contrario, hasta el momento, no están del todo claros los mecanismos que confieren resistencia al 2,4-D en esta especie.

En el presente trabajo (1) se caracteriza la resistencia a tribenuron-metil y 2,4-D de algunos biotipos de *P. rhoeas* donde se sospecha dicha resistencia, así como (2) se estudian los mecanismos de resistencia "Non-Target-Site" (NTS) de absorción y translocación a tribenuron-metil y 2,4-D en estos mismos biotipos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron las semillas de tres poblaciones de amapola (F-0213, B-0313 y S-0114) 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 fincas comerciales de cereal localizados en Noreste de España. Junto a estos biotipos, también se empleó un estándar sensible de Herbiseed (HR-S13). Las semillas de estos biotipos se colocaron en placas Petri (1.4% agar complementado con 0.2% KNO₃ y 0.02% GA₃) 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 7x7x7 cm que contenían una mezcla de turba (40%), arena (30%) y perlita

(30%). Dichas macetas se colocaron en un invernadero en Lleida (41° 37'N, 0° 38'O) y se regaron periódicamente.

Caracterización de la resistencia

Inicialmente se trasplantaron cinco plántulas en cada una de las macetas y posteriormente se redujo a un total de tres plantas por maceta. Cuando alcanzaron la fenología de seis-ocho hojas (5-6 centímetros) se aplicaron con tribenuron-metil y 2,4-D. En los biotipos donde se sospechaba la resistencia el tribenuron-metil (Granstar 50 SX, DuPont, 50%) se aplicó a: 1200, 600, 150, 75, 37.5, 18.7, 9.3, 4.6 y 0 g i.a.·ha⁻¹ y el 2,4-D (Esteron 60, Dow AgroSciences, 60%) a: 4800, 1200, 600, 300, 150, 75 y 0 g i.a.·ha⁻¹. En el estándar sensible sin embargo, el Granstar 50 SX se aplicó a: 18.7, 9.3, 4.6, 2.3, 1.1, 0.5, 0.25 y 0 g i.a.·ha⁻¹ y el Esteron 60 a: 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.7, 9.3 y 0 g i.a.·ha⁻¹. Se emplearon un total de cuatro repeticiones para cada una de las dosis. Cuatro semanas después de la aplicación se evaluó el peso fresco y seco (48 h a 65°C) de cada una de las macetas. 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 (RD₅₀) se calculó gracias a la curva Log-logistic de cuatro parámetros. A partir de la RD₅₀ se calcularon los factores de resistencia (FR) para cada uno de los biotipos y productos.

Absorción y translocación

Para los experimentos de absorción-translocación se empleó 2,4-D y tribenuron-metil marcados con ¹⁴C. Cada uno de estos productos se mezcló con su correspondiente homólogo comercial a la dosis de registro. Se desarrollaron dos experimentos independientes (uno para cada producto). Cada una de las repeticiones recibió cuatro gotas (2µL) de la mezcla de herbicida marcado y herbicida comercial a la dosis de registro (18.7 y 600 g i.a.·ha⁻¹ para el tribenuron-metil y 2,4-D respectivamente). En caso del 2,4-D cada una de las muestra recibió una radioactividad de 500 Bq mientras que en el tribenuron-metil cada planta recibió 166,5 Bq. La absorción y translocación de estos productos fue evaluada 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). Posteriormente se calculó el porcentaje de radioactividad absorbida respecto al total de radioactividad aplicada y la partición de la radiactividad translocada en: hoja tratada (HT), resto de la parte aérea de la planta (PA) y en la raíz (R). Para cada tiempo y producto los datos se sometieron a un análisis de

varianza (ANOVA) y las medias de cada uno de los biotipos empleados se separaron empleando el test de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres biotipos de *P. rhoeas* ensayados resultaron ser resistentes a tribenuron-metil y 2,4-D. Los FR para tribenuron-metil fueron de 778, 393 y 320 (biotipos B-0313, S-0313 y F-0213, respectivamente) (Tabla 1). Algunas de las plantas empleadas en este ensayo toleraron 64 veces la dosis de tribenuron-metil empleada en campo. Los FR obtenidos por Kaloumenos et al. (2009) en amapola resistente a tribenuron-metil oscilaron entre 137 y 2400. La población más resistente a 2,4-D obtuvo un FR de 18 (B-0313) mientras que los otros dos biotipos (S-0313 y F-0213) alcanzaron FR de 13 y 12 (Tabla 1). En todos estos biotipos la dosis de 2,4-D que causó en 100% de mortalidad fue 4800 g i.a.ha⁻¹.

Tabla 1. Factores de resistencia para tribenuron-metil y 2,4-D de los biotipos de *P. rhoeas* F-0213, B-0313 y S-0114.

Biotipo	Factor de resistencia ($RD_{50}R / RD_{50}HR-S13$)	
	Tribenuron-metil	2,4-D
F-0213	320	12
B-0313	778	18
S-0114	393	13

No se detectaron diferencias significativas en la absorción del tribenuron-metil marcado entre las plantas R y S. Los valores de penetración de este producto fueron inferiores a los detectados para el 2,4-D, alcanzándose valores que oscilaron entre el 21 y el 40%. La translocación de este producto hasta las raíces fue mínima en todos los biotipos ensayados. Las diferencias en la translocación, únicamente se detectaron 96 horas después de la aplicación en la parte aérea. Los biotipos resistentes translocaron más tribenuron-metil a la parte aérea respecto al biotipo sensible (Tabla 2). En los ensayos con 2,4-D marcado tampoco se detectaron diferencias en el patrón de absorción entre plantas R y S. Toda la absorción parece producirse en las 12 primeras horas después de la aplicación, ya que los valores establecidos entre el primer y el último tiempo de valoración (12 y 96 h.) son muy parecidos (oscilando del 62 al 78%). Las diferencias en este producto aparecieron cuando se estudió la translocación. El biotipo sensible translocó mucho más [¹⁴C]-2,4-D a la parte aérea y raíces. A las 12, 24, 48 y 96 h. los biotipos resistentes en promedio

translocaron un 76, 72, 80 y 85% menos de 2,4-D marcado a la parte aérea que el biotipo sensible (Tabla 3). Otros trabajos parecidos también detectaron resultados de la misma naturaleza en *Lactuca serriola* L. para el 2,4-D (Riar et al., 2011).

Tabla 2. Absorción (% radioactividad recuperada) y translocación (% de la radioactividad absorbida) del ¹⁴C-tribenuron-metil en los biotipos de *P. rhoeas* HR-S13, F-0213, B-0313 y S-0114.

Biotipo	12 h	24 h	48 h	96 h
Absorción				
<i>HR-S13</i>	34.1 ± 5.7 [†] ab	36.1 ± 3.7 ab	36.12 ± 5.7 a	30.59 ± 6.7 a
<i>F-0213</i>	43.7 ± 6.2 a	25.3 ± 3.5 b	29.47 ± 3.6 a	32.77 ± 5.6 a
<i>B-0313</i>	24.3 ± 3.1 ab	31.0 ± 3.1 ab	28.34 ± 3.4 a	31.31 ± 3.6 a
<i>S-0114</i>	21.4 ± 3.0 b	40.0 ± 1.2 a	32.37 ± 4.4 a	32.77 ± 5.3 a
Radioactividad medida en hoja tratada (HT)				
<i>HR-S13</i>	83.3 ± 2.5 a	69.8 ± 7.1 a	72.2 ± 6.6 a	70.9 ± 5.2 a
<i>F-0213</i>	80.7 ± 7.9 a	71.7 ± 6.7 a	54.0 ± 3.2 a	49.3 ± 1.1 b
<i>B-0313</i>	64.5 ± 7.9 a	68.6 ± 10.1 a	60.1 ± 3.5 a	27.6 ± 1.9 c
<i>S-0114</i>	78.1 ± 2.5 a	65.7 ± 1.1 a	56.4 ± 1.8 a	47.4 ± 6.5 b
Radioactividad medida en el resto de la parte aérea (PA)				
<i>HR-S13</i>	13.6 ± 2.5 a	28.9 ± 7.8 a	25.2 ± 6.4 a	25.6 ± 4.4 c
<i>F-0213</i>	16.1 ± 1.5 a	24.8 ± 6.3 a	42.7 ± 3.2 a	46.8 ± 0.9 b
<i>B-0313</i>	31.2 ± 7.2 a	28.6 ± 10.2 a	36.1 ± 3.9 a	68.9 ± 2.1 a
<i>S-0114</i>	17.4 ± 3.4 a	30.4 ± 1.3 a	40.1 ± 2.3 a	49.1 ± 6.8 b
Radioactividad medida en raíz (R)				
<i>HR-S13</i>	3.1 ± 0.4 a	2.44 ± 0.5 a	2.4 ± 0.3 a	3,4 ± 0.7 a
<i>F-0213</i>	3.2 ± 0.4 a	3.37 ± 0.6 a	3.2 ± 0.2 a	3,7 ± 0.3 a
<i>B-0313</i>	4.2 ± 0.8 a	2.71 ± 0.2 a	3.8 ± 0.4 a	3,4 ± 0.4 a
<i>S-0114</i>	4.3 ± 1.2 a	3.82 ± 0.6 a	3.4 ± 0.5 a	3,4 ± 0.7 a

[†] Error estándar de la media.

[†] Letras diferentes establecen diferencias significativas entre biotipos en la el porcentaje de radioactividad absorbida y translocada para cada uno de los tiempos evaluados mediante el Test de Tukey (P < 0.05).

Tabla 3. Absorción (% radioactividad recuperada) y translocación (% de la radioactividad absorbida) del ¹⁴C-2,4-D en los biotipos de *P. rhoeas* HR-S13, F-0213, B-0313 y S-0114.

Biotipo	12 h	24 h	48 h	96 h
Absorción				
<i>HR-S13</i>	70.9 ± 3.3 [†] a	78.1 ± 5.7 a	62.7 ± 5.6	65.8 ± 5.5 a
<i>F-0213</i>	65.8 ± 9.1 a	78.2 ± 8.7 a	70.5 ± 7.4	76.9 ± 7.8 a
<i>B-0313</i>	68.4 ± 3.3 a	67.1 ± 2.9 a	76.5 ± 5.7	62.5 ± 5.6 a
<i>S-0114</i>	75.7 ± 6.1 a	77.4 ± 6.1 a	75.2 ± 4.6	78.2 ± 4.5 a
Radioactividad medida en hoja tratada (HT)				
<i>HR-S13</i>	93.7 ± 1.2 a	83.6 ± 3.1 a	78.3 ± 3.8 a	70.1 ± 6.5 a
<i>F-0213</i>	99.1 ± 0.1 b	96.2 ± 1.5 ab	98.2 ± 0.4 b	97.4 ± 0.2 b
<i>B-0313</i>	98.9 ± 0.2 b	98.4 ± 0.5 b	95.6 ± 1.7 b	95.4 ± 1.2 b
<i>S-0114</i>	97.7 ± 0.5 b	88.2 ± 6.1 ab	94.3 ± 1.2 b	93.4 ± 1.6 b
Radioactividad medida en el resto de la parte aérea (PA)				
<i>HR-S13</i>	4.2 ± 0.9 a	12.7 ± 2.5 a	15.1 ± 3.3 a	22.2 ± 6.1 a
<i>F-0213</i>	0.3 ± 0.04 b	2.6 ± 1.2 b	0.5 ± 0.1 b	1.1 ± 0.2 b
<i>B-0313</i>	0.7 ± 0.2 b	1.1 ± 0.5 b	3.8 ± 1.6 b	3.1 ± 1.1 b
<i>S-0114</i>	1.9 ± 0.5 ab	6.3 ± 2.7 ab	4.5 ± 1.3 b	6.1 ± 1.5 b
Radioactividad medida en raíz (R)				
<i>HR-S13</i>	1.9 ± 0.4 a	3.6 ± 0.5 a	6.5 ± 0.5 a	7.7 ± 1.1 a
<i>F-0213</i>	0.5 ± 0.1 b	1.1 ± 0.3 a	1.1 ± 0.3 b	1.4 ± 0.1 b
<i>B-0313</i>	0.2 ± 0.01 b	0.3 ± 0.06 a	0.5 ± 0.1 b	1.4 ± 0.2 b
<i>S-0114</i>	0.3 ± 0.06 b	5.4 ± 3.7 a	1.1 ± 0.4 b	0.4 ± 0.1 c

[†] Error estándar de la media.

[†] Letras diferentes establecen diferencias significativas entre biotipos en la el porcentaje de radioactividad absorbida y translocada para cada uno de los tiempos evaluados mediante el Test de Tukey (P < 0.05).

CONCLUSIONES

Se han observado diferencias significativas en la translocación de ambos productos entre biotipos resistentes y sensibles. El hecho de que el biotipo HR-S13 transloque menos tribenuron-metil que el resto de poblaciones puede ser debido al propio efecto fitotóxico de este producto. Por el contrario, la menor translocación de 2,4-D observada en biotipos resistentes respecto a los sensibles es una evidencia indirecta de la presencia de un mecanismo de resistencia de estas plantas al herbicida hormonal.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se ha realizado gracias a la financiación y colaboración de la empresa Du Pont de Nemours S.A.S y dentro del programa de becas predoctorales AGAUR (Generalitat de Cataluña). Además agradezco la

ayuda prestada por parte de Eva Edo, Laia Mateu y Daniel Camacho en la propagación y preparación del material vegetal empleado en estos experimentos.

BIBLIOGRAFÍA

CLAUDE JP, GABARD J, DE PRADO R & 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 & 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>. Accessed April 01, 2015.

KALOUMENOS NS, DORDAS CA, DIAMANTIDIS GC & 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.

RIAR DS, BURKE IC, YENISH JP, BELL J & GILL K (2011) Inheritance and physiological basis for 2,4-D resistance in prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 9417-9423.

TABERNER A, ESTRUCH F & 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.