

# Genotipado del gen *HIS1* en variedades de arroz salvaje de Extremadura

## Genotyping of the *HIS1* gene in wild rice varieties from Extremadura

Blanca García-García, María García-Muñoz, Angel Minor, María Vázquez-Sandez & Maria Dolores Osuna\*

Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Guadajira (Badajoz), España

(\*E-mail: mariadolores.osuna@juntaex.es)

<https://doi.org/10.19084/rca.34992>

Recibido/received: 2024.01.15

Aceptado/accepted: 2024.02.28

### RESUMEN

Benzobicyclón es un herbicida perteneciente al grupo de inhibidores de la enzima HPPD (grupo 27), un modo de acción nuevo dentro de los utilizados en la actualidad para el cultivo del arroz en la Unión Europea. El gen HPPD Inhibitor Sensitive 1 (*HIS1*) es responsable de la tolerancia en el arroz. La sensibilidad a benzobicyclón en ciertos cultivares de arroz viene principalmente dada por diferentes mutaciones que pueden ocasionar pérdida de función de este gen (alelo *his1*). El arroz salvaje es una mala hierba problemática en el cultivo del arroz, cuyo control en la actualidad depende en gran medida del uso de variedades de arroz resistentes a herbicidas. Estudios previos realizados en zonas arroceras de EE.UU. han mostrado que el benzobicyclón tiene cierto potencial para ser una pieza complementaria del programa de control de arroz salvaje, dependiendo su efectividad en gran medida de la frecuencia de alelos *HIS1/his1* de la accesión. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta a benzobicyclón en diferentes accesiones de arroz salvaje en Extremadura, genotipando el gen *HIS1*, para detectar la presencia de diferentes cambios en dicho gen relacionados con la sensibilidad al herbicida (presencia de alelo *his1*). De las 30 accesiones evaluadas, 1 de ellas mostro la mutación T1510G, 4 presentaron el genotipo denominado como *his1/his1* y 2 el genotipo denominado *HIS1/his1*. Por lo tanto, en general, no se debe esperar que benzobicyclón proporcione un control aceptable del arroz salvaje, pero basándonos en nuestros resultados, benzobicyclón puede proporcionar cierto grado de supresión en plantas, proporcionando un control complementario a los utilizados en la actualidad. Estudios adicionales necesitan ser realizados, incluyendo un mayor número de accesiones.

**Palabras clave:** benzobicyclón, arroz salvaje, gen *HIS1*

### ABSTRACT

Benzobicyclon is an herbicide belonging to the group of HPPD enzyme inhibitors (group 27), a new mode of action among those currently used for rice cultivation in the EU. The HPPD Inhibitor Sensitive 1 (*HIS1*) gene is responsible for tolerance in rice. Sensitivity to benzobicyclon in certain rice cultivars is mainly due to different mutations that can cause loss of function of this gene (*his1* allele). Wild rice is a problematic weed in rice cultivation, the control of which currently depends largely on the use of herbicide-resistant rice varieties. Previous studies in U.S. rice growing areas have shown that benzobicyclon has some potential to be a complementary piece of the wild rice control program, with its effectiveness depending largely on the frequency of *HIS1/his1* alleles in the accession. The objective of this study was to evaluate the response to benzobicyclon in different wild rice accessions in Extremadura, genotyping the *HIS1* gene to detect the presence of different changes in this gene related to herbicide sensitivity (presence of *his1* allele). Of the 30 accessions evaluated, 1 of them showed the T1510G mutation, 4 showed the *his1/his1* genotype and 2 the *HIS1/his1* genotype. Therefore, in general, benzobicyclon should not be expected to provide acceptable control of wild rice, but based on our results, benzobicyclon may provide some degree of suppression in plants, providing complementary control to those currently used. Further studies need to be conducted, including a larger number of accessions.

**Keywords:** benzobicyclon, wild rice, *HIS1* gene

## INTRODUCCIÓN

Las malas hierbas son el principal problema fitosanitario del cultivo del arroz, causando pérdidas cercanas al 30% de la producción (Calha *et al.*, 2023). El control se hace principalmente mediante el uso de herbicidas. En la actualidad, la mayoría de los herbicidas autorizados para el cultivo del arroz pertenecen a dos modos de acción: inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y de la acetil coenzimaA-carboxilasa (ACCase). El uso de herbicidas con el mismo modo de acción junto con la falta de uso de otras herramientas de control, han producido un incremento en la aparición de poblaciones de malas hierbas resistentes.

Hay confirmados varios casos de malas hierbas resistentes a herbicidas en las diferentes zonas arroceras españolas en las principales malas hierbas de arroz: *Echinochloa* spp., *Leptochloa* spp., *Cyperus difformis* y *Alisma plantago-aquatica* (Gómez de Barreda *et al.*, 2022) a herbicidas inhibidores de la ALS y de la ACCase. Como resultado de esta resistencia, así como de una disminución significativa en el número de nuevos herbicidas y una regulación cada vez más estricta del uso de herbicidas, especialmente en Europa es necesaria la implementación de una gestión integrada de las malas hierbas, donde se minimice el número de tratamientos herbicidas y se maximice su eficacia, integrando alternativas de control no químico.

Benzobicyclon es un herbicida con un nuevo modo de acción herbicida en el cultivo del arroz. Perteneció al grupo de inhibidores de la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) (grupo 27) que actúa sobre una amplia gama de malas hierbas en arrozales. La tolerancia del arroz a dicho herbicida puede variar en función de la genética de cada cultivar. El gen HPPD Inhibitor Sensitive 1 (*HIS1*) es el responsable de la tolerancia en el arroz, que se confiere a través de la hidroxilación del hidrolizado de benzobicyclon (herbicida activo) en un compuesto menos fitotóxico que no es benzobicyclon (pro-herbicida) (Maeda *et al.*, 2019). La sensibilidad en ciertos cultivares es el resultado de una delección de 28-bp que da lugar a una proteína truncada (Maeda *et al.*, 2019) o de una mutación sin sentido (T1510G) que codifica para una glicina en lugar de una valina en el aminoácido 286 (Val-286-Gly) (Lv *et al.*,

2021). En lo sucesivo, un alelo *HIS1* con cualquiera de las mutaciones se denominará *his1*.

El arroz salvaje es una de las malas hierbas más problemáticas del cultivo del arroz. Los productores actualmente dependen en gran medida de la tecnología de arroz resistente a herbicidas para su control (por ejemplo, Clearfield® y Provisia®) (Peñas *et al.*, 2022). El herbicida benzobicyclon ha demostrado cierto potencial para ser una pieza complementaria para el programa de control de arroz salvaje, tanto en arroz convencional como en arroz resistente a herbicidas (Patterson *et al.*, 2022). El éxito de benzobicyclon para controlar el arroz salvaje en un campo concreto dependerá en gran medida de la frecuencia de alelos *HIS1/his1* de la accesión (Brabham *et al.*, 2022).

El objetivo principal de este trabajo ha sido el genotipado del gen *HIS1*, para detectar la presencia de diferentes cambios en dicho gen relacionados con la sensibilidad al herbicida (presencia de alelo *his1*) en diferentes accesiones de arroz salvaje recogidas en diferentes zonas arroceras de Extremadura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para este estudio se analizaron 30 accesiones de arroz salvaje procedentes de distintos campos de cultivo de Extremadura y recolectada en diferentes años (Tabla 1).

**Tabla 1 -** Accesiones\* de arroz salvaje de Extremadura incluidas en el estudio

Año	ID
2008	-03, -05, -07, -10, -11, -12, -14, -15, -16, -20, -24, -27, -33, -36, -37, -38, -41, -42,
2013	-08
2016	-02
2017	-01, -02
2019	-02, -04, -05, -06
2020	-01, -03, -04
2021	-01

(\* en adelante la identificación de las distintas accesiones se codificarán como: AS+2 últimas cifras del año+ID



## Genotipado *HIS1/his1* (región TGATGC)

Como se mencionó en la metodología, se amplificó la región donde diferentes cambios nucleotídicos se corresponderían a genotipos *HIS1/HIS1* (TGATGC), *HIS1/his1* (T/CGATGC/T) e *his1/his1* (CGATGT). De las 30 accesiones incluidas en este estudio, 4 presentaron el genotipo *his1/his1*, 2 el genotipo *HIS1/his* y los 24 restantes el genotipo *HIS1/HIS1* (Figuras 1A y 1B).

## Mutación puntual (T1510G)

De las 30 accesiones analizadas, solo una muestra (AS-1902) ha presentado la mutación T1510G descrita en Lv *et al.* (2021) como responsable de la tolerancia a benzobiciclón (Figura 2). Esta muestra también presenta un genotipo *HIS1/his*, como se describió en el apartado anterior.

nuestro laboratorio han mostrado que la presencia del genotipo *his1/his1* o *HIS1/his1* está relacionado con un blanqueamiento inicial de la planta tratada, que desaparece con el tiempo, y la sensibilidad viene dada cuando aparece asociado a alguna de las otras dos mutaciones (Osuna, comunicación personal).

De las 30 accesiones incluidas en este estudio, solo una de ellas presenta la mutación T1510G, y seis de ellas han sido genotipadas como *his1/his1* o *HIS1/his1*. Se está ampliando este estudio con la inclusión de más accesiones, pero como conclusión preliminar se podría decir que el benzobiciclón puede proporcionar cierto grado de supresión en plantas, proporcionando un control complementario a los utilizados en la actualidad.

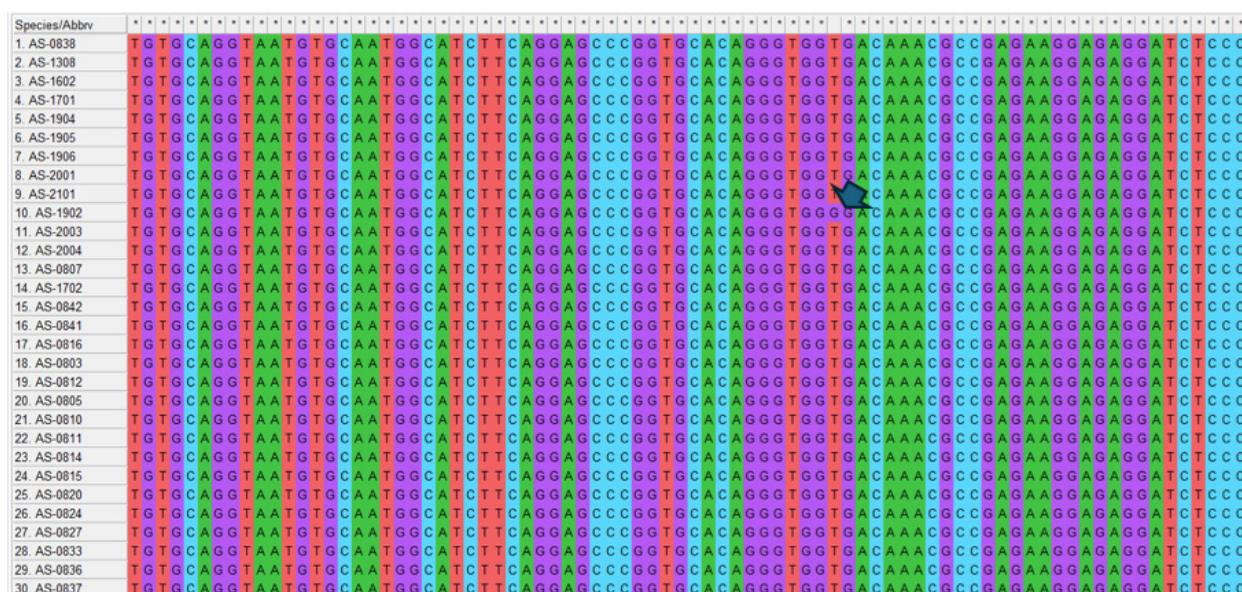


Figura 2 - Alinamiento de secuencias de diferentes accesiones de arroz salvaje (región T1510G).

## CONCLUSIONES

Tanto la mutación T1510G como la delección de 28 pb están relacionados directamente con la sensibilidad al herbicida benzobiciclón en los cultivos de arroz que la presentan (Lv *et al.*, 2021). El genotipado en base a lo publicado por Brabham *et al.* (2020) puede dar ciertos errores en la correcta identificación de los accesiones sensibles-tolerantes a benzobiciclón. Experimentos realizados en

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto MIPLEX, cofinanciado por el Programa Operativo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de Extremadura. Agradecemos a la empresa GOWAN Crop Protection por la colaboración en este estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brabham, C.; Norsworthy, J.K. & González-Torralva, F. (2020) - Presence of the *HPPD inhibitor sensitive 1* gene and ALS<sup>S653N</sup> mutation in weedy *Oryza sativa* sensitive to benzobicyclon. *Plants*, vol. 9, n. 11, art. 1576. <https://doi.org/10.3390/plants9111576>
- Brabham, C.; Norsworthy, J.K.; Sha, X.; Varanasi, V.K. & González-Torralva, F. (2022) - Benzobicyclon efficacy is affected by plant growth stage, HPPD Inhibitor Sensitive 1 (HIS1) expression and zygoty in weedy rice (*Oryza sativa*). *Weed Science*, vol. 70, n. 3, p. 328-334. <https://doi.org/10.1017/wsc.2022.17>
- Calha, I.; Oliveira, M.F. & Reis, P. (2023) - Weed management challenges in rice cultivation in the context of pesticide use reduction: A survey approach. *Sustainability*, vol. 15, n. 1, art. 244. <https://doi.org/10.3390/su15010244>
- Gómez de Barreda; D.; Pardo; G.; Osca; J.M.; Catala-Forner, M.; Consola, S.; Garnica, I.; López-Martínez, N.; Palmerín, J.A. & Osuna, M.D. (2021) - An overview of rice cultivation in Spain and the management of herbicide-resistant weeds. *Agronomy*, vol. 11, n. 6, art. 1095. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061095>
- Lv, Q.; Zhang, X. & Yuan, D. (2021) - Exploring natural allelic variations of the  $\beta$ -triketone herbicide resistance gene *HIS1* for application in indica rice and particularly in two-line hybrid rice. *Rice*, vol. 14, art. 7. <https://doi.org/10.1186/s12284-020-00448-7>
- Maeda, H.; Murata, K.; Sakuma, N.; Takei, S.; Yamazaki, A.; Karim, M.R.; Kawata, M.; Hirose, S.; Kawagishi-Kobayashi, M.; Taniguchi, Y.; Suzuki, S.; Sekino, K.; Ohshima, M.; Kato, H.; Yoshida, H. & Tozawa, Y. (2019) - A rice gene that confers broad-spectrum resistance to  $\beta$ -triketone herbicides. *Science*, vol. 26, n. 6451, p. 393-396. <https://doi.org/10.1126/science.aax0379>
- Patterson, J.A.; Norsworthy, J.K.; Butts, T.R. & Gbur, E.E. (2022) - Benzobicyclon for weedy rice control in quizalofop- and imidazolinone-resistant rice systems. *Weed Technology*, vol. 36, n. 4, p. 497-505. <https://doi.org/10.1017/wet.2022.47>
- Peñas, G.; Contreras, J.M.; Navarro, A. & Alameda, A. (2022) - BASF en el cultivo del arroz: tecnología e innovación para el control de malas hierbas y gestión de resistencias. In: *Libro de Actas XVIII Congreso Sociedad Española de Malherbología*, Mérida, España, p. 253-258.