

Caracterización de resistencia a los inhibidores de la ALS y EPSPS en poblaciones españolas de *Amaranthus palmeri*

Characterization of ALS- and EPSPS-inhibitors resistance in Spanish populations of *Amaranthus palmeri*

Alfredo Manicardi^{1,*}, German Mora Marin¹, Josep María Llenes², José María Montull¹, André Lucas Simões Araujo⁴, Todd Adam Gaines⁴, Jorge Lozano Juste³ & Joel Torra Farré¹

¹ Departamento de Ciencias Forestales y Agrícolas e Ingeniería, Universidad de Lleida, Lleida, España

² Unidad de Ciencias de las Malezas del Servicio de Protección de Plantas, DARP, Generalitat de Catalunya, Lleida, España

³ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universitat Politècnica de València (UPV), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Valencia, España.

⁴ Colorado State University, Department of Agricultural Biology, Fort Collins, Colorado, USA

(*E-mail: alfredo.manicardi@udl.cat)

<https://doi.org/10.19084/rca.35013>

Recibido/received: 2024.01.15

Aceptado/accepted: 2024.02.28

RESUMEN

Amaranthus palmeri es una mala hierba invasora presente en territorio español. Se han descrito poblaciones resistentes a los inhibidores de la ALS y a los de la EPSPS. Se sospecha la presencia de resistencia múltiple a los dos modos de acción en unas mismas poblaciones. En este trabajo se ensaya la respuesta a estos modos de acción (MoA) en de dos poblaciones de margen de carretera procedentes de Catalunya. En un ensayo dosis respuesta la mayoría de las plantas tratadas con 540 g i.a./ha de glifosato sobrevivía en las dos poblaciones y algunos individuos incluso a la dosis de campo de 1080g/ha. Tratamientos con dosis única con inhibidores de la ALS destacan una alta resistencia a thifensulfuron-metil (6 g a.i. ha⁻¹) y baja a imazamox (40 g a.i. ha⁻¹) en ambas poblaciones. El mecanismo de resistencia *target-site* se ha descrito como la principal causa de supervivencia para las dos poblaciones a los dos modos de acción. Las plantas supervivientes a glifosato muestran un aumento en el número de copias del gen EPSPS y ninguna mutación en la proteína diana. Sorprendentemente, las supervivientes a tratamiento con inhibidores de la ALS presentan distintas mutaciones génicas en la diana de los herbicidas: Pro-197-Ser, Pro-197-Thr, Asp-376-Glu y Trp-574-Leu. Dado el historial de presión de selección y la alta incidencia de mutaciones detectadas, es razonable suponer que ambas poblaciones hayan desarrollado dicha resistencias *ex situ*. Este escenario plantea un desafío importante para la agricultura española, ya que supone una continua introducción de poblaciones de *A. palmeri* con resistencia múltiple, complicando su manejo en campo.

Palabras-clave: *Amaranthus palmeri*, resistencia herbicida, inhibidores de ALS, inhibidores de EPSPS, resistencia múltiple.

ABSTRACT

Amaranthus palmeri is an invasive weed present in Spanish territory. Populations resistant to ALS and EPSPS inhibitors have been described. It is suspected that the accumulation of multiple resistance to both modes of action (MoA) within the same population. In this study we evaluate the herbicide responses in two roadside populations of *A. palmeri* from Catalonia. In a dose-response essay, most of the plants treated with 540 g a.i./ha of glyphosate survived in both populations, and some individuals even survived the field dose of 1080 g/ha. Single-dose treatments with ALS inhibitors reveal high resistance to thifensulfuron-methyl (6 g a.i. ha⁻¹) and low resistance to imazamox (40 g a.i. ha⁻¹) in both populations. Target-site resistance mechanisms are identified as the primary cause of survival for both modes of action in both populations. Glyphosate survivors show increased EPSPS gene copies but no mutations in the target protein. Surprisingly, survivors of ALS inhibitor treatment have multiple allelic mutations at codon: Pro-197-Ser, Pro-197-Thr, Asp-376-Glu, and Trp-574-Leu. Given the selection pressure history and the high incidence of detected mutations, it is reasonable to assume an *ex situ* selection of these populations to these MoA. This scenario presents a significant challenge for Spanish agriculture, indicating the ongoing introduction of *A. palmeri* populations with multiple resistance, complicating field management.

Keywords: *Amaranthus palmeri*, herbicide resistance, ALS-inhibitors, EPSPS-inhibitors, multiple resistance.

INTRODUCCIÓN

Amaranthus palmeri, S. Watson (*A. palmeri*) es una especie de maleza invasora peligrosa, que puede reducir drásticamente la producción de cultivos gracias a su rápido crecimiento, adaptabilidad y producción prolífica de semillas (Ehleringer, 1983). *A. palmeri* puede acumular rasgos de resistencia a múltiples modo de acción herbicidas, entre ellos los inhibidores de la ALS y de la EPSPS (Küpper *et al.*, 2017). Los inhibidores de ALS son una clase de herbicidas que inhiben la *acetolactato sintasa*, una enzima esencial en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina (Duggleby *et al.*, 2008). Los inhibidores de la EPSPS causan la muerte de las plantas al inhibir la enzima *5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa*, presente en la ruta de síntesis de los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano (Grube *et al.*, 2019). En el caso de la ALS la resistencia es debida a mutaciones puntuales en los codones A122, P197, A205, D376, R377, W574, S653 and G654 impiden al herbicida de ligarse y interactuar con el sitio activo de la enzima. Por otro lado, la sobreexpresión del gen EPSPS es el mecanismo mayormente reportado en esta especie donde la presencia de un exceso de copias del gen impide que el herbicida inhiba todas ellas de manera efectiva (Powles & Yu, 2010). Debido a la continua introducción de nuevas semillas y a la presión de selección herbicida que las mismas reciben una vez llegadas, es probable que existan poblaciones con resistencia múltiple a estos dos MoA. En este estudio se evalúa la resistencia a los inhibidores de la ALS y EPSPS en dos poblaciones españolas de *A. palmeri* procedentes de margen de carreteras y se caracteriza la presencia de mecanismo de resistencia múltiple tanto a nivel de población como de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Tres poblaciones de *A. palmeri* fueron incluidas en este estudio: dos fueron recolectadas en un margen de carretera en Montblanc (MB) y en Tarragona (TA) en el noreste de España, y una de Carolina del Norte, EE. UU., que se utilizó como control sensible (WT). Las semillas se recolectaron de diferentes plantas madre, se limpiaron y se almacenaron

a temperatura ambiente hasta que comenzaron los experimentos.

Tratamiento con inhibidores de la ALS

Las distintas poblaciones se sembraron en turba, se colocaron en bandejas de aluminio y se cultivaron en condiciones de invernadero. Después de cinco días, se trasplantaron 20 plántulas por población a bandejas de plástico (325 × 265 × 95 cm³) con un suelo de arcilla, turba y perlita (60%, 20%, 20%) regándolas diariamente. Al estadio de 4-5 hojas se trataron con thifensulfuron-metil, THIF (Harmony 50 SX, DuPont™) e imazamox, IMA (Tuareg®, DuPont™) en dosis recomendadas en campo de 6 g a.i. ha⁻¹ y 40 g a.i. ha⁻¹, respectivamente. El diseño experimental fue completamente aleatorio con dos repeticiones (una bandeja, una repetición). Cuatro semanas después de la aplicación, se determinó el porcentaje de plantas sobrevivientes y se recolectó el material vegetal para los ensayos moleculares.

Tratamiento Inhibidores de la EPSPS

Las plantas se cultivaron según se describe en la sección anterior con algunas diferencias: durante la etapa de 4-5 hojas, las plantas fueron sometidas a tratamiento con glifosato (Roundup®, SC, 360 g i.a./L, Bayer Cropscience) con dosis de: 0, 33.7, 67.5, 135, 270, 540, 1080 g i.a./ha para WT, y 135, 270, 540, 1080, 2160, 4320 g i.a./ha para MB y TA. Los rango de dosis son diferentes porque el WT se controla completamente a 540 g i.a./ha, se ve inútil añadir más dosis. El diseño experimental fue completamente aleatorio con tres repeticiones (una bandeja, una repetición). Cuatro semanas después de la aplicación, se determinó el porcentaje de plantas sobrevivientes y se recolectó el material vegetal para los ensayos moleculares.

Extracción de ADN

Se recolectaron muestras frescas de hojas de plantas sobrevivientes a los diferentes herbicidas para cada población. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta que se extrajo el ADN genómico y el extra cromosómico utilizando el protocolo de

extracción con urea (Miriam Gil, UPNA, comunicación personal). La concentración y calidad del ADN se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Mutaciones en el gen ALS

Las regiones del gen *ALS* CAD (desde los aminoácidos 124 a 205) y la región BE (desde los aminoácidos 574 a 653) fueron amplificadas con los primers Ap_3F, Ap_4R y Ap_2F, Ap_2R respectivamente (Scarabel *et al.*, 2007). Después de la amplificación, los productos de PCR fueron purificados y secuenciados. Los resultados fueron visualizados y alineados utilizando Geneious Prime® 2023.2.1.

Mutaciones en el gen EPSPS

La región TAP del gen fue amplificada utilizando los primers EGF y EGR (Gaines *et al.*, 2010) utilizando la misma reacción descrita anteriormente. Las condiciones de PCR fueron 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 61°C durante 30 segundos, 72°C durante 15 segundos, y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Después de la amplificación, los productos de PCR fueron purificados y secuenciados. Los resultados fueron visualizados y alineados utilizando Geneious Prime® 2023.2.1.

Número de copias del gen EPSPS

Se realizó una reacción de qPCR para evaluar el número relativo de copias del gen *EPSPS* y normalizarlo con β -tubulina (Koo *et al.*, 2018) utilizando los primers: EPSPS_F, EPSPS_R3, β -tubulin_F y β -tubulin_R y el aumento relativo en el número de copias genómicas de *EPSPS* se expresó como $2^{\Delta Ct}$ (Gaines *et al.*, 2010). Cada muestra se evaluó por triplicado.

Resistencia múltiple a nivel de planta

Para caracterizar los mecanismos de resistencia múltiple a inhibidores de ALS y EPSPS a nivel de planta, se seleccionaron cinco biotipos de cada planta madre (total diez plantas por población) que

sobrevivieron a glifosato y en los cuales se confirmó el mecanismo de resistencia. Estos biotipos seleccionados se utilizaron para la amplificación parcial del gen *ALS* siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los bioensayos con herbicidas junto con estudios moleculares y secuenciación confirmaron la resistencia múltiple a los inhibidores de ALS y EPSPS en dos poblaciones españolas de *A. palmeri*. Los patrones de resistencia a THIF e IMA fueron similares en ambas poblaciones, con mayor supervivencia al primero y muy baja al segundo, indicando la ausencia de mecanismos de resistencia cruzada. Se encontraron distintas mutaciones en los codones: Pro-197-Thr, Asp-376-Glu y Trp-574-Leu (Figura 1). Estudios de dosis-respuesta con glifosato mostraron que biotipos resistentes de ambas poblaciones sobrevivieron a 540 g i. a/ha del producto comercial, mientras que el WT fue controlado completamente. No se encontraron mutaciones en la secuencia génica de *EPSPS*. Las pruebas de qPCR confirmaron que la sobreexpresión del este gen es el mecanismo primario de resistencia en ambas poblaciones, con un número mayor de copias entre 39 y 120 respecto a las plantas WT. La sobreexpresión del gen *EPSPS* es un mecanismo común de resistencia al glifosato en *A. palmeri* (Gaines *et al.*, 2010; Küpper *et al.*, 2017, 2018) lo que podría justificar su supervivencia al glifosato. Diez plantas por población supervivientes a glifosato se han ensayado para la confirmar la acumulación de mecanismo de resistencia múltiple a nivel de planta buscando mutaciones en el gen *ALS*. Se encontraron tres mutaciones en posiciones Pro-197, Asp-376 y Trp-574. Sorprendentemente, en Pro-197 se confirmaron cuatro sustituciones aminoacídicas: Pro-197-Thr, Pro-197-Ser, Pro-197-Ala y Pro-197-Ile. Cuatro plantas presentaban sustitución de glutámico por aspártico en el codón Asp-376 y tres con mutación en Trp-574 (leucina por triptófano). En tres biotipos se encontraron acumulaciones de alelos mutados, dos con Pro-197-Thr junto con Asp-376-Glu y una con Pro-197-Thr y Trp-574-Leu. Aunque estudios previos han reportado la coexistencia de diversas mutaciones alélicas dentro de una misma población (Küpper *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2019; Manicardi *et al.*, 2023) nunca se había reportado antes

la acumulación de mutaciones ampliamente reconocidas que confieren resistencia a inhibidores de ALS a nivel de planta en esta especie. Se necesitan más estudios para descartar la presencia de eventuales mecanismo de resistencia *non-target site*.

Aunque faltan estudios genéticos, estos datos sugieren el desarrollo inicial de estos mecanismos en el país de origen y su posterior selección in situ. Esta conclusión se respalda con la alta variabilidad de mutaciones alélicas en el gen ALS.

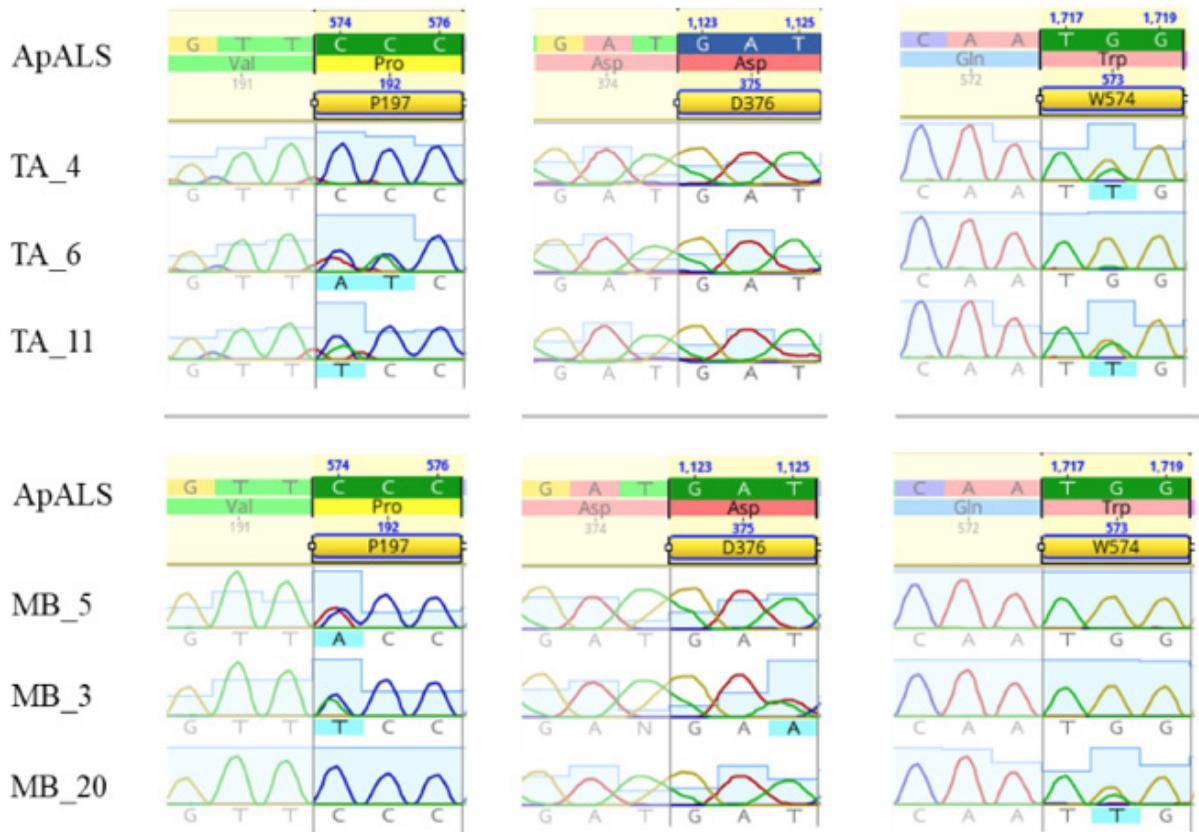


Figura 1 - Detalles del cromatograma de las mutaciones de ALS encontradas en este estudio. Se muestran tres secuencias de las poblaciones TA (TA) y MB (MB) alineadas al genoma de referencia (ApALS). Las mutaciones en los codones Pro-197, Asp-376 y Trp-574 están resaltadas. Los cambios de aminoácidos son: CCC a prolina (197), ACC a serina, ATC a isoleucina y ACC a treonina; GAT a ácido aspártico y GAA a ácido glutámico; TGG a triptófano y TTG a leucina. El doble pico indica heterocigosis.

CONCLUSIONES

En este estudio se confirma por primera vez la presencia en España de poblaciones de *A. palmeri* con resistencia múltiple a los inhibidores de la ALS y la EPSPS, siendo además el primer caso en Europa para esta especie. También se identificó la presencia de biotipos con múltiples mecanismos de resistencia *target-site* a ambos MoA.

Dada la presencia de poblaciones resistentes a múltiples mecanismos de acción y sus continuas introducciones, es fundamental aplicar estrategias de manejo integrado para contener su expansión tanto en áreas agrícolas como en márgenes de carreteras. Reducir la presión de selección de herbicidas, utilizando medios de control alternativo, es crucial para limitar su propagación en cultivos y garantizar la eficacia de los productos herbicidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Duggleby, R.G.; McCourt, J.A. & Guddat, L.W. (2008) - Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 46, n. 3, p. 309–324. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.004>
- Ehleringer, J. (1983) - Ecophysiology of *Amaranthus palmeri*, a sonoran desert summer annual. *Oecologia* vol. 57, n. 1, p. 107–112. <https://doi.org/10.1007/BF00379568>
- Gaines, T.A.; Zhang, W.; Wang, D.; Bukun, B.; Chisholm, S.T.; Shaner, D.L.; Nissen, S.J.; Patzoldt, W.L.; Tranel, P.J.; Culpepper, A.S.; Grey, T.L.; Webster, T.M.; Vencill, W.K.; Sammons, R.D.; Jiang, J.; Preston, C.; Leach, J.E. & Westra, P. (2010) - Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, n. 3, p. 1029–1034. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0906649107>
- Grube, M.; Kalnenieks, U. & Muter, O. (2019) - Metabolic response of bacteria to elevated concentrations of glyphosate-based herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 173, p. 373–380. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.02.045>
- Koo, D.H.; Molin, W.T.; Sasaki, C.A.; Jiang, J.; Putta, K.; Jugulam, M.; Friebe, B. & Gill, B.S. (2018) - Extrachromosomal circular DNA-based amplification and transmission of herbicide resistance in crop weed *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 115, n. 13, p. 3332–3337. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719354115>
- Küpper, A.; Borgato, E.A.; Patterson, E.L.; Netto, A.G.; Nicolai, M.; Carvalho, S.J.P.; Nissen, S.J.; Gaines, T.A. & Christoffoleti, P.J. (2017) - Multiple resistance to glyphosate and acetolactate synthase inhibitors in palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) identified in Brazil. *Weed Science*, vol. 65, n. 3, p. 317–326. <https://doi.org/10.1017/WSC.2017.1>
- Küpper, A.; Manmathan, H.K.; Giacomini, D.; Patterson, E.L.; McCloskey, W.B. & Gaines, T.A. (2018) - Population genetic structure in glyphosate-resistant and -susceptible palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) populations using genotyping-by-sequencing (GBS). *Frontiers in Plant Science*, vol. 9, art. 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00029>
- Manicardi, A.; Scarabel, L.; Llenes, J.M.; Montull, J.M.; Osuna, M.D.; Farré, J.T. & Milani, A. (2023) - Genetic basis and origin of resistance to acetolactate synthase inhibitors in *Amaranthus palmeri* from Spain and Italy. *Pest Management Science*, vol. 79, n. 12, p. 4886–4896. <https://doi.org/10.1002/ps.7690>
- Powles, S.B. & Yu, Q. (2010) - Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 61, p. 317–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Scarabel, L.; Varotto, S. & Sattin, M. (2007) - A European biotype of *Amaranthus retroflexus* cross-resistant to ALS inhibitors and response to alternative herbicides. *Weed Research*, vol. 47, n. 6, p. 527–533. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3180.2007.00600.X>
- Singh, S.; Singh, V.; Salas-Perez, R.A.; Bagavathiannan, M.V.; Lawton-Rauh, A. & Roma-Burgos, N. (2019) - Target-site mutation accumulation among ALS inhibitor-resistant Palmer amaranth. *Pest Management Science*, vol. 75, n. 4, p. 1131–1139. <https://doi.org/10.1002/ps.5232>