

Resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa en poblaciones de *Leptochloa* spp. en arrozales de Extremadura

AMARO I¹, ROMANO Y¹, PALMERIN JA², QUILES JM³, OSUNA MD^{1a}

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Guadajira (Badajoz);

^amariadolores.osuna@juntaex.es

²Servicio de Sanidad Vegetal (Junta de Extremadura), Don Benito (Badajoz)

³Servicio de Producción Agraria (Junta de Extremadura), Mérida (Badajoz)

Resumen: El género *Leptochloa* incluye especies de malas hierbas muy problemáticas en el cultivo del arroz. En la actualidad, los herbicidas autorizados en España para controlar esta mala hierba en arroz pertenecen, principalmente, a 2 modos de acción: inhibidores de la ALS (acetolactato sintasa) e inhibidores de la ACCasa (acetil coenzima A carboxilasa). El uso repetido y continuado de estos herbicidas puede conllevar la aparición de resistencias. En este trabajo se realizaron prospecciones de *Leptochloa* spp. durante varios años en arrozales de Extremadura donde existían fallos de control utilizando herbicidas autorizados. De las 42 poblaciones estudiadas, se ha confirmado en laboratorio distintos tipos de mutaciones en las secuencias en ambas enzimas (ALS y ACCasa). En ALS la mutación predominante fue Pro197Ser, mientras que en ACCasa fue Ile1781Leu. Asimismo, se detectaron poblaciones con mutaciones en los dos genes. A la vista de las mutaciones encontradas, se aconseja un control integrado de malas hierbas (CIM) utilizando, además de los herbicidas disponibles, técnicas alternativas para evitar el incremento de biotipos resistentes en la región.

Palabras clave: *Leptochloa*, arroz, resistencia, mutación, ALS, ACCasa, sitio de acción, control integrado de malas hierbas.

1. Introducción

El arroz es un cultivo fundamental y un alimento básico en todo el mundo. En España, Extremadura es la segunda comunidad de mayor producción de arroz después de Andalucía. Según (MAPAMA 2018), Extremadura tuvo una superficie cultivada de 24,700 ha y una producción de 175,000 toneladas en 2017. Debido a la importancia de este cultivo, existe una preocupación creciente sobre el control de malas hierbas, ya que éstas constituyen un problema serio en cuanto a la producción de los campos de arroz (*Oryza sativa* L.) de todo el mundo (OSCA 2013, SAITO 2010). En este sentido, se sabe que las malas hierbas pertenecientes a la familia de las gramíneas reducen el rendimiento del arroz más que las malas hierbas de hoja ancha o la juncia (SMITH 1988).

Una gramínea que reduce considerablemente la producción de este cultivo en Extremadura es el género *Leptochloa*. Éstas, son plantas anuales de primavera muy comunes en América y Asia (TEHRANCHIAN ET AL. 2016), pero no fue hasta los años 80 cuando se detectaron por primera vez en España dentro de Extremadura. La primera especie descrita en esta región fue *Leptochloa fascicularis*, siendo una de las gramíneas de arroz más dañinas (SAAVEDRA ET AL. 1995, SMITH 1988). De las especies de *Leptochloa* que aparecen en el arroz en Extremadura, *L. fascicularis* y *L. uninervia* son las más comunes (OSUNA ET AL. 2012) debido a que están bien adaptadas a condiciones de inundación o suelo saturado.

El control químico contra estas malas hierbas es bastante eficiente en este cultivo (TALBERT AND BURGOS 2007, TEHRANCHIAN ET AL. 2016). De este modo, los herbicidas más utilizados para ello, pertenecen principalmente a dos grupos de herbicidas: inhibidores de la ALS (acetolactato sintasa) e inhibidores de la ACCasa (acetil-CoA carboxilasa) (OSUNA ET AL. 2012, TEHRANCHIAN ET AL. 2016).

El uso repetido y continuado de herbicidas con un mismo modo de acción está dando lugar a numerosos casos de resistencias en distintas especies. Hasta la fecha, 160 especies diferentes de malas hierbas han desarrollado resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS y 48 han mostrado resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa (HEAP 2019). El primer caso de resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa en *Leptochloa* spp. (*L. chinensis* L.) fue descrito por MANEECHOTE ET AL. (2005). Sin embargo, no hay casos documentados de herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa en *L. fascicularis* y *L. uninervia* (HEAP 2019). El mecanismo más común por el que una planta puede desarrollar resistencia a un herbicida es por mutación en el sitio de acción del mismo (gen ALS y/o ACCasa).

Por todo lo expuesto anteriormente, los objetivos de este trabajo son (1) realizar prospecciones en campos de arroz de Extremadura donde los agricultores describieron fallos en el control de *Leptochloa* spp. con herbicidas y (2) analizar las secuencias de la ALS y ACCasa buscando la existencia de posibles mutaciones que pudieran explicar dichos fallos de control.

2. Material y Métodos

2.1- Prospecciones

Se realizaron prospecciones desde 2009 hasta 2016 en campos de arroz de Extremadura. Se contó para ello con el asesoramiento de técnicos del servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura que eran conocedores de la existencia de fallos de control de *Leptochloa* spp. en este cultivo. Así, se llevaron a cabo los muestreos de poblaciones de este género en arrozales de la región donde se sospechaban casos de resistencias. Todas las muestras recogidas fueron georreferenciadas.

2.2- Material vegetal

Las semillas de las poblaciones de *Leptochloa* spp. estudiadas fueron germinadas en macetas de 7x7x9 cm. utilizándose un sustrato de turba-vermiculita en una proporción 3:1 en invernadero con condiciones controladas de humedad y temperatura,

2.3- Caracterización molecular y morfológica

Las muestras fueron caracterizadas a nivel de especie mediante el uso de marcadores moleculares AFLP usando la metodología de ROMANO ET AL. (2017). Estas poblaciones se clasificaron en *L. fascicularis* o *L. uninervia*. Los resultados del estudio molecular se contrastaron con una caracterización morfológica siguiendo la metodología de FERNÁNDEZ-CAVADA ET AL. (2008). Según este autor, *L. fascicularis* se distingue *L. uninervia* por sus espiguillas más aristadas.

2.4- Extracción del ADN y reacciones de PCR

Cuando se obtuvo suficiente material vegetal (60-100mg), se procedió a la extracción del ADN utilizándose para ello el kit de extracción de ADN para plantas de BIOTOOLS siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído, se cuantificó utilizando el NANODROP 1000 (Thermo Scientific) para asegurarnos unas condiciones adecuadas de concentración y pureza. A continuación, se hicieron diluciones a 10 ng/μl (concentraciones utilizadas en las posteriores PCR). El ADN se conservó a -21 °C hasta su utilización en los análisis.

En la secuencia de la **ACCasa** se estudiaron 8 codones: ile1781, trp1999, trp2027, Ile2041, asp2078, lys2080, ser2088 y gly2096 utilizando los cebadores de la Tabla 1.

En la secuencia de la **ALS** se estudiaron 2 zonas: la CAD (incluye los codones ala122, pro197, ala205), y la BE (incluye los codones trp574 y ser653). Los cebadores utilizados para esta secuenciación quedan reflejados en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados para la secuenciación de los genes ALS y ACCasa y los codones estudiados

Cebador	Secuencia	Tamaño fragmento (bp)	Codones estudiados
Gen ACCasa			
CRUSS-F	5'-GATTGGCATAGCCGATGAAG-3'	474	Ile1781
CRUSS-R	5'-TGGACAACACCATGGTAGC-3'		
AC6F	5'-AGCTTGGAGGAATCCCTGTT-3'	496	Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Lys2080, Ser2088 Gly2096
AC6R	5'-GGGTCAAGCCTACCCATACA-3'		
Gen ALS			
PALI-1F	5'-CGACGTCTTCGCCTACCC-3'	455	Zona CAD: Ala122, Pro197, Ala205
PALI-2R	5'-ATCTGCTGCTGGATGTCCT-3'		
BE-1	5'-GTCTTGGGGCTATGGGATTT-3'	594	Zona BE: Trp574 y Ser653
BE-2	5'-CGACAGAACAAGGGAGAACA-3'		

Para la reacción de PCR, la mezcla de los reactivos utilizada fue de 1,125μl de cada primer (10pmol/ μl), 2,4 μl de la mezcla de dNTP (2.5mM), 3 μl de Buffer 10X, 0.3μl de Taq polimerasa (5U/ μl) y se completó con agua de PCR hasta un volumen final de

30 µl. El ciclo de PCR llevado a cabo para todas las parejas de cebadores fue el mismo variando únicamente la temperatura de unión de los cebadores: 95°C 5min (x1); 95°C 30seg, X°C 30seg, 72°C 1min (x35) y 72°C 5min (x1), manteniéndose a 4°C al final del ciclo. Así, para las parejas CRUSS-F/ R, AC-6F/R, y PALI-1F/1R la temperatura de unión de los cebadores fue de 57°C; para la pareja BE-1/2 esta temperatura fue de 61°C.

2.5- Electroforesis en gel de agarosa y purificación de las bandas de interés

Los productos de ADN amplificados mediante la técnica de PCR explicada en el apartado anterior, fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.3% y visualizados mediante el transiluminador Alpha Innotech. El gel de agarosa fue teñido con Red Safe (20.000X; INTRON). Las bandas esperadas, se cortaron y purificaron utilizando el Kit de Purificación de ADN de BIOTOOLS (según las indicaciones del fabricante).

2.6- Secuenciación de los fragmentos amplificados.

Tras purificar las bandas, éstas fueron enviadas para su secuenciación al STAB (Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia) de la Universidad de Extremadura. Las secuencias, fueron visualizadas utilizando el programa CHROMAS y fueron alineadas mediante el programa CLUSTAL OMEGA.

3. Resultados y Discusión

Un total de 42 poblaciones de *Leptochloa* spp. fueron utilizadas en este estudio, abarcando desde muestras recogidas en 2009 hasta 2016.

Mediante la caracterización molecular ROMANO ET AL. (2017) y morfológica (artículo por publicar) se determinó que todas las poblaciones estudiadas pertenecieron a dos especies: *L. fascicularis* o *L. uninervia*. (datos no especificados/mostrados).

Respecto al análisis de las secuencias de genes de la ALS y la ACCasa, las muestras que presentaron mutación se distribuyen en Extremadura como se detalla en la Figura 1. De las 42 muestras estudiadas, 6 de ellas mostraron mutación en el gen de la ALS, 13 poblaciones con mutaciones en el gen de la ACCasa y 3 poblaciones que presentaron mutaciones al mismo tiempo en ambos genes como se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de mutaciones encontradas en cada población

Mutación	Porcentaje de muestras encontradas
<i>Gen ALS</i>	14,29%
Pro197Ser	7,14%
Pro197Leu	7,14%
<i>Gen ACCasa</i>	30,95%
Ile1781Leu	28,57%
Trp1999Cys	2,38%
<i>En ambos genes a la vez</i>	7,14%
Pro197Ser y Trp1999Cys	4,76%
Pro197Ser y Trp2027Cys	2,38%

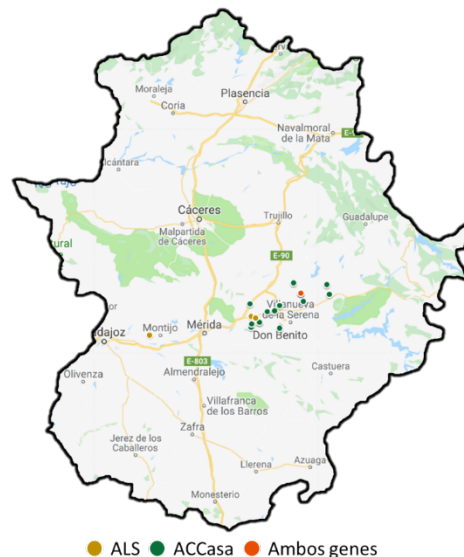


Figura 1. Distribución de poblaciones de *Leptochloa* spp. con mutación en gen de la ALS, ACCase o en ambos en Extremadura

Debido a que el arroz es uno de los cultivos con mayor escasez de materias activas disponibles y, a la vista de los resultados obtenidos en cuanto a mutaciones se refiere, se aconseja un control integrado de malas hierbas (CIM) utilizando, además de los herbicidas disponibles, técnicas alternativas para evitar el incremento de biotipos resistentes en la región.

Agradecimientos

Se ha recibido financiación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) con la Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI-INIA) otorgada a Ignacio Amaro Blanco, el proyecto INIA RTA2014-00033-C03-01 y el apoyo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del proyecto AGROS (CCESAGROS)

Referencias

- FERNÁNDEZ-CAVADA S, CIRUJEDA A, CARMELO M, SALAS I, AIBAR J, & ZARAGOZA C (2008) *Leptochloa. Leptochloa uninervia* (C. Presl) Hitch. & Chase. Dirección General de Alimentación. Centro de Producción Vegetal. Gobierno de Aragón
- HEAP I (2019) The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org>. Accessed February 14, 2019
- MANEECHOTE C, SAMANWONG S, ZHANG X-Q, & POWLES SB (2005) Resistance to ACCase-inhibiting herbicides in sprangletop (*Leptochloa chinensis*). *Weed Sci* **53**:290–295
- MAPAMA (2018) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
- OSCA JM (2013) Expansion of *Leptochloa fusca* ssp. *uninervia* and *Leptochloa fusca* ssp. *fascicularis* in rice fields in Valencia, eastern Spain. *Weed Res* **53**:479–488
- OSUNA MD, ROMANO Y, & QUILES JM (2012) Principales malas hierbas y métodos de control en el cultivo de arroz en España. *Vida Rural* **339**:74–77
- ROMANO Y, MENDOZA F, PALMERÍN JA, QUILES JM, AMARO-BLANCO I, & OSUNA MD (2017) Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura: “*Echinochloa* spp.” y “*Leptochloa* spp.” Pages 337–342 in XVI Congreso de la Sociedad Española de

Malherbología: actas: Pamplona-Iruña, 25-27 octubre, 2017. Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra

SAAVEDRA M, CORTÉS JA, GÓMEZ DEBD, RODRÍGUEZ-BERNABÉ JA, TABENER A, CASTEJÓN M, MONTSERRAT A, & ZARAGOZA C (1995) Malas hierbas de difícil control. *Minist Agric Pesca y Aliment Madrid*

SAITO K (2010) Weed pressure level and the correlation between weed competitiveness and rice yield without weed competition: An analysis of empirical data. *F Crop Res* **117**:1–8

SMITH RJ (1988) Weed thresholds in southern US rice, *Oryza sativa*. *Weed Technol* **2**:232–241

TALBERT RE & BURGOS NR (2007) History and management of herbicide-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas rice. *Weed Technol* **21**:324–331

TEHRANCHIAN P, NORSWORTHY JK, KORRES NE, MCELROY S, CHEN S, & SCOTT RC (2016) Resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in Amazon sprangletop: Confirmation, control, and molecular basis of resistance. *Pestic Biochem Physiol* **133**:79–84

Resistance to ALS- and ACCase-inhibiting herbicides in *Leptochloa* spp. in rice fields from Extremadura

Summary: The genus *Leptochloa* includes very problematic weed species in rice cultivation. Currently, the authorized herbicides in Spain to control this weed in rice belong mainly to 2 modes of action: ALS (acetolactate synthase) inhibitors and ACCase (acetyl coenzyme A carboxylase) inhibitors. The repeated and continuous use of these herbicides can lead to the appearance of resistance. In this work, surveys of *Leptochloa* spp. were carried out for several years in paddy fields from Extremadura where there were control failures using authorized herbicides. Out of the 42 populations studied, different types of mutations in the sequences in both enzymes (ALS and ACCase) have been confirmed in laboratory. In ALS the predominant mutation was Pro197Ser, while in ACCase it was Ile1781Leu. Also, populations with mutations in the two genes were detected. Due to the mutations found, an integrated weed management (IWM) is recommended, using, in addition to the available herbicides, alternative techniques to avoid the increase of resistant biotypes in the region.

Keywords: *Leptochloa*, resistance, mutation, ALS, ACCase, target-site, integrated weed management.