

Estudios de características anatómicas foliares en *Sinapis alba* L. resistente al tribenuron metil

Jesús Rosario¹ y Rafael De Prado²

Sinapis Alba L. es una mala hierba competitiva en el cultivo de trigo del sur de España. En una población de malezas manejada con aplicaciones continuas de tribenuron metil (TM) durante los últimos 15 años, se ha observado fallas de control. Semillas de plantas no controladas por TM consideradas población sospechosa de tener resistencia (AR₁₁) y semillas de una población sensible (AR₂) cosechadas en área nunca tratada con TM, fueron germinadas y cultivadas para confirmar la resistencia a TM y determinar la posible relación de características anatómicas de la superficie foliar adaxial con la penetración y resistencia al herbicida. Se realizaron ensayos de dosis-respuesta (D-R), estudios radio-isotópicos (penetración de ¹⁴C-TM) y microscópicos en la superficie adaxial foliar (densidad de estomas, densidad de tricomas, forma de la superficie adaxial y espesor de cutícula). El estudio de D-R mostró que la dosis de TM necesaria para reducir en 50% el peso fresco (ED₅₀) del biotipo AR₁₁ fue de 4,2 g de TM ha⁻¹, resultando 10,6 veces mayor que la ED₅₀ del sensible AR₂ (0,3939 g de TM ha⁻¹). Los resultados de penetración indicaron que ambos biotipos AR₁₁ (40,2%) y AR₂ (41,4%) absorben porcentajes similares de TM. Mientras que las densidades de estomas y de tricomas y la forma de la superficie adaxial fueron similares en ambos biotipos. No obstante, el espesor de la cutícula fue diferente (AR₁₁=2.41 mm y AR₂=1.34 mm). La resistencia confirmada en *S. alba* a TM, no es debida a diferencias en la absorción del herbicida ni a cambios anatómicos foliares; por tanto, se investigan otros mecanismos.

Palabras clave: resistencia, estomas, tricomas, cutícula

INTRODUCCIÓN

Sinapis alba L. es una crucífera anual de la zona mediterránea, presente en el sur de España, donde compete con el cultivo de trigo y ha sido controlada durante los últimos 15 años mediante aplicaciones con el herbicida tribenuron metil (TM) (Rosario *et al.* 2010).

TM es un herbicida sulfonilurea inhibidor de la acetolactato sintasa (ALS; EC 4.1.3.18) que cataliza la biosíntesis de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Singh *et al.* 1991; Tranel y Wright 2002; McCourt y Duggleby 2006). El uso incorrecto de este herbicida inhibidor de la ALS ha causado la evolución de resistencia en biotipos de *S. alba* prospectados en Ronda, Málaga, España (Cruz-Hipólito *et al.* 2008; Rosario *et al.* 2010).

En la actualidad existen 365 biotipos de malezas resistentes a herbicidas en 200 especies, distribuidas en 450,000 campos. Del total de especies resistentes el 30.7% (112 especies) han desarrollado resistencia a los inhibidores de ALS (Heap 2011), siendo este el grupo herbicida con mayor incremento de biotipos resistentes.

Comúnmente, la resistencia a herbicida es explicada basado en modificaciones genéticas ocurridas en el sitio de acción, por ejemplo mutación en el punto de unión en la enzima blanco. Así como en la resistencia fuera

del sitio de acción, debida a reducción de la absorción y/o translocación, secuestro y metabolismo del herbicida (Powles y Yu 2010; De Prado y Franco 2004). Sin embargo, ciertas características morfológicas de la superficie adaxial foliar pueden influenciar la cantidad de herbicida que entra en los tejidos de las hojas (Kogan y Pérez 2003; García-Torres y Fernández-Quintanilla 1991), y afectar la expresión de la resistencia a herbicidas en malezas. Los objetivos del presente trabajo fueron: a) estudiar y confirmar la resistencia de *S. alba* a TM, b) conocer la posible influencia de características morfológicas con la resistencia a TM detectada en *S. alba*, asociada a la absorción de ¹⁴C-TM y c) determinar si la absorción de ¹⁴C-TM es un mecanismo que explica la resistencia en *S. alba*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue desarrollada en invernadero y laboratorio, utilizando TM de grado técnico (DuPont de Nemours y Co., Nambshiem, France) y el correspondiente formulado comercial al 75% de i.a. Se utilizaron semillas de las poblaciones AR₁₁ (probablemente resistente) y AR₂ (susceptible), germinadas en oscuridad y frío (4°C) por 72 horas en caja petri. Las plántulas se cultivaron en macetas hasta la instalación de cada estudio.

¹ Investigadores en protección vegetal. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. jesusrosario_1@yahoo.com

² Universidad de Córdoba, España.

Para los ensayos dosis-respuesta (D-R), plantas en estado de 4-5 hojas fueron tratadas con 0.0, 0.05, 0.10, 0.40, 0.80, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 16.0 y 32.0 g de TM ha^{-1} con un equipo de aplicación experimental de herbicida. El experimento fue instalado en un arreglo factorial, usando un diseño completamente al azar con 5 repeticiones (plantas) por población y dosis. Se cosechó el tejido aéreo y se determinó el peso fresco 21 días después del tratamiento (DDT). Los datos se ajustaron a un modelo de regresión no lineal (Seefeld *et al.* 1995), estimándose las ED_{50} . El factor de resistencia (FR) se obtuvo como la relación $ED_{50} AR_{11}/ED_{50} AR_2$.

Para estudiar la penetración de ^{14}C -TM las plantas fueron tratadas con una solución del herbicida marcado (^{14}C -tribenuron metil, 1666.66 Bq) más el formulado comercial (15 g i.a. ha^{-1}), aplicando una gota (1 μL ; 833.33 Bq.) en la cuarta hoja de cada planta. Las plantas fueron divididas en hoja tratada (HT), resto de planta (RT) y raíces (R); se lavó la radiactividad no absorbida, los tejidos fueron secados, combustionados en el oxidador biológico y determinada la radiactividad en el cuantificador Beckman LS 6500 TA (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). La absorción (%) fue calculada como radiactividad combustionada/radiactividad recuperada*100. El experimento fue un arreglo factorial y los tratamientos organizados en un diseño completamente al azar. Los datos se analizaron con Statistix 8.0.

La densidad de estomas se determinó mediante huellas estomáticas obtenidas con fragmentos de la superficie adaxial foliar (2 cm x 1 cm) de plantas AR_{11} y AR_2 . Los estomas/ mm^2 fueron observados y cuantificados en el microscopio óptico (Nikon UFX II-Labophot-2, Japan); se utilizaron 6 repeticiones (plantas) por biotipo y los datos se analizaron con Statistix 8.0.

Fragmentos foliares (0.5 cm x 0.5 cm) de cada biotipo sensible y resistente de *S. alba*, fueron procesados según el procedimiento del Servicio Central de Apoyo a la Investigación y, después examinados y fotografiados en un microscopio JSM 6300 (Scanning Microscope) de la Universidad de Córdoba. Este mismo procedimiento fue utilizado para observar y cuantificar la densidad de tricomas en la superficie adaxial. Los datos de tricomas se sometieron a análisis de varianza y comparación de media con Statistix 8.0.

Para el espesor de la cutícula se utilizó cortes foliares iguales a los anteriores y se obtuvieron bloques de glicol metacrilato polimerizados según el kit JB-4 (Polysciences Inc., Steinheim, Switzerland). Discos de 3 μm fueron teñidos con auramine O (0.1%), observados y fotografiados al microscopio óptico, midiendo el espesor de la cutícula con el programa Image Tool. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación de media con Statistix 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos dosis-respuesta (D-R)

El peso fresco de tejidos aéreos (PF) de los biotipos AR_{11} (R) y AR_2 (S) disminuyó con el incremento de la dosis de TM, Figura 1. La mayor reducción de PF se registró en AR_2 que resultó altamente susceptible a TM, observándose síntomas fitotóxicos cuatro DDT. R y S registraron ED_{50} de 4.2 y 0.3939 g i.a. ha^{-1} , respectivamente. Estos resultados mostraron que TM no controló el biotipo AR_{11} 21 DDT, el cual requirió una ED_{50} 10.6 veces mayor que el biotipo sensible AR_2 . La resistencia a TM ha sido confirmada en otras especies de malezas, tales como *Sinapis arvensis* (Warwick *et al.* 2005),

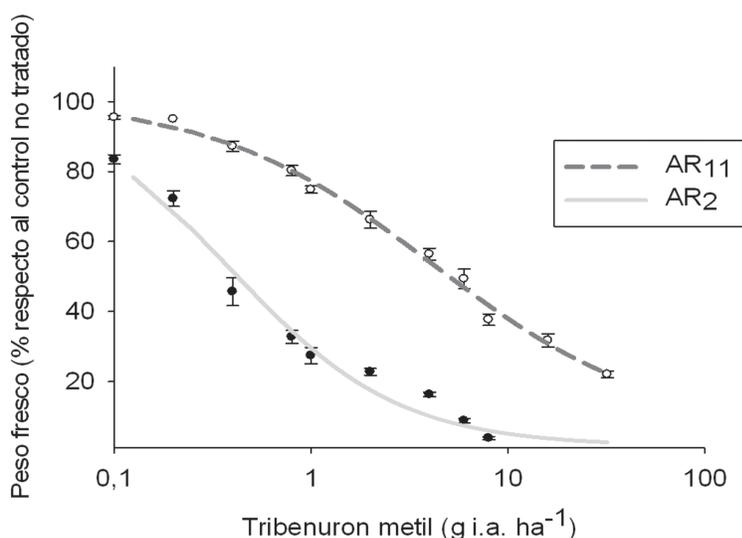


Figura 1. Respuesta de dos biotipos (AR_{11} y AR_2) de *S. alba* a dosis crecientes de tribenuron-metil. El PF se cuantificó 21 DDT como porcentaje respecto al control no tratado. Cada punto en la curva es la media del error estándar (SE) de dos experimentos.

Tabla 1. Absorción de ^{14}C -TM en biotipos AR₂ (S) y AR₁₁ (R) de *S. alba*, medido desde 24 hasta 120 HDT.

Biotipo	HDT	Penetración (%)
AR ₂	24	18.1±9.0c
	48	24.8±6.8bc
	72	29.4±4.5bc
	96	37.2±6.4ab
	120	41.4±4.0a
AR ₁₁	24	19.7±7.1c
	48	27.3±5.5bc
	72	31.7±6.3abc
	96	38.8±5.2ab
	120	40.2±2.2a

Papaver rhoeas (Kaloumenos *et al.* 2009), *Descurainia sophia* (Xu *et al.* 2010) y *Gallium aparine* L. (Jian *et al.* 2011).

El alto nivel de resistencia detectado mediante ensayos *in vivo* sugiere que *S. alba* evolucionó resistencia debido al repetido uso de TM durante más de 15 años, lo que también ha sido documentado en otras especies (Brown y Cotterman 1994; Saari *et al.* 1992).

Penetración de ^{14}C -TM

No fueron encontradas diferencias estadísticas significativas en la absorción de ^{14}C -TM entre los biotipos AR₁₁ y AR₂ de *S. alba*. La absorción total de ^{14}C -TM cuantificada 120 horas después del tratamiento (HDT) fue 41.4±4.0 % (AR₂) y 40.2±2.2 % (AR₁₁) (Table 1).

La absorción de ^{14}C -TM mostró un comportamiento similar en ambos biotipos AR₂ y AR₁₁ de *S. alba*. Similares resultados fueron encontrados en *Conyza albida* (Osuna y De Prado 2003), *Aster squamatus* (Osuna *et al.* 2003), resistentes a herbicidas inhibidores de ALS. Resultados diferentes son reportados en la absorción de propoxycarbazone-sodium en biotipos de *Bromus tectorum* (Park *et al.* 2004).

Estomas y tricomas, forma de la superficie adaxial y cutícula

Las densidades de estomas (figuras 2 y 3), de tricomas (Figuras 4 y 5); así como la forma de la superficie adaxial de la hoja (Figuras 6 y 7) resultaron similares en los biotipos AR₁₁ y AR₂ de *S. alba*. Esto significa que estas características anatómicas foliares no coadyuvan a que haya una respuesta diferencial en la absorción de TM, y por tanto, no contribuyen para que esta explique la resistencia confirmada en *S. alba*. Los estomas y tricomas tienen una función poco importante en la respuesta diferencial de selectividad o tolerancia a un ingrediente activo (Bukoyac 1976). Esto también ha sido verificado en *Cyperus spp.* y *Gallium aparine*, sin estomas en la superficie adaxial foliar, vía por donde mayormente deben absorberse los herbicidas (Kogan y Pérez 2003). En *Lycopersicon sculentum* Mill., la tolerancia a acifluorfen se explica por la diferencia en la densidad de estomas y tricomas (Ricotta y Masiunas 1992).

Ambos biotipos de *S. alba* mostraron diferencias significativas en el espesor de la cutícula AR₁₁ (2.41±0.48µm a) y AR₂ (1.34±0.16µm b), figuras 8 y 9. Estas diferencias en el espesor de cutícula no fueron suficientemente

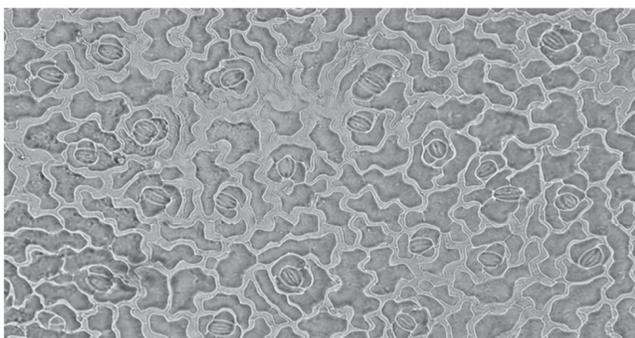


Figura 2. Estomas AR₂ (1,0±0,24 estomas mm⁻²)

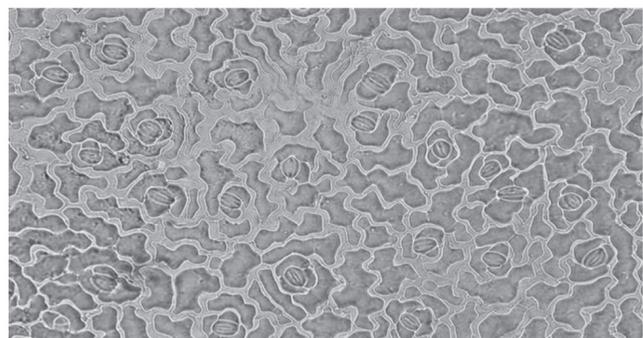


Figura 3. Estomas AR₁₁ (1,1±0,30a estomas mm⁻²)

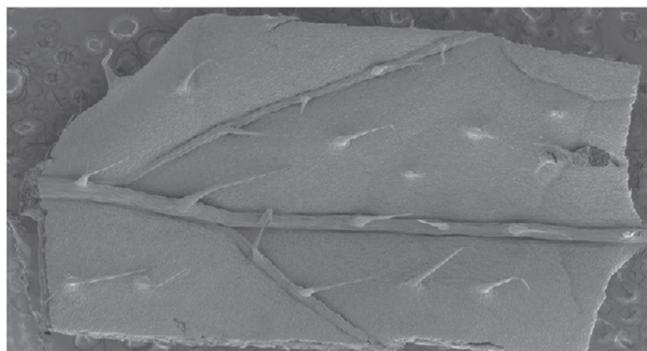


Figura 4. Tricomas AR₂ (4,46±1,37 tricomas mm⁻²)

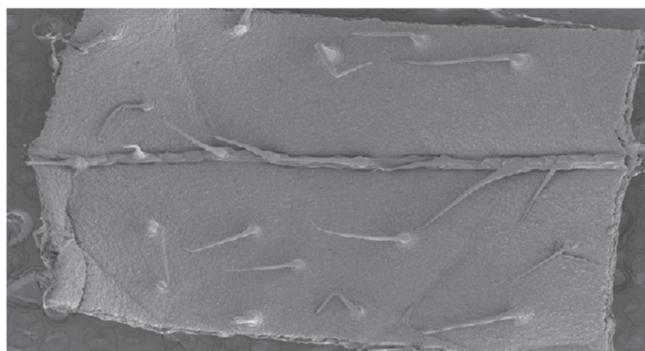


Figura 5. Tricomas AR₁₁ (4,34±0,47a tricomas mm⁻²)

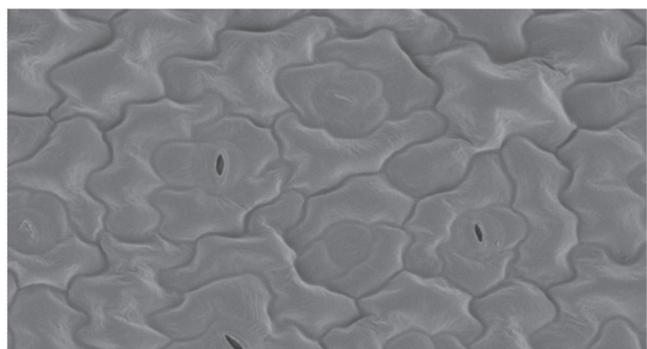


Figura 6. Forma de superficie adaxial R₂

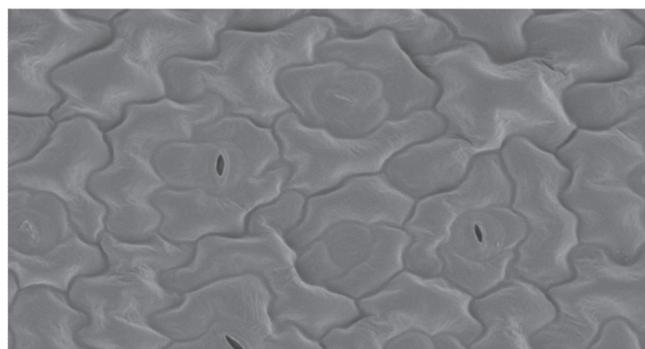


Figura 7. Forma de superficie adaxial AR₁₁

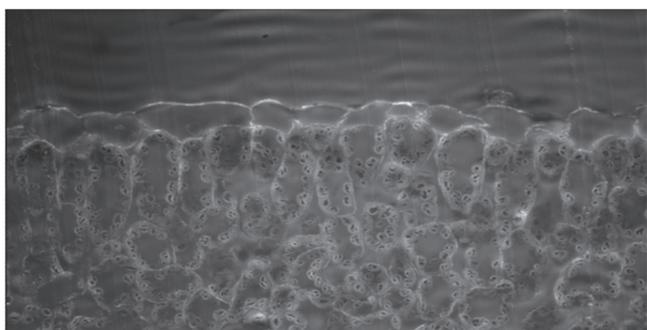


Figura 8. Espesor de cutícula AR₂ (1,34±0,16µm b)



Figura 9. Espesor de cutícula AR₁₁ (2,41±0,48µm a)

para que la cutícula fuera determinante en la observación de diferencias a nivel de la absorción de ¹⁴C-TM, en consecuencia, el espesor de la cutícula no influyó en la resistencia a TM en *S. alba*.

CONCLUSIONES

- Los ensayos *in vivo* de dosis-respuesta confirmaron la resistencia de *S. alba* al TM.
- Las densidades de estomas y de tricomas, y la forma de la superficie adaxial no influyeron sobre la absorción foliar del TM, ni fueron determinante en la evolución de resistencia en *S. alba*.

- La absorción de ¹⁴C-tribenuron-metil se descarta como mecanismo de resistencia en el biotipo AR₁₁ de *S. alba*.
- El espesor de la cutícula no influyó en la absorción foliar de ¹⁴C-TM en los biotipos AR₂ y AR₁₁ de *S. alba*; ni contribuyó en la resistencia de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos el apoyo recibido de la Universidad de Córdoba, España, del Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF) y del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) de la República Dominicana.

LITERATURA CITADA

- Brown, H.; Cotterman, J. 1994. Recent advances in sulfonylurea herbicides. *In: Chemistry of Plant Protection*, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg 10: 49-81.
- Bukoyac, M. 1976. Herbicide entry into plants. *In: L.J. Audus et al. (ed.) Herbicides*. Academic Press. London. Physiology, Biochemistry, Ecology 1: 335-364.
- Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M.; Domínguez-Valenzuela, J.; Gonzalez, F.; Medina-Pitalua, J.; De Prado, R. 2008. Resistencia de *Sinapis alba* a inhibidores de la ALS: primer caso en el mundo. *In: XXIX Congreso de la ASOMECEMA*, Tapachula, Chiapas, MX.
- García-Torres, L.; Fernández-Quintanilla, C. 1991. Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Servicio de Extensión Agraria. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, ES. 348 p
- Heap, I. 2011. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. (En Línea). Consultado el 16 de marzo del 2014. Disponible en: <http://www.weedscience.org/summary/home.aspx>.
- Jian, S.; Jin-xin, W.; Hong-jun, Z.; Jun-liang, L.; Sheng-nan, B. 2011. Study on mutations in ALS for resistance to tribenuron-methyl in *Gallium aparine* L. *Agricultural Science in China* 10 (1):86-91.
- Kaloumenos, N.; Dordas, C.; Diamantidis, G.; Eleftherohorinos, I. 2009. Multiple Pro197 substitutions in the Acetolactate synthase of corn poppy (*Papaver rhoeas*) confer resistance to tribenuron. *Weed Sci.* 57: 362-368.
- Kogan, M.; Perez, A. 2003. Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Ediciones Universidad Católica de Chile. Vicerrectoría de Comunicaciones y Extensión. Santiago, CL. 333 p.
- McCourt, J.; Duggleby, R. 2006. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids* 31:173-210.
- Osuna, M.; Fischer, A.; De Prado, R. 2003. Herbicide resistance in *Aster Squamatus* conferred by less sensitive form of acetolactate synthase. *Pest Manag Sci.* 59: 1210-1216.
- Osuna, M.; De Prado, R. 2003. *Conyza albida*: a new biotype with ALS inhibitor resistance. *Weed Research* 43: 221-226.
- Park, K.; Fandrich, L.; Mallory-Smith, C. 2004. Absorption, translocation, and metabolism of propoxycarbazone-sodium in ALS-inhibitor resistant *Bromus tectorum* biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 79:18-24.
- Powles, S.; Yu, Q. 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:317-347.
- Prado, R.; Franco, A. 2004. Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Sci.* 52:441-447.
- Ricotta, J.; Masiunas, J. 1992. Relationship of leaf surface characteristics to acifluorfen tolerance in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) and related species. *Weed Sci.* 40: 402-407.
- Rosario, J.; Cruz-Hipólito, H.; Smeda, R.; De Prado, R. 2010. Chemical Control of White Mustard (*Sinapis alba*, L). 62nd. International Symposium on Crop Protection. Ghent University, Ghent, Belgium. May 18th, 2010.
- Saari L.; Cotterman, J.; Thill, D. 1994. Resistance to acetolactate synthase-inhibitor herbicides. *In: Powles SB, Holtum JAM (Eds) Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*. Lewis, Boca Raton, FL. Pp 83-139.
- Seefeldt, S.; Jensen, J.; Fuerst, E. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technol.* 9: 218-227.
- Singh, B.; Schmitt, G.; Lillis, M.; Hand, J.; Misra, R. 1991. Overexpression of acetohydroxyacid synthase from Arabidopsis as an inducible fusion protein in Escherichia coli. *Plant Physiol.* 97: 657-662.
- Tranel, P.; Wright, T. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science*, 50:700-712.
- Warwick, S., Sauder, C.; Beckie, H. 2005. Resistance in Canadian biotypes of wild mustard (*Sinapis arvensis*) to acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 53: 631-639.
- Xu, X.; Wang, G.; Chen, S.; Fan, C.; Li, B. 2010. Confirmation of Flixweed (*Descurainia sophia*) resistance to tribenuron-methyl, using three different assay methods. *Weed Sci.* 58: 56-60.

