

# Resistencia de variedades de trigo al herbicida imazamox en España

Francisco Jiménez<sup>1</sup>, Antonia Rojano<sup>2</sup>, Nelson Espinoza<sup>3</sup> y Rafael De Prado<sup>2</sup>

Los cultivos clearfield presentan cierta tolerancia, resistencia o insensibilidad a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) como las Imidazolinonas. Esta resistencia ocurre mediante sustituciones aminoacídicas que generan mutaciones en la ALS de biotipos resistentes (resistencia en el sitio de acción). La resistencia, también puede ocurrir fuera del sitio de acción del herbicida, debido a menor penetración y/o translocación, metabolización, secuestro y conjugación del herbicida. El objetivo de este estudio fue evaluar la resistencia a Imazamox de los cultivares de trigo 'Pantera' (Chile) y 'Gazul' (España). Se cultivaron plantas de ambas variedades y se realizaron ensayos de inhibición de actividad de ALS y de dosis-respuesta, calculándose la concentración de herbicida que reduce en 50% la actividad de la ALS ( $I_{50}$ ) y la dosis que reduce el peso fresco en 50%, con respecto al control no tratado ( $ED_{50}$ ). Los valores de  $I_{50}$  fueron 29.06 y 2.25  $\mu\text{M}$ , en tanto que los valores de  $ED_{50}$  fueron 107.70 y 1.63  $\text{g ia ha}^{-1}$ , para Pantera y Gazul, respectivamente. Los valores de  $I_{50}$  y  $ED_{50}$  en Pantera mostraron correlación significativa ( $P < 0.05$ ), lo que sugiere que el mecanismo principal de resistencia en estas variedades de trigo es debido a la expresión de insensibilidad en la enzima ALS.

**Palabras clave:** IMI, trigo, resistencia,  $ED_{50}$ ,  $I_{50}$

## INTRODUCCIÓN

Mediante métodos de mejoramiento clásico, tales como selección por retro cruzamiento con cultivares élites y mutagénesis, se han obtenido cultivares resistentes a herbicidas de la familia imidazolinona o cultivos IMI-resistentes. Esta resistencia es atribuida a una mutación en la enzima acetolactato sintasa (ALS), en el sitio de unión con el herbicida, a pesar de que otros mecanismos de resistencia podrían estar presentes (Tan *et al.* 2005).

Los mecanismos de resistencia a herbicidas comprenden la retención en la superficie de la hoja, alteración de la absorción y translocación, metabolismo a compuestos no tóxicos del herbicida por la planta, e insensibilidad de la enzima diana al herbicida (Powles y Yu 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia del cultivar de trigo Pantera (R) y Gazul (S) mediante estudio de la ALS y en ensayos de dosis respuesta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Herbicida

Los ensayos de dosis respuesta se realizaron con el herbicida Imazamox (Pulsar 40, BASF). En tanto que los estudios enzimáticos (ALS) se realizaron con productos puros (> 98%) suministrados por BASF.

### Material vegetal

El cultivar de trigo ensayado fue desarrollado mediante convenio entre el INIA-Carillanca de Chile y la compañía BASF, y comercializado en Chile (Newhouse *et al.* 1992). Se estudiaron los cultivares 'Pantera' IMI-resistente (R) (Chile) y 'Gazul' sensible (S) (España). Las semillas fueron pregerminadas y colocadas en macetas de 1 litro, conteniendo una mezcla de turba y arena en una relación 1:1, y mantenida en invernadero a temperatura noche/día de 18/27 °C y fotoperiodo de 14/10 h. Los tratamientos se aplicaron cuando las plantas alcanzaron de 3 a 5 hojas de desarrollo.

### Ensayos de dosis-respuesta

Las plantas fueron tratadas con el herbicida Imazamox (Pulsar 40) a las dosis de 0, 40, 80, 120, 160 y 240  $\text{g ia ha}^{-1}$ , utilizando un volumen de 250  $\text{l ha}^{-1}$ . Las plantas se cortaron 21 días después de tratadas, para calcular la dosis efectiva que reduce en un 50% ( $ED_{50}$ ) el peso fresco de los cultivares con respecto a un control no tratado (De Prado *et al.* 2006). El factor de resistencia (FR) se determinó mediante la relación  $ED_{50} (R) / ED_{50} (S)$ . Los datos se ajustaron a un modelo de regresión no lineal (Streibig *et al.* 1993; Seefeldt *et al.* 1995).

<sup>1</sup> Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), República Dominicana.

<sup>2</sup> Universidad de Córdoba, España.

<sup>3</sup> INIA. Carillanca. Temuco. Chile. fjimenez23@hotmail.com

## Ensayo de actividad de la ALS

La actividad ALS se midió como la cantidad formada de acetolactato, después de la conversión de este producto en acetoina por descarboxilación en presencia de ácido (Ray 1984). La extracción de la enzima y los estudios de la actividad enzimática se realizó sobre hojas jóvenes siguiendo la metodología descrita por Calha *et al.* (2007). Los ensayos de actividad de la ALS se realizaron sobre extractos enzimáticos incubados con Imazamox, y se expresaron como la concentración de herbicida necesaria para reducir la actividad ALS en un 50% ( $I_{50}$ ) con respecto al control.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayo de dosis-respuesta ( $ED_{50}$ )

Los datos de peso fresco de los cultivares se ajustaron al modelo de regresión no lineal log-logistic con un nivel de significancia ( $P < 0.01$ ), permitiendo estimar las dosis efectivas que reduce en 50% ( $ED_{50}$ ) el peso fresco de los cultivares tratados (Tabla 1 y Figura 1).

La dosis requerida para reducir el peso fresco en un 50% del cultivar Pantera ( $ED_{50}$ ) fue de 107.7 g ia ha<sup>-1</sup> (Tabla 1). Esta dosis es 2.5 veces la recomendada, lo que muestra alta resistencia. Por el contrario, para Gazul (S) la  $ED_{50}$  fue de 1.63 g ia ha<sup>-1</sup>, lo que muestra un nivel de reducción de masa fresca a dosis muy bajas y por supuesto la sensibilidad del mismo

El factor de resistencia (FR) del cultivar Pantera fue 66.1, indicando que este cultivar requiere 66.1 veces la dosis de cultivar sensible para reducir la masa fresca en un 50% (Tabla 1).

### Ensayo de actividad de la enzima ALS

Los datos para cada uno de los cultivares muestran un ajuste significativo ( $P < 0.05$ ) a la ecuación log-logistic (Tabla 2). Para el cultivar Pantera, la actividad de la enzima ALS se redujo con el aumento de la concentración de Imazamox, mostrando una respuesta sigmoidal (Figura 2). La concentración de herbicida que reduce en 50% la actividad de la enzima ( $I_{50}$ ) de los cultivares Pantera y Gazul fue 29.06 y 2.25  $\mu$ M, y el FR calculado, obtenido de la relación entre el cultivar resistente y sensible ( $I_{50} R / I_{50} S$ ) fue 12.91 en Pantera (Tabla 2).

Los resultados mostraron correlación entre los valores de  $I_{50}$  y la  $ED_{50}$ , lo que explica la reducción de la masa fresca como consecuencia de la inhibición de actividad enzimática en el cultivar Gazul, ya que esta enzima cataliza la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina, los cuales son esenciales para el crecimiento de la planta.

## CONCLUSIONES

Los resultados de la actividad enzimática de la ALS y de dosis respuesta indican un alto nivel de resistencia en el cultivar Pantera, cuya correlación sugiere una mutación en la proteína de enlace con el herbicida.

Tabla 1. Parámetros de la ecuación<sup>1/</sup> usada para calcular la dosis de Imazamox requerida para reducir en un 50% la masa fresca ( $ED_{50}$ ) de los cultivares de trigo (R) y (S).

Cultivars	Respuesta	U	L	b	Pseudo $r^{2\ 3/}$	$ED_{50}$ (SE) <sup>2/</sup>	FR <sup>4/</sup>
Pantera	R	98.80	12.21	6.05	0.97	107.70 (2.013)	66.1
Gazul	S	100.00	6.06	2.63	0.99	1.63 (0.103)	-----

<sup>1/</sup>Ecuación Log-logistic  $Y = L + \{(U-L) / [1 + (x/ED_{50})^b]\}$ , donde Y es la masa fresca, expresada como porcentaje con respecto al control no tratado; x (variable independiente) es la dosis del herbicida Imazamox (g ia ha<sup>-1</sup>), U es el valor máximo de la asíntotas, L es el valor mínimo, b es el punto de inversión de la curva, y  $ED_{50}$  es la dosis efectiva requerida para reducir en 50 % la masa fresca de los cultivares. Los datos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal. Los datos representan el promedio de diez repeticiones. <sup>2/</sup> SE= error estándar. <sup>3/</sup> coeficiente de determinación. <sup>4/</sup> FR = factor de resistencia =  $ED_{50} R / ED_{50} S$ .

Tabla 2. Parámetros de la ecuación utilizada<sup>1/</sup> para calcular la concentración de Imazamox que reduce en 50% la actividad enzimática ( $I_{50}$ ).

Cultivar	Respuesta	U	L	b	Pseudo $r^{2\ 3/}$	$ED_{50}$ (SE) <sup>2/</sup>	FR <sup>4/</sup>
Pantera	R	101.53	14.73	0.48	0.98	29.06(3.65)	12.91
Gazul	S	100.32	5.86	1.09	0.98	2.25 (0.16)	-----

<sup>1/</sup>Ecuación Log-logistic  $Y = L + \{(U-L) / [1 + (x/I_{50})^b]\}$ , donde Y es la actividad enzimática, expresada como porcentaje con respecto al control no tratado; x (variable independiente) es la concentración Imazamox ( $\mu$ M), U es el valor máximo de la asíntotas, L es el valor mínimo, b es el punto de inversión de la curva, e  $I_{50}$  es la concentración de Imazamox requerida para reducir en 50% la actividad enzimática de la ALS. Los datos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal. <sup>2/</sup>SE= error estándar. <sup>3/</sup>coeficiente de determinación. <sup>4/</sup>FR = factor de resistencia =  $I_{50} R / I_{50} S$ .

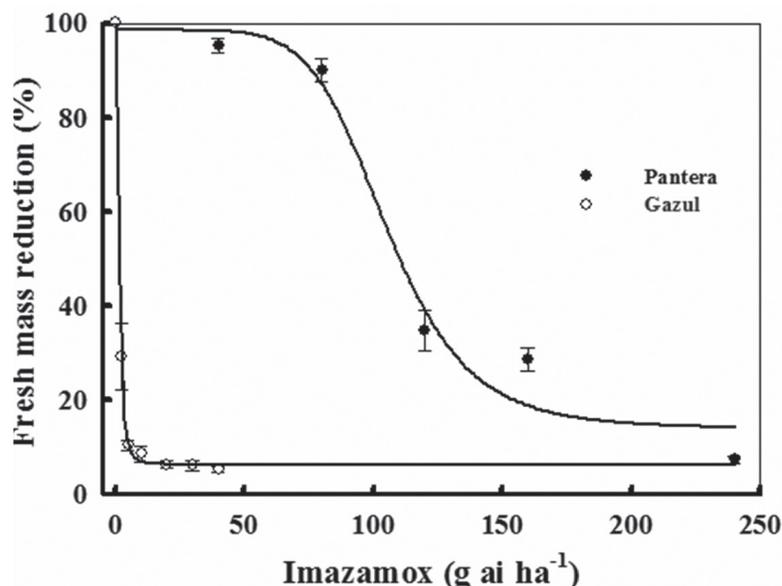


Figura 1. Dosis-respuesta (ED50) en dos cultivares de trigo tratados con Imazamox. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  SE (n = 10).

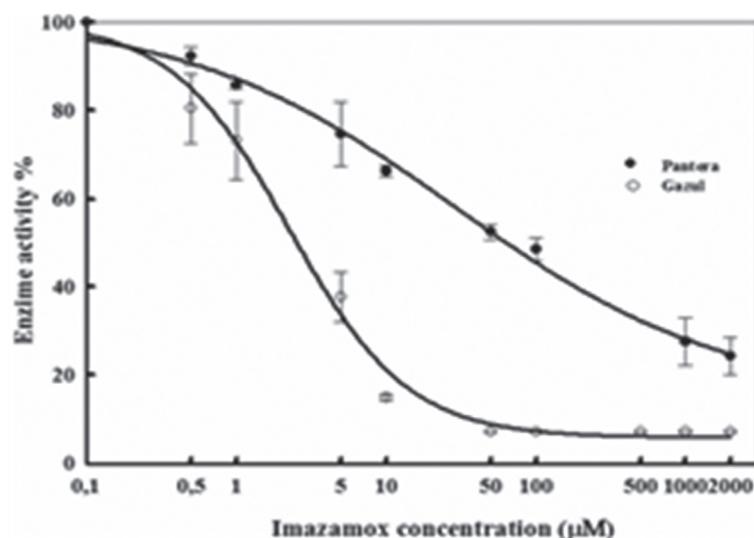


Figura 2. Actividad enzimática incubada a diferentes concentraciones de Imazamox. Ecuación en tabla 2.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencias e Innovación de España, a través del proyecto AGL2010-16774, el Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) y el Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF). Se agradece la colaboración técnica de Rafael A. Roldán-Gómez.

## LITERATURA CITADA

Calha, I.; Osuna, M.; Serra, C.; Moreira, I.; De Prado, R.; Rocha F. 2007. Mechanism of resistance to bensulfuron-methyl in *Alisma plantago-aquatica* biotypes from Portuguese rice paddy fields. *Weed Research* 47(3):231-240

De Prado, R.; Cruz-Hipólito, H.; Martínez-Cordón, M. 2006. Uso de herbicidas en olivicultura. *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura* 297: 419-431.

Newhouse, K.; Smith, W.; Starrett, M.; Schaefer, T.; Singh, B. 1992. Tolerance to Imidazolinone herbicides in wheat. *Plant Physiology*. 100:882-886

Powles, S.; Yu, Q. 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*. 61:317-347.

Ray, T. 1984. Site of Action of Chlorsulfuron. Inhibition of Valine and Isoleucine Biosynthesis in Plants. *Plant Physiology* 75: 827-831.

Seefeldt, S.; Jensen, J.; Fuerst, E. 1995. Log-logistic analysis of dose-response relationships. *Weed Technology* 9:218-227

Streibig, J.; Kudsk, P. 1993. *Herbicide Bioassays*. CRC Press. Boca Ratón, FL. 270 p.

Tan, S.; Evans, R.; Dahmer, M.; Singh B.; Shaner, D. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 61:246-257.

