



**Alfredo Manicardi^{1*},
Laura Scarabel², Josep
Maria Llenes³, José
Maria Montull³, Maria
Dolores Osuna⁴, Joel
Torra Farré⁴ y Andrea
Milani²**

¹ Departamento de Ciencias
y Ingeniería Forestal y
Agrícola, Universidad de
Lleida.

² Instituto para la
Protección Sostenible
de Plantas (IPSP), CNR,
Legnaro, Italia.

³ Unidad de Ciencia de las
Malas Hierbas del Servicio
de Protección de Plantas,
DARP, Generalitat de
Catalunya, Lleida.

⁴ Departamento de
Protección de Plantas,
Centro de Investigación
Científica y Tecnológica de
Extremadura (CICYTEX),
Badajoz.

*alfredo.manicardi@udl.cat

Origen de la resistencia a los inhibidores de ALS en poblaciones europeas de *Amaranthus palmeri*

Poblaciones resistentes de *Amaranthus palmeri* a inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) están presentes en España e Italia y ponen en riesgo la producción de los cultivos de verano. El origen evolutivo de la resistencia sigue siendo desconocido. Aunque se ha caracterizado los mecanismo de resistencia herbicida, se desconocen sus orígenes evolutivos. En este estudio se ha evaluado la respuesta de once poblaciones de *A. palmeri* a los inhibidores de ALS, y se utiliza un método genético basado en estudio de haplotipos para determinar origen y distribución de la resistencia. Todas las poblaciones ensayadas eran resistentes a tifensulfurón-metil (THIF) y imazamox (IMA). La mutación en el alelo Trp-574-Leu del gen ALS era la causa principal de la resistencia cruzada en ambos países. En dos poblaciones españolas también se encontraron alelos mutantes en 376-Glu y 197-Thr.). Los análisis genéticos revelaron diferentes grupos que comparten el mismo evento evolutivo (haplotipos) en cada país. Las poblaciones españolas e italianas tienen historias evolutivas diferentes y los eventos de introducción en cada país son independientes. La resistencia a los inhibidores de ALS se propagó a cortas y largas distancias mediante la dispersión de semillas. El mayor número y diversidad genética entre los haplotipos españoles indican invasiones recurrentes.

Palabras clave: *Amaranthus palmeri*, inhibidores de la ALS, análisis de haplotipos, origen de la resistencia, difusión de la resistencia.

Amaranthus palmeri (*A. palmeri*) S. Wats es una mala hierba diploide que pertenece a la familia de las Amaranthaceae nativa del desierto de Sonora y del suroeste de Estados Unidos (Ehleringer, 1983). Es una especie invasora en Europa, capaz de reducir drásticamente la producción en los cultivos de verano como maíz (*Zea mays*) y soja (*Glycine max*) gracias a su tamaño, alta producción de semillas y habilidad para adaptarse a nuevos hábitats (Ward y col., 2013).

Los inhibidores de la *Acetolactato sintasa* (ALS) son herbicidas comúnmente utilizados en post-emergencia para controlar malezas de hoja ancha como *A. palmeri* (Yu & Powles, 2014). Estos compuestos inhiben la actividad enzimática que lleva a la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina y isoleucina, causando la muerte de la planta. La resistencia a los inhibidores de la ALS en esta especie está causada por mutaciones no sinónimo (SNPs) que llevan a cambios aminoacídicos impidiendo al herbicida de llegar al sitio activo de la enzima o cambiando la conformación del mismo (Duggleby y col., 2008).

Poblaciones de *A. palmeri* resistentes a los inhibidores de la ALS se ha reportado en distintos países de Europa, entre ellos España y Italia. En Italia se ha reportado biotipos resistentes a dosis de campo de THIF y IMA se ha confirmado la presencia la mutación Trp-574-Leu (Milani y col., 2021). En España, la presencia de *A. palmeri* se va extendiendo en el país, con cuatro comunidades autónomas afectadas y nuevas poblaciones resistentes detectadas. Hasta ahora su presencia e concentra sobre todo en margen de carretera, donde no hay un historial de presión de selección con este modo de acción, aunque se ha confirmado la presencia de biotipos resistentes a THIF y mutaciones en tres alelos de la ALS: 197, 376 y 574 (Torra y col., 2020). Se ve indispensable comprender la dinámica de invasión y la propagación de alelos resistentes a ALS en Europa para poder controlar esta especie de manera eficaz.

El análisis de haplotipos (un grupo de variantes genéticas físicamente

vinculadas que se heredan juntas) es una herramienta potente para poder establecer si una mutación puntual compartida entre múltiples poblaciones surgió durante un único proceso de selección o si apareció a través de eventos de mutación independientes. Existen muchos protocolos para obtener haplotipos, pero para este estudio se crearon por secuenciación Sanger a partir de productos de PCR alelo-específica (AS-PCR) (Rudi y col., 2006)

El objetivo de este estudio es la caracterización de los patrones de resistencia a THIF e IMA en poblaciones de *A. palmeri* de Italia y España, identificar los mecanismos de resistencia involucrados, y analizar la historia evolutiva de las poblaciones que llevan la mutación Trp-574-Leu en ALS.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Once poblaciones de *A. palmeri* (Tabla 1), cuatro de Italia y siete de España, fueron incluidas en este estudio. Una población de Carolina del Norte (EE. UU.) se utilizó como control negativo (Chandi y col., 2012). Para cada población, se recolectaron semillas de al menos 20 plantas hembra maduras, seleccionadas al azar en el sitio de muestreo, limpiadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta el inicio de los experimentos.

Tratamiento herbicida

Se realizaron bioensayos para determinar la sensibilidad a THIF e IMA, excepto para IT-1, IT-2 y IT-3, que fueron estudiados previamente (Milani y col., 2021). Se sembraron en bandejas de aluminio con turba (Scarabel y col., 2007). Al estadio de 4-5 hojas, las plantas se trataron con THIF (Harmony 50 SX, DuPont™, 500 g a.i. 1 kg⁻¹) e IMA (Tuareg®, DuPont™, 40 g a.i. L⁻¹) 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 y 20 plantas por bandeja). Cuatro semanas después de la aplicación, se determinó el porcentaje de plantas sobrevivientes y se recolectó el material vegetal para extraer ADN, estudiar los mecanismos de resistencia y los haplotipos.

Extracción de ADN

Se recolectaron muestras frescas de hojas de plantas sobrevivientes a herbicidas para cada población. Todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta que se extrajo el ADN genómico utilizando el protocolo de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) adaptado para tubos de centrifugación (Milani y col., 2021) La concentración y calidad del ADN se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Tabla 1. Poblaciones de *Amaranthus palmeri* incluidas en el estudio.

Año de cosecha	ID	País	Localidad	Provincia	Sitio de mostreo
2018	IT-1	Italia	Camposampiero	Veneto	Soja
2019	IT-2	Italia	Curtarolo	Veneto	Soja
2019	IT-3	Italia	Mira	Veneto	Soja
2020	IT-4	Italia	Lonato del Garda	Veneto	Maíz
2019	ES-1	España	La Portella	Cataluña	Maíz
2019	ES-2	España	Torrefasneda	Extremadura	Maíz
2019	ES-3	España	Torrefasneda	Extremadura	Maíz
2017	ES-4	España	Benavent de Segrià	Cataluña	Maíz
2020	ES-5	España	Ulldacona	Cataluña	Margen de carretera
2016	ES-6	España	Lleida	Cataluña	Margen de carretera
2016	ES-7	España	Binéfar	Aragón	Margen de carretera

Creación de haplotipos por AS-PCR

Para detectar la mutación 574-Leu en *ALS* y crear las bases de datos para lo estudio de haplotipos, primero se llevó a cabo un ensayo CAPS para seleccionar solo las plantas heterocigotas por la mutación 574-Leu (Patzoldt & Tranel, 2007). Se extrajo ADN de plantas que sobrevivieron al tratamiento con imazamox. Se obtuvieron productos de PCR de 1.394 pb utilizando los primers Caps_F1 y 3UTR_R1. Las PCR se llevaron a cabo siguiendo las condiciones relatadas por Manicardi y col. (2023). Después, los productos de PCR se incubaron 5 µL a 37 °C durante 1 hora con 0.1 µL de MnlI (MfeI) (10 U/µL) (Thermo Scientific, Waltham, US), 9 µL de agua y 1 µL de Buffer G 10X. Las muestras digeridas se corrieron en un gel de agarosa al 1%: las muestras no cortadas se consideraron como genotipo homocigoto salvaje (WT), mientras que las muestras cortadas dos veces (dos bandas de aproximadamente 514 y 880 pb, respectivamente) se consideraron como genotipo homocigoto mutante, y las muestras cortadas una vez (tres bandas de 1.394, 880 y 514 pb, respectivamente) como mutantes heterocigotos 574-Leu/Trp. Las muestras heterocigotas se amplificaron por AS-PCR, se purificaron y se secuenciaron por Secuencia Sanger. Los SNPs se visualizaron con NovoSNP. Cada secuencia fue revisada y editada manualmente y se alinearon al gen de referencia de *Amaranthus tuberculatus* usando MEGAX para obtener un árbol de Neighbor-Joining (NJ) (Kumar y col., 2018). Los archivos se exportaron en formato NEXUS y se formatearon para incluir las secuencias de haplotipos, su distribución entre poblaciones y la posición geográfica de cada población. Se utilizó PopART para inferir la red TCS de haplotipos y crear mapas de diversidad de haplotipos georreferenciados. Las secuencias idénticas del alineamiento fueron identificadas y visualizadas con PopART.

Amplificación parcial de ALS

Para para amplificar la región ALS CAD y detectar eventuales otras mutaciones en aminoácidos de Ala122

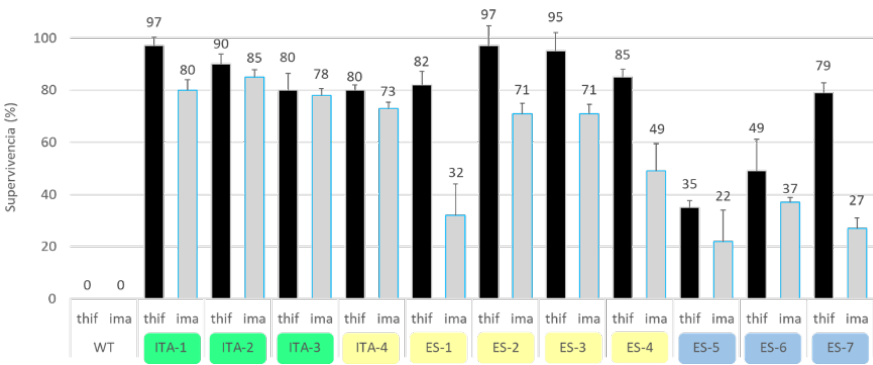


Figura 1. Porcentaje de plantas de *A. palmeri* que sobrevivieron a los tratamientos con tifensulfurón-metil (THIF, columnas negras) e imazamox (IMA, columnas grises); se muestran los valores medios de los dos experimentos (réplicas); las barras verticales representan el error estándar. 'WT' es la población de referencia susceptible. Las poblaciones recolectadas en campos de soja se etiquetan en verde, en campos de maíz en amarillo, mientras que las recolectadas en la cuneta se muestran en azul.

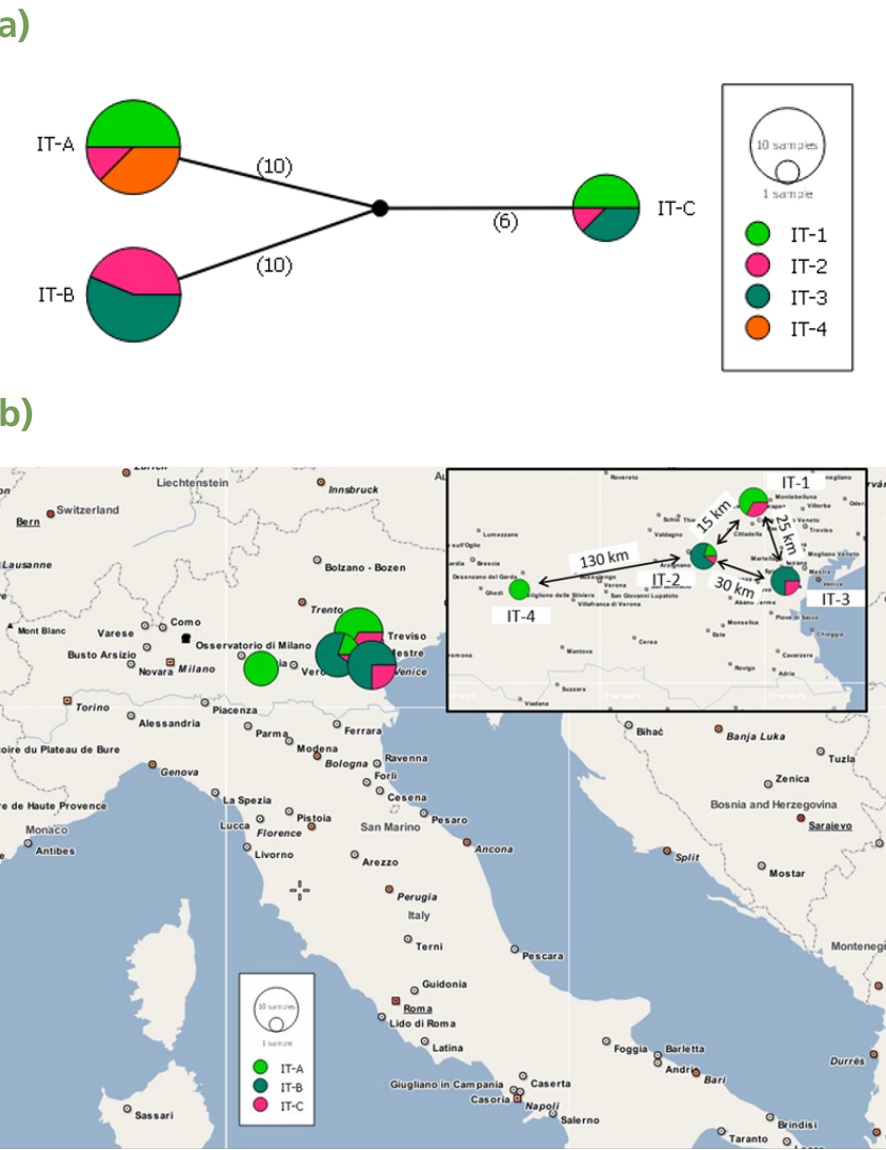


Figura 2. (a) Red de haplotipos ALS TCS obtenida después del análisis de las muestras italianas. Cada círculo representa un haplotipo diferente, y el tamaño del círculo representa la proporción de individuos que portan el mismo haplotipo. Los colores se refieren a diferentes poblaciones. Los círculos negros indican haplotipos intermedios faltantes (no observados). Los pasos mutacionales se informan entre paréntesis. (b) Mapa georreferenciado de la diversidad de haplotipos obtenido después del análisis de las muestras italianas. Cada color corresponde a un haplotipo diferente. La posición de las poblaciones cercanas se aproximó para evitar la superposición de los gráficos circulares; las distancias entre las poblaciones se indican en kilómetros.

a Arg377 se utilizaron los primers 3F y 4R. Las condiciones de PCR que se utilizaron las reportadas por Manicardi y col. (2023). Una vez purificados, los productos de PCR fueron secuenciados por Sanger por BMR Genomics (Padua, Italia), visualizados con FinchTV 1.4.0 y alineados con MEGA X

Resultados y discusión

Resistencia a los inhibidores de ALS

Siete poblaciones españolas y cuatro italianas de *A. palmeri* son resistentes a los inhibidores de ALS (Figura 1). Una población española tiene la misma susceptibilidad del WT. Cuatro poblaciones mostraron resistencia cruzada a ambos herbicidas, y entre ellas, las recolectadas en campos cultivados (ES-2, ES-3, ITA-1, ITA-2, ITA-3 y ITA-4) presentaron tasas de supervivencia más altas que las provenientes de margen de carreteras (ES-5 y ES-6). Esto sugiere que la presión de selección impuesta por el uso frecuente de herbicidas en los cultivos aumenta la frecuencia de plantas resistentes de *A. palmeri*. Las otras tres poblaciones resistentes (ES-1, ES-4 y ES-7) se caracterizaron por una alta tasa de supervivencia a THIF y baja a IMA, indicando la presencia de plantas resistentes a THIF además de las plantas con resistencia cruzada. Los diferentes perfiles de resistencia observados entre las poblaciones coinciden con las mutaciones detectadas en el sitio objetivo. La mutación Trp-574-Leu se encontró en casi todas las poblaciones excepto en una (ES-6). En las poblaciones italianas fue el único mecanismo de resistencia encontrado. En las españolas se rescontraron dos mutaciones más: Pro-197-Thr y Asp-376-Glu (ES-1 y ES-4), esta última se reporta por primera vez en poblaciones europeas de *A. palmeri*. La selección de poblaciones de *A. palmeri* en España que albergan diferentes alelos mutantes de ALS debe estar relacionada con los diversos contextos ambientales en los que fueron recolectadas.

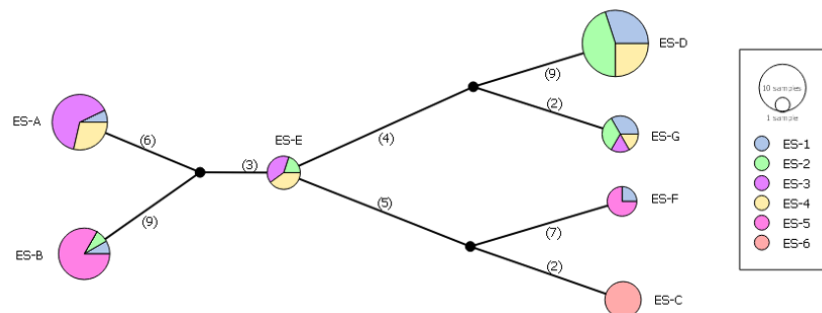
Origen y difusión de los haplotipos 574-leu

En las poblaciones españolas se observaron dos patrones de disper-

sión: un patrón de dispersión a corta distancia y otro a larga distancia. La presencia del mismo haplotipo dentro de poblaciones localizadas a una distancia corta de aproximadamente 30 km puede explicarse por la dispersión de semillas mediada por maquinaria agrícola. Este es el caso de las poblaciones italianas y de las españolas ES-1 y ES-4. La dispersión de semillas mediada por maquinaria agrícola no es factible para la dispersión a larga distancia observada en las poblaciones italianas IT-1 y IT-2 y por las españolas ES-1 y ES-3, o ES-2 y ES-4. Es poco probable que la misma mutación haya evolucionado de manera independiente en haploti-

pos WT idénticos, al menos para las poblaciones europeas de *A. palmeri* descritas aquí. Esto se debe a que *A. palmeri* no es nativa de Europa y principalmente se reporta como una especie exótica ocasional fuera del hábitat agrícola, con poblaciones normalmente muy pequeñas en comparación con su área de distribución nativa. Además, no hay historial de presión de selección de herbicidas sobre esta especie en el continente. La alta diversidad observada entre poblaciones muy cercanas respalda la hipótesis de una introducción independiente y repetida de biotipos resistentes desde fuera de España. Por ejemplo, ES-2 y ES-3 recolectadas en

a)



b)

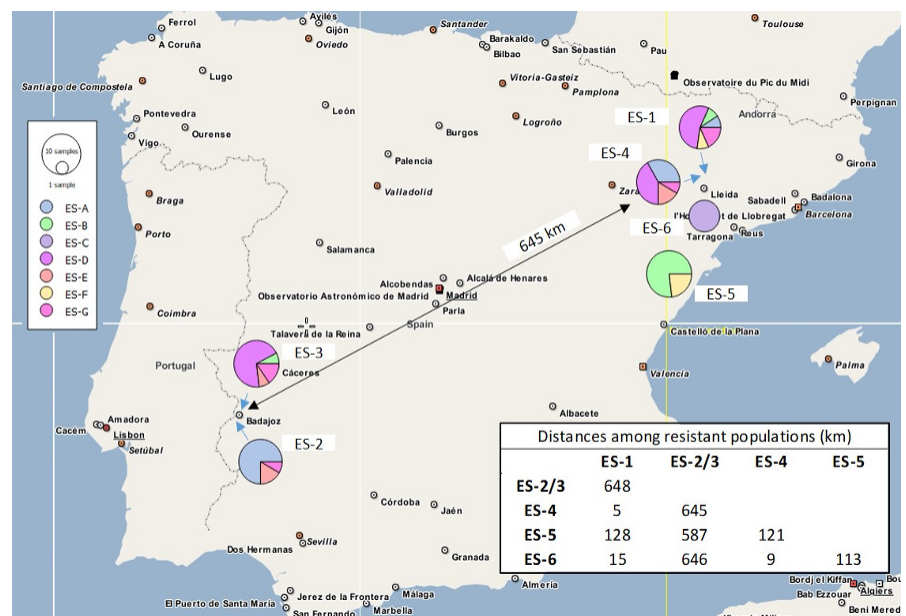


Figura 3. (a) La red de haplotipos ALS TCS se obtuvo después del análisis de muestras españolas. Cada círculo representa un haplotipo diferente, y el tamaño del círculo representa la proporción de individuos que portan el mismo haplotipo. Los colores se refieren a diferentes poblaciones. Los círculos negros indican haplotipos intermedios faltantes (no observados). Los pasos mutacionales se informan entre paréntesis. (b) Mapa georreferenciado de la diversidad de haplotipos obtenido después del análisis de muestras españolas. Cada color corresponde a un haplotipo diferente. La posición de las poblaciones cercanas se aproximó para evitar la superposición de los gráficos circulares; las distancias entre las poblaciones resistentes se indican en kilómetros. Las poblaciones ES-2 y ES-3 se recolectaron de campos diferentes dentro de un radio de menos de 5 km.

la misma área (menos de un radio de 5 km) mostraron haplotipos diferentes, mientras que ES-5 y ES-6 comparten un único haplotipo mutante. Dado que *A. palmeri* es una especie de polinización cruzada, se esperaba que las secuencias obtenidas por AS-PCR de 574-Trp fueran genéticamente muy diferentes. En cambio, resultaron ser bastante conservadas.

Conclusiones

Por primera vez, se estudia la base genética y la historia evolutiva de la resistencia a herbicidas inhibidores de ALS en *A. palmeri* en Europa. Nuestros datos revelaron que la resistencia depende un solo alelo mutante ALS en Italia (574-Leu), y a tres alelos mutantes distintos en España (197-Thr, 376-Glu, 574-Leu). Se requieren in-

vestigaciones adicionales para detectar posibles otros mecanismos.

Los análisis genéticos revelaron que las poblaciones de *A. palmeri* resistentes a ALS fueron introducidas de manera independiente en Italia y España, lo que resultó en diferentes haplotipos en ambos países. Se supone que maquinaria agrícola y material contaminado de piensos causaron la dispersión de semillas a corta y larga distancia, respectivamente. Dada la alta tasa de supervivencia de las semillas de *Amaranthus* a la digestión animal, se recomienda una evaluación cuidadosa de fuentes económicas de alimento animal si el cultivo fuente es susceptible a infestaciones. El método de haplotipo propuesto en este estudio ofrece un enfoque rentable para determinar

posibles conexiones genéticas entre poblaciones recién descubiertas y aquellas conocidas previamente.

Dado que *A. palmeri* es altamente invasivo, es crucial implementar estrategias de manejo efectivas en ambos países para limitar su establecimiento. Esto incluye tomar precauciones especiales para prevenir la introducción de *A. palmeri* a través de granos contaminados o alimento animal, y llevar a cabo un monitoreo preciso para erradicar rápidamente las plantas y prevenir su proliferación. El reciente descubrimiento de biotipos resistentes al glifosato en los márgenes de carreteras en España enfatiza la importancia de adoptar tácticas integradas de control de malezas para reducir la presión de selección de herbicidas.

Bibliografía

- ! Chandi, A.; Milla-Lewis, S. R.; Giacomini, D.; Westra, P.; Preston, C.; Jordan, D. L.; York, A. C.; Burton, J. D. & Whitaker, J. R. (2012). Inheritance of Evolved Glyphosate Resistance in a North Carolina Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) Biotype. *International Journal of Agronomy*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/176108>
- Duggleby, R. G.; McCourt, J. A. & Guddat, L. W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 46, Issue 3, pp. 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* 57:1, 57(1), 107–112. <https://doi.org/10.1007/BF00379568>
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35 (6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- 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*. <https://doi.org/10.1002/ps.7690>
- Milani, A.; Panozzo, S.; Farinati, S.; Iamónico, D.; Sattin, M., Loddó, D. & Scarabel, L. (2021a). Recent discovery of *Amaranthus palmeri* S. Watson in Italy: Characterization of als-resistant populations and sensitivity to alternative herbicides. *Sustainability (Switzerland)*, 13 (13). <https://doi.org/10.3390/su13137003>
- Patzoldt, W. L. & Tranel, P. J. (2007). Multiple ALS Mutations Confer Herbicide Resistance in Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Science*, 55 (5), 421–428. <https://doi.org/10.1614/WS-06-213.1>
- Rudi, H.; Gylder, K. E.; Rognli, O. A. & Rudi, K. (2006). Direct haplotype-specific DNA sequencing. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 36 (3), 253–257. <https://doi.org/10.1080/10826060600716687>
- 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*, 47 (6), 527–533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2007.00600.x>
- Torra, J.; Royo-Esnal, A.; Romano, Y.; Osuna, M. D.; León, R. G. & Recasens, J. (2020). *Amaranthus palmeri* a new invasive weed in Spain with herbicide resistant biotypes. *Agronomy*, 10 (7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070993>
- Ward, S. M.; Webster, T. M. & Steckel, L. E. (2013). Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*): A Review . *Weed Technology*, 27 (1), 12–27. <https://doi.org/10.1614/WT-D-12-00113.1>
- Yu, Q. & Powles, S. B. (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Management Science*, 70 (9), 1340–1350. <https://doi.org/10.1002/ps.3710>