

# Infección de biotipos de garranchuelo susceptibles y resistentes a un herbicida inhibidor de ALS por un hongo causante de carbón

## Infection of large crabgrass biotypes susceptible and resistant to an ALS-inhibiting herbicide by a smut fungus

M. Teresa Mas<sup>1,\*</sup>, Maria Arias-Martin<sup>2</sup>, M. Concepción Escorial<sup>2</sup>,  
Íñigo Loureiro<sup>2</sup> & Antoni M.C. Verdú<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, Universitat Politècnica de Catalunya, Castelldefels, Barcelona, España

<sup>2</sup> Departamento de Protección Vegetal, Centro Nacional Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA,CSIC), Madrid, España

(\*E-mail: maite.mas@upc.edu)

<https://doi.org/10.19084/rca.35066>

Recibido/received: 2024.01.15

Aceptado/accepted: 2024.02.28

### RESUMEN

El amplio uso de herbicidas ha contribuido a la evolución de la resistencia en muchas especies de malas hierbas, entre ellas *Digitaria sanguinalis* (DIGSA) una gramínea importante como arvense que presenta biotipos resistentes a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS). En el marco de la dinámica eco-evolutiva en los agroecosistemas es importante prestar atención a las interacciones ecológicas, como por ejemplo las que se dan entre plantas y patógenos, puesto que podrían afectar de forma distinta a biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a herbicidas. Una de estas interacciones bióticas es la que se establece entre DIGSA y *Ustilago syntherismae*, hongo cuya infección puede llegar a evitar la producción de semilla en las plantas. Se ha llevado a cabo un experimento en el que se han puesto en contacto teliósporas del hongo con semillas de biotipos R y S de DIGSA, aplicando vacío, con el fin de evaluar su infección por el hongo. Las semillas germinaron en placas de Petri a 20°C 12h oscuridad / 30°C 12h luz y las plántulas fueron analizadas 10 días después. Se transparentaron, tiñeron y observaron al microscopio óptico para detectar la infección sistémica. La proporción de plántulas infectadas se sometió a un análisis estadístico. Los resultados mostraron que el porcentaje medio de infección fue significativamente mayor en el biotipo R (98,4 %) que en el S (93,7 %). Son necesarios más estudios para evaluar la posibilidad de que la resistencia al herbicida pueda penalizar la aptitud biológica en la interacción planta-patógeno.

**Palabras clave:** Control biológico, patógeno sistémico, monocíclico, maleza

### ABSTRACT

The widespread use of herbicides has contributed to the evolution of resistance in many weed species, including *Digitaria sanguinalis* (DIGSA), a grass important as weed that presents presents biotypes with different resistance mechanisms to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides. Within the framework of eco-evolutionary dynamics in agroecosystems, it is important to pay attention to ecological interactions, such as those between plants and pathogens, since they could affect herbicide-resistant (R) and herbicide-susceptible (S) biotypes differently. One of these biotic interactions is the one established between DIGSA and *Ustilago syntherismae*, a fungus whose infection can prevent seed production in plants. An experiment has been carried out in which teliospores of the fungus have been placed in contact with seeds of R and S biotypes of DIGSA, applying a vacuum, in order to evaluate their infection by the fungus. The seeds were germinated in Petri dishes at 20°C 12h darkness / 30°C 12h light. After 10 days, the seedlings were cleared, stained and observed under an optical microscope to detect the systemic infection. The proportion of infected seedlings was subjected to statistical analysis. The results showed that the mean percentage of infection was significantly higher in the R biotype (98.4%) than in the S biotype (93.7%). Further studies are necessary to evaluate the possibility that herbicide resistance may have fitness costs in the plant-pathogen interaction.

**Keywords:** Biological control, systemic pathogen, monocyclic, weed

## INTRODUCCIÓN

El amplio y exitoso uso de herbicidas sintéticos durante los últimos 70 años ha supuesto una intensa presión de selección que ha conllevado que cientos de especies de malas hierbas presenten resistencia (Gaines *et al.*, 2020). De hecho, en la actualidad se conocen malas hierbas resistentes a los principales modos de acción de los herbicidas (Délye *et al.*, 2013). *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. es una mala hierba cosmopolita muy frecuente en cultivos de verano, de la cual se conocen varias poblaciones resistentes a herbicidas (Aceres-Berazain, 2022).

Las interacciones bióticas que se establecen entre plantas y patógenos o insectos fitófagos representan un escenario interesante para poder estudiar el fenómeno de la resistencia a herbicidas desde la dinámica eco-evolutiva (Cousens & Fournier-Level, 2018), pero son escasos (Vila-Aiub, 2019). Se trata de dos factores (el organismo patógeno y los herbicidas) que pueden promover cambios en las poblaciones de la mala hierba de distinta índole, pero que, por lo menos en parte, dependerán de la capacidad que tengan las plantas de contrarrestar la entrada del hongo y del herbicida. En 2004, en Caldes de Montbui (Barcelona), se encontraron plantas de *D. sanguinalis* que presentaban carbón reemplazando las espiguillas; se trata del hongo patógeno *Ustilago syntherismae* (Schwein.) Peck (Mas *et al.*, 2006), capaz de infectarlas en fase de plántula (Mas & Verdú, 2014).

El objetivo del trabajo fue conocer y comparar la susceptibilidad a la infección por el patógeno *U. syntherismae* en plántulas de *D. sanguinalis* de dos biotipos distintos, uno susceptible a los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa y otro resistente a este tipo de herbicidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las teliósporas de *U. syntherismae* se obtuvieron en un experimento realizado en invernadero en verano de 2022 utilizando espiguillas y soros de plantas recolectadas en 2021 en Torre Marimon (Caldes de Montbui, Barcelona).

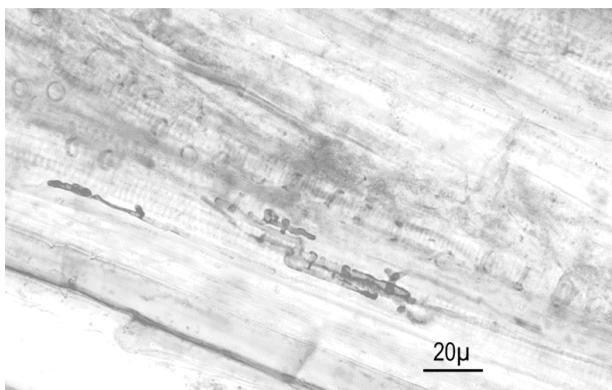
Las espiguillas de DIGSA que se infectaron con dichas teliósporas se obtuvieron multiplicando dos biotipos cedidos por Christophe Délye. Inicialmente las del biotipo resistente (DIGSA-C008) se recolectaron en un campo de maíz cerca de Saint Georges de Pointindoux, al Sur de Nantes (Francia), y las del biotipo susceptible (DIGSA-SF) de un campo de soja cerca de Dijon (Francia) (C. Délye, comunicación personal).

Las espiguillas y las teliósporas se pusieron en contacto mediante vacío, en una suspensión de teliósporas en solución nutritiva completa para plantas, siguiendo el protocolo propuesto por Mas & Verdú (2014). Se dispusieron en placas de Petri humedecidas con la misma suspensión de teliósporas a temperatura ambiente (25°C) en semioscuridad durante 30h, y posteriormente se colocaron en una cámara en condiciones de 12h a 20°C en oscuridad /12h a 30°C con luz. A medida que se observó la protusión de la radícula las semillas germinadas se transfirieron, en grupos de 20-25, a nuevas placas de Petri humedecidas con una suspensión de teliósporas preparada con 48h de anterioridad e incubada en las mismas condiciones de temperatura e iluminación. Cada una de estas placas constituyó una unidad experimental. Pasados 10 días, las plántulas de transparentaron, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico siguiendo la metodología de Mas & Verdú (2014).

Los datos obtenidos fueron el número de plántulas de *D. sanguinalis* infectadas, con hifas de *U. syntherismae* visibles en el mesocótilo y/o en el meristemo apical caulinar, respecto al número de plántulas de cada unidad experimental. Estos datos se analizaron con un modelo lineal generalizado de la distribución binomial considerando un solo factor de variación: el biotipo de *D. sanguinalis*. Los parámetros se estimaron con la función complementaria (link) logit por máxima verosimilitud restringida; el cociente entre la deviancia y los grados de libertad se utilizó para ajustar todos los estadísticos con el fin de evitar sobredispersión. Las medias estimadas de los dos niveles del factor, resistentes a los inhibidores de la ALS (R) o susceptibles (S) se compararon con test de Tukey. El procedimiento GENMOD del paquete estadístico SAS (SAS, 2013) se empleó tanto para conocer la significación del factor como para comparar las medias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general el desarrollo de las plántulas, dispuestas en 34 placas de Petri, fue el adecuado para permitir el procesamiento y la observación de 563 plántulas. En la Figura 1 se muestra el aspecto de una preparación microscópica de una plántula infectada con el micelio teñido, en visión longitudinal. También son visibles los refuerzos de la pared secundaria de los vasos xilemáticos.



**Figura 1** - Aspecto microscópico de las hifas de *Ustilago syntherismae*, teñidas intensamente, orientadas paralelamente a los vasos xilemáticos con refuerzos anillados y espiralados de lignina, en una plántula de *Digitaria sanguinalis*.

El conjunto de las plántulas resultó ser altamente susceptible a la infección por *U. syntherismae* en las condiciones empleadas, extremadamente favorables para el hongo. Sólo 21 de las 563 plántulas observadas no presentaban hifas. El porcentaje de plántulas infectadas obtenido superó en un 43%

al encontrado por Mas & Verdú (2014) siguiendo el mismo protocolo de inoculación, crecimiento y procesamiento de plántulas, realizado con semillas y teliósporas recolectadas en Torre Marimón en 2009. En la Tabla 1 se muestran los parámetros del análisis estadístico de la proporción de plántulas infectadas.

El factor biotipo fue muy significativo y las medias estimadas de los dos niveles del factor, R y S, se separaron significativamente ( $P < 0.05$ ) a pesar de ser similares.

De los resultados obtenidos destaca la elevada proporción de plántulas infectadas, algo prometedor de cara a un posible control biológico de estas poblaciones. La población resistente a los herbicidas inhibidores de la ALS (R, DIGSA-C008) se infectó, en promedio, un 6% más que el biotipo susceptible a estos herbicidas, por lo que no puede descartarse que la mencionada resistencia reduzca la capacidad reproductiva (fitness) de ese biotipo si entra en contacto con el hongo.

Que una planta esté infectada es el primer paso para que el hongo transforme las inflorescencias en soros que contengan teliósporas, pero no en todas las plantas la esterilización es completa, puesto que se conocen fenotipos que producen teliósporas y espiguillas y también plantas infectadas asintomáticas (Mas & Verdú, 2020). Por lo tanto, son necesarios experimentos que incluyan el desarrollo de plantas reproductivas para completar la evaluación de la penalización en la aptitud biológica que pueda comportar la resistencia al herbicida en presencia del patógeno.

**Tabla 1** - Análisis de la proporción de plántulas de *Digitaria sanguinalis* infectadas por *Ustilago syntherismae* contemplando el biotipo de *D. sanguinalis* como fuente de variación, en la parte superior de la tabla. Estimación de las medias de los dos niveles del factor: R: biotipo resistente a los herbicidas inhibidores de la ALS, y S: biotipo susceptible a los mismos herbicidas, en la parte inferior de la tabla

Fuente de variación	g.l. del numerador	g.l. del denominador	Valor F	P > F	Chi-q	P > Chi-q
Biotipo	1	32	7.54	0.0098	7.54	0.0060
	Niveles	Media	Intervalo de confianza a $P=0.05$			
	R	0.9839 A	(0.9590, 0.9938)			
	S	0.9365 B	(0.8948, 0.9624)			

Medias seguidas de la misma letra no se consideran diferentes según el test de Tukey a  $P < 0.05$ .

## CONCLUSIONES

Las plántulas del biotipo resistente a los herbicidas se infectaron, por término medio, un 6% más que las plántulas del biotipo susceptible. Es posible, pues, que la aptitud reproductiva del biotipo resistente se vea penalizada en la interacción con el patógeno.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación, PID2022-136920OR-C43/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Areces-Berazain, F. (2022) - *Digitaria sanguinalis* (large grabgrass). *CABI compedium datasheet*.  
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/18916>
- Cousens, R.D. & Fournier-Level, A. (2018) - Herbicide resistance costs: what are we measuring and why? *Pest Management Science*, vol. 74, n. 7, p. 1539-1546. <https://doi.org/10.1002/ps.4819>
- Délye, C.; Jasieniuk, M. & Le Corre, V. (2013) - Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, vol. 29, n. 11, p. 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.001>
- Gaines, T.A.; Duke, S.O.; Morran, S.; Rigon, C.A.G.; Tranel, P.J.; Küpper, A. & Dayan, F.E. (2020) - Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 295, n. 30, p. 10307-10330.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013572>
- Mas, M.T. & Verdú, A.M.C. (2014) - Within population variation in resistance of *Digitaria sanguinalis* to *Ustilago syntherismae* resulting from different modes of seed germination and environment. *Plant Pathology*, vol. 63, n. 1, p. 140-147. <https://doi.org/10.1111/ppa.12084>
- Mas, M.T. & Verdú, A.M.C. (2020) - The dynamics of an interaction between *Digitaria sanguinalis* and *Ustilago syntherismae* at local scale is strongly influenced by environment and spatial distribution. *Plant Pathology*, vol. 69, n. 2, p. 221-230. <https://doi.org/10.1111/ppa.13129>
- Mas, M.T.; Verdú, A.M.C. & Girbal, J. (2006) - New report of loose smut (*Ustilago syntherismae*) on *Digitaria sanguinalis* in Spain. *Plant Pathology*, vol. 55, n. 2, p. 298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01303.x>
- SAS (2013) - *Statistical Analysis Systems*, Software Version 9.4. Cary, North Carolina, USA: SAS Institute Inc.
- Vila-Aiub, M.M. (2019) - Fitness of herbicide-resistant weeds: current knowledge and implications for management. *Plants*, vol. 8, n. 11, art. 469. <https://doi.org/10.3390/plants8110469>