

Interacción entre herbicidas auxínicos y los inhibidores de la ACCasa y ALS. ¡Una mezcla que hay que evitar!

El uso de diferentes herbicidas con diferentes modos de acción es una práctica común para incrementar el espectro de control de malezas (*p.e.* hojas anchas y gramíneas). Sin embargo, algunas ocasiones por desconocimiento se realizan mezclas las cuales en el mejor de los casos inactivan o reducen la efectividad de uno o de los dos productos usados. En el peor de los casos, hay combinaciones que pueden estimular el desarrollo de mecanismos de resistencia basados en el metabolismo.

Este puede ser el caso de la utilización conjunta de 2,4-D y los inhibidores de la ACCasa y ALS. El 2,4-D es usado para eliminar malezas de hoja ancha (dicotiledoneas), por lo que es frecuente usarlo en cultivos como trigo y cebada. Sin embargo, cuando en la aplicación cuando se mezcla con otros herbicidas el efecto puede ser contrario a lo que se espera.

Durante mucho tiempo se mencionó el antagonismo entre estos modos de acción, sin embargo no se habían realizado estudios puntuales que demostraran la causas de este antagonismo. En el artículo titulado “Enhanced herbicide metabolism induced by 2,4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl” (Pest Manag Sci 2013; 69: 996–1000) Heping Han y colaboradores demostraron que las aplicaciones de 2,4-D confieren resistencia a inhibidores de la ACCase y ALS.

Rapid Report



Received: 15 November 2012 Revised: 1 March 2013 Accepted article published: 5 April 2013 Published online in Wiley Online Library: 20 June 2013

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.3552

Enhanced herbicide metabolism induced by 2,4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl

Heping Han,^a Qin Yu,^{a*} Gregory R Cawthray^b and Stephen B Powles^a

Abstract

BACKGROUND: The auxinic herbicide 2,4-D amine is known, *in vitro*, as a cytochrome P450 inducer. The current study uses 2,4-D pre-treatment, at the whole plant level, to study mechanism(s) of non-target site based herbicide resistance to the ACCase-inhibiting herbicide diclofop-methyl in *Lolium rigidum*.

RESULTS: The 2,4-D pre-treatment caused up to 10-fold shift in LD₅₀ and GR₅₀ in dose–response to subsequently applied diclofop-methyl in a herbicide susceptible *L. rigidum* population. Foliar uptake and translocation of ¹⁴C-diclofop-methyl did not differ in 2,4-D pre-treated versus untreated plants. HPLC analysis revealed that de-esterification of diclofop-methyl to toxic diclofop acid was similar, but further metabolism of diclofop acid to non-toxic metabolites was significantly (1.8-fold) faster in 2,4-D pre-treated than untreated plants. HPLC profile of major polar metabolites was similar when *L. rigidum* and diclofop-methyl tolerant wheat were compared, but wheat metabolised diclofop acid three-fold faster than *L. rigidum*. In addition, 2,4-D pre-treatment also induced cross-protection against the ALS-inhibiting herbicide chlorsulfuron, and the known P450 inhibitor malathion can reverse this effect.

CONCLUSIONS: Protection against diclofop-methyl provided by 2,4-D pre-treatment in susceptible *L. rigidum* is associated with higher rates of herbicide metabolism, mirroring that identified in field-evolved, non-target site-based diclofop-methyl resistant populations. 2,4-D may induce higher level expression of herbicide-metabolising genes hence providing protection, and therefore, this 2,4-D induction system can be used, in combination with other genomic approaches, to assist isolating cytochrome P450 and other genes that are involved in herbicide metabolism and endow herbicide resistance in *L. rigidum*.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: 2,4-D amine; antagonism; chlorsulfuron; cytochrome P450; diclofop-methyl; herbicide metabolism; *Lolium rigidum*

1 INTRODUCTION

The annual diploid grass *Lolium rigidum* is genetically diverse, present at high densities in Australia, where since the first report¹ it has evolved herbicide resistance across vast areas, especially to the ACCase- and ALS-inhibiting herbicides (hereafter referred to ACCase or ALS herbicides).² It is a feature of these *L. rigidum* populations that multiple herbicide resistance mechanisms are accumulated within individual resistant plants.^{3,4} While target site resistance can be precisely determined,⁵ non-target site herbicide resistance (NTSR) is relatively difficult to study. For many years our laboratory has been investigating NTSR in *L. rigidum* and has established that NTSR to ACCase and ALS herbicides in *L. rigidum* populations involves enhanced rates of herbicide metabolism.^{6,7} Additionally, we have compelling indirect evidence using known cytochrome P450 inhibitors that P450s are involved in the enhanced rates of metabolism of ACCase and ALS herbicides.⁸ However, progress has been slow at the molecular level in understanding P450 genes involved in herbicide resistance. Plant P450s have wide diversity and substrate specificity, and so far only a small number of herbicide-metabolising plant P450s have been identified and characterised.⁹

The auxinic herbicide 2,4-D is known, *in vitro*, as a P450 inducer,¹⁰ but its relevance to *in vivo* herbicide metabolism and hence herbicide resistance is unknown in *L. rigidum*. Here, in whole plant studies we show that 2,4-D pre-treatment can protect a herbicide susceptible *L. rigidum* population against diclofop-methyl and the dissimilar herbicide chlorsulfuron. We demonstrate that this 2,4-D induced protection against diclofop-methyl is due to enhanced rates of diclofop-methyl metabolism, mimicking that which occurs in field-evolved herbicide resistant *L. rigidum* populations. Application of this 2,4-D induced protection system is discussed in assisting the discovery of genes responsible for NTSR in *L. rigidum*.

* Correspondence to: Qin Yu, Australian Herbicide Resistance Initiative, School of Plant Biology, University of Western Australia, Crawley, WA 6009, Australia. E-mail: qin.yu@uwa.edu.au; yuqin@plants.uwa.edu.au

^a Australian Herbicide Resistance Initiative, School of Plant Biology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Western Australia, Crawley, WA 6009, Australia

^b School of Plant Biology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Western Australia, Crawley, WA 6009, Australia

Todo esto ocurre mediante la activación de los genes de la familia citocromo P450. Esta es una familia de aproximadamente 350 genes que esta relacionada con la detoxificación en plantas. En condiciones *in vitro* se sabe que el 2,4-D es un activador de estos genes. En el estudio utilizaron una línea de *Lolium rigidum* susceptible a herbicidas y mediante la aplicación previa de 2,4-D lograron incrementar la resistencia a diclofop metil y clorosulfuron.

Las plantas de *Lolium* se dejaron crecer hasta la etapa en la que generalmente se realiza el control de malezas. Previo a la aplicación de herbicidas se hicieron aplicaciones de 2,4-D (amina, 4000 g a.i. ha⁻¹ más surfactante al 0.2%), 24 horas después se realizó la aplicación de diclofop metil ó clorosulfuron.

Adicionalmente se hicieron tratamientos con la aplicación de malatión (insecticida organosfosforado), el cual es conocido por inhibir la síntesis de genes P450.

TRATAMIENTOS

- Diclofop metil
- Clorosulfuron

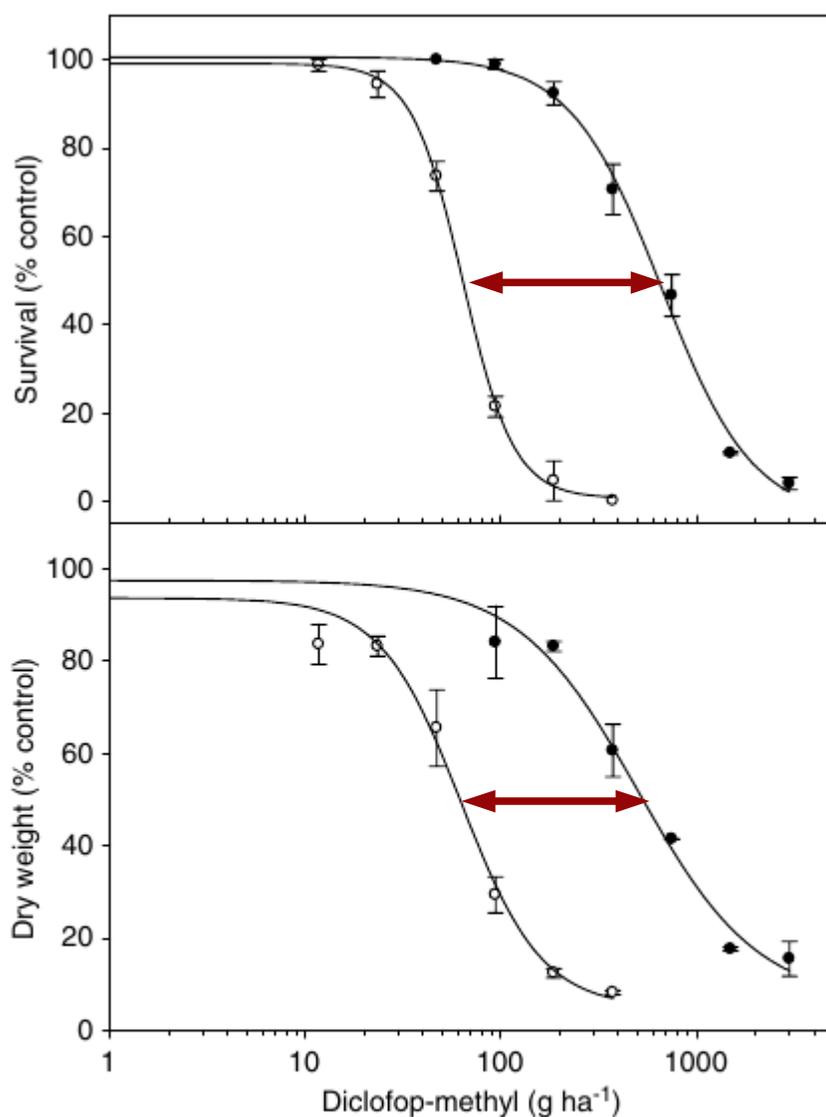
2,4-D +

- Diclofop metil
- Clorosulfuron

2,4-D + Clorosulfuron + Malatión



Los resultados mostraron que en el caso de la resistencia a diclofop metil la aplicación previa de 2,4-D incrementó 71% la supervivencia y confirió de 8 a 10 veces de mayor resistencia respecto a plantas no tratadas.



La misma población susceptible incrementó su supervivencia y resistencia

Figure 1. Diclofop-methyl dose response of the susceptible *L. rigidum* population with (closed circle) or without (open circle) 2,4-D (4000 g a.i. ha⁻¹) pre-treatment. The experiment was conducted in a controlled environmental room under day/night temperature of 15/10 °C. Each data point is the mean \pm SE ($n = 2$).

En el caso de clorosulfuron también se observó un incremento en la supervivencia y en la resistencia cuando se aplicó el 2,4-D. En los tratamientos con aplicación de 2,4-D + malatión, las plantas respondieron igual que las susceptibles.

Table 1. Antagonistic effect of 2,4-D on the ALS herbicide chlorsulfuron and reversal by the P450 inhibitor malathion in the susceptible *Lolium rigidum* population

Chlorsulfuron (g ha ⁻¹)	2,4-D (g ha ⁻¹)	Malathion (g ha ⁻¹)	Survival (%)
0	4000	0	100 ± 0 ^a
0	0	1000	100 ± 0 ^a
100	0	0	5.3 ± 1.3 ^d
100	4000	0	32.3 ± 2.3 ^b
100	4000	1000	6.7 ± 1.3 ^d
200	0	0	2.0 ± 1.2 ^d
200	4000	0	14.7 ± 0.7 ^c
200	4000	1000	0.7 ± 0.7 ^d

Each value is the mean ± SE (n = 3).

Means with different letters in a column are significantly different according to Tukey's HSD ($\alpha = 0.05$)

Se observa una clara diferencia por la aplicación de 2,4-D

Pruebas adicionales de translocación y metabolismo indicaron que la traslocación fue igual en todos los tratamientos. Por lo que se descarta que la aplicación de 2,4-D reduzca la movilidad de los otros herbicidas al interior de la planta. De igual manera el porcentaje de radioactividad recuperado mostró que las plantas con 2,4-D tienen una menor cantidad de diclofop ácido (la forma fitotóxica del herbicida).



Table 2. Metabolism of ^{14}C -diclofop-methyl by the susceptible *Lolium rigidum* plants*

Time point	Population	Treatment	Radiolabel (% of radioactivity recovered)		
			Total metabolites	Diclofop acid	Diclofop-methyl
48 h	Susceptible	- 2,4-D	30.44 ± 0.61 ^c	64.86 ± 0.22 ^a	4.71 ± 0.40 ^{ab}
		+ 2,4-D	56.27 ± 6.60 ^b	36.87 ± 3.05 ^b	6.86 ± 3.55 ^a
96 h	Susceptible	- 2,4-D	87.67 ± 0.65 ^a	12.15 ± 0.63 ^c	0.19 ± 0.12 ^b
		+ 2,4-D	36.61 ± 0.30 ^c	60.15 ± 1.63 ^a	3.25 ± 1.34 ^{ab}
				35.81 ± 0.42 ^b	6.35 ± 0.84 ^a

*The herbicide susceptible *L. rigidum* population VLR1. The proportion of the parent herbicide and metabolites were expressed as a percentage peak area of total radioactivities in the sample injection. Six plants per treatment were bulked as a replicate and two replicates per treatment were analysed for each time point. Means with different letters in a column are significantly different by the Tukey's HSD test ($\alpha = 0.05$)

La lección de este estudio es que se debe evitar mezclar 2,4-D con cualquier otro tipo de herbicidas. La resistencia metabólica es capaz de degradar prácticamente cualquier molécula ajena a la planta. En casos en los que se requiere hacer un control tanto de hojas anchas como de gramíneas es recomendable primero aplicar el graminicida y posteriormente (al menos un día para que el herbicida llegue al interior de las células) el 2,4-D.

Elaboró
Dr. Jesús R. Torres García
Laboratorio de Ecología y Evolución Molecular
CIIDIR-IPN, Unidad Michoacán
jrtorresg@ipn.mx

