

Amaranthus palmeri en Cataluña y Aragón ¿Tres poblaciones con un mismo origen?

Jordi Recasens^{1✉}, María Dolores Osuna² Aritz Royo-Esna¹, Joel Torra¹

¹Agrotecnio. ETSEA. Universitat de Lleida. Avda. Rovira Roure 191. 25198-Lleida,

²Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Ctra A-V, km 372. 06187. Guadajira. Badajoz

✉ jrecasens@hbj.udl.cat

Resumen: Se analiza mediante marcadores moleculares la posibilidad de parentesco de tres poblaciones de *Amaranthus palmeri* presentes desde 2007 en Cataluña y Aragón. A su vez se han realizado ensayos de germinación (porcentaje y velocidad) y comparado con otras especies de *Amaranthus* locales. Las tres poblaciones de *A. palmeri* se diferencian de las especies locales por mostrar una mayor velocidad de germinación a temperaturas óptimas (25/35°C) y posibilidades de germinar incluso a temperaturas <20°C (constantes y en ausencia de luz). Los análisis moleculares indican un nivel de similitud de un 75% entre las tres poblaciones, siendo superior a un 86% para dos de ellas. Estos resultados reflejan la posibilidad de parentesco de las tres poblaciones derivado de un mismo proceso de introducción y una mayor plasticidad germinativa que otras especies locales de *Amaranthus*.

Palabras clave: análisis molecular, germinación, mala hierba exótica, invasora, parentesco.

1. INTRODUCCIÓN

Amaranthus palmeri S. Watson es una de las especies más nocivas de los cultivos de la parte meridional de Estados Unidos y México (Ward, et al., 2013), no solo por su capacidad competitiva sino también por su capacidad de desarrollar resistencia a distintos grupos de herbicidas (Heap, 2017). Su rápida expansión geográfica por otros continentes ha disparado la alarma por su alta capacidad de invasión. A nivel europeo, la EPPO la ha incluido de forma reciente en la «Alert List», lista donde se relacionan aquellos organismos sobre los que hay alarma precoz o, eventualmente, necesidad de establecer protocolos de «Pest Risk Assessment» (EPPO, 2017). El año 2007 se observaron dos poblaciones de esta especie en la provincia de Lleida (Menàrguens y Lleida) y otra en la de Huesca (Binéfar) estando hoy aún presentes allí donde fueron observadas por primera vez (Recasens y Conesa, 2011). Solamente la población de Menàrguens se encuentra dispersa entre campos de cultivo y márgenes adyacentes; las poblaciones de Lleida y Binéfar corresponden a individuos presentes solamente en cunetas de la carretera. La presencia de estas tres poblaciones, distantes entre ellas menos de 50 km, nos ha planteado la posibilidad de averiguar si se trata de poblaciones con distintos procesos de introducción o bien puede tratarse de un caso de introducción única y derivada en una posterior dispersión antrópica, mediante maquinaria o material agrícola. Las tres poblaciones se hallan próximas a áreas industriales donde existen empresas con una intensa actividad dedicada a la importación de grano y elaboración de piensos.

La reciente presencia de estas tres poblaciones en la zona constituye un interesante escenario para poder verificar la hipótesis de una única introducción y su posterior expansión por el territorio, proceso que solo podría confirmarse si se comprobara un alto nivel de parentesco entre ellas. A su vez, la capacidad de expansión y persistencia de estas poblaciones estará determinado, entre otros aspectos, por su facilidad de dispersión y requerimientos germinativos de las semillas. Con este fin se ha realizado un doble estudio, a nivel molecular y germinativo, para discernir sobre a) el posible parentesco entre las tres poblaciones de *A. palmeri* y b) posibles diferencias en cuanto comportamiento germinativo respecto a otras especies locales de *Amaranthus*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal. En otoño de 2013 se recogieron semillas de las tres poblaciones de *A. palmeri* (Lleida, Menàrguens y Binéfar) así como de poblaciones locales de *A. retroflexus*, *A. hybridus*, *A. viridis* y *A. powellii* en la misma u otras localidades próximas. Una vez en laboratorio, las semillas de las siete poblaciones fueron limpiadas, verificada su viabilidad mediante el test de tetrazolio y estimado el peso de 1000 semillas.

2.2. Ensayos de germinación. Se realizaron dos ensayos distintos de germinación. En el primero de ellos se sometieron las semillas a distintas temperaturas constantes (5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29 y 32°C) y a dos condiciones de luz distintas: fotoperiodo 12/12h y oscuridad. En el segundo ensayo se ubicaron las semillas a tres intervalos térmicos distintos (10/20°C; 15/25°C y 25/35°C) y a dos condiciones de luz: fotoperiodo de 12/12h y oscuridad. Para cada situación y población se ubicaron 25 semillas en una placa de Petri con agar. Se realizaron 4 repeticiones de cada ensayo. De forma diaria, y hasta los 21 días, se estimó el número de semillas germinadas, considerando como tales aquéllas que mostraban una longitud mínima de 2mm de radícula. Los parámetros analizados han sido porcentaje de germinación y el coeficiente de velocidad de germinación estimado como:

$$T = \sum (N_i * D_i) / \sum N_i$$

donde N_i es el número de semillas germinadas el día D_i , y D_i el número de días transcurridos desde la siembra. Valores bajos de T indican una mayor velocidad de germinación. Para el análisis estadístico se ha realizado un ANOVA y el test de Tukey (a un nivel del 95%).

2.3. Análisis molecular. Diez individuos de cada una de las poblaciones recogidas en campo, fueron puestas a germinar en condiciones de invernadero. El ADN de estos individuos, a partir de hojas jóvenes, fue extraído utilizando el kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen).

Para los análisis con marcadores moleculares, se utilizaron siete marcadores de tipo ISSR (Tabla 1), los cuales fueron escogidos entre un grupo de 18 por presentar polimorfismo y un patrón de amplificación claro y reproducible. La mezcla de cada reacción contenía: 10 ng de ADN genómico, 1,5 μ l de tampón de reacción 10x, 0,6 μ l dNTP, 0,2 μ l de cebador y 0,3 μ l de Taq polimerasa (5 unidades/ μ l, Sigma) en un volumen final de 15 μ l. La amplificación se realizó con un programa de 1 ciclo de 5' a 94°C, 40 ciclos de 30" a 94°C, 45" a 52°C y 2' a 72°C, y un ciclo final de 7' a 72°C. La separación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % (p/v) y que se tiñeron con bromuro de etidio. El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa NTSYSpc 2.2 (Rohlf, 1998).

Tabla 1. Secuencia de los ISSR utilizados en este estudio

| Nombre | Secuencia |
|---------|--------------------|
| ISSR 2 | DBDACACACACACAC |
| ISSR 6 | ACACACACACACACYG |
| ISSR 7 | ATGATGATGATGATGATG |
| ISSR 11 | ATGATGATGATGATGATG |
| ISSR 13 | ACACACACACACACAG |
| ISSR 14 | GGAGAGGAGAGGAGA |
| ISSR 17 | GAGAGAGAGAGAGAT |

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Viabilidad y peso 1000 semillas. El test de tetrazolio verificó unos porcentajes de viabilidad, para el conjunto de poblaciones, comprendidos entre el 70 y el 80%. Los valores de peso de 1000 semillas obtenido para las poblaciones de *A. palmeri* (entre 0,33-0,35g) son menores que los de *A. retroflexus* (0,39g) y *A. powellii* (0,47g) y mayores que los de *A. hybridus* (0,30g) y *A. viridis* (0,28g).

3.2. Ensayo de germinación. El ensayo realizado a temperaturas constantes refleja un comportamiento germinativo similar en todas las especies de *Amaranthus* (Tabla 2). Para todas las especies y poblaciones, los máximos porcentajes (superiores a un 90%) se obtienen a la máxima temperatura (32°C) y con fotoperiodo. Sin embargo a temperaturas más suaves, entre los 23° y los 26°C las tres poblaciones de *A. palmeri* muestran unos porcentajes de germinación superiores al 70%, significativamente mayores a los mostrados por el resto de especies –con la excepción de *A. retroflexus*-; y a temperaturas más bajas (entre 14 y 17°C) las tres poblaciones de *A. palmeri* muestran germinaciones entre el 10% y el 30%, -siempre mayores en oscuridad que con fotoperiodo de 12h-, mientras que el resto de poblaciones locales apenas llegan a germinar.

Tabla 2. Porcentajes de germinación de distintas especies de *Amaranthus* a temperatura constante y a dos situaciones de iluminación: Luz: fotoperiodo de 12h; Osc: oscuridad total 24h. M: Menàrguens; B: Binèfar; L: Lleida. Valores con distinta letra muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) según condiciones de luz (Luz vs Osc) para cada especie o población y temperatura considerada

| | | <i>A. palmeri</i> (M) | <i>A. palmeri</i> (B) | <i>A. palmeri</i> (L) | <i>A. hybridus</i> | <i>A. retroflexus</i> | <i>A. viridis</i> | <i>A. powellii</i> |
|------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 5°C | Luz | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Osc | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8°C | Luz | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Osc | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11°C | Luz | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Osc | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 14°C | Luz | 22 a | 36 a | 10 | 0 | 0 | 8 | 0 |
| | Osc | 54 b | 49 b | 16 | 8 | 6 | 7 | 1 |
| 17°C | Luz | 27 a | 5 | 10 a | 0 | 1 | 32 a | 1 |
| | Osc | 36 b | 6 | 22 b | 0 | 6 | 13 b | 0 |
| 20°C | Luz | 71 | 31 a | 53 | 15 | 24 | 25 | 3 |
| | Osc | 79 | 45 b | 56 | 15 | 33 | 27 | 13 |
| 23°C | Luz | 81 | 82 | 90 a | 59 | 55 | 45 a | 18 |
| | Osc | 83 | 81 | 78 b | 69 | 48 | 18 b | 12 |
| 26°C | Luz | 71 | 47 a | 63 | 54 a | 88 | 52 a | 41 |
| | Osc | 70 | 71 b | 70 | 34 b | 85 | 24 b | 47 |
| 29°C | Luz | 91 | 75 | 71 | 91 | 99 | 77 a | 90 a |
| | Osc | 84 | 76 | 87 | 83 | 93 | 20 b | 71 b |
| 32°C | Luz | 86 | 95 a | 97 a | 99 a | 100 | 98 a | 100 |
| | Osc | 87 | 82 b | 83 b | 90 b | 98 | 48 b | 98 |

En el segundo ensayo de germinación, se constata que ante una alternancia de temperaturas de 25/35°C se alcanza en todas las poblaciones y especies, los mayores valores de germinación (entre 80 y 96%) (Tabla 3). Sin embargo a intervalos inferiores (15/25°C o 10/20°C) –y a excepción de *A. powellii*– la presencia de luz (fotoperiodo de 12h) resulta significativa frente a la oscuridad en favorecer la germinación. No se observan diferencias en el comportamiento germinativo entre las tres poblaciones de *A. palmeri* y el resto, aunque si en el coeficiente de velocidad de germinación, que en condiciones óptimas (25/35°C) resulta más rápido, con valores comprendidos entre 2,6 y 3,1, inferiores a los mostrados por el resto de especies, con valores comprendidos entre 4,6 y 6,3.

Steckel et al. (2004) confirman también una germinación más precoz y más rápida de *A. palmeri* que el resto de especies de *Amaranthus* estudiadas y también un incremento de germinación de *A. palmeri* con temperatura y luz, si bien no observan diferencias entre temperaturas alternas y constantes. Por su parte, Jha et al. (2010) establecen la temperatura base para el desarrollo fenológico de esta especie en 16°C. El establecimiento de un modelo local de germinación y desarrollo permitiría verificar la posible existencia de ecotipos de esta especie, adaptados a nuestras condiciones mediterráneas.

Tabla 3. Porcentaje y velocidad de germinación de distintas poblaciones y especies de *Amaranthus* a distintas condiciones de temperatura y de iluminación. Valores con distinta letra muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) según condiciones de luz para cada especie o población y temperatura considerada

Porcentaje de germinación (%)

| Temperatura (°C) | 10/20 | | 15/25 | | 25/35 | |
|------------------------------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| | 12/12h | Oscuridad | 12/12h | Oscuridad | 12/12h | Oscuridad |
| <i>A. palmeri</i> Menàrguens | 6 | 4 | 23 | 12 | 85 | 94 |
| <i>A. palmeri</i> Lleida | 0 | 0 | 16 a | 5 b | 96 a | 78 b |
| <i>A. palmeri</i> Binéfar | 2 a | 0 b | 19 a | 1 b | 93 | 85 |
| <i>A. hybridus</i> | 2 a | 0 b | 19 a | 1 b | 93 | 85 |
| <i>A. retroflexus</i> | 30 a | 18 b | 50 | 58 | 98 | 94 |
| <i>A. viridis</i> | 23 a | 3 b | 65a | 7b | 91 a | 18 b |
| <i>A. powelli</i> | 1 a | 0 b | 0 a | 5 b | 77 a | 89 b |

Velocidad de germinación

| Temperatura (°C) | 10/20 | | 15/25 | | 25/35 | |
|------------------------------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| | 12/12h | Oscuridad | 12/12h | Oscuridad | 12/12h | Oscuridad |
| <i>A. palmeri</i> Menàrguens | 15,6 a | 8,7 b | 9,5 a | 5,4 b | 2,4 | 2,6 |
| <i>A. palmeri</i> Lleida | 0 | 0 | 13,7 a | 2,1 b | 2,4 | 3,1 |
| <i>A. palmeri</i> Binéfar | 4,7 a | 0 b | 12,4 a | 1,5 b | 3,3 | 2,6 |
| <i>A. hybridus</i> | 1,6 a | 0 b | 3 | 3,9 | 3,7 a | 5,6 b |
| <i>A. retroflexus</i> | 10,9 a | 2,7 b | 5,9 | 3,9 | 3,4 a | 4,6 b |
| <i>A. viridis</i> | 10,3 a | 4,5 b | 8,7 a | 1,7 b | 6,4 a | 2,9 b |
| <i>A. powelli</i> | 3,5 a | 0 b | 0 a | 10 b | 5,9 | 6,3 |

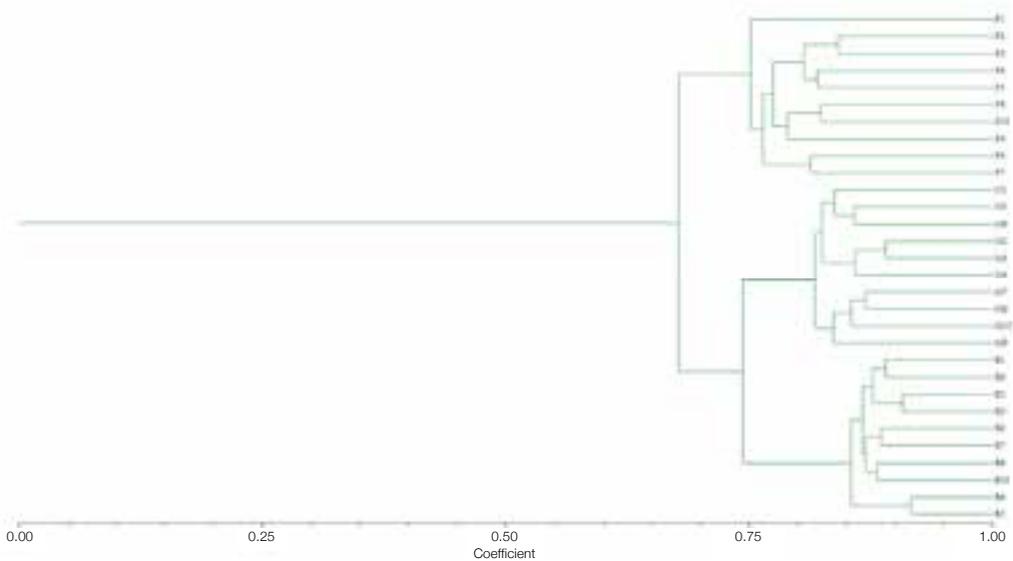


Figura 1. Dendrograma UPGMA mostrando las relaciones moleculares entre los 30 individuos de *A. palmeri* estudiados. P1-P10: individuos procedentes de Lleida; M1-M10: individuos procedentes de Menàrguens; B1-B10: individuos procedentes de Binéfar.

3.3. Análisis molecular. El número total de fragmentos polimórficos obtenido con los siete ISSR utilizados fue 256. A partir de los datos obtenidos se elaboró una matriz de presencia-ausencia. La distancia entre las poblaciones se calculó aplicando el índice de distancia genética de Nei de 1972 y a continuación el método de UPGMA para visualizar el agrupamiento de los distintos materiales.

Como se observa en la figura 1, todas las plantas estudiadas comparten una similitud genética de 0,67, lo cual refleja un 37% de variación genética entre todos los individuos estudiados. Dos grandes grupos fueron observados a un nivel de similitud de 0,75. El primer grupo contenía todos los individuos pertenecientes al material recogido de la zona de Lleida y el segundo grupo al material obtenido en las zonas de Menàrguens y Binéfar. El grupo 2 se separó en dos semigrupos a un nivel de 0,86. Los grupos que se han diferenciado lo han hecho principalmente coincidiendo con el origen geográfico del material estudiado, cosa que apunta a que la formación de estos grupos puede ser debida a un proceso de dispersión de semillas.

El porcentaje de parentesco, analizado mediante marcadores moleculares, entre las tres poblaciones de *Amaranthus palmeri* encontradas en Cataluña y Aragón, apunta la posibilidad de que deriven de una misma población. Ésta pudo haberse introducido con la importación de semillas de cultivo para producción de harina o pienso. Una posterior dispersión antrópica, ligada posiblemente al transporte de mercancías, justificaría la existencia de estas tres poblaciones en sus localidades actuales. La introducción y expansión debió tener lugar hace más de 10 años, tiempo suficiente para que las siguientes generaciones hayan podido desarrollar ecotipos adaptados a las condiciones climáticas de nuestra zona y explicar la persistencia del banco de semillas. A su vez, a temperaturas limitantes (< 20°C) para la mayoría de especies locales de *Amaranthus*, las tres

poblaciones de *A. palmeri* han mostrado germinación, incluso en ausencia de luz. Esta mayor plasticidad en cuanto a requisitos térmicos para que tenga lugar la germinación, parece constituir una de las características de su potencial adaptabilidad.

4. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Fátima Mendoza, del CITYTEX, los análisis realizados en laboratorio a nivel molecular.

5. REFERENCIAS

- EPPO (2017). EPPO Alert List. www.eppo.int/INVASIVE_PLANTS/ias_lists.htm#AlertList. Con acceso el 7-4-2017. París.
- Heap I (2017). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Acceso el 6-4-2017. Available www.weedscience.com.
- Jha P, Norsworthy JK, Riley MB and Bridges W. (2010). Annual changes in temperature and light requirements for germination of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) seeds retrieved from soil. *Weed Science*, 58, 426-432.
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Recasens J & Conesa JA (2011). Presencia de la mala hierba *Amaranthus palmeri* en el NE de la Península Ibérica. Una amenaza como potencial invasora de cultivos extensivos de regadío. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 37, 129-132.
- Rohlf FJ (1998). NTSYS-Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Publ., New York.
- Steckel LE, Sprague CL and Stoller EW, Wax LM (2004). Temperature effects on germination of nine *Amaranthus* species. *Weed Science*, 52, 217-221.
- Ward SM, Webster TM and Steckel LE (2013). Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*): A review. *Weed Technology*, 27, 12-27.

***Amaranthus palmeri* in Aragon and Catalonia (Spain). Three populations with the same origin?**

Summary: The parental relationship between three populations of *A. palmeri* presents in Aragon and Catalonia since 2007 has been analysed by molecular markers. At the same time different assessments of germination (percentage and speed) have been made and compared with other local *Amaranthus* species. The three populations of *A. palmeri* showed, at optimal temperatures (25-35°), greater germination speed than local species and capacity also to germinate at < 20°C (at constant temperature and darkness). The analysis by molecular markers reflects a similarity index of 75% between the three populations and an 86% for two of them. These results appointed that the three populations came from the same process of introduction, and as result of an adaptive process show greater germination plasticity than other local species of *Amaranthus*.

Keywords: exotic weed, germination, invasive, molecular analysis, parental relationship.