



Universidad de Córdoba

**Mutación en el gen ALS explica resistencia de *Sinapis alba* (Jaramago) a Tribenurón metil en el Sur de España.**

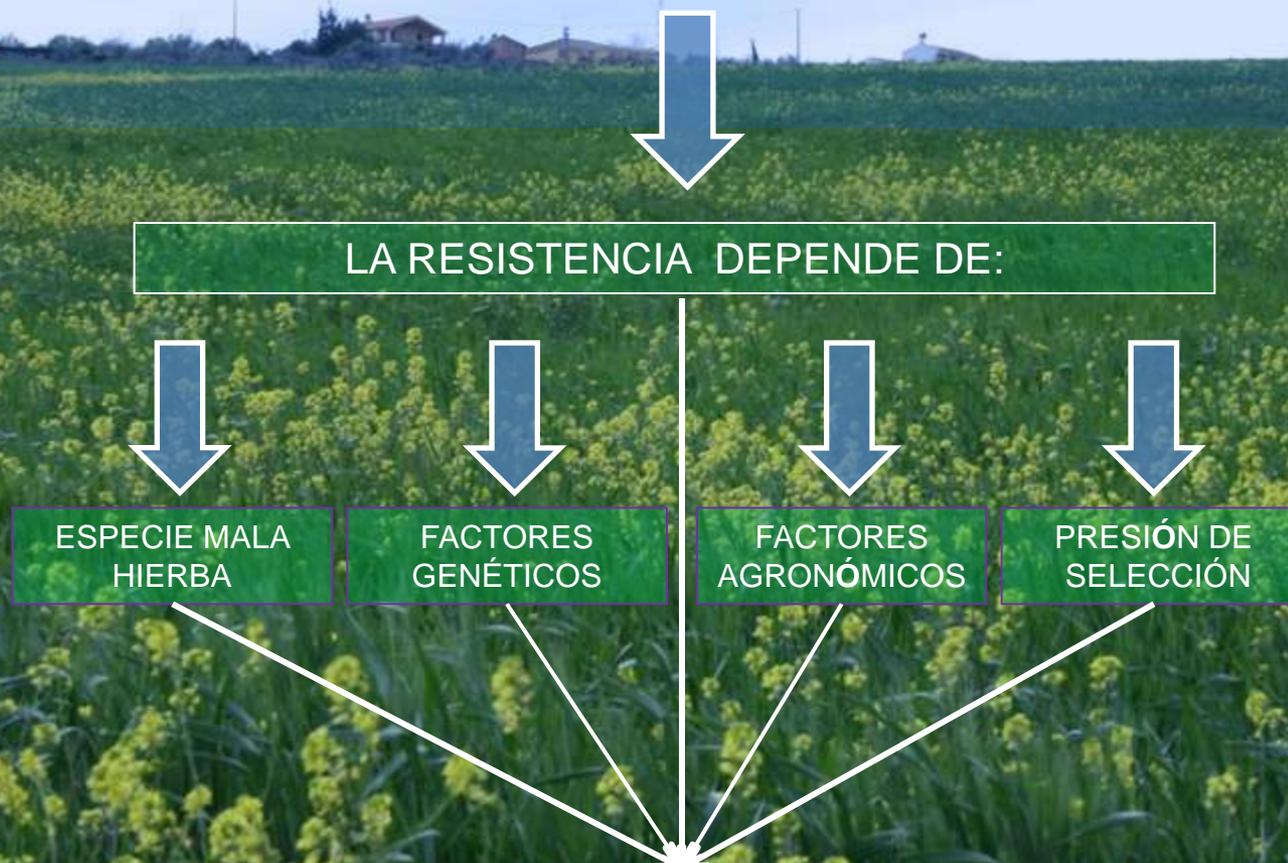
**Jesús María Rosario Socorro**

**Juan Dolio, San Pedro de Macoris, República Dominicana**

**24 al 26 de octubre, 2013**

# RESISTENCIA A HERBICIDAS

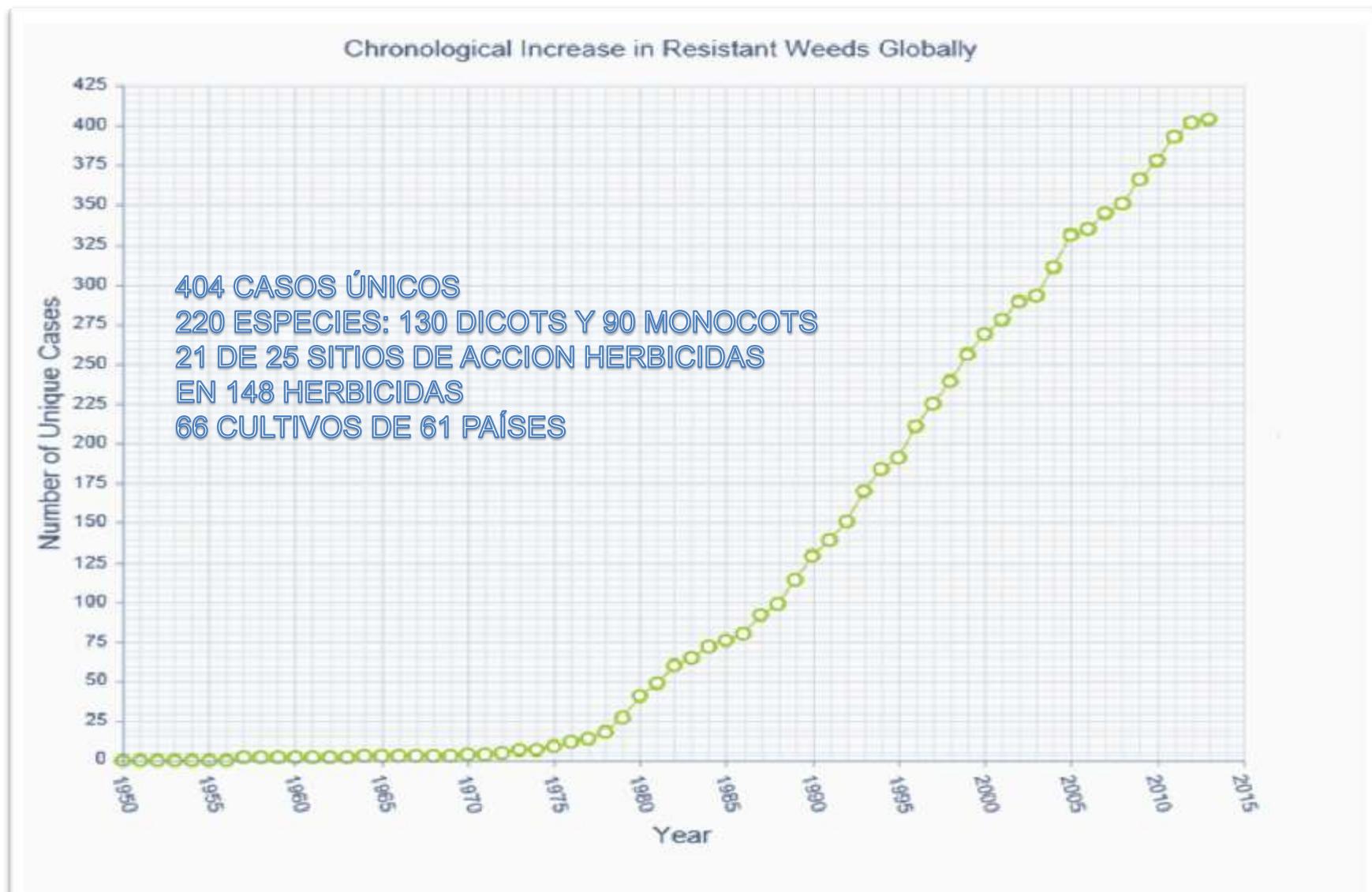
LA RESISTENCIA A HERBICIDAS ES UN CARÁCTER HEREDABLE, QUE LE PERMITE A CIERTAS PLANTAS DENTRO DE UNA POBLACIÓN SOBREVIVIR Y REPRODUCIRSE LUEGO DE SER TRATADA CON LA DOSIS AGRICOLA DE UN HERBICIDA, EL CUAL CONTROLABA LA POBLACIÓN CUANDO ERA SENSIBLE.



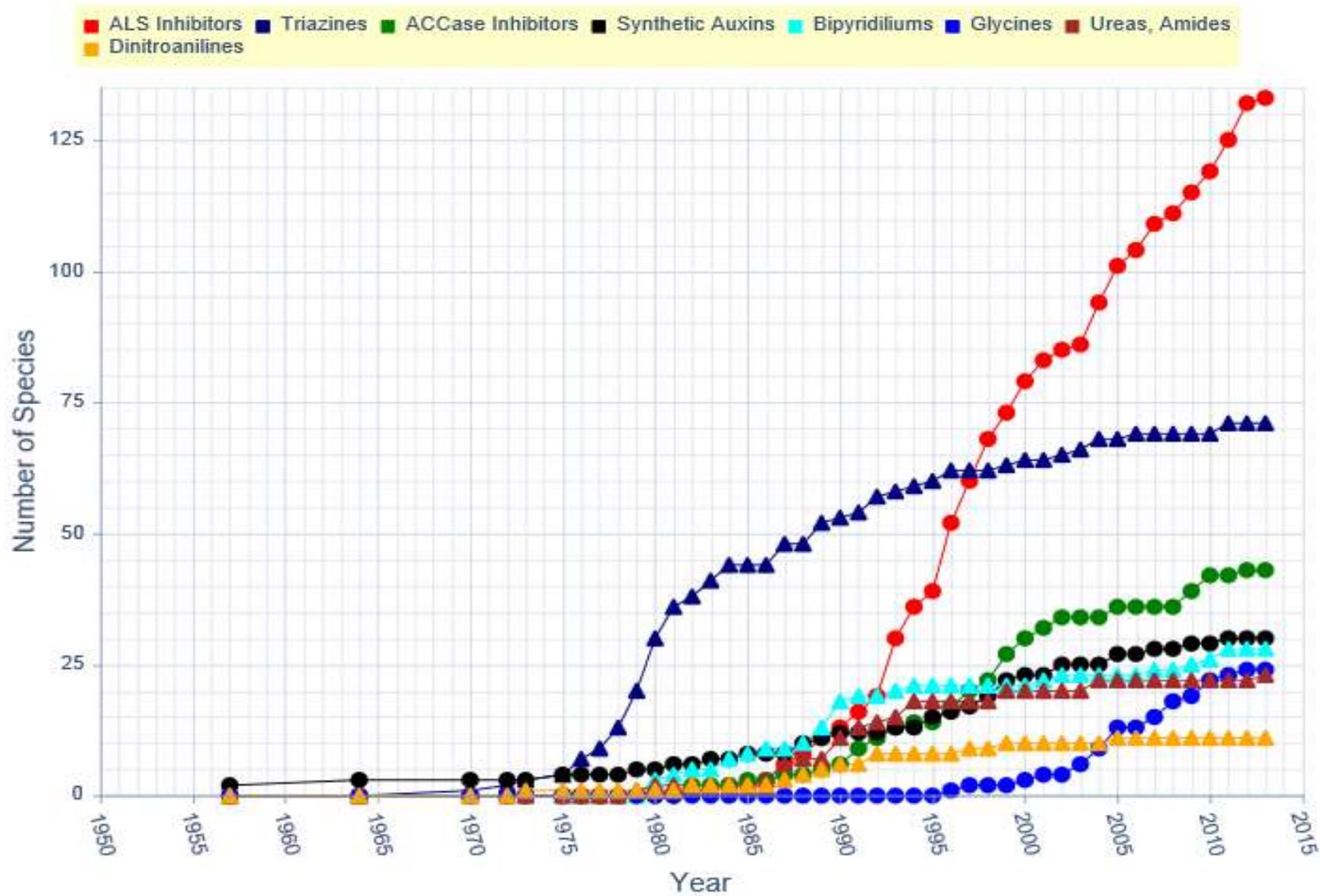
LA PRESENCIA DE BIOTIPOS RESISTENTES IMPACTA NEGATIVAMENTE AL SISTEMA DE CULTIVO, MANEJO DE MALEZAS Y RENDIMIENTO, INCREMENTANDO LOS COSTOS Y REDUCIENDO LA RENTABILIDAD DEL CULTIVO; POR LO QUE PREOCUPA A AGRICULTORES, PROFESIONALES, CIENTÍFICOS Y A FABRICANTES DE HERBICIDAS.



# BIOTIPOS DE MALAS HIERBAS RESISTENTES A HERBICIDAS

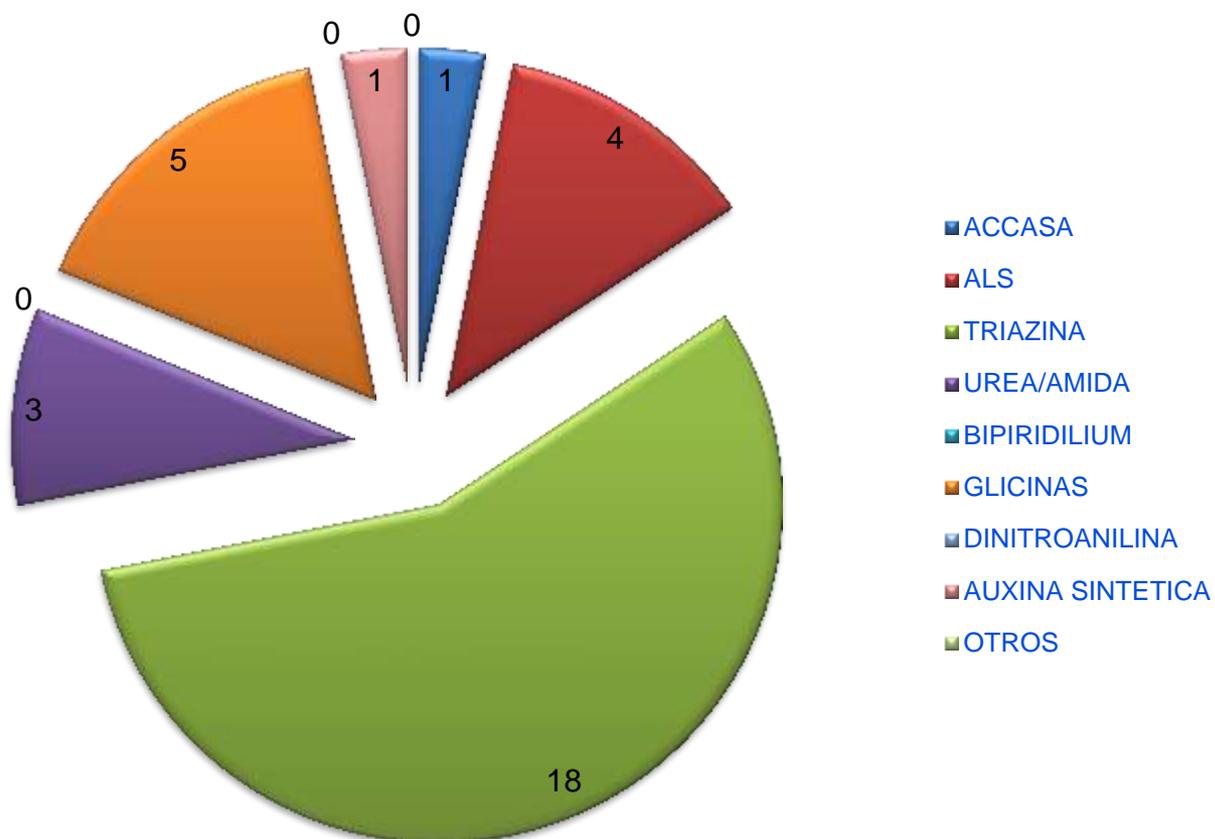


## Chronological Increase in Resistant Weeds Globally



# ESTADO DE LA RESISTENCIA A HERBICIDAS EN ESPAÑA

32 BIOTIPOS DE MALAS HIERBAS RESISTENTES A HERBICIDAS EN 6 MODOS DE ACCIÓN



## *JARAMAGO* (*Sinapis alba* L.)



Mala hierba crucifera del orden capparales, muy competitiva en cultivo de trigo del Sur de España, manejada con aplicaciones continuas de tribenuron metil (TM) durante los últimos 15 años, y confirmada resistente en 2008.

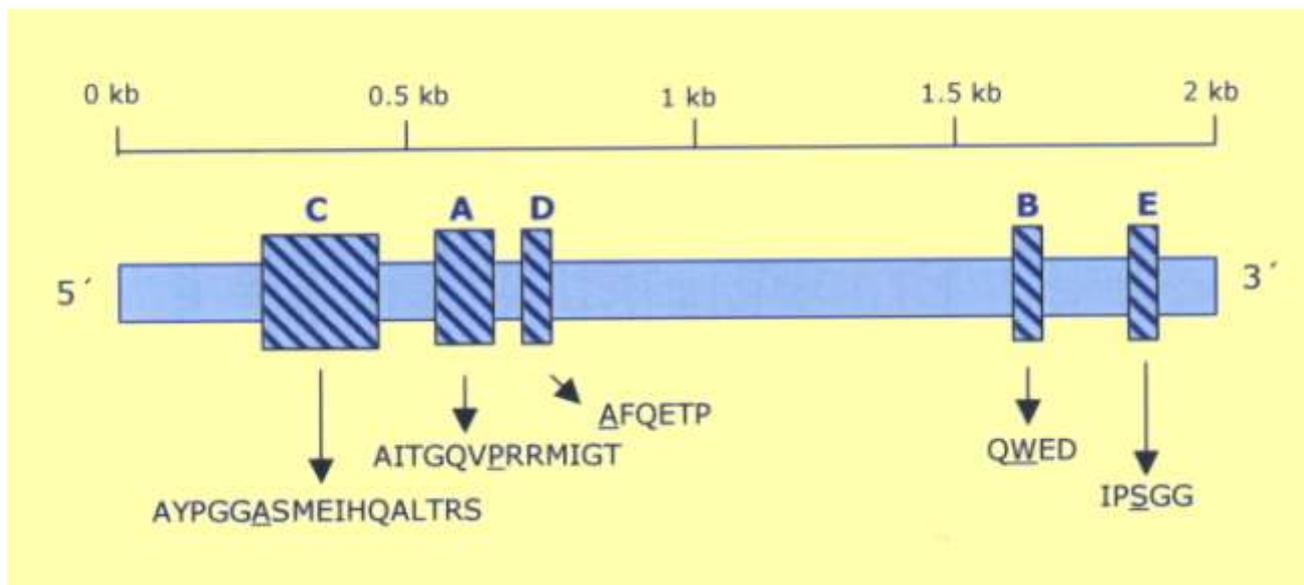
## **ACETOLACTATO SINTASA (ALS)**



**INHIBIDA POR SU, IMI, PTB , TP Y SCT**

**ESTOS HERBICIDAS CAUSAN  
DEFICIENCIA DE PROTEÍNAS Y MUERTE DE LA  
PLANTA POR INANICION**

## PRINCIPAL MECANISMO DE RESISTENCIA A HERBICIDAS INHIBIDORES DE ALS



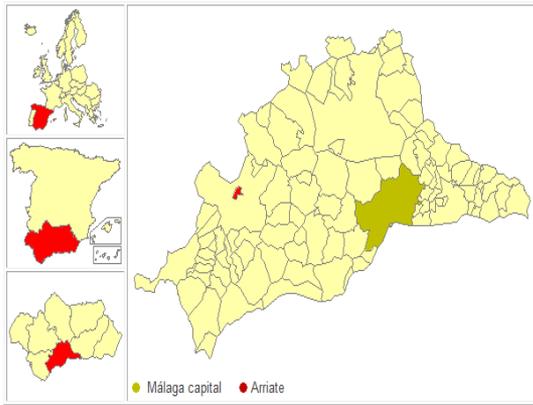
ESTE MECANISMO CAUSA UNA PERDIDA DE AFINIDAD DEL HERBICIDA CON SU SITIO DE ACCION EN LA PLANTA, DEBIDO A CAMBIOS AMINOACIDICOS EN LOS DOMINIOS A, B, C, D Y E DE LA ALS

## OBJETIVO GENERAL

**Describir la posible mutación de gen ALS responsable de la resistencia de *Sinapis alba*, L. al herbicida tribenuron metil.**

# MATERIALES Y MÉTODOS

# Prospección de biotipos de *S. alba* y Cultivo en invernadero



Prospección de poblaciones AR1 y AR8 de *S. alba*



Cultivo en invernadero



Conservación 4ta. Hoja a -40°C

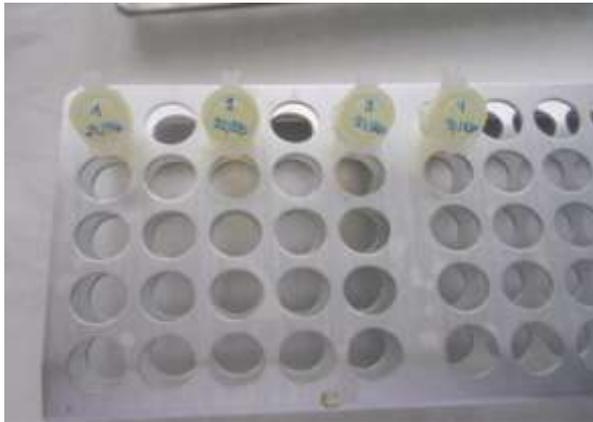


Confirmación de respuesta al tribenuron metil

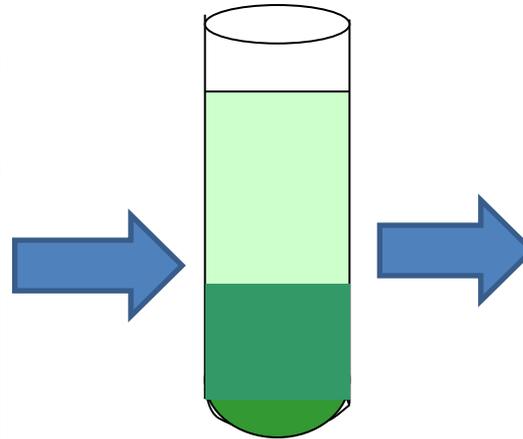


Tratamiento biotipos con Tribenuron

# EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y DILUCIÓN DEL ADN DE BIOTIPOS AR8 Y AR1



kit Speed Tools de Extracción de ADN



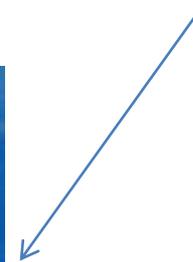
Extracto para cuantificar



Espectrofotómetro NANODROP



Dilución a 10 ng/μl para PCR

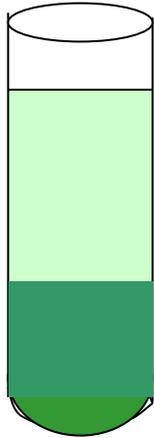


# Iniciadores para secuenciación del gen ALS

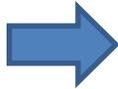
Iniciadores	Secuencia 5' -3'
ALS 3B	TCARTACTWAGTGCKACCATC
ALS3F	GGRGAAGCCATTCCTCC
P1	GAAGCCCTCGARCGTCAAGG
P2	CATAGGTTGWTCCCARTTAG

---

# Amplificación fragmentos de ADN



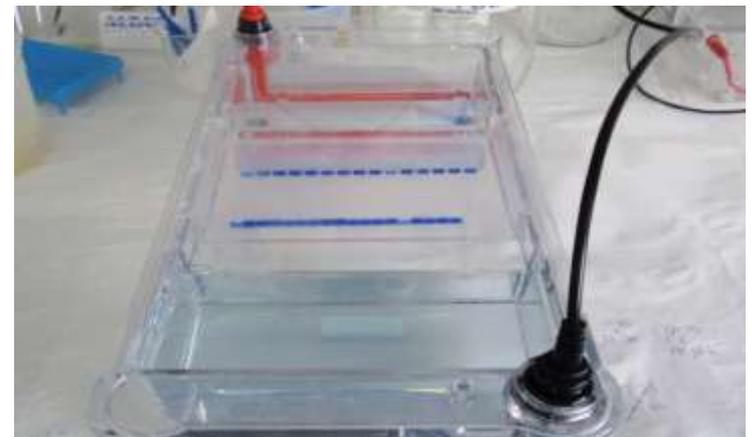
20  $\mu$ L para pcr:  
DNA+TAQ+dNTP+primers+tamp  
on



Etapas	ALS 3B/ALS 3F	P1/P2
Desnaturalización inicial	94°C/1 minuto (1C)	94°C/1 minuto (1C)
Desnaturalización	94°C/1 min y 52 °C/30 s (1C)	94°C/1 min y 52 °C/30 s (1C)
Alineamiento	72°C/1min (35 C)	72°C/1min (35 C)
Extensión	75°C/5 minutos (1C)	75°C/5 minutos (1C)



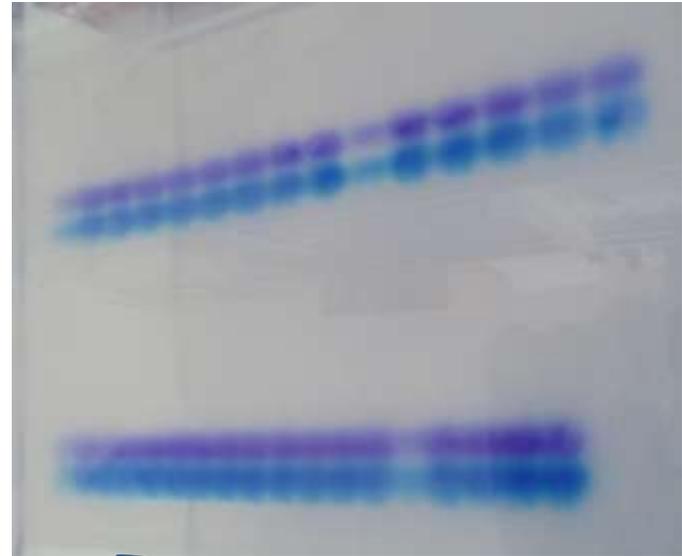
Observacion de fragmentos ADN



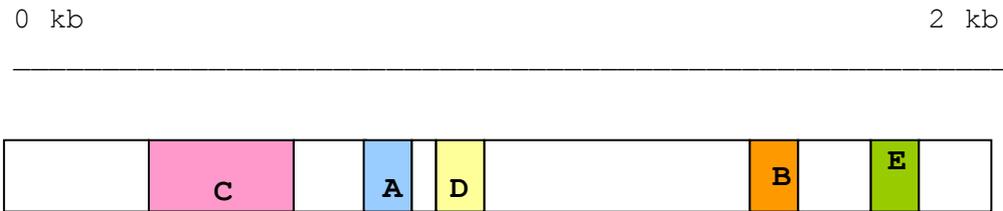
Separación de fragmentos de ADN en Gel de agarosa (1.5%)

# Purificación fragmentos de ADN

Kit Speed Tools  
para eliminar  
impurezas después  
de la PCR (Biotools  
B&M LABS S.A)



# Secuenciación ADN purificado de *S. alba*



ALS3B/ALS3F

P1/P2



**Unidad de Genómica del Servicio Central de Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.**

A photograph of a plant stem with green leaves and flowers against a blue sky background. The plant is silhouetted against the sky, with some leaves and flowers appearing in shades of green and yellow. The text "Resultados y Discusión" is overlaid in the center of the image.

# Resultados y Discusión

# Resultados y discusión

- La técnica de PCR, con los primers ASL3b/ALS3f y P1/P2 produjo fragmentos de 639 (Dom CAD, reg. 1) y 501 (Dom BE, reg. 2) pares de bases
- Las secuencias del gen ALS fueron obtenidas para cada una de las 15 plantas de las poblaciones AR<sub>1</sub> y AR<sub>8</sub> de *S. alba*
- Las secuencias del dominio BE procedentes de biotipos resistentes no difieren de aquellas encontradas en el biotipo sensible (datos no mostrados).
- Las secuencias de la región conteniendo los dominios C,A,D de los biotipos resistentes difiere de la encontrada del biotipo sensible
- En la secuenciación de la región que comprende los dominios CAD, se observa que se registró una mutación puntual en la posición nucleotídica 197 en la región del Dominio A del gen ALS, con sustitución de citosina (C) por timina (T) en el codón CCT que cambia a TCT, dando lugar a la mutación de Prolina por Serina en el biotipo AR<sub>8</sub> (Figura ).

# Mutación detectada en el gen ALS

```
      ....|.....|  ....|.....|  ....|.....|  ....|.....|  ....|.....|  ....|.....|
      245      255      265      275      285      295
R3P1  TTGACAGTGT TCCTCTTGTC GCTATTACAG GACAGGTCTC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
R7P1  TTGACAGTGT TCCTCTTGTC GCTATTACAG GACAGGTCTC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
R8P1  TTGACAGTGT TCCTCTTGTC GCTATTACAG GACAGGTCTC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
R5P1  TTGACAGTGT TCCTCTTGTC GCTATTACAG GACAGGTCTC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
S1P1  TTGACAGTGT TCCTCTTGTC GCTATTACAG GACAGGTCC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
R4P1  TTGACAGTGT TCCTCTTGTC GCTATTACAG GACAGGTCTC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
R6P1  TTGACAGTGT TCCTCTTGTC GCTATTACAG GACAGGTCTC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
Clustal Co *****
      ....|.....|  ....|.....|  ....|.....|  ....|.....|  ....|.....|  ....|.....|
```

**Secuencias de los dominios CAD del gen ALS en plantas AR<sub>8</sub> y AR<sub>1</sub>.**

# CONCLUSIÓN

La secuenciación del gen de la ALS en plantas R y S de *S. alba*, mediante el uso de primers específicos diseñados para los distintos dominios, reveló la existencia de una ALS alterada debido a una sustitución nucleotídica de Citosina por Timina (**C**CT por **T**CT) responsable de la mutación Pro<sub>197</sub>/Ser en el dominio A del gen, la cual es el mecanismo que describe la evolución de resistencia a tribenuron y a otros herbicidas inhibidores de ALS en esta especie.



**Gracias**