Universidad de Córdoba

Estudio e identificación de mecanismos de resistencia en cultivares de trigo Clearfield®

Francisco Jiménez Rosario
Rafael De Prado Amián

7mo Congreso SODIAF
del 10 al 12 de noviembre 2016

Sistema Clearfield

MALEZAS EMPARENTADAS CON EL CULTIVO

Cultivos Clearfield → Mutación enzima ALS

HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ACETOLACTATO SINTASA (ALS).

Los herbicidas que actúan en la ALS comprenden cinco familias.

- **Las Imidazolinonas (IMI)**
- **Sulfonilureas (SU)**
- **Triazolopirimidinas (TP)**
- **Pirimidiltiobenzoatos (PTB)**
- **Sulfonil amino carbonil triazolinonas (SCT)**

- **Los herbicidas ALS son muy utilizados en el mundo debido a su amplio espectro de control de malas hierbas, baja toxicidad en mamíferos, alta selectividad y bajas dosis de aplicación (Mallory-Smith y Retzinger , 2003; Arregui y Puricelli, 2008).**

MECANISMOS DE RESISTENCIA

RESISTENCIA? .. **(HRAC)**

Tolerancia Natural

La define como la habilidad y/o aptitud heredable de una especie vegetal para sobrevivir y reproducirse después de un tratamiento herbicida, pudiendo considerarse como una característica a nivel de especie.

Resistencia

Es la capacidad de un individuo dentro de una población de una especie de malas hierbas, que le permite sobrevivir y reproducirse después de recibir un tratamiento herbicida a la dosis de campo recomendada, y que era normalmente controlada cuando era sensible.

- **Esto es debido a:**

- **Variabilidad intra específica, presión de selección (Modo de acción), sistema de producción y aplicación de producto.**

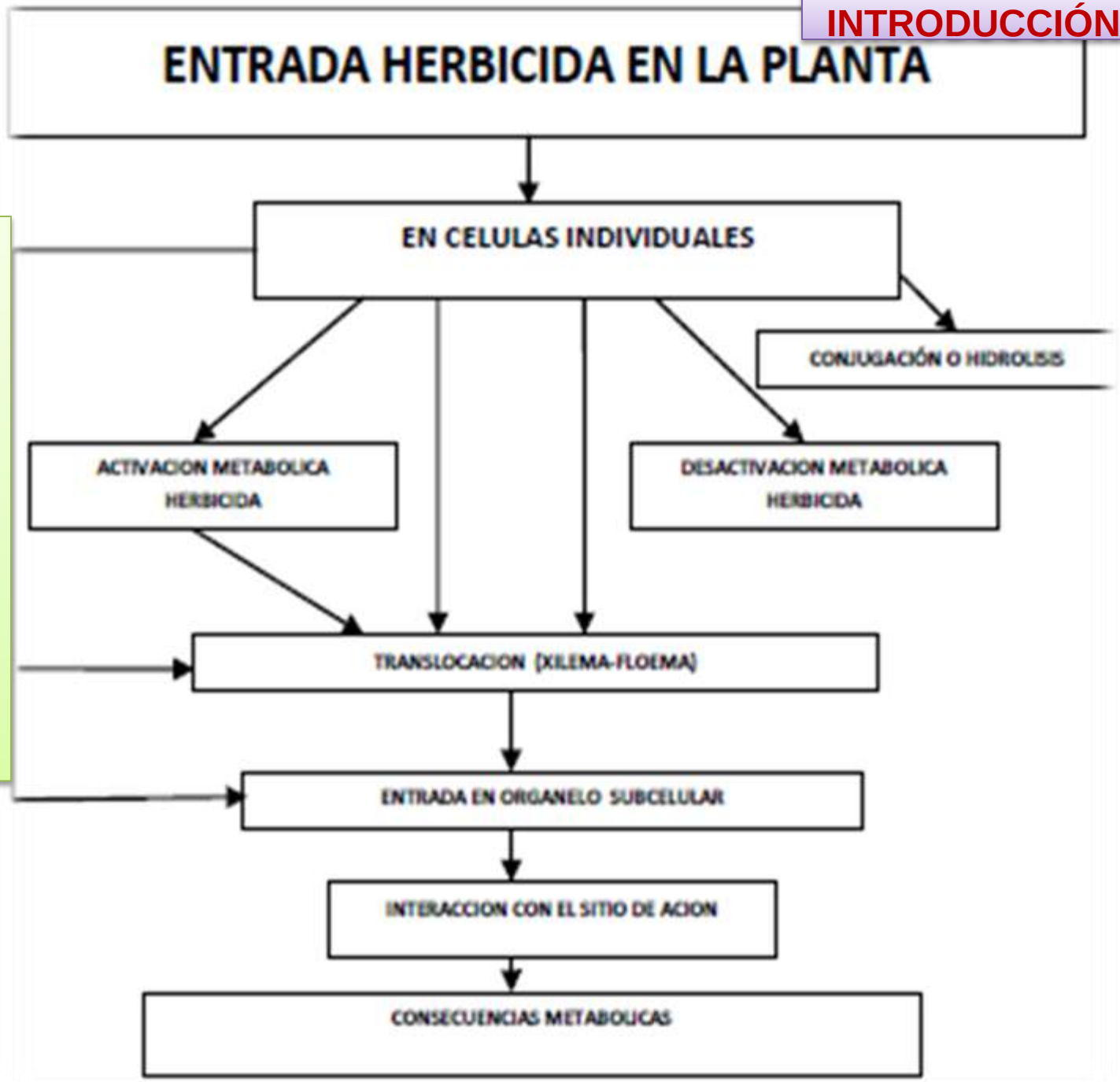
MECANISMOS DE RESISTENCIA

RESISTENCIA? .. **(HRAC)**

- **RESISTENCIA EN EL SITIO DE ACCIÓN CAUSADA POR:**
  - ***MODIFICACIÓN EN EL SITIO DE UNIÓN CON EL HERBICIDA***
  - ***SOBREEXPRESIÓN DE LA ENZIMA***
- **RESISTENCIA FUERA DEL SITIO DE ACCIÓN DEBIDA A:**
  - ***RETENCIÓN***
  - ***PENETRACIÓN REDUCIDA***
  - ***TRANSLOCACIÓN REDUCIDA***
  - ***METABOLIZACIÓN DEL HERBICIDA***

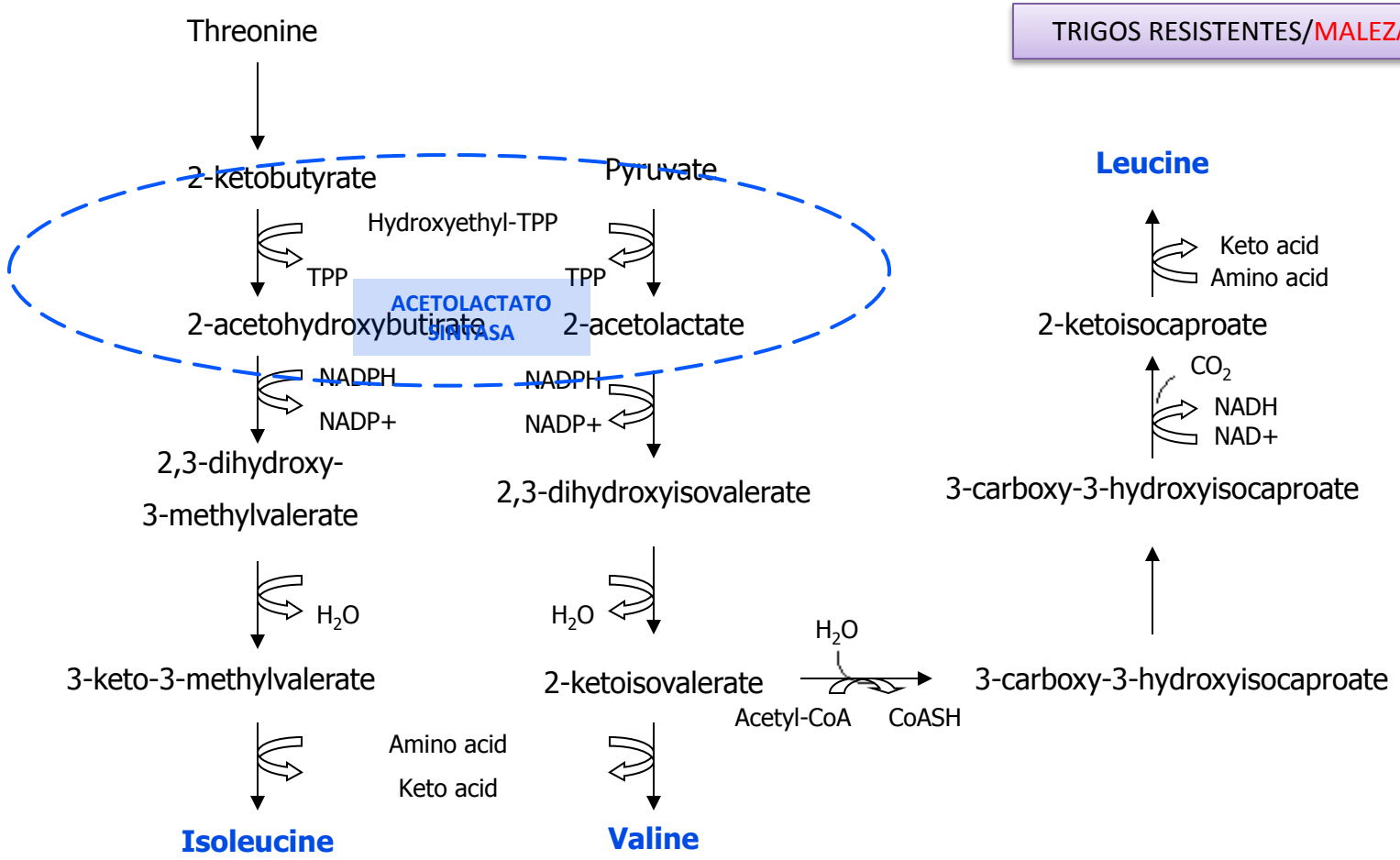
FIGURA 2

El modo de acción del herbicida implica todo un proceso de etapas relacionadas con la entrada, movimiento y llegada del herbicida hasta el sitio donde ejercerá el efecto fitotóxico en la planta (Devine *et al.*, 1993)



ACETOLACTATO SINTASA (ALS)

TRIGOS RESISTENTES/MALEZAS!!!



➢**Figura 3. Ruta Biosintética de aminoacidos. ALS, también conocida como acetohidroxiácido sintasa (AHAS), es la primera enzima común de la biosíntesis de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, importantes en la síntesis de proteínas vitales en microorganismos y plantas .**

OBJETIVOS

Los objetivos generales que se plantean son:

- **Definir mecanismos de resistencia a Imazamox de siete cultivares de trigo.**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. **Establecer niveles de resistencia de los cultivares de trigo IMI-resistentes y Gazul (sensible) al herbicida Imazamox, mediante:**

   - ***Ensayos de dosis-respuesta.***
   - ***Ensayos de inhibición de la actividad enzimática de la ALS***

4. **Estudiar mecanismos de resistencia de los cultivares de trigo IMI-resistente mediante las siguientes actividades:**

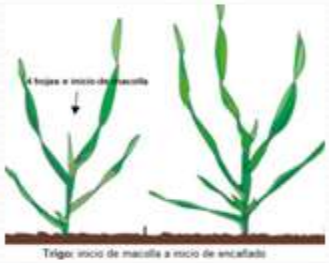
   - ***Ensayos de retención foliar.***
   - ***Ensayos de metabolismo.***

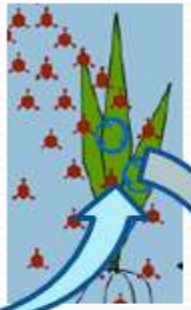
ENSAYO DOSIS RESPUESTAS (ED_{50})

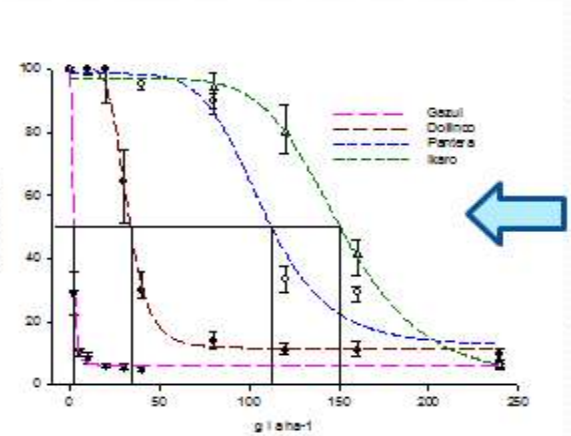
MATERIALES Y MÉTODOS

0, 40, 80, 120, 160 y 240 g ia ha^{-1} Dosis de Imazamox + 1.25 L ha^{-1} Dash. (Caldo 250 L ha^{-1}).

SIETE CULTIVARES



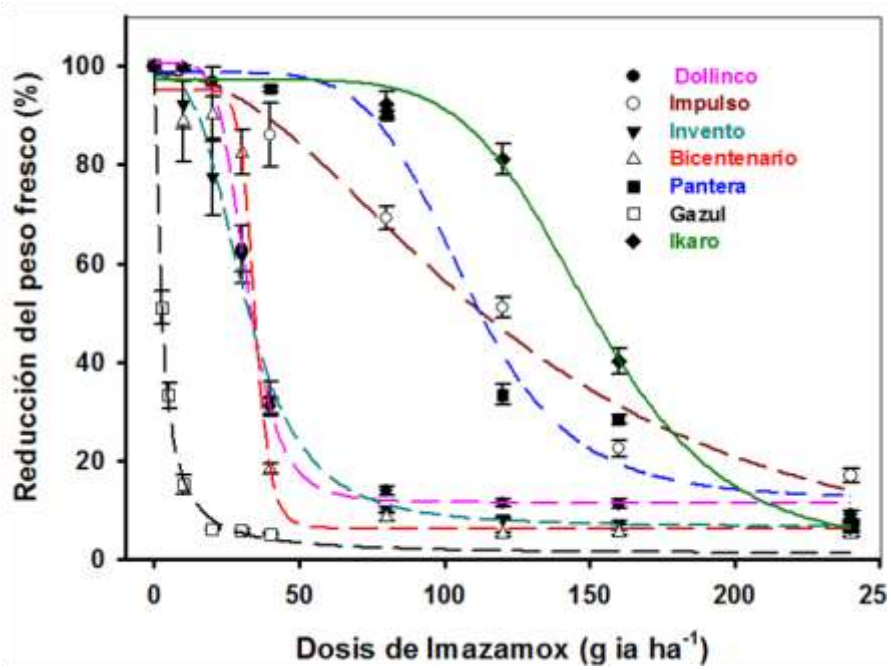




PARÁMETROS DE LA ECUACIÓN UTILIZADA[1/] PARA ESTIMAR LAS ED_{50} DE LOS CULTIVARES DE TRIGO TRATADOS CON IMAZAMOX.

Cultivares	Accesión	Máximo	Mínimo	Pendiente de Hill	(R^2 adj.)[3]	ED_{50} (g ia ha^{-1})	FR[4]
Dollinco	R	100.00	11.05	5.67	0.98	31.98 (0.383)[2]	19.6
Impulso	R	99.15	3.93	2.66	0.96	110.05 (6.029)	67.5
Invento	R	95.09	6.30	12.62	0.97	34.55 (0.409)	21.2
Bicentenario	R	97.81	6.65	3.18	0.96	31.56 (0.954)	19.4
Pantera	R	98.80	12.21	6.05	0.97	107.70 (2.013)	66.1
Gazul	S	100.00	6.06	2.63	0.99	1.63 (0.103)	------
Ikaro	R	97.16	2.02	6.57	0.97	151.03 (2.754)	92.7

[1/]Ecuación Log-logistic $Y = L + \{(U-L) / [1 + (x/I_{50})^b]\}$, donde Y es la actividad enzimática, expresada como porcentaje con respecto al control no tratado; x (variable independiente) es la dosis de Imazamox (g ia ha^{-1}), U es el valor máximo de la asíntotas, L es el valor mínimo, b es el punto de inversión de la curva, ED_{50} es la dosis de Imazamox requerida para reducir en 50% el peso fresco. Los datos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal. [2/]SE= error estándar. [3/]coeficiente de determinación. [4/]FR = factor de resistencia = ED_{50} R / ED_{50} S).



Ikaro > Impulso > Pantera > Invento >Dollinco ≥ Vicentenario > Gazul

ESTUDIOS DE ACTIVIDAD DE ACETOLACTO SINTASA (ALS)

Extracción de la enzima

↓

Ensayos de actividad ALS

↓

La inhibición de la ALS se determinó mediante el método colorimétrico que estima la cantidad de acetolactato, luego de que se convierte en acetoína por descarboxilación en presencia de ácido. Los valores de acetoína se utilizaron como actividad de ALS y se expresaron en porcentaje respecto al control.

↓

Estimación de I_{50}

↓

Determinación de Factores de Resistencia (F.R.)

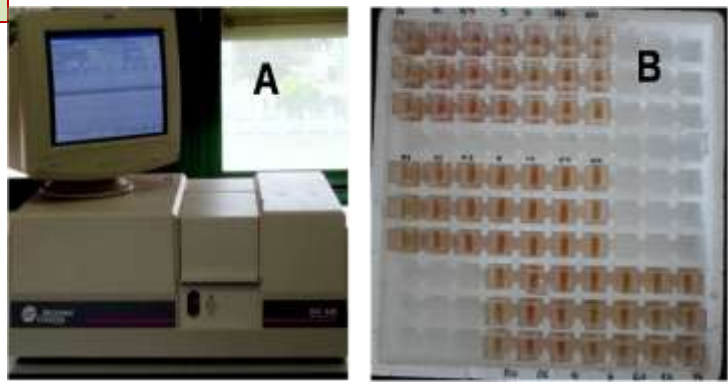


Figura 22. (A) Espectrofotómetro para medir la absorbancia de la acetoína debido a la coloración de la acetolactato tras la conversión a acetoína (B).

PARÁMETROS DE LA ECUACIÓN[1] UTILIZADA PARA ESTIMAR LA ACTIVIDAD DE LA ALS (I_{50}) EN LOS CULTIVARES DE TRIGO TRATADOS CON IMAZAMOX.

Cultivares	Accesión	Máximo	Mínimo	Pendiente de Hill	$(R^2)^3$	I_{50} (µM)	FR[4]
Dollinco	R	101.42	10.95	0.56	0.99	8.45 (1.24)[2]	3.75
Impulso	R	100.85	26.91	0.52	0.99	37.08 (5.38)	16.48
Invento	R	101.67	16.48	0.53	0.98	11.53 (3.15)	5.12
Bicentenario	R	101.25	15.32	0.68	0.99	8.05 (0.87)	3.57
Pantera	R	101.53	14.73	0.48	0.98	29.06 (3.65)	12.91
Gazul	S	100.32	5.86	1.09	0.98	2.25 (0.16)	-------
Ikaro	R	101.51	19.15	0.40	0.98	60.94 (8.90)	27.08

[1]Ecuación Log-logistic $Y = L + \{(U-L) / [1 + (x/I_{50})^b]\}$, donde Y es la actividad enzimática, expresada como porcentaje con respecto al control no tratado; x (variable independiente) es la concentración Imazamox (µM), U es el valor máximo de la asíntotas, L es el valor mínimo, b es el punto de inversión de la curva, e I_{50} es la concentración de Imazamox requerida para reducir en 50% la actividad enzimática de la ALS. Los datos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal. [2]SE= Valores entre paréntesis Error estándar. [3]coeficiente de determinación. [4]FR = factor de resistencia = I_{50} R/ I_{50} S).

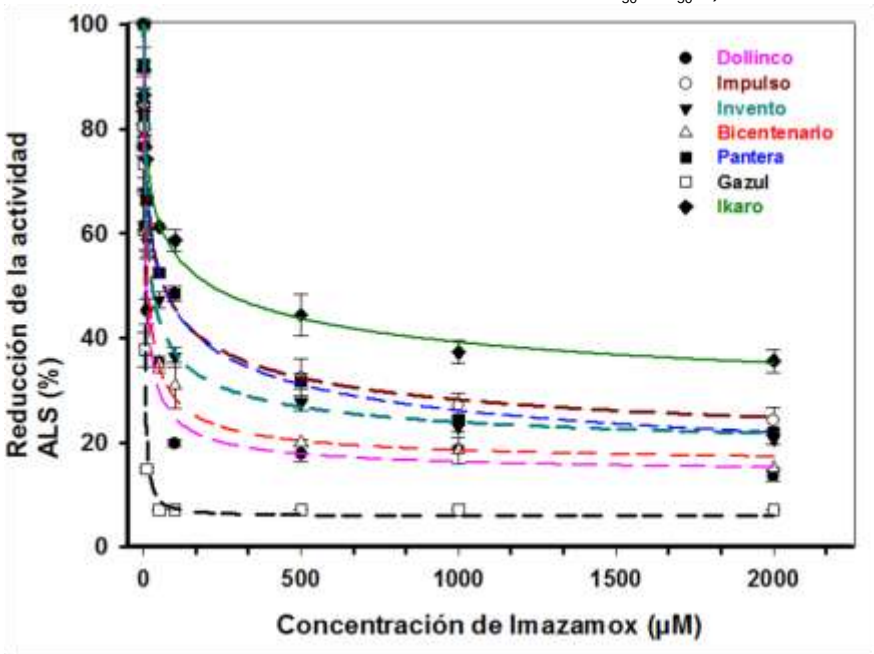
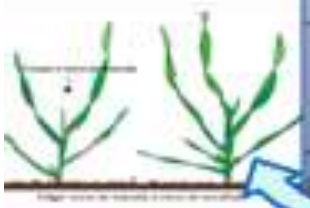


Figura 34. Actividad enzimática en siete cultivares de trigo R y S incubados con diferentes concentraciones de Imazamox.

ENSAYO DE RETENCIÓN FOLIAR

MATERIALES Y MÉTODOS

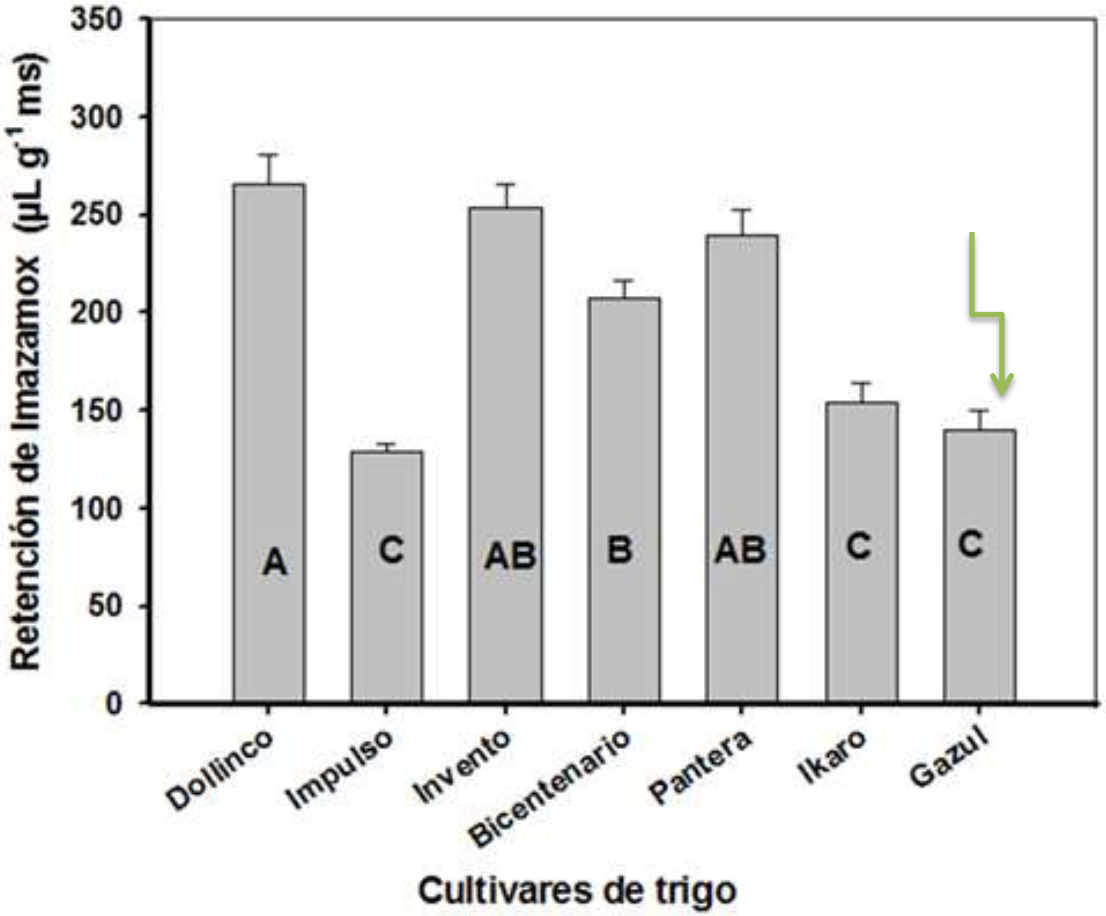
Solución de Pulsar 40 en dosis de 60 g ia ha^{-1} de Imazamox + Dash a 1.25 L ha^{-1} (100 mg fluoresceína/ Litro NaOH 5 mM)



Secado

Espectrofluorímetro
Absorbancia: 490 / 510 nm

Secado 80°C/72 h

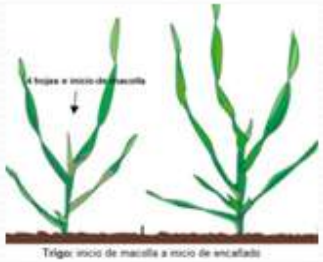


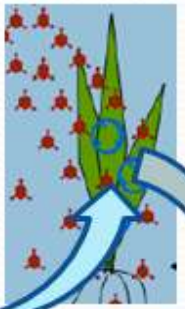
Retención foliar de Imazamox en siete cultivares de trigo. Los datos corresponden al promedio de 10 plantas (repetición). (P <0.05) de Tukey.

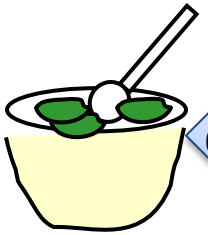
ESTUDIOS DE METABOLISMO DE IMAZAMOX

MATERIALES Y MÉTODOS

DOSIS 40 y 80 g ia ha^{-1} y cortado 24-48-72-96 y 120 horas DDT

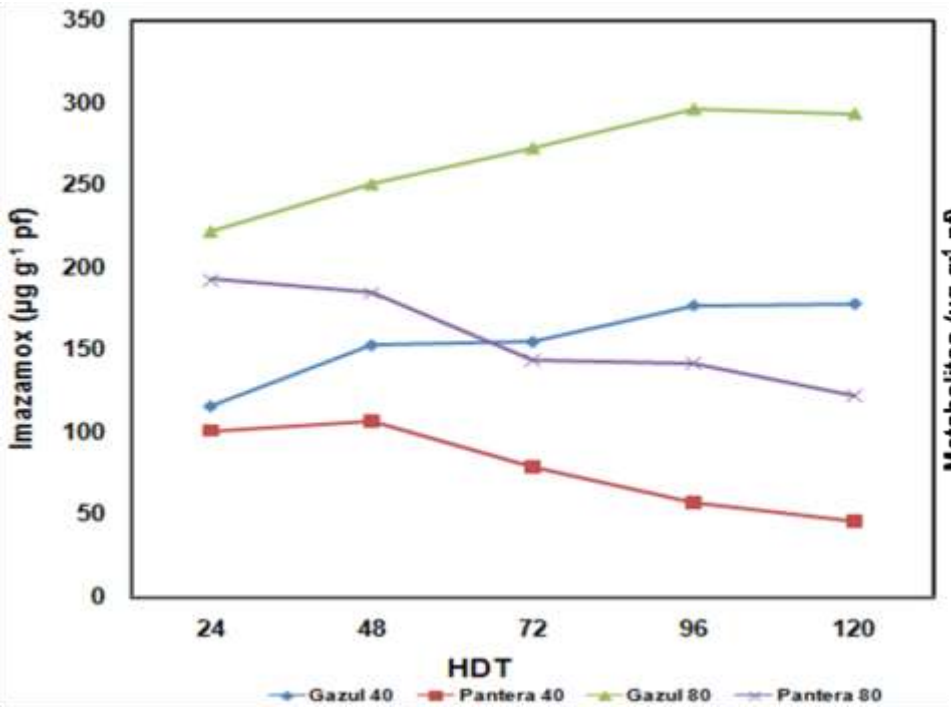


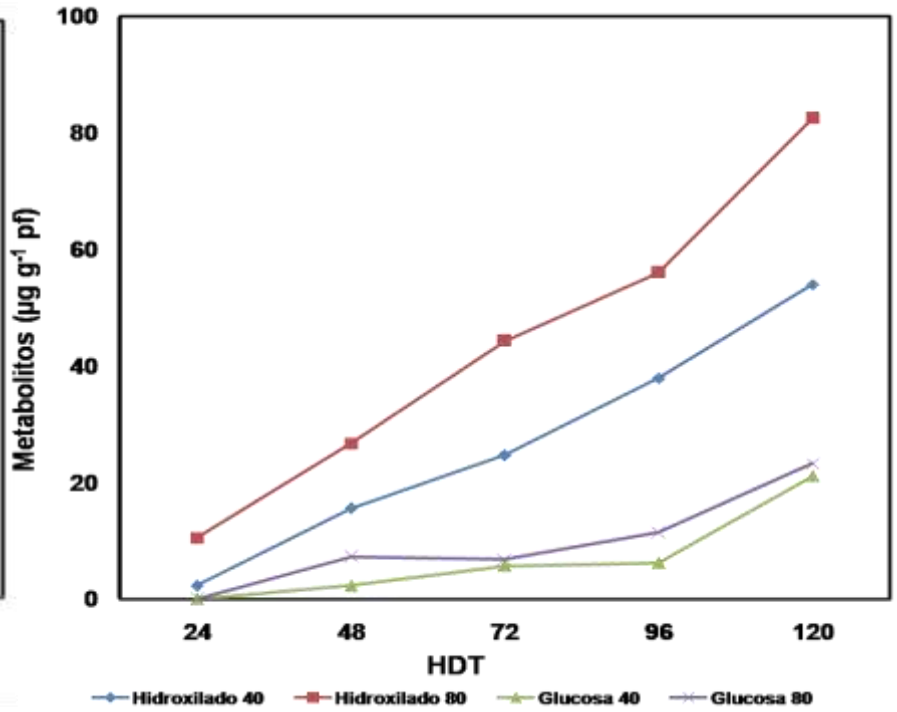




0-24- 48- 72- 96 -120

Cultivar pantera





Cantidad de Imazamox y sus metabolitos respecto a dosis y tiempo de evaluación en los cultivares Pantera R y Gazul S.

CONCLUSIÓNES

Los resultados de las investigaciones realizadas permitieron llegar a las siguientes conclusiones.

- **Los ensayos de respuestas a dosis de Imazamox (*in vivo) y de actividad enzimática (in vitro)* permitieron clasificar los cultivares según el nivel de resistencia en; alta (Ikaro), medio (Impulso y Pantera) y moderado (Invento, Dollinco y Bicentenario).**

- **Se confirma la metabolización de Imazamox a metabolitos hidroxilado y glucosídico, confirmándose la presencia del mecanismo de Desactivación metabólico del herbicida, además de la mutación, en el cultivar Pantera R.**

- **Se descarta el mecanismo de absorción y translocación de imazamox en el cultivar Pantera R.**

- **Se selecciona el cultivar Pantera para el programa de Mejora genética utilizando el cultivar Gazul como cultivar adaptado.**

AGRADECIMIENTO

Agradecer al consejo Nacional de Investigación Agropecuarias y Forestales (CONIAF) por disponer de los recursos financieros a fin de cubrir los gastos de estancia durante el desarrollo de mis estudios doctorales.

Agradecer al Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) por facilitar el proceso para la realización de mis estudios doctorales.