



UNIVERSIDAD DE CORDOBA
INSTITUTO DOMINICANO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS



Resistencia de *Sinapis alba* (Mostaza blanca) a inhibidores de ALS y control herbicida alternativo en España

J. M. ROSARIO, H. CRUZ-HIPOLITO y R. DE PRADO

Boca Chica, República Dominicana
Julio, 2010.

Introducción

- La resistencia a herbicida es un carácter inherente a ciertos individuos en una población de una especie maleza, que les permite sobrevivir y reproducirse después de la aplicación de la dosis recomendada de un herbicida, que en condiciones normales debió controlarla eficazmente.

Aplicaciones de herbicidas y aparición de la **resistencia**

1	2	3	4	5	6	7
XXXXXX	XX X XX	XXX X X	X XXXX	X X XXX	X XXX	XXXXX
XXXXXX	XXXXXX	XX X XX	X X XXX	X X XXX	XXXX X	XXXXX
XXXXXX	X XXXX	XXXX X	X X XXX	X X XXX	XXXX X	XXXXX
XXXXXX	XXXXXX	XX X XX	X XXXX	X X XXX	XXXX X	X X XXX
X X XXX	XXXXXX	XX X XX	X X XXX	X X XXX	XXXX X	XXXXX
XXXXXX	XXXXX X	XXXXXX	X XXXX	X X XXX	XXXX X	XXXXX
XXXXXX	XXXXXX	XX X XX	X X XXX	X X XXX	XXXX X	XXXXX
XXXXXX	XXXXXX	X XXXX	X X XXX	X X XXX	XXXX X	XXXXX
XXXXXX	X XXXX	XXX X X	X X XXX	X X XXX	XXXX X	X X XXX
XXXXXX	XXXXXX	X XXXX	X X XXX	X X XXX	XXXX X	XXXXX
XXXXXX	XXXXX X	X X XXX	X X XXX	X X XXX	XXXX X	XXXXX

Introduction

- La acetolactato sintasa (ALS) cataliza la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina, esenciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- Los herbicidas que se unen en algún sitio de la enzima acetolactato sintasa son conocidos como inhibidores de la ALS, causando deficiencia de estos aminoácidos y la posible muerte en plantas susceptibles .
- Los inhibidores de ALS es el grupo con mayor tasa anual de resistencia, 181 biotipos en 108 especies, 80 dicots y 28 monocots en 34 países (Heap, 2010).
- España, tiene 32 especies resistentes y de estas 4 son resistentes a inhibidores de ALS: *Alisma plantago-aquatica*, *Cyperus difformis*, *Papaver rhoeas* y *Sinapis alba*.

***S. alba* L (Mostaza blanca):**

Origen

Agresividad

Control



Objetivo General :

Examinar la resistencia de *S. alba* a herbicidas inhibidores de ALS, elucidar mecanismos de resistencia y evaluar control herbicida alternativo en campo.

Materiales y métodos

- Material vegetal para ensayos de laboratorio e invernadero
- Fueron prospectadas semillas de 15 poblaciones de *S. alba* en el Suroeste de España, controladas con tribenuron metil durante la última década en cultivo de cereales. Semillas de plantas cosechadas en áreas nunca tratadas fueron consideradas como testigo susceptible.
- Las semillas fueron germinadas a 4°C en oscuridad/luz.
- Las plántulas crecieron en macetas y sustrato 2:1:1 (suelo:turba:vermiculita) en invernadero a 18/14°C día/noche, 65% HR y 10 h luz hasta el estado de 4-5 hojas.

Screening con poblaciones de *S. alba*



Ensayos Dosis-Respuesta



- Biotipos: AR₁ (S) y AR₈ (R)
- Arreglo Tratamiento : DCA
- Evaluación peso fresco 21 DDT
- Datos ajustados a modelo de regresión no lineal log-logistic
- Se estimó la ED₅₀ y se cálculo el F.R.

Ensayos Dosis-Respuesta: herbicidas y dosis

Herbicidas	Biotipo	Dosis (g i. a. ha ⁻¹)									
		0.0	0.4	0.8	1.6	2.4	3.2	4.8	6.4	12.8	25.6
Tribenuron	R	0.0	0.4	0.8	1.6	2.4	3.2	4.8	6.4	12.8	25.6
	S	0.0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8
Iodosulfuron	R	0.0	0.4	0.8	1.6	2.4	3.2	4.8	6.4	12.8	25.6
	S	0.0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8
Mesosulfuron	R	0.0	16.0	28.0	40.0	64.0	80.0	128.0	160.0		
	S	0.0	8.0	16.0	32.0	40.0	64.0	80.0			
Imazamox	R	0.0	1.8	3.6	7.2	14.4	28.8	57.6	115.2		
	S	0.0	0.075	0.15	0.3	0.6	1.2	2.4	4.8		
Florasulam	R	0.0	2.5	3.75	5.75	10.0	15.0	20.0			
	S	0.0	0.3125	0.625	1.25	2.5	5.0	7.5			
Flucarbazone	R	0.0	14.0	28.0	56.0	84.0	112.0	168.0	224.0		
	S	0.0	7.0	14.0	21.0	28.0	42.0	56.0	84.0		
Bispiribac sodium	R	0.0	0.0625	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0		
	S	0.0	0.0625	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0		

Ensayos de inhibición de la ALS

1.- Extracto Crudo de ALS :

- Corte 3 gramos tejido foliar de planta R y S
- Congelado y pulverizado tejido foliar en mortero
- Adición de 0.5 g polivinilpirrolidona
- Adición de 4 ml solución Ext. Buffer/g tissue
- Agitado, filtrado y centrifugado del homogenado
- Precipitado de la fracción de proteína con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Centrifugado y suspendido del pelet en sol. extracción buffer (700 μL)
- Calibrado Col. sefadex con sol. Elución Buffer.
- Agitado del pelet redissuelto a baja temperatura
- Paso del pelet redissuelto al través de la col. Sefadex, adicionando 2 ml, 1 ml y otro ml de elución buffer a la columna

2.-Medición de la actividad ALS

- Mezcla de 0.05 ml de Extracto de ALS+0.1 ml de la sol. Buffer de ensayo
- Adición de la concentración de c/. herbicida en c/. eppendorf
- Agregado a cada eppendorf de 0.25 ml with PP
- Adición de 0.05 ml H_2SO_4 3M solo al eppendorf del blanco para detener la reacción
- Incubación a $37^\circ\text{C}/1\text{h}$, después de adicionar H_2SO_4 al resto
- Nueva incubación a $60^\circ\text{C}/15$ min
- Adición de 0.25 ml de las soluciones de creatina y naftol
- Agitado y reincubado a $60^\circ\text{C}/15$ min
- La acetoina fue detectada como un complejo coloreado a 520 nm
- La inhibición de la ALS fue expresada en $\text{nmol de acetoina mg}^{-1}$ protein

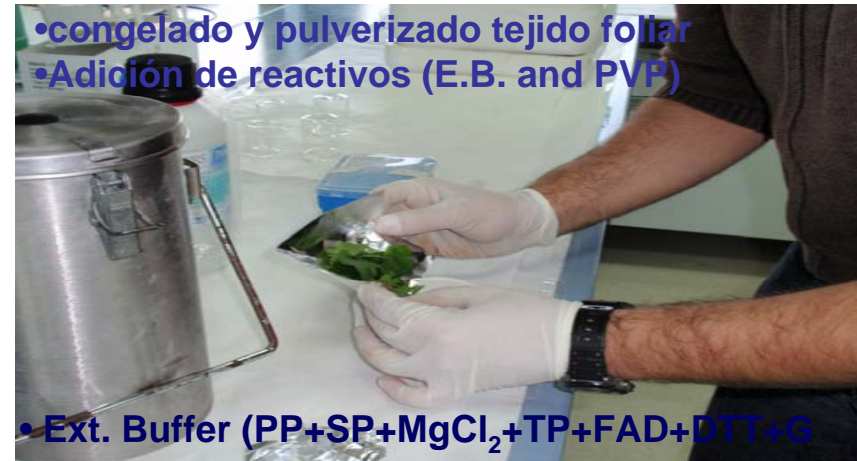
Ensayo inhibición ALS: herbicidas y concentración

Herbicida	B	Concentraciones Herbicidas											
		0.0	5.0	10.0	25.0	50.0	100.0	250.0	500.0	1000.0	1500.0	2500.0	3000.0
Tribenuron (mM)	R	0.0	5.0	10.0	25.0	50.0	100.0	250.0	500.0	1000.0			
	S	0.0	0.05	0.10	0.25	0.5	0.75	1.0					
Iodosulfuron (nM)	R	0.0	500	1000	2500	5000	10000	25000	50000				
	S	0.0	500	1000	2500	5000	10000	25000					
Mesosulfuron (nM)	R	0.0	50.0	250.0	500.0	1000	10000	25000	30000				
	S	0.0	50.0	100.0	250.0	500.0	10000	25000	30000				
Imazamox (µM)	R	0.0	0.25	0.50	1.0	2.50	5.0	10.0	30.0	50.0			
	S	0.0	0.25	0.50	1.0	2.50	5.0	10.0	30.0	50.0			
Florasulam	R	0.0	25.0	50.0	100.0	200.0	300.0	500.0	1000				
	S	0.0	6.25	12.5	25.0	50.0	100.0	200.0	250.0	300.0			
Flucarbazone (nM)	R	0.0	50.0	100.0	250.0	500.0	1000	2500	5000	10000	15000	25000	30000
	S	0.0	50.0	100.0	250.0	500.0	1000	2500	5000	10000	15000	25000	30000
Bispiribac sodium (nM)	R	0.0	1.25	2.50	5.0	10.0	25.0	40.0					
	S	0.0	1.25	2.50	5.0	10.0	25.0	40.0					

Ensayos de inhibición de ALS

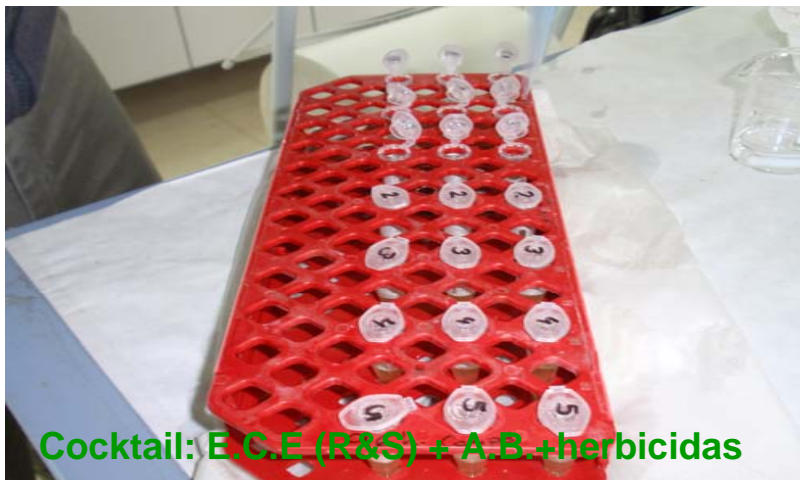


3 gramos tejido foliar planta R y S

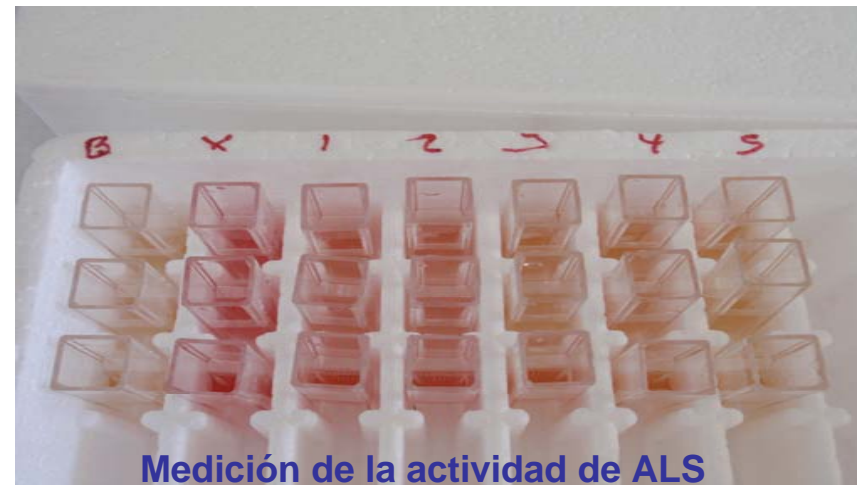


- congelado y pulverizado tejido foliar
- Adición de reactivos (E.B. and PVP)

- Ext. Buffer (PP+SP+MgCl₂+TP+FAD+DTT+G



Cocktail: E.C.E (R&S) + A.B. + herbicidas



Medición de la actividad de ALS

Evaluación de herbicidas posemergentes para control de *S. alba* resistente.



Tratamientos herbicidas postemergentes

<i>Tratamiento herbicida</i>	<i>Rates (g a.i ha⁻¹)</i>
Control no tratado
Tribenuron metil 50% SG	14.0
Tribenuron metil 50% (2)	56.0
Mecoprop-P+tribenuron metil	800.0+0.1
Tribenuron metil+MCPA	28 + 600
Tribenuron metil+bromoxinil	8.4 + 168
(Iodosulfuron+mesosulfuron)+mefenpyr diethyl+(ioxinil+bromoxinil+mecoprop-P)	(3+15)+0.5+(112.5+112.5+562.5)



**Evaluación rendimiento de trigo y
biomasa seca aérea de *S. alba***

Resultados y Discusiones

Screening con poblaciones de *S. alba*

Poblaciones <i>S. alba</i>	Peso fresco testigo	Peso fresco 20 g i. a. ha ⁻¹		Reducción peso fresco (21 DDT)
AR1	12.6	1.1	11.5	90.9±2.3a
AR2	15.4	1.3	14.1	90.9±2.1a
AR3	20.7	1.2	19.4	91.3±1.8a
AR4	19.6	13.6	6.0	30.0±2.3b
AR5	13.9	11.9	2.0	13.1±3.1c
AR6	7.9	6.9	1.0	11.6±2.1cd
AR7	19.0	16.7	2.4	11.9±2.2cd
AR8	16.4	14.5	1.9	10.9±2.7de
AR9	19.0	16.8	2.2	11.1±2.2d
AR10	16.7	14.9	1.8	10.2±1.2de
AR11	16.4	14.8	1.6	9.0±2.2ef
AR12	14.0	12.9	1.2	7.9±2.8fg
AR13	8.6	7.9	0.7	7.7±2.7fg
AR14	19.4	18.0	1.4	6.6±1.8gh
AR15	16.4	15.3	1.1	6.4±2.2gh
AR16	17.8	16.7	1.1	5.7±1.8h
LSD Fischer: alfa 0,05				1.9675

Screening poblaciones *S. alba*



Ensayos Respuesta a Dosis e Inhibition de ALS-

Herbicida	B	Ensayos Respuesta-Dosis (invernadero)				Ensayos Inhibición-ALS (Lab)			
		ED ₅₀	RF	Rajust	Valor-P	ED ₅₀	RF	Rajust	Valor-P
Tribenuron	R	1.760	9.8	0.985	<0.0001	908.25	3,969.0	0.91	<0.0001
	S	0.180		0.993	<0.0001	0.22		0.89	<0.0001
Iodosulfuron	R	2.462	17.5	0.975	<0.0001	427.96	835.0	0.972	<0.0001
	S	0.141		0.997	<0.0001	0.51		0.996	<0.0001
Mesosulfuron	R	18.175	11.9	0.997	<0.0001	11833.57	900.0	0.99	<0.0001
	S	1.529		0.999	<0.0001	13.39		0.90	<0.0001
Imazamox	R	1.905	4.5	0.997	<0.0001	7.80	1.8	0.97	<0.0001
	S	0.423		0.987	<0.0001	4.39		0.97	<0.0001
Florasulam	R	2.771	65.2	0.989	<0.0001	72.10	24.0	0.97	<0.0001
	S	0.042		0.999	<0.0001	3.07		0.98	<0.0001
Flucarbazone	R	203.091	8.5	0.998	<0.0001	3780.37	86.0	0.98	<0.0001
	S	23.878		0.979	<0.0001	43.87		0.96	<0.0001
Bispiribac s	R	0.107	0.16	0.963	<0.0001	9.0	1.6	0.98	<0.0001
	S	0.66		0.883	<0.0001	5.73		0.93	<0.0001

Ensayos Respuesta-Dosis

Efecto de tribenuron



Efecto de florasulam



Efecto de mesosulfuron



Efecto de bispiribac



Herbicidas Alternativos para control de *S. alba* resistente a tribenuron.

Herbicida	Peso seco tejidos aéreo (Gramos m ⁻²)	Eficacia Herbicida	Rendimiento trigo (kg ha ⁻¹)
Testigo no tratado	138.5±1.4a	0.0±0.0d	2856.0±12.0d
Tribenuron + MCPA	11.5±0.4e	92.3±12.8a	4186.0±10.0b
Mecoprop-P+tribenuron	34.5±1.4d	88.7±19.3a	3958.0±26.0c
Tribenuron methyl 75%	62.0±3.0c	70.3±7.5b	3814.0±74.0c
Tribenuron + bromoxinyl	38.5±1.6d	66.0± 0.0b	3842.0±50.0c
Tribenuron methyl 50%	71.0±2.8b	28.7±2.8c	2924.0±24.0d
*(l+m)+m-d+ (i+b+mecop-P)	14.0±1.0e	89.0±0.0a	4752.0±56.0a
LSD (0.05)	7.1837	17.818	157.18
*(Iodosulfuron+mesosulfuron)+mefenpyr diethyl+(ioxinyl+bromoxinyl+mecoprop-P) ; Medias ensayo 2007-2008.			

Conclusiones

- **Esta investigación confirmó la resistencia de *S. alba* a tribenuron metil y otros herbicidas inhibidores de ALS**
- **Los ensayos *in vitro* sugieren que el mecanismo de resistencia es debido a la falta de afinidad de tribenuron en el sitio de acción (ALS).**
- **La retención foliar y el ángulo de contact podrían contribuir en la evolución de resistencia de *S. alba* al tribenuron y otros herbicidas inhibidores de ALS.**
- **La mezcla de tribenuron con otros herbicidas de diferentes modos de acción (MCPA or bromoxinyl) puede ser aplicada para el control de mostaza blanca resistente.**



Gracias por su atención

View of resistant *S. alba*, Arriate, Málaga, Spain, 2009.