

Detección de resistencias metabólicas en *Lolium rigidum*

Joel Torra Farré

13 de enero 2020

CPRH



Proyecto del Plan Nacional

nhTAI (Subproyecto AGL 2017 – 83325-C4-2-R)

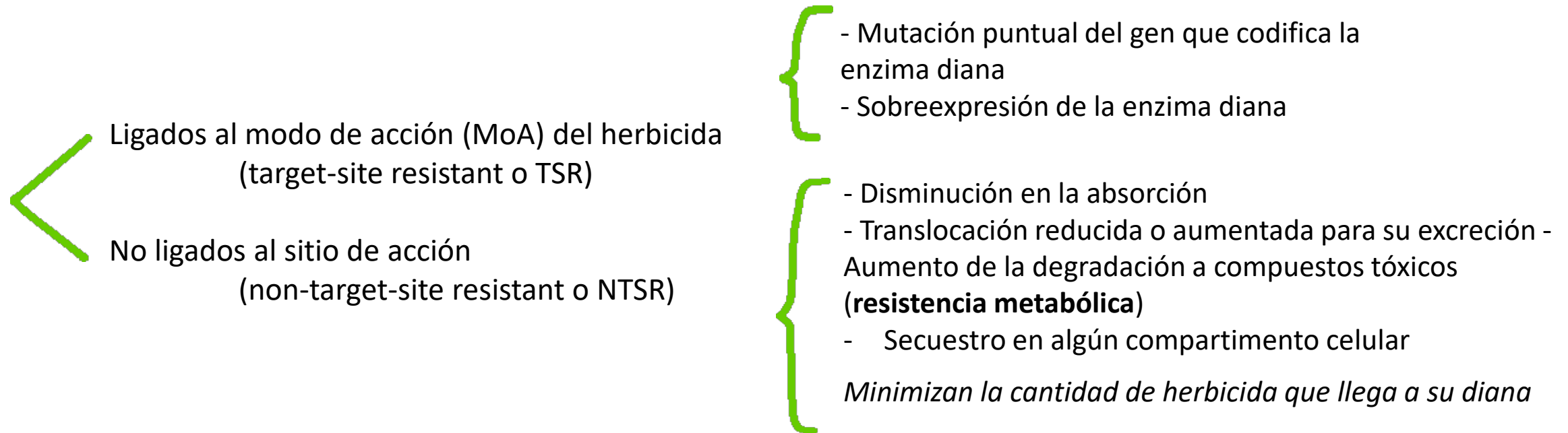


- José María Montull
- Joel Torra Farré
- Ana Oliver (TFM)



- Profesor Robert Edwards
- Investigadora Nawaporn Onkokesung

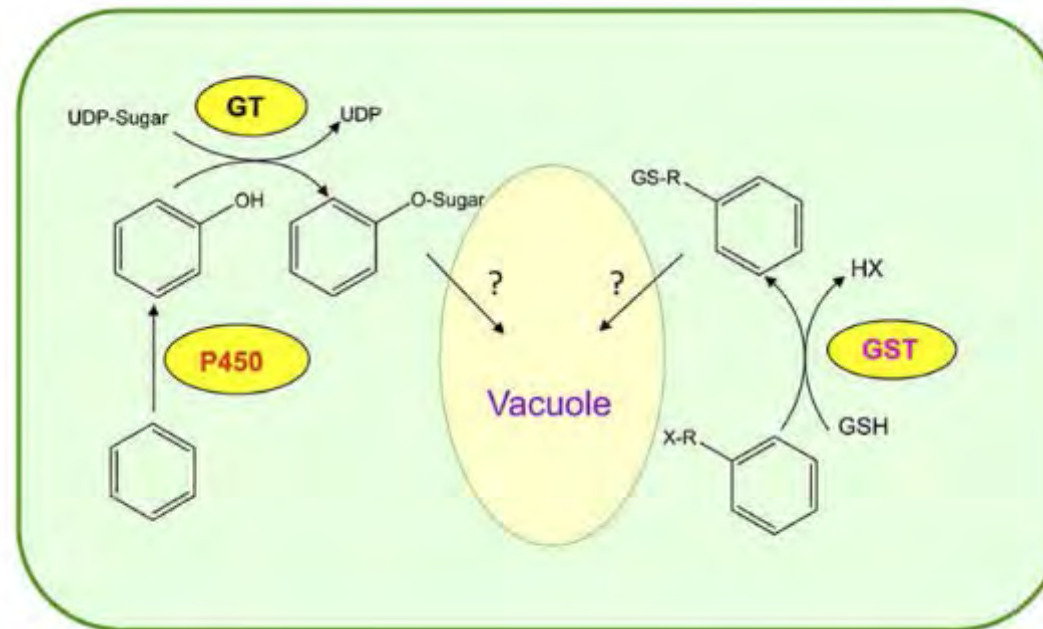
Tipos de resistencias



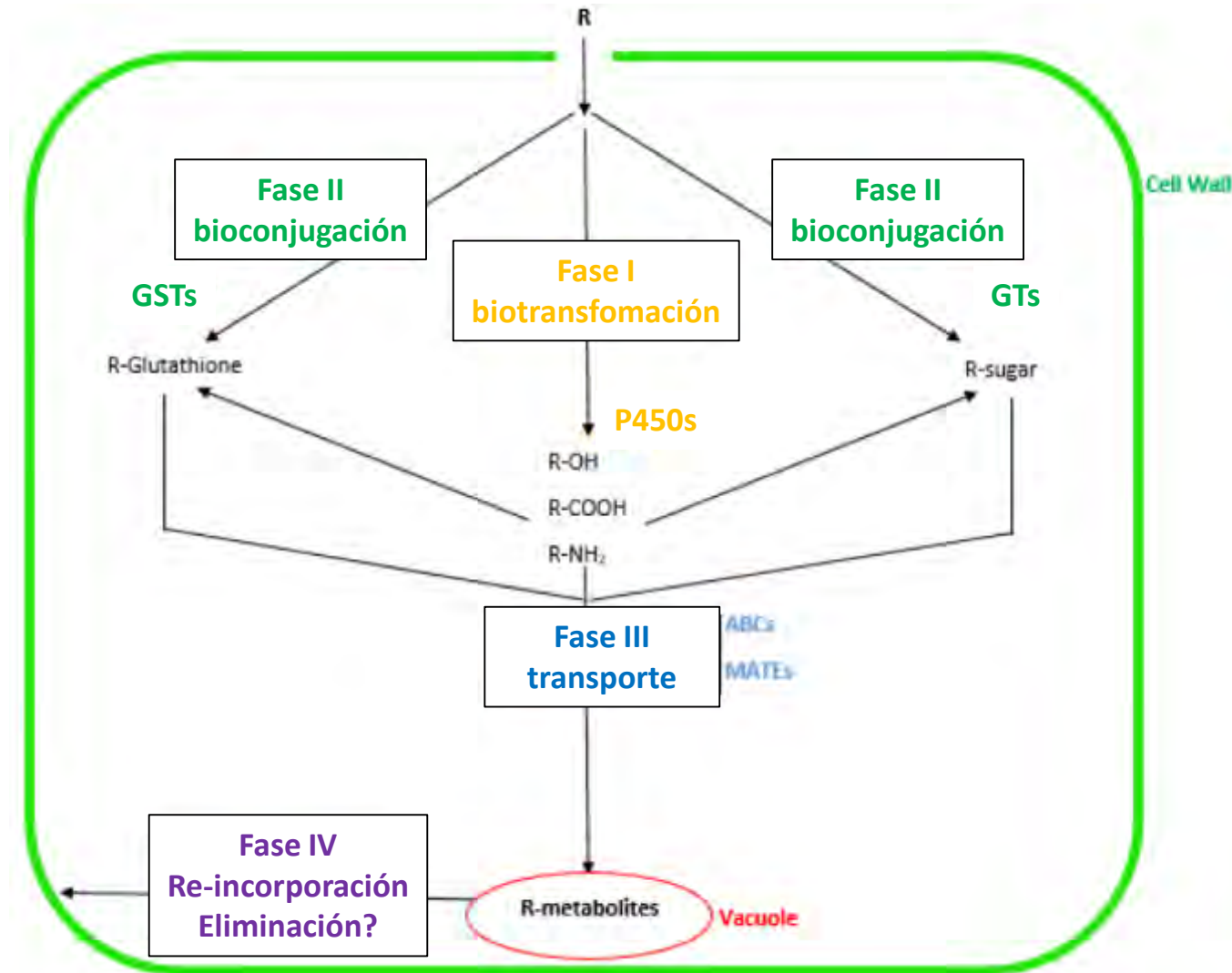
La Resistencia Metabólica es la principal amenaza: puede dar resistencia cruzada a varios herbicidas, de la misma o diferente clase química, o con diferentes modos de acción.

Resistencias metabólicas

- Citocromo P450 (P450)
- Glutati6n-S-transferasa (GST)
- Glicosil transferasas (GT)
- Transportadores de membrana (ABC y otros)



Resistencias metabólicas

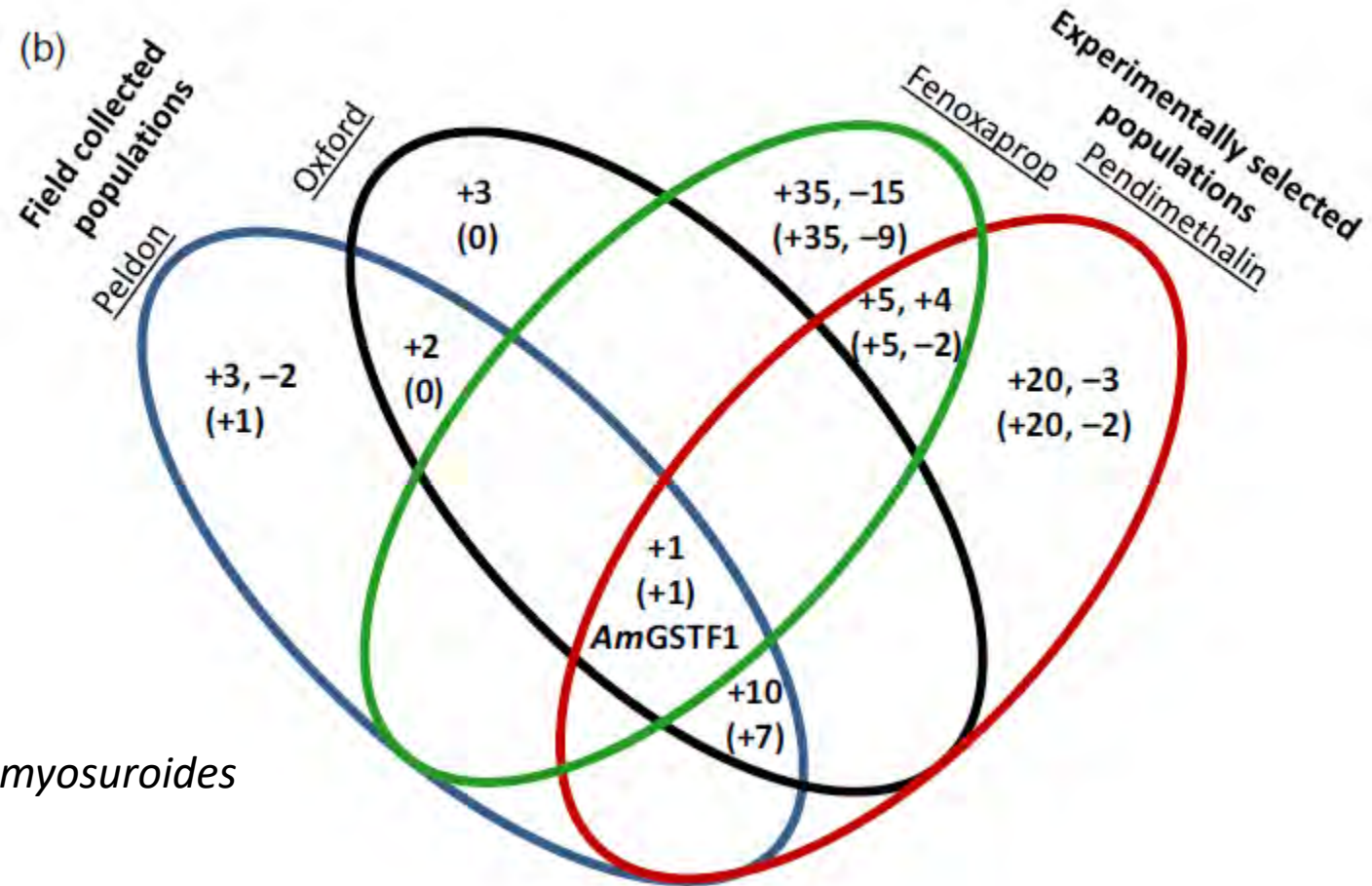


Resistencias metabólicas

- ¿Hay algún gen que se pueda utilizar de biomarcador de la resistencia metabólica a herbicidas?
- GSTs: Clases Phi i Tau, tienen la capacidad de degradar herbicidas
- *Alopecurus myosuroides* en Reino Unido: resistente A “TODO”.

AmGSTF1 - Alopecurus myosuroides

Glutación-S-transferasa



Tecnologías de detección de resistencias a herbicidas

Test BReD (Robert Edwards de Newcastle University) <https://www.mologic-bred.co.uk/>

- Herramienta de diagnóstico de resistencia para *Alopecurus myosuroides*
- Inmunoensayo de flujo lateral rápido
- Detectar y cuantificar la proteína glutatión-S-transferasa: AmGSTF1 de la clase phi)

↑ nº lectura ↑ AmGSTF1 ↑ metabolismo aumentado



Alopecurus myosuroides



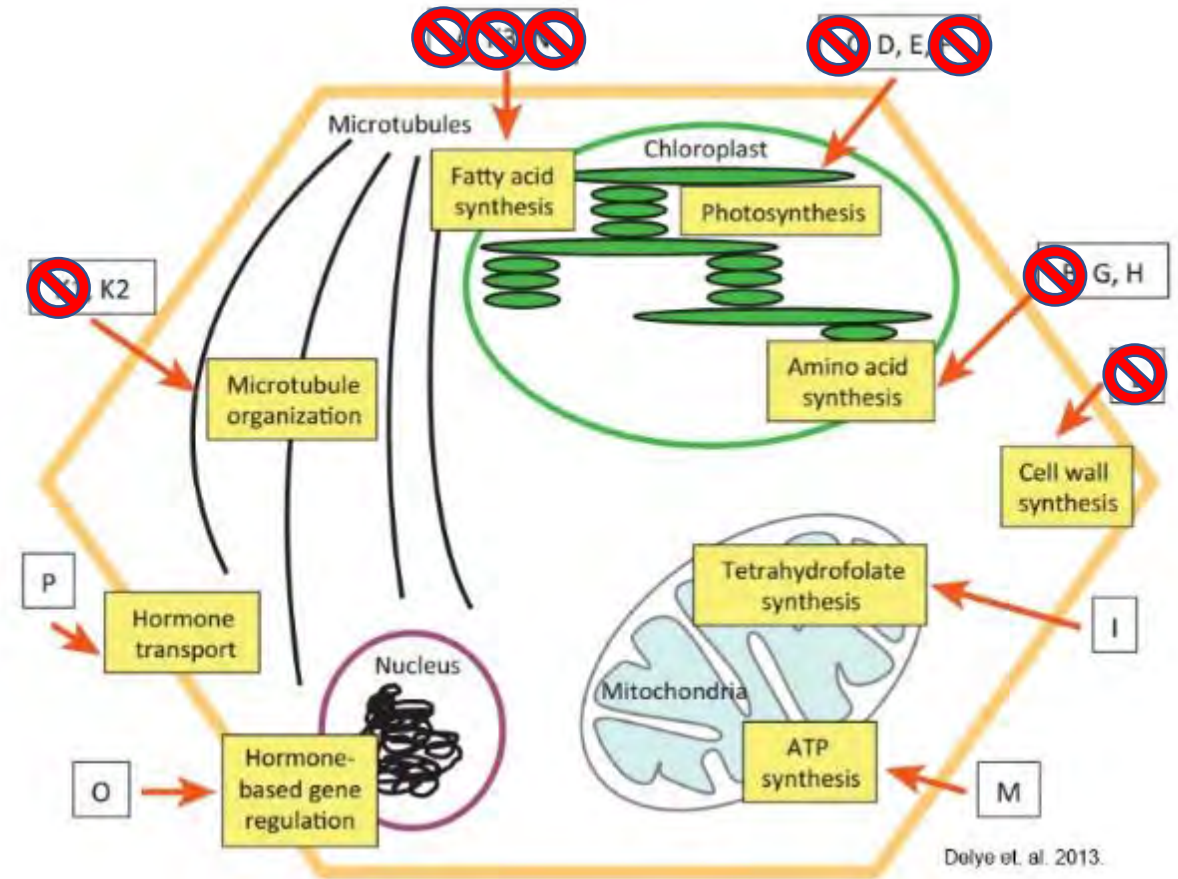
Resistencias en *Lolium rigidum*

Modos de acción para el control de vallico:

- **Pre-siembra:** Grupo G

- **PRE / POST:** Grupos A, B, C, K, S, V

Que aportan control F, N, P, L.



Resistencias en *Lolium rigidum*

- Estudios previos de R. Edwards ya apuntaban que *LrGSTF1* puede estar asociada con la resistencia metabólica en la especie

LrGSTF1 - *L. rigidum*

AmGSTF1 - *A. myosuroides*

LrGSTF1 <-> *AmGSTF1* : 91% de identidad

- En vallicos australianos y europeos se ha demostrado el rol de las GSTs en la resistencia a los grupos N y K3



Cummins et al., 2013
Dücker et al., 2019; Busi et al., 2018

Objetivos:

- **¿Nuestros vallicos más duros con seguramente resistencia por metabolismo aumentado presentan también niveles elevados de GST?**
- **En caso afirmativo, comprobar la eficacia del kit de detección rápida de resistencias metabólicas, BReD, en *L. rigidum*.**

Poblaciones estudiadas

Población	Año recolección	Localidad	Supuesto perfil
S1	2018	Ballobar	Sensible
R1	2015	Calonge de Segarra	Resistente a prosulfocarb y clortolurón
R2	2015	Calonge de Segarra	Resistente a prosulfocarb

- **SLR31** y **VLR69**: poblaciones resistentes de referencia australianas

Grupo HRAC	B	B	A	N	C2	K3 + F1
Herbicida	Iodosulfuron + Mesosulfuron	Pyroxsulam + Florasulam	Clethodim	Prosulfocarb	Clortoluron	Flufenacet + Diflufenican
S1	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
R1	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Poco resistente
R2	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Poco resistente

Poblaciones estudiadas

Grupo HRAC	B	B	A	N	C2	K3 + F1
Herbicida	Iodosulfuron + Mesosulfuron	Pyroxsulam + Florasulam	Clethodim	Prosulfocarb	Clortoluron	Flufenacet + Diflufenican
S1	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
R1	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Poco resistente
R2	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Poco resistente

Populations	ALS Trp-574	ACCase Ile-1781	ACCase Trp-2027	ACCase Ile-2041	ACCase Asp-2078
ES-sensitive 1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ES-resistant 1	N.D.	N.D.	Heterozygous mutation	N.D.	Homozygous mutation
ES-resistant 2	N.D.	N.D.	Homozygous mutation	N.D.	Heterozygous mutation

Método de detección precoz

- Niveles de GST (*LrGST1*)

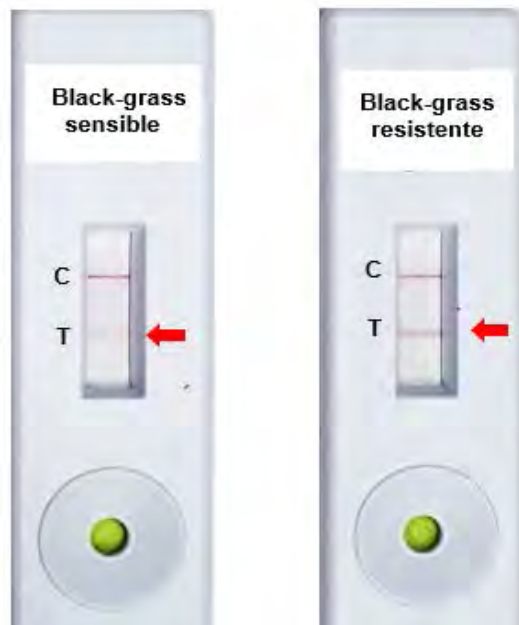
- Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

- Usando los mismos anticuerpos específicos que en el LFD

- 5 repeticiones por población (4 individuos por repetición)



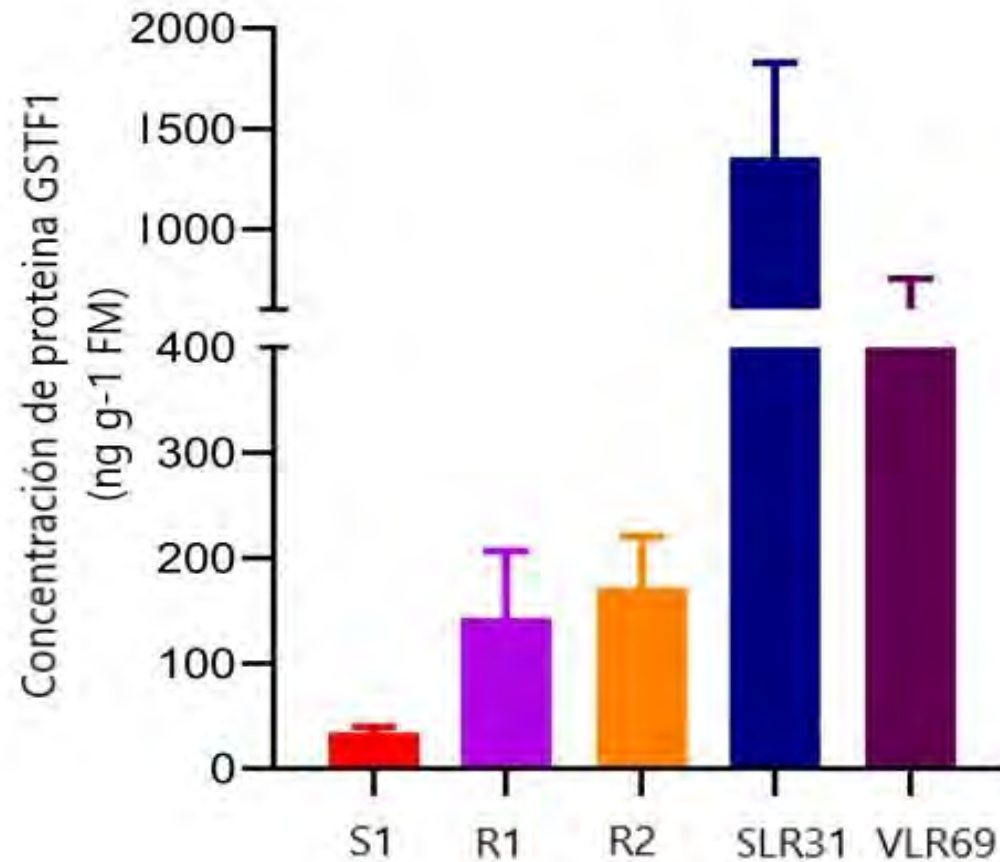
- Test de detección rápida BReD



1. Triturarlos a trozos 3 cm de hoja de *Lolium rigidum*
2. Se añaden en una botella con Buffer de Extracción y tres bolas metálicas
3. Agitar tan vigorosamente durante 30 seg
4. Añadir 3 gotas del extracto vegetal en el *Lateral Flow Device*
5. 5 minutos de reacción, se comprueba la aparición de la segunda línea
6. Se cuantifica la intensidad en el Lector de intensidad del Kit

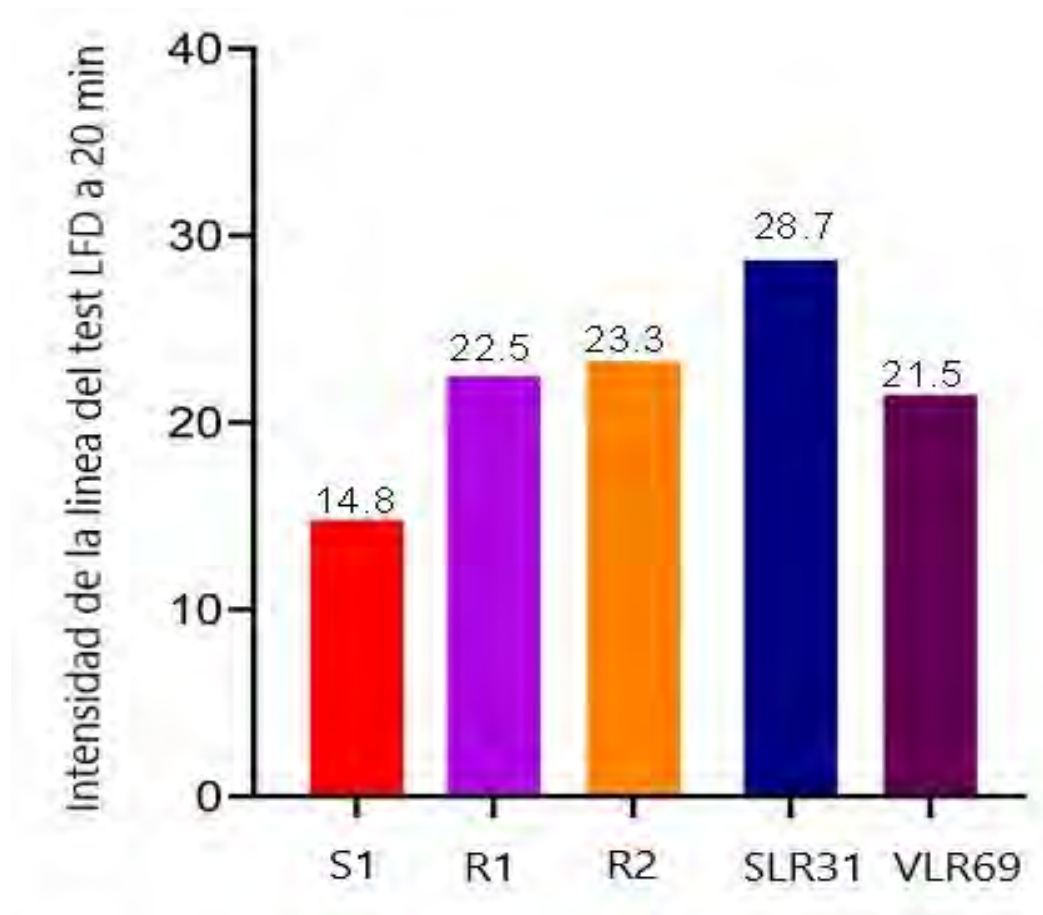
Muestras de 20 individuos por población

- Niveles de GST (*LrGST1*)

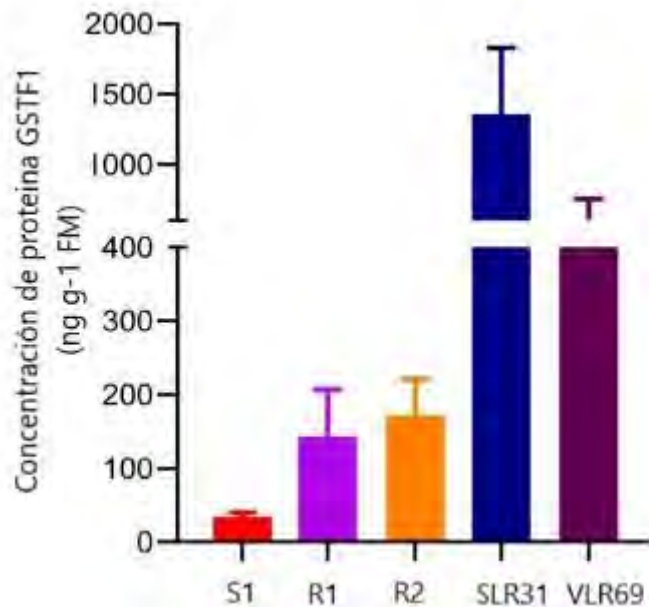
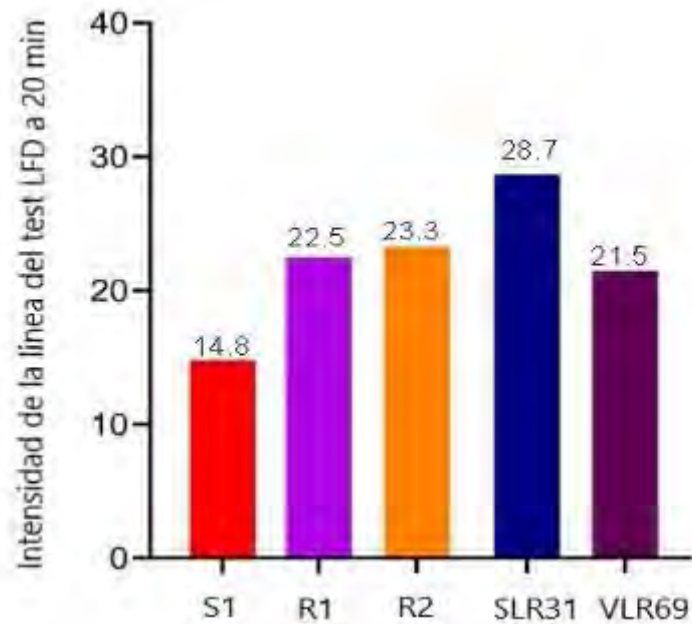


SLR31 > VLR69 >>> R2 > R1 >> S1

- Test de detección rápida BReD



SLR31 > R2 > R1 > VLR69 >> S1



- Intensidad de la banda de LFD corresponde con los niveles *LrGSTF1*
- Niveles de *LrGSTF1* y intensidad de la banda: resistentes >> sensibles
- Relación intensidad - concentración de enzimas: desproporcionada en poblaciones de referencia resistentes SLR31 y VLR69, respecto a las demás.

LFD se satura

Ac y kit no sea específico para la proteína *LrGST1*.

→ Detección mejorable

RESISTENCIA METABÓLICA

- En las poblaciones estudiadas (R1 y R2) de *L. rigidum*, con resistencia múltiple a diversos modos de acción, presentaron niveles elevados de *LrGST1* respecto a la población sensible.

BReD KIT

- Potencialmente se podría adaptar el uso del kit BReD (desarrollado para *Alopecurus*) para su uso en *Lolium rigidum* con resistencia múltiple y cruzada a varios herbicidas por metabolismo aumentado.
- Disponer de esta información sería clave en la toma de decisiones para racionalizar el uso de herbicidas.

¡Muchas gracias por vuestra atención!

