



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Edafología y Química Agrícola

**RESISTENCIA DE *Sinapis alba* L. A HERBICIDAS
INHIBIDORES DE LA ALS: BASES AGRONOMICAS
BIOQUIMICAS Y MOLECULARES**

Tesis Doctoral

Jesús María Rosario Socorro

Directores

Dr. Rafael De Prado Amián

Dra. María Dolores Osuna

Campus de Rabanales, Córdoba.

Marzo de 2011

TITULO: *Resistencia de Sinapis alba L. A herbicidas inhibidores de la ALS: bases agronómicas bioquímicas y moleculares*

AUTOR: *Jesús María Rosario Socorro*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-694-4763-5



TÍTULO DE LA TESIS:

RESISTENCIA DE *Sinapis alba* L. A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ALS:
BASES AGRONOMICAS BIOQUIMICAS Y MOLECULARES

DOCTORANDO/A:

JESUS MARIA ROSARIO SOCORRO

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Que el presente trabajo de investigación titulado “**Resistencia de *Sinapis alba* L. a Herbicidas Inhibidores de la ALS: Bases Agronómicas, Bioquímicas y Moleculares**”, constituye la memoria que presenta D. Jesús María Rosario Socorro, para aspirar al grado de Doctor en “Biociencias y Ciencias Agroalimentarias”, y ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba, bajo nuestra dirección. Ha sido supervisada por nosotros y consideramos que cumple los requisitos legales para optar al grado de Doctor en “Biociencias y Ciencias Agroalimentarias”.

Trabajos Publicados:

1. Rosario, J. M.; Cruz-Hipolito, H.; Smeda, R. J.; De Prado, R. WHITE MUSTARD (*Sinapis alba*) RESISTANCE TO ALS-INHIBITING HERBICIDES AND ALTERNATIVE HERBICIDES FOR CONTROL IN SPAIN. In press

European Journal of Agronomy (EURAGR24973, DOI 10.1016/J.EJA.2011.03.002).

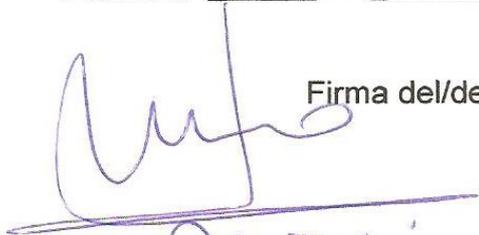
2. Rosario, J. M.; Cruz-Hipolito, H.; Osuna, M. D.; Smeda, R. J.; De Prado, R. Resistance Mechanism to Tribenuron-methyl in White mustard (*Sinapis alba* L.) from Southern of Spain. Submitted to Journal Agriculture Food Chemistry.

Y para que así conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Córdoba, a 28 de marzo de 2011.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 29 de marzo de 2011

Firma del/de los director/es


Fdo.: R. De Prado Fdo.: M. D. Osuna

INDICE GENERAL

CAPITULO I. INTRODUCCION

1.1. Introducción.....	2
1.1. Definición de mala hierba.....	2
1.2. Características de las malas hierbas.....	3
1.3. Efectos de las malas hierbas.....	6
1.4. Importancia agronómica de las malas hierbas.....	8
1.5. Métodos de control de las malas hierbas.....	9
1.6. Herbicidas.....	12
1.6.1. Importancia de los herbicidas.....	14
1.6.2. Clasificación de los herbicidas.....	15
1.6.3. Acetolactato sintasa.....	19
1.6.4. Herbicidas inhibidores de la Acetolactato Sintasa.....	23
1.7. Resistencia de las malas hierbas a herbicidas.....	27
1.7.1. Biotipos resistentes a herbicidas.....	30
1.7.2. Mecanismos de resistencia a herbicidas.....	34

1.7.3. Resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa...	42
1.7.3.1. Bases moleculares de la resistencia a herbicidas inhibidores de ALS.....	45
1.7.3.2. Principales familias herbicidas inhibidoras de la ALS.....	48
1.7.3.2.1. Sulfonilureas.....	48
1.7.3.2.2. Imidazolinonas.....	50
1.7.4. Estudios de la superficie adaxial.....	53
1.8. Detección de resistencia a herbicidas.....	59
1.8.1. Prospección.....	59
1.8.2. Detección de resistencia (screening y dosis respuesta).....	62
1.9. Descripción general de <i>Sinapis alba</i> L.....	64
1.10. Objetivos.....	67
1.10.1. Objetivos generales.....	68
1.10.2. Objetivos específicos.....	68
 CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	
2.1. MATERIALES Y METODOS.....	71
2.1.1. Condiciones de crecimiento.....	72

2.2. Herbicidas ensayados.....	72
2.2.1. Características de los herbicidas.....	74
2.2.1.1. Sulfonilureas.....	74
2.2.1.1.1. Tribenuron metil.....	74
2.2.1.1.2. Iodosulfuron.....	75
2.2.1.1.3. Mesosulfuron.....	76
2.2.1.2. Imidazolinonas.....	77
2.2.1.2.1. Imazamox.....	77
2.2.1.3. Triazolopirimidinas.....	78
2.2.1.3.1. Florasulam.....	78
2.2.1.4. Pirimidiniltiobenzoatos.....	79
2.2.1.4.1. Bispiribac-sodio.....	79
2.2.1.5. Sulfonilaminocarboniltriazolinonas.....	80
2.2.1.5.1. Flucarbazone-sodio.....	80
2.2.1.6. Otros herbicidas aplicados en campo.....	81
2.2.1.6.1. 2,4-D.....	81
2.2.1.6.2. MCPA.....	82

2.2.1.6.3. Mecoprop.....	82
2.2.1.6.4. Bromoxinil.....	83
2.3. Ensayos en condiciones controladas.....	84
2.3.1. Respuesta de poblaciones de <i>S. alba</i> a tribenuron metil (screening).....	84
2.3.2. Ensayos de dosis-respuesta a herbicidas inhibidores de ALS....	85
2.3.3. Estudios de retención y ángulo de contacto.....	87
2.3.4. Absorción y translocación de tribenuron metil.....	88
2.3.5. Estudios en la superficie adaxial de <i>S. alba</i>	92
2.3.5.1. Estudios de fotosíntesis y clorofila (SPAD).....	92
2.3.5.2. Densidad de estomas.....	94
2.3.5.3. Densidad de tricomas.....	94
2.3.5.4. Medición de espesor de la cutícula.....	95
2.3.5.5. Estudios de la forma de la superficie adaxial.....	96
2.3.6. Metabolismo de tribenuron metil en <i>S. alba</i>	96
2.3.7. Actividad de ALS en dos biotipos de <i>S. alba</i>	98
2.3.7.1. Extracción de la enzima ALS.....	98
2.3.7.2. Ensayos de medición de la actividad enzimática.....	98

2.3.7.3. Determinación de la Proteína.....	100
2.3.8. Bases moleculares de la resistencia en <i>S. alba</i>	101
2.3.8.1. Material vegetal y Extracción de ADN.....	101
2.3.8.2. Amplificación por PCR.....	102
2.3.8.3. Purificación y secuenciación del ADN genómico.....	104
2.3.9. Respuesta de <i>S. alba</i> a tribenuron y a otros herbicidas en campo.....	105

CAPITULO III. RESULTADOS

3. RESULTADOS	110
3.1. Respuesta de poblaciones de <i>S. alba</i> a tribenuron metil.....	110
3.2. Ensayos de dosis-respuesta a herbicidas en invernadero.....	112
3.3. Estudios de retención y ángulo de contacto.....	113
3.4. Absorción y translocación de tribenuron metil.....	115
3.4.1. Análisis cuantitativo.....	115
3.4.2. Análisis cualitativo.....	117
3.5. Estudios de fotosíntesis y clorofila (SPAD).....	119
3.6. Densidad de estomas.....	122

3.7. Densidad de tricomas.....	123
3.8. Medición del espesor de la cutícula.....	124
3.9. Estudio de la forma de la superficie adaxial.....	124
3.10. Metabolismo de tribenuron metil en <i>S. alba</i>	125
3.11. Actividad ALS en dos biotipos de <i>S. alba</i>	126
3.12. Bases moleculares de la resistencia en <i>S. alba</i>	128
3.13. Respuesta de <i>S. alba</i> a tribenuron y a otros herbicidas en campo.....	129
3.13.1. Control visual de <i>S. alba</i>	130
3.13.2. Efecto de herbicidas en el peso seco de tejidos aéreos de <i>S. alba</i>	132
3.13.3. Efecto de herbicidas sobre el rendimiento de trigo.....	133
 CAPITULO IV. DISCUSION	
4. DISCUSION.....	136
 CAPITULO V. CONCLUSIONES	
5. CONCLUSIONES.....	151
 CAPITULO VI. REFERENCIAS	
6. REFERENCIAS.....	154

INDICE DE TABLAS

CAPITULO I.

Tabla 1.1. Producción de semillas en algunas especies de malas hierbas.....	4
Tabla 1.2. Pérdidas estimadas debidas a plagas en la producción de 8 cultivos y 5 regiones.....	9
Tabla 1.3. Venta mundial de plaguicidas.....	15
Tabla 1.4. Clasificación de los herbicidas por el modo de acción.....	17
Tabla 1.5. Resumen de las tres fases del metabolismo de plaguicidas.....	36
Tabla 1.6. Malas hierbas más importantes resistentes a herbicidas inhibidores de la ALS.....	43
Tabla 1.7. Biotipos resistentes a herbicidas inhibidores de la ALS en España.....	44
Tabla 1.8. Principales mutaciones en los dominios del gen ALS, que confieren resistencia a herbicidas sulfonilureas e imidazolinonas.....	47

CAPITULO II.

Tabla 2.1. Herbicidas ensayados en condiciones de invernadero y laboratorio.....	73
Tabla 2.2. Herbicidas aplicados sobre <i>S. alba</i> en campo.....	74
Tabla 2.3. Herbicidas inhibidores de la ALS usados en ensayos de Dosis-respuesta.....	86
Tabla 2.4. Cebadores utilizados en la secuenciación del gen ALS.....	103
Tabla 2.5. Programas de amplificación por PCR de los dominios conservados del gen ALS.....	103

Tabla 2.6. Tratamientos herbicidas aplicados sobre <i>S. alba</i> en campo.....	105
----------------------------------------------------------------------------------------	-----

CAPITULO III.

Tabla 3.1. Peso fresco para poblaciones de <i>S. alba</i> tratadas con tribenuron metil.....	111
Tabla 3.2. Parámetros estimados de la ecuación de regresión y Factores de Resistencia (FR).....	113
Tabla 3.3. Retención de tribenuron metil y ángulo de contacto de las gotas en plantas AR ₈ (R) y AR ₁ (S) de <i>S. alba</i>	114
Tabla 3.4. Efectos de tribenuron en los valores de SPAD (%) y en la fotosíntesis en biotipos de <i>S. alba</i>	120
Tabla 3.5. Radioactividad residual absorbida presente en tejidos de plantas AR ₈ (R) y AR ₁ (s) de <i>S. alba</i> , correspondiente a los productos metabólicos detectados mediante TLC.....	126
Tabla 3.6. Parámetros estimados de la ecuación de regresión y factores de resistencia a herbicidas inhibidores de ALS en biotipos R y S de <i>S. alba</i>	128
Tabla 3.7. Control herbicida de <i>S. alba</i> en cultivo de trigo (<i>Triticum aestivum</i>) en Arriate, Málaga, España.....	131
Tabla 3.8. Efecto de herbicidas en el peso seco de <i>S. alba</i> y en el rendimiento de trigo en Arriate, Málaga, España.....	133

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO I.

Figura 1.1. Eventos desde la entrada del herbicida hasta la muerte de la planta.....	19
Figura 1.2. Ruta biosintética de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina.....	21
Figura 1.3. Reacción catalizada por la ALS, formando a partir de dos moléculas de piruvato una de acetolactato.....	22
Figura 1.4. Cofactores de la Acetolactato Sintasa.....	23
Figura 1.5. Herbicidas inhibidores de la ALS.....	25
Figura 1.6. Estructura de las sulfonilureas e imidazolinonas.....	27
Figura 1.7. Malas hierbas resistentes a herbicidas durante 2010.....	32
Figura 1.8. Número de biotipos resistentes a familias de herbicidas.....	33
Figura 1.9. Mapa mundial de la distribución del número de especies de malas hierbas resistentes a herbicidas en el mundo.....	33
Figura 1.10. Estructura del gen ALS con los 5 dominios conservados.....	46
Figura 1.11. Estructura química de las sulfonilureas e imidazolinonas.....	52
Figura 1.12. Flores y frutos característicos de <i>Sinapis alba</i> L.....	66

CAPITULO II.

Figura 2.1. Zona de prospección de poblaciones de <i>S. alba</i>	71
Figura 2.2. Germinación de semillas de <i>S. alba</i>	72
Figura 2.3. Aplicación de tribenuron metil sobre poblaciones de <i>S. alba</i>	85
Figura 2.4. Plantas de <i>S. alba</i> tratadas con la solución de ¹⁴ C-tribenuron.....	89
Figura 2.5. Combustión de muestras en el oxidador biológico.....	90
Figura 2.6. Color del complejo después de la conversión.....	100
Figura 2.7. Medición de absorbancia de acetofna.....	100
Figura 2.8. ADN amplificado por PCR.....	104
Figura 2.9. Fragmento de ADN separados.....	104
Figura 2.10. Fragmentos de ADN purificados de 501 (izquierda) y 639 (derecha) pb (P1/P2), digeridos durante 3 h.....	105
Figura 2.11. Aplicación de tratamientos herbicidas en campo.....	107
Figura 2.12. Evaluación de biomasa seca del jaramago y rendimiento de trigo.....	108

CAPITULO III.

Figura 3.1. Respuesta de poblaciones de <i>S. alba</i> prospectadas en Arriate, Málaga.....	111
Figura 3.2. Efecto de tribenuron en biotipos AR ₁ y AR ₈	113
Figura 3.3. Efecto de florasulam en biotipos AR ₁ y AR ₈	113

Figura 3.6. Angulo de contacto en el biotipo AR ₁	115
Figura 3.7. Angulo de contacto en el biotipo AR ₈	115
Figura 3.8. Absorción de ¹⁴ C-tribenuron metil en dos biotipos de <i>S. alba</i>	116
Figura 3.9. Penetración de ¹⁴ C-tribenuron metil a través del tiempo en <i>S. alba</i>	116
Figura 3.10. Distribución porcentual de ¹⁴ C-tribenuron en biotipos de <i>S. alba</i>	117
Figura 3.11. Autorradiografías de plantas AR ₁ (S), tratadas con ¹⁴ C-tribenuron metil.....	118
Figura 3.12. Autorradiografías de plantas AR ₈ (R), tratadas con ¹⁴ C-tribenuron metil.....	119
Figura 3.13. Actividad fotosintética de biotipos S y R de <i>S. alba</i> tratados con tribenuron.....	121
Figura 3.14. Valores SPAD (%) en biotipos S. y R de <i>S. alba</i> tratados con tribenuron.....	121
Figura 3.15. Densidad de estomas en el biotipo AR ₁ (S) de <i>S. alba</i>	122
Figura 3.16. Densidad de estomas en el biotipo AR ₈ (R) de <i>S. alba</i>	123
Figura 3.17. Densidad de tricomas en el biotipo AR ₁	124
Figura 3.18. Densidad de tricomas en el biotipo AR ₈	124
Figura 3.19. Espesor de cutícula en el biotipo AR ₁	124
Figura 3.20. Espesor de cutícula en el biotipo AR ₈	124
Figura 3.21. Forma de la superficie adaxial en <i>S. alba</i> (S).....	125

Figura 3.22. Forma de la superficie adaxial en <i>S. alba</i> (R).....	125
Figura 3.23. Secuencias de los dominios CAD del gen ALS en plantas AR ₈ y AR ₁	129
Figura 3.24. <i>S. alba</i> (AR ₈) sin herbicida.....	132
Figura 3.25. Control de <i>S. alba</i> con tribenuron.....	132
Figura 3.26. Efecto de florasulam sobre AR ₈	132
Figura 3.27. Control de <i>S. alba</i> con bromoxinil.....	132
Figura 3.28. <i>Sinapis</i> sin herbicida.....	134
Figura 3.29. Control de <i>Sinapis alba</i> con tribenuron+buctril.....	134
Figura 3.30. Control de tribenuron.....	134
Figura 3.31. Control de florasulam.....	134

ABREVIATURAS

Acetohidroxiácido sintasa.....	AHAS
Acetolactato sintasa.....	ALS
Arriate.....	AR
Adenosin trifosfato.....	ATP
Días después de la aplicación.....	DDA
Diferencia mínima significativa.....	DMS
Días después del tratamiento.....	DDT
Ditiotreitol.....	DTT
Acido 2,4-dicloro fenoxi acético.....	2,4-D
Dosis herbicida que reduce en 50% el peso de las plantas respecto al tratamiento control sin herbicida.....	ED ₅₀
Acido etilendiaminotetracético.....	EDTA
Solución de formaldehido, ácido acético y alcohol.....	FAA
Flavin adenin dinucleótido.....	FAD
Factor de resistencia a herbicida.....	FR
Gramo(s).....	g

Hora después del tratamiento.....	HDT
Hidroxietil tiamina pirofosfato.....	HETPP
Herbicide Resistance Action Committee.....	HRAC
Concentración herbicida que reduce en un 50 la actividad de la enzima diana.....	I ₅₀
Ingrediente activo.....	i.a.
Imidazolinona.....	IMI
Kilogramo(s).....	Kg
Manejo Integrado de Plagas.....	MIP
Mecoprop-p.....	MCPP
Metsulfuron metil.....	MM
No detectado.....	nd
Resistencia fuera del sitio de acción herbicida.....	No-SA
Metsulfuron metil hidroxilado.....	OH-MM
Pares de bases nitrogenadas.....	pb
Reacción en Cadena de Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)..	PCR
Pirimidiniltiobenzoato.....	PTB
Polivinilpirrolidona.....	PVPP

Revoluciones por minuto.....	rpm
Resistencia en el sitio de acción herbicida.....	SA
Servicio Central de Apoyo a la Investigación.....	SCAI
Sulfonilaminocarboniltriazolinona.....	SCT
Desarrollo de análisis de suelo y planta (Soil Plant Analysis Development).....	SPAD
Sulfonilurea.....	SU
<i>Thermus aquaticus</i>	Taq
Cromatografía de capa fina (thin layer chromatography).....	TLC
Tribenuron metil.....	TM
Triazolopirimidina.....	TP
Tiamina pirofosfato.....	TPP

RESUMEN

Sinapis alba L. compete en diferentes sistemas de cultivo en el Sur de España, específicamente en trigo de invierno, y ha sido controlada en los últimos 15 años con aplicaciones intensivas de tribenuron metil, detectándose la resistencia en 2008. El propósito principal de este trabajo fue conocer los posibles mecanismos de resistencia de *S. alba* al tribenuron metil, mediante estudios agronómicos, morfológicos, bioquímicos y moleculares. Los resultados de los ensayos con aplicación de tribenuron y/o otros herbicidas inhibidores de ALS (screening y Dosis-Respuesta) confirmaron pérdida de sensibilidad, resistencia al tribenuron y altos niveles de resistencia cruzada a herbicidas SU, TP, y SCT, así como baja resistencia a IMI. Se observó que los estudios de absorción, translocación y metabolismo, así como los estudios morfológicos en la superficie adaxial, no explicaron la resistencia de *S. alba* al tribenuron. La aplicación de tribenuron metil disminuyó la clorofila y la actividad fotosintética del biotipo sensible. La actividad ALS demostró alta resistencia al tribenuron (factor de resistencia de 4.128) y fuerte resistencia cruzada a SU, SCT y TP, y muy baja resistencia cruzada a PTB y a IMI. Los estudios moleculares detectaron un cambio prolina por serina en la posición 197 del dominio A en la región 1 del gen ALS, representando esta mutación el mecanismo de resistencia de *S. alba* al tribenuron. Esta resistencia se controla con herbicidas de mecanismos de acción distintos a los inhibidores de ALS (bromoxinil, MCPA y 2,4-D).

ABSTRACT

White mustard (*Sinapis alba* L.) is highly competitive in several cropping systems from Southern of Spain., specifically in winter wheat, being controlled during last 15 years with tribenuron metil intensive spraying. Therefore, tribenuron resistance was confirmed on 2008. The main objective in this work was to know the possible resistance mechanisms of *S. alba* to tribenuron metil by agronomic, morphologic, biochemical and molecular studies. Results of the *S. alba* populations treated with tribenuron (screening), and the ALS inhibitor dose-response assays confirmed sensibility lost, tribenuron resistance and high levels of cross-resistance to herbicides SU, TP and SCT, as well as low resistance to IMI. Absorption and translocation and leaf morphological studies results no explained resistance of *S. alba* to tribenuron metil. However, tribenuron spraying on resistant and sensible biotypes reduced the relative values of chlorophyll and photosynthetic activity of the sensible biotype. ALS activity assays showed high level of resistance to tribenuron (resistance factor of 4,128) and stronger cross-resistance to SU, SCT and TP, with very low or non cross-resistance to PTB and IMI. Molecular studies demonstrated that tribenuron resistance mechanism in *S. alba* is a single point mutation Proline per Serine in the domain A 197 position of the ALS gene region 1, following ALS gene sequence numbering of *Arabidopsis thaliana*. Field experiments demonstrated that *S. alba* resistance can be controlled by herbicide applications with distinct action sites to the ALS inhibitor herbicides, such as bromoxinil, mecopro-p, MCPA and 2,4-D.

I.INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Definición de mala hierba

Varios conceptos de la expresión “mala hierba” han sido emitidos en los libros de Malherbología. Se establecen definiciones antropocéntrica, ecológica, o bien mixta (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991), ya sea que una o varias especies vegetales al proliferar interfieran los intereses del hombre, o que se les consideren desde el punto de vista de sus interacciones en el ecosistema, o bien, valorando su impacto al través del tiempo y del espacio en interacción con las actividades del ser humano.

Dentro de las definiciones revisadas la más interesante es la de Pujadas y Hernández (1988), quienes consideran que “mala hierba o maleza es toda planta que crece siempre o de forma predominante en situaciones marcadamente alteradas por el hombre, que resulta no deseable por él en un lugar y momento determinado”.

De acuerdo con otros autores, el término “mala hierba” ha sido definido de acuerdo a los siguientes criterios:

- Antropocéntricos: basados en la interferencia que pueden tener estas plantas con los objetivos o las necesidades del ser humano.
- Ecológicos: considera las características comunes observadas en especies que repetidamente muestran un comportamiento invasivo de las zonas cultivadas.
- Mixtos: combina ambos criterios anteriores.

Características de las malas hierbas

Las malas hierbas más importantes en la producción de alimentos y bienes de importancia para la humanidad, representan el 0,1% de las 250,000 especies vegetales identificadas en el mundo. Es decir, 250 especies de la flora conocida son malas hierbas y el 72% de ellas pertenecen a 12 familias de plantas cultivadas importantes en la alimentación de los humanos. Mientras, 76 especies del total de malas hierbas conocidas están consideradas como las “peores malezas en el mundo” (Holm *et al.*, 1977; García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991). Estas son plantas capaces de invadir nuevos hábitat, de persistir en ellos, y de competir en forma ventajosa con las plantas cultivadas, a pesar de las numerosas y variadas alteraciones introducidas por el hombre.

Las características que confieren a las malas hierbas alto poder invasivo y, mayor capacidad de adaptación, supervivencia y crecimiento con respecto a los cultivos son:

- a) Cantidad de semilla: la producción de muchas semillas y generalmente pequeñas es una de las maneras de garantizar la persistencia de la especie (Tabla 1).
- b) Fácil dispersión: semillas de algunas especies de malas hierbas poseen estructuras que les permiten ser fácilmente dispersadas por el viento o animales (trasladarse adheridas en los pelos) o por el agua de lluvia o riego (flotar o ser arrastradas).
- c) Los tamaños y formas de semillas similares a las especies de cultivo. Algunas especies de malas hierbas son similares a las de las semillas de los cultivos en los cuales están presentes, por tanto son difíciles de distinguir y separar, pudiendo ocurrir mezclas entre ellas.
- d) Rápido desarrollo de la fase vegetativa y pronto inicio de la fase reproductiva.

e) Capacidad de crecer en condiciones adversas. Especies tolerantes a suelos salinos, niveles de inundación, pH ácidos y básicos, entre otras.

f) Capacidad de reproducción sexual, asexual y en muchos casos ambas formas de propagación, en las especies de mayor importancia a nivel mundial.

g) Alta capacidad de persistencia, debido a:

- Producción de semillas en un amplio rango de condiciones ambientales. Producción de cientos y miles de semillas en condiciones favorables y muy pocas en condiciones adversas.
- Largo periodo de viabilidad. Las semillas de malas hierbas pueden permanecer viables en el suelo durante muchos años. Numerosas especies poseen semillas que se mantienen en latencia, esta alta longevidad unida a la gran cantidad de semilla producidas, da lugar a la existencia de unas enormes reservas de semillas viables en los suelos agrícolas (banco de semillas).
- Germinación escalonada. Esta propiedad constituye una forma de dispersión en el tiempo, permitiéndolas evitar riesgos y persistir a pesar de la destrucción ocasional de sus poblaciones.

Tabla 1.1. Producción de semillas en algunas especies de malas hierbas.

Especie	Semillas por planta	Referencia
<i>Amaranthus spinosus</i>	235,000	Holm <i>et al.</i> , 1977
<i>Amaranthus retroflexus</i>	117,400	Stevens, 1957
<i>Ageratum conizoides</i>	40,000	Baker, 1965
<i>Avena fatua</i>	450-3000	Mailett, 1991
<i>Avena sterilis</i>	100	Ross y Lembi, 1985
<i>Cenchrus spinosus</i>	1,110	Ashton y Monaco, 1991
<i>Cyperus esculentus</i>	2,420	Ashton y Monaco, 1991
<i>Eleusine indica</i>	40,000	Schwerzel, 1970
<i>Echinochloa crus-galli</i>	7,000	Ross y Lembi, 1985
<i>Gallium aparine</i>	230	Ross y Lembi, 1985
<i>Lolium multiflorum</i>	1100	Holm <i>et al.</i> , 1977
<i>Panicum maximum</i>	9,000	Javier, 1970
<i>Phalaris minor</i>	9300	Franke, <i>et al.</i> , 2007
<i>Portulaca oleracea</i>	52,300	Stevens, 1957
<i>Rumex crispus</i>	60,000	Holm <i>et al.</i> , 1977
<i>Solanum nigrum</i>	178,000	Holm <i>et al.</i> , 1977

h) Capacidad de interferencia. Se entiende como la capacidad que tiene una planta sobre el crecimiento y desarrollo de sus vecinos, efecto que se expresa como la alteración en el crecimiento y desarrollo de la planta. En términos generales, las interacciones entre plantas pueden ser consideradas positivas ó negativas. La relación entre las especies de malas hierbas y los cultivos se consideran dentro del grupo de las interacciones negativas al tener establecida principalmente una relación de competencia por los recursos del medio. El nivel de competencia por los recursos se da cuando éstos se encuentran en bajas cantidades y es mayor, entre mayor sea la similitud de los requerimientos de las plantas de cultivo y las malas hierbas (Radosevich *et al.*, 1997).

Una de las formas de conocer el nivel de competencia entre las plantas es la biomasa acumulada, la cual a su vez depende, de la fotosíntesis como proceso fisiológico responsable. Los recursos directamente involucrados en este proceso son los de mayor efecto al momento de la competencia entre plantas. Acompañando a los factores anteriores, la competencia por nutrimentos es drástica, al ser recursos responsables del crecimiento de las plantas y componentes de enzimas que actúan en procesos fisiológicos esenciales (Radosevich *et al.*, 1997; Haigh, 2000).

La finalidad de la agricultura es producir mayores niveles de rendimientos y rentabilidad económica, por tal razón los agricultores dirigen los esfuerzos a las plantas cultivadas, luchando contra las plantas indeseables mediante la utilización de distintas prácticas de cultivo para reducir los efectos de la competencia en la cosecha. De modo, que conocidos los daños agronómicos y económicos causados por el crecimiento de malas hierbas en los cultivos, se precisa la realización de prácticas de control para maximizar el rendimiento y hacer rentable la cosecha.

1.3. Efectos de las malas hierbas

El interés por el control de las malas hierbas es sucesivo a la época en que el hombre deja de ser nómada y se convierte en sedentario, necesitando de techo y provisión para vivir. Por necesidad el hombre se hizo agricultor y al alterar el ecosistema y practicar el monocultivo propició la invasión, colonización y persistencia de especies que interfieren el crecimiento de las plantas cultivadas y reducen la producción agrícola. Por eso, desde el inicio de la agricultura hasta la época agrícola moderna los agricultores han tenido que utilizar métodos de control para reducir los daños de estas especies invasivas, siendo los herbicidas el método más utilizado.

Este proceso antropogénico puso en evidencia la gran plasticidad fenotípica de las malas hierbas, que se adaptaron al nuevo ambiente propiciado por el hombre con los cambios introducidos en los ecosistemas naturales. Muchas especies, entre ellas las perennes, presentaron mayor persistencia y adaptación al laboreo del suelo, al corte (pastos y céspedes), fechas de siembra y a diversas prácticas relacionadas con la modernización agrícola.

Estos cambios adaptativos de las malas hierbas tuvieron en consecuencias daños directos e indirectos en los ecosistemas agrícolas. Los daños directos son los relacionados con la economía del agricultor, que incluye aumento de costes de producción, disminución de cosechas y pérdida de calidad en la producción (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991; Radosevich *et al.*, 1997).

Las características similares comunes a malas hierbas y plantas cultivadas, hace que ambas requieran de los mismos recursos vitales disponibles en su entorno (agua, luz, nutrientes, oxígeno, CO₂, espacio, etc.), originándose la interferencia de las malezas con el cultivo, si dichos recursos no están disponibles en cantidad y calidad suficientes para el crecimiento y desarrollo de las especies en competencia (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991).

El principal ejemplo de daños indirectos de malas hierbas en los cultivos, es que sirven de hospederos alternos a artrópodos (plagas), agentes fitopatógenos (hongos, bacterias y nematodos), partículas virales y otros agentes. Igualmente, las malas hierbas disminuyen la calidad de la cosecha, interfieren con las labores, incrementan los costos de producción y reducen el valor de la tierra. Los niveles porcentuales de los daños atribuidos a malas hierbas han sido estimados en un 12% de la producción agrícola mundial. De esta pérdida, un 25-30% corresponde a los países menos desarrollados (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991).

Según Wyse (1978), las pérdidas generadas por las malas hierbas en la agricultura pueden atribuirse a diferentes causas:

- a) Reducción del rendimiento: genéricamente, la pérdida de rendimiento por crecimiento de malas hierbas en un cultivo dependerá de factores como especie de mala hierba, densidad de población infestante y tiempo de contacto entre población y cultivo. Estas pérdidas pueden ser de dos tipos:
 - Pérdidas debidas a efectos competitivos: demanda de mala hierba y cultivo de los mismos recursos limitantes para el crecimiento y desarrollo (agua, nutrientes, etc.).
 - Pérdidas debidas a efectos no competitivos (alelopatía): emisión de exudados o sustancias químicas que afectan negativamente al cultivo u otra especies vegetal.
- b) Interferencia en la recolección: se origina mediante la obstrucción de la maquinaria con tejido vegetal verde de malas hierbas durante la recolección de la cosecha.
- c) Incrementos en los costes de producción: se deben a labores de escardas manuales o mecánicas, roturación de terreno, técnicas de

cultivo y de control químico necesario para prevenir o eliminar el efecto competitivo de las malezas que generan pérdidas en los cultivos.

- d) Reducción en la calidad de los productos.
- e) La reducción de la calidad puede expresarse en aspectos tales como:
 - Transferencia al producto de sabores y olores desagradables procedentes de las poblaciones infestantes.
 - Presencia en el producto de sustancias tóxicas.
 - Pérdida de la calificación de semilla certificada.
 - Baja calidad durante la industrialización por presencia de restos de malas hierbas.
- f) Reducción en el valor de la tierra: lotes altamente infestados y/o con un gran banco de semillas persistentes de especies muy agresivas y de difícil control pierden valor desde el punto del uso agrícola y podrían disminuir el precio de mercado hasta un 50%.

1.4 Importancia agronómica de las malas hierbas

Las malas hierbas, debido al efecto de interferencia causan pérdidas considerables en los rendimientos y la rentabilidad de los sistemas de producción de cultivos en todo el mundo (Tabla 1. 2). Aunque las pérdidas más significativas ocurren en países de Europa, Norte América y Australia, que tienen sistemas de producción agrícola altamente desarrollados, los costos del manejo de malezas son mayores en los países menos desarrollados (Haigh, 2000).

Tabla 1.2. Pérdidas estimadas debidas a plagas en la producción de ocho cultivos en cinco regiones (Haigh, 2000).

Región	Producción real y pérdidas y en billones de dólares				
	Producción	Patógenos	Insectos	Malas hierbas	Total
África	13.3	4.1	4.4	4.3	12.8
Norte América	50.5	7.1	7.5	8.4	22.9
América Latina	30.7	7.1	7.6	7.0	21.7
Asia	162.9	43.8	57.6	43.8	145.2
Europa	42.6	5.8	6.1	4.9	16.8
Oceanía	3.3	0.8	0.6	0.5	1.9

1.5 Métodos de control de las malas hierbas

La reducción del impacto de las malas hierbas sobre el crecimiento, desarrollo y producción de las plantas cultivadas requiere la aplicación de diversos métodos de control, tales como el control preventivo, físico, cultural, biológico y/o químico. La intervención con dichos métodos en los cultivos, es causa de modificación o alteración del hábitat utilizado por otros organismos, tanto plagas como benéficos, afectando los hábitos biológicos de los mismos.

Lo anterior obliga a considerar a las malas hierbas como un componente importante en el agroecosistema, así como sus interrelaciones con otros organismos y las consecuencias de la aplicación de medidas específicas de control. Los principales métodos aplicados en el control de malas hierbas se exponen a continuación:

- a) Control preventivo: son las medidas que evitan la introducción, establecimiento y desarrollo de especies de malas hierbas en áreas no infestadas. El uso de semilla certificada libre de semillas ó propágulos de malas hierbas, la eliminación de malas hierbas en canales de riego y caminos, la limpieza de aperos y maquinaria agrícola usada en áreas infestadas y evitar el acceso del

ganado desde zonas altamente infestadas con malas hierbas hacia zonas no contaminadas; así como la restricción del movimiento de material vegetal entre provincias y países, mediante medidas de cuarentena, representan métodos preventivos útiles en la lucha contra las malas hierbas.

- b) Control cultural: se basa en la ejecución de prácticas agrícolas rutinarias que crean un hábitat menos favorable para el crecimiento de malas hierbas y que confieren ventajas competitivas a las plantas de la variedad cultivada. Son todas aquellas labores de manejo que incluyen preparación de terreno, rotación de cultivos, técnica de cultivo, densidad y época de siembra, fertilización, etc., desfavorable para la mala hierba y que permiten al cultivo expresar el máximo potencial de desarrollo.
- c) Rotación de cultivos: consiste en alternar diferentes cultivos en la misma área año tras año. Ciertas especies de malas hierbas están asociadas con cultivos específicos. Esta práctica incrementa el rendimiento en la mayoría de los cultivos, reduce la presión de inóculo de agentes causales (enfermedades), existe una mayor fijación de nitrógeno atmosférico (si se rota con cultivos de leguminosas) y el empobrecimiento de la fertilidad del suelo es menor.
- d) Control mecánico: existen diversas técnicas mecánicas para la eliminación de malas hierbas. Aquí se engloban todos los métodos que desarraigan, entierran, cortan, cubren, o queman la vegetación.
- e) Control físico: Consiste en la aplicación de técnicas que reduzcan la competencia o eliminen la viabilidad de las semillas de malas hierbas, o bien, que impidan la germinación. Una labor realizada en arrozales en América Latina, es la incineración de los restos vegetales de la cosecha y plantas malas hierbas de generación tardía en el ciclo de cultivo. Las altas temperaturas debidas al fuego afectan la viabilidad del embrión de las semillas en la superficie del lote. Otra práctica, es el uso de plástico negro para cubrir el suelo

en cultivos de melón y otras hortalizas, constituyendo una barrera que impide el paso de luz necesaria para la inducción de la germinación.

f) Control biológico: Utiliza enemigos naturales para eliminar especies de malas hierbas, entre los que se pueden destacar:

- Pastoreo: es el método más tradicional y comúnmente más usado para el control biológico de malas hierbas. Se pueden usar distintas especies animales que utilizan las plantas como alimento: rumiantes, granívoros, insectos, roedores, aves, etc.
- Herbicidas biológicos: consiste en el uso de patógenos de plantas para el control de malas hierbas, promoviendo el control natural o liberando productos formulados de eficacia reconocida contra malas hierbas específicas. Estos organismos usados como herbicidas biológicos, se multiplican en medios artificiales en forma barata y fácil, y se aplican en el campo de la misma forma que los herbicidas químicos. Si el organismo es un hongo, el producto es llamado micoherbicida. El mayor inconveniente es su especificidad y su sensibilidad al ambiente. En arroz se utiliza un micoherbicida obtenido a partir de *Colletotrichum lindemutianum* y usado comercialmente en Estados Unidos, para el control *Ludwigia* sp.
- Alelopatía: es el efecto nocivo directo o indirecto de una planta sobre otra, causado por la producción de sustancias químicas liberadas al medio. Las sustancias alelopáticas pueden afectar negativamente la germinación, emergencia y desarrollo de la otra planta.

g) Control químico: Supone el uso de productos químicos (herbicidas) que aplicados en época y dosis adecuadas, inhiben el desarrollo o matan a las plantas indeseables. Es el método más utilizado por muchas razones que se enumeran a continuación:

- Oportunidad en el control, al eliminar la mala hierba antes de la emergencia o bien en las primeras etapas de desarrollo.
- Amplio espectro de acción, pudiendo controlar varias especies con una sola aplicación.
- Control de malas hierbas perennes con reproducción asexual (bulbos, rizomas, etc.)
- Control residual de malas hierbas con herbicida de gran persistencia en el suelo.

1.6. Herbicidas

Desde el inicio de la agricultura, las infestaciones crónicas de malas hierbas fueron controladas básicamente mediante escardas manuales y mecánicas (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991). Sin embargo, la modernización de la producción agrícola con la aplicación de herbicidas químicos a partir de 1946, ha desestimado estas estrategias de control por la tendencia de los productores a repetir una práctica que ha resultado exitosa (Harker, K.N., 2004).

Los herbicidas han sido una alternativa indispensable en el manejo y control de especies malas hierbas. Inicialmente fueron utilizados en países desarrollados y más recientemente en países en vías de desarrollo. El impacto revolucionario de estas sustancias y la popularización de su uso en la agricultura, se atribuye a distintas razones (Coble, 1996; Menéndez, 1997; Bastida y Menéndez, 2001):

- a) Es una tecnología altamente confiable y eficaz. Con frecuencia los herbicidas ofrecen un control aceptable sobre un amplio abanico de especies indeseadas, a la vez que resultan prácticamente inocuos en los cultivos que protegen. Esta eficacia suele estar muy por encima de la presentada por otras opciones de control en la mayoría de los cultivos.
- b) Los herbicidas son de fácil manejo. La mayoría de los herbicidas no requieren de una maquinaria especial o de prácticas culturales específicas antes o después de su aplicación.

- c) Son económicamente rentables. Tras una buena selección y correcto uso, los herbicidas producen un menor coste por unidad de superficie que cualquiera de los otros métodos utilizados. Esta comparación es aún más favorable cuando se incluye el tiempo requerido para aplicar las medidas de control.
- d) Son agronómicamente versátiles. Los herbicidas ofrecen al agricultor la posibilidad de elegir cuándo y cómo controlar el problema de malas hierbas, permitiendo un margen de uso que va desde la preemergencia a la postemergencia tardía y diversas opciones de tratamiento en cada cultivo.

Varios son los argumentos sobre los efectos inicuos de los plaguicidas, con los cuales se pretende que otras alternativas de control no químicas, como las referidas anteriormente) reemplacen la aplicación de los agroquímicos (Zadoks, 1992):

- a) Uso extensivo de cultivares resistentes a plagas. En los próximos 20 años se producirá un importante incremento en el uso de cultivos transformados genéticamente. Así, por ejemplo, existen un buen número de cultivos transgénicos resistentes a herbicidas (Berner *et al.*, 1997).
- b) Control biológico de plagas. Los plaguicidas provenientes de fuentes naturales derivan de materiales naturales como son animales, plantas, hongos, bacterias o minerales.
- c) Mejora en la formulación y métodos de aplicación de los productos. Las corporaciones internacionales más importantes que dominan el mercado de los plaguicidas, están investigando en el desarrollo de productos nuevos, menos tóxicos, menos persistentes y un espectro menos amplio para cumplir las condiciones impuestas en los mercados más importantes de todo el mundo.

d) Uso de sistemas expertos de decisión en el control de plagas. El MIP (Manejo Integrado de Plagas) sería otra alternativa para reducir el uso de plaguicidas. Sin embargo, tras más de 20 años de la introducción de este concepto en EE.UU., hoy todavía no existe una definición aceptada de MIP. Ciertos autores definen el MIP, como parte de un amplio enfoque que conduce a una “agricultura sin químicos”, mientras que otros ven al MIP, como un sistema que incluye un uso más eficiente de los plaguicidas sintéticos.

Según los conceptos anteriores, el MIP se define como la combinación de diversas medidas directas de control (medidas de tipo mecánico, químico o biológico) e indirectas (métodos culturales, manejo de agua, época de cultivo, técnicas de cultivo y fertilización) para mantener las poblaciones de malas hierbas bajo un umbral económicamente admisible (Zwerger, 1996). Las medidas de control implicadas en el MIP, han sido aplicadas con éxito en el control de insectos y patógenos, pero aun no han resultado exitosas o viables en el manejo de malas hierbas (Zorner *et al.*, 1993).

Las principales objeciones del uso de bioherbicidas se basan en su limitada acción biológica, su gran dependencia del medio y su excesiva especificidad. En cuanto al uso de la biotecnología en la producción de cultivos, hay conceptos que preocupan, como es la posible transferencia de cualidades genéticas de las plantas modificadas a las malas hierbas, creando nuevas generaciones de plantas resistentes a herbicidas. Además, existen dudas sobre los efectos a largo plazo por el incremento del consumo de productos modificados genéticamente, tanto para animales como para humanos.

1.6.1. Importancia de los herbicidas

La aplicación de herbicidas es el método más utilizado para el control de malas hierbas en sistemas agrícolas, contribuyendo al desarrollo de más y mejores productos alimenticios para el bienestar de la humanidad. Sin los herbicidas

hubiese sido muy difícil cultivar grandes extensiones de tierra, ya que los métodos tradicionales de escardas manuales y mecánicas son más adecuados a pequeñas y medianas extensiones y serían inoperantes para mantener el cultivo libre de competencia de malas hierbas en grandes fincas. Bien gestionados ofrecen grandes beneficios a los agricultores. En la actualidad se han desarrollado más de 200 moléculas con potencial herbicida (Senseman, 2007).

El mercado mundial de plaguicidas supone cantidades millonarias de dólares a nivel mundial, en el que Norteamérica y Europa gastan más de la mitad del total. De estos fitosanitarios los herbicidas representan casi la mitad de las ventas (Tabla 1.3) y su utilización en campo, este hecho obedece a que ningún campo por bien gestionado que se encuentre se librará de la germinación y emergencia de malas hierbas. El mercado mundial de plaguicidas ascendió a más de 30 millones de dólares en el año 2006 y más de 33 millones en 2007 (Tabla 1.3). Las ventas de herbicidas representaron la mayor parte de los gastos totales (más del 40%), seguido por los insecticidas, fungicidas, y otros plaguicidas, respectivamente.

Tabla 1.3. Venta mundial de plaguicidas en 2006 y 2007

Plaguicida	2006		2007	
	Millones de USD	Porcentaje	Millones de USD	Porcentaje
	\$	%	\$	%
Herbicidas	14 805	48,7	16 115	48,1
Insecticidas	7 380	24,3%	8 016	24,0
Fungicidas	7 180	23,5%	8 105	24,0
Otros	1 060	3,5%	1 154	3,50
Total	30 425	100%	33 390	100

AEPLA, 2009

1.6.2. Clasificación de los herbicidas

Los herbicidas pueden ser clasificados fundamentado en diversos criterios, los que de acuerdo a la finalidad de la clasificación pueden tener cierta utilidad. De estos criterios enumeramos los más relevantes:

-
- a) Efecto observado (quemaduras, clorosis...)
 - b) Época de aplicación (presembrado, preemergencia, postemergencia...)
 - c) Movimiento en la planta (sistémico, contacto...)
 - d) Comportamiento en suelo (persistencia, lixiviación...)
 - e) Estructura química (según analogía en la estructura química)
 - f) Modo de acción

A nivel internacional, el criterio de clasificación de los herbicidas más aceptado es según el modo de acción del herbicida en las plantas, que consta de 25 grupos químicos (Tabla 1.4). Esta clasificación provee mayor información sobre la interacción final entre herbicida y planta, expresando las consecuencias fitotóxicas del herbicida. Dicha clasificación permite la elección de herbicidas con diferentes modos de acción para hacer rotaciones o mezclas de ingredientes activos útiles para evitar la aparición de malas hierbas resistentes o reducir el riesgo de ocurrencia de resistencia.

Tabla 1.4. Clasificación de los herbicidas por el modo de acción (HRAC, 2008)

Grupo	Modo de acción	Familia química
A	Inhibición de la acetil CoA carboxilasa (ACCasa)	Ariloxifenoxipropionatos, ciclohexanodionas, fenilpirazolinas
B	Inhibición de la acetolactato sintasa (ALS)	Imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos, sulfonilaminocarboniltriiazolinonas
C1	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazinas, triazinonas, uracilos, piridazinona, fenil-carbonatos
C2	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Ureas, amida
C3	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Nitrilos, benzotiadiazol, fenil-piridazina
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema I	Bipiridilos
E	Inhibición del protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difeniléteres, N-fenil-ftalamidas, tiadiazoles, oxadiazol, triazolinona
F1	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	Piridazinona, nicotinanilida, otros
F2	Decoloración: inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD)	Trikenona, ixosazol, pirazol
F3	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides (punto desconocido)	Triazol, isoxazolidinona, urea
G	Inhibición de la EPSP sintetasa	Glicinas
H	Inhibición de la glutamino sintetasa	Acido fosfínico
I	Inhibición del DHP (dihidropterato) sintetasa	Carbamato
K1	Inhibición de la unión de los microtúbulos de la mitosis	Dinitroanilinas, fosforoamidatos, piridazina, ácido benzoico
K2	Inhibición de la mitosis	Carbamatos, benzileter
K3	Inhibición de la división celular	Cloroacetamidas, carbamato, acetamida, benzamida, oxiacetamida
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Nitrilos, benzamida
M	Desacopladores (alteración de la membrana)	Dinitrofenoles
N	Inhibición de la síntesis de los lípidos (no ACCasa)	Tiocarbamatos, fosforoditioato, benzofurano, ácidos clorocarbónicos
O	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético, AIA)	Acidos fenoxi-carboxílicos, ácido benzoico, ácido piridin-carboxílico, ácido quinolin-carboxílico, otros
P	Inhibición del AIA	Ftalamato, diflufenzopir
R/S/T/Z	Desconocido	Acido arilamino propiónico, organoarsenicales, otros

Desde el punto de vista más simple el modo acción del un herbicida en la planta se resume como las interacciones bioquímicas y fisiológicas del herbicida con la planta. Sin embargo, el modo de acción de un herbicida es algo más que estas interacciones; 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).

La mayoría de los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su acción sobre un sitio primario de trascendental importancia biológica. Esta acción puede producir efectos fitotóxicos secundarios y terciarios que producen la muerte de la planta. En la Figura 1.1, se resumen los pasos desde la entrada de los herbicidas en la planta hasta ocasionar la muerte. El sitio primario es el lugar donde se une el herbicida o interfiere de alguna forma, causando la muerte de la planta. La acción del herbicida se puede estudiar en dos fases: la primera fase, que conlleva el movimiento del herbicida al sitio de acción, mientras la segunda fase conlleva las consecuencias metabólicas resultantes de la interacción en el sitio de acción (Devine *et al.*, 1993).

La primera fase empieza con la entrada del herbicida en la planta, bien por vía foliar o por vía radical. La entrada en la planta es seguida rápidamente por una serie de pasos que preceden la llegada del herbicida a su sitio de acción. Aquí se incluye la entrada a las células, la difusión en distancias cortas, el transporte a largas distancias, la conversión metabólica del herbicida y la entrada en organelos subcelulares. La interacción del herbicida con el sitio de acción se puede considerar el primer paso de la segunda fase; esto está seguido por una serie de consecuencias tóxicas que producen la muerte de la planta.

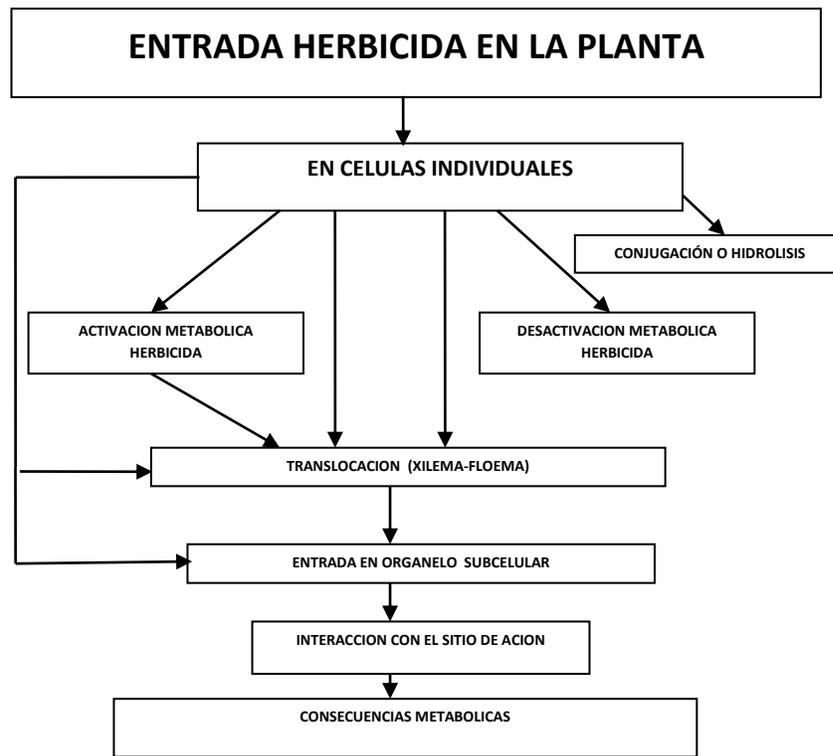


Figura 1.1. Eventos desde la entrada del herbicida hasta la muerte de la planta.

1.6.3. Acetolactato Sintasa

La acetolactato sintasa (ALS, acetohidroxiácido sintasa, AHAS, E.C. 4.1.3.18) cataliza el primer paso común en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina en plantas y microorganismos (Figura 1.2) (Saari y Mauvais, 1996; Powles y Yu, 2010). Cuatro de las enzimas de la ruta son comunes a la síntesis de los tres aminoácidos de cadena ramificada. La acetolactato sintasa condensa dos moléculas de piruvato para formar CO_2 y 2-acetolactato, que es el precursor de valina y leucina. La ALS también puede desarrollar la misma reacción con piruvato y 2-ketobutirato para formar CO_2 y 2-acetohidroxibutirato, un precursor de isoleucina. La ALS requiere FAD, tiaminapirifosfato (TPP), y Mg o Mn para su actividad, y la enzima produce hidroxietil-TPP (HETPP) como un producto intermedio. En presencia de FAD, la ALS es predominantemente de forma tetramérica. Esta enzima es regulada

mediante la inhibición del feedback o resíntesis de los tres productos aminoácidos. Existen dos formas de ALS en alguna, si no en todas, las plantas superiores. Cada forma tiene sensibilidad característica a los aminoácidos de cadena ramificada y a los herbicidas inhibidores de ALS. La ruta completa puede ser encontrada en los plastidios, aunque las enzimas son codificadas en el núcleo con péptido de tránsito para movimiento propio hacia el plastidio. Los genes que codifican para la síntesis de ALS han sido aislados y caracterizados en tabaco y *Arabidopsis thaliana*, con casi 85% de homología entre los 667 y 670 productos aminoácidos de la proteína, respectivamente (Devine *et al.*, 1993).

El estudio de esta ruta de biosíntesis en plantas es importante debido, entre otras razones: por ser la ruta donde se catalizan tres de los 10 aminoácidos esenciales y por presentar gran valor nutricional, y ser precursores de metabolitos secundarios, como glucosinolatos y glicósidos. La inhibición de esta enzima causa la desnutrición de la planta por falta de síntesis de estos aminoácidos. Este mecanismo primario, junto a los efectos secundarios de producción de 2 ketobutirato, alteración del transporte de fotosintatos y la disminución de la síntesis de proteínas se considera el mecanismo general causante de la muerte de las plantas sensibles a inhibidores de la ALS (Tranel y Wright, 2002).

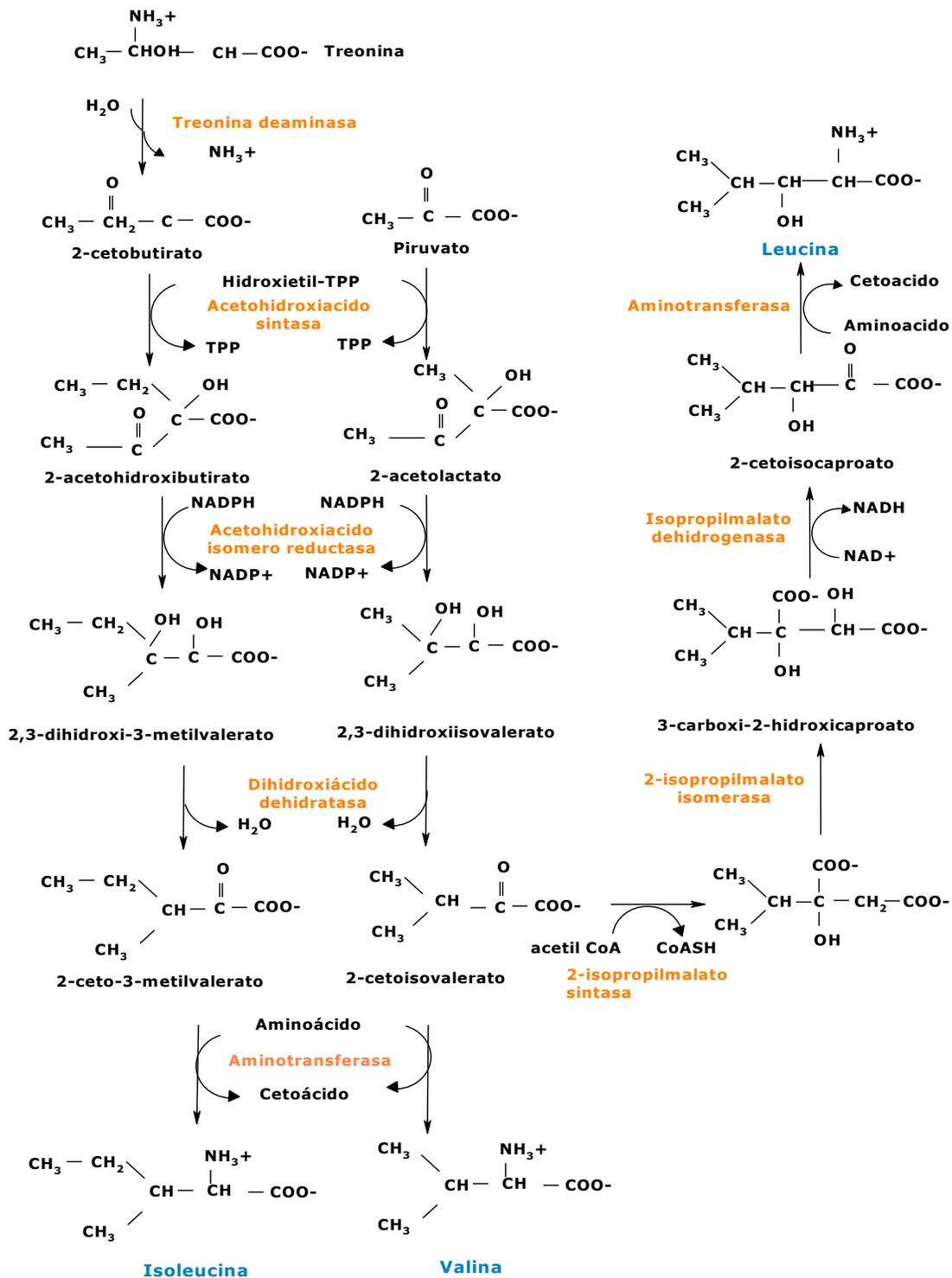


Figura 1.2. Ruta biosintética de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina. (Coruzzi y Last, 2000).

En esta ruta existen varios pasos paralelos en los que están involucradas estas cuatro enzimas: acetolactato sintasa (ALS), acetohidroxiácido isomero-reductasa, dihidroxiácido dehidratasa y aminotransferasa. El precursor común para estos aminoácidos es el piruvato. Además para la síntesis de isoleucina se requiere un segundo precursor, el 2-cetobutirato. Este compuesto proviene de treonina que es deaminada por una treonina deaminasa. La reacción que cataliza la ALS incluye la descarboxilación irreversible del piruvato y la condensación del radical acetaldehído con una segunda molécula de piruvato para dar 2-acetolactato, o con una molécula de 2-cetobutirato para dar 2-acetohidroxibutirato. En ambas reacciones se forma un intermediario entre el piruvato y el TPP. La descarboxilación de este intermediario conlleva la formación de un anión de hidroxietil-TPP (HET-PP) el cual actúa como un nucleófilo en el grupo 2-ceto de una segunda molécula de piruvato o 2-oxobutirato, resultando TPP y acetolactato o acetohidroxibutirato (Figura 1.2).

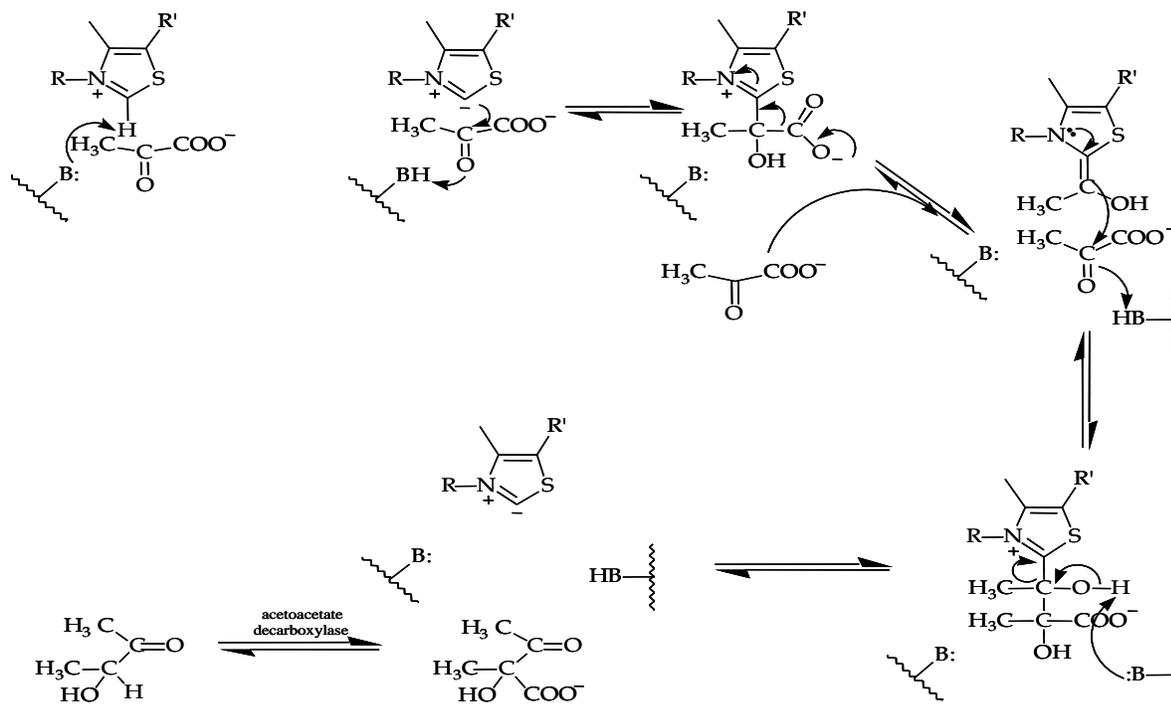


Figura 1.3. Reacción catalizada por la ALS, formando a partir de dos moléculas de piruvato una de acetolactato. La otra reacción catalizada por esta enzima es la condensación de una molécula de piruvato y otra de 2-cetobutirato para formar 2-acetohidroxibutirato.

La ALS, requiere FAD lo cual no es justificable ya que esta reacción no conlleva ninguna oxidación o reducción. Se especula que el papel del FAD es un vestigio de una proteína ancestral similar a la piruvato oxidasa, en la cual el FAD juega un papel redox. Las estructuras de estos cofactores se muestran en la Figura 1.4.

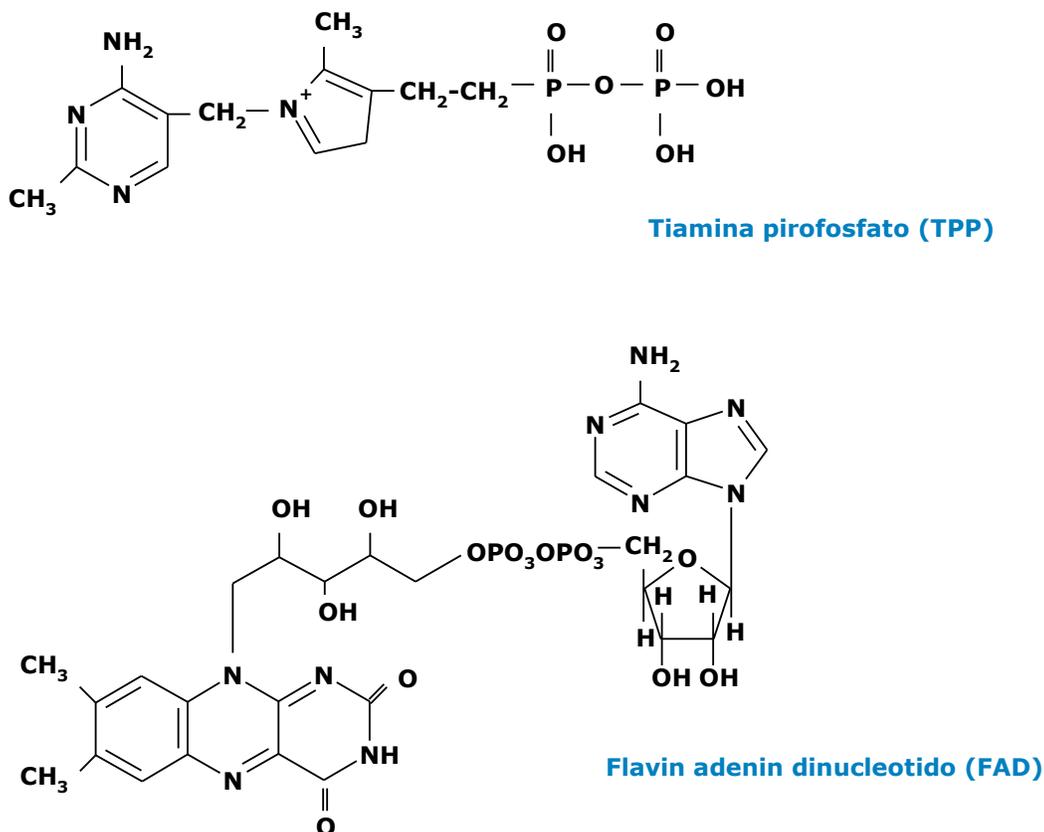


Figura 1.4. Cofactores de la acetolactato sintasa (ALS).

1.6.4. Herbicidas Inhibidores de la Acetolactato Sintasa

Las sulfonilureas como potentes inhibidores de la ALS fue descrita por científicos de Dupont a mediados de los 70 (Levitt, 1978). Desde entonces cientos de compuestos han sido identificados como inhibidores de esta enzima. En la década de los 80, American Cyanamid desarrolló una serie de herbicidas con estructura de imidazolinona que también inhibían la ALS (Shaner *et al*, 1984). En la actualidad se conoce que esta enzima es el sitio de acción de varias familias de

herbicidas incluidas dentro del grupo B de la clasificación realizada por el Comité de Acción Contra la Resistencia de Herbicidas (Figura 1.5), grupo de gran importancia en la agricultura moderna (Kishore y Shah, 1988; Hawkes, 1989; Hawkes *et al.*, 1989; Devine y Eberlein, 1997; Powles y Yu, 2010).

Los herbicidas que inhiben la ALS han tenido gran éxito dentro de la agricultura moderna, no solo por su alta eficacia, sino también por su baja toxicidad en mamíferos y bajo impacto ambiental, amplia selectividad en numerosos cultivos, uso en pre y post-emergencia; así como por el amplio espectro de control sobre varias especies de malas hierbas. En la actualidad este grupo presenta el mayor número de ventas en el mercado (Heap, 2002).

Uno de los aspectos más importantes de la evolución de poblaciones de malezas resistentes a los herbicidas inhibidores de ALS ha sido la alta frecuencia con que ocurre este fenómeno. La selección de biotipos resistentes a inhibidores de ALS, principalmente, es debida al uso repetido de herbicidas en grandes aéreas, no uso de herbicidas con diferentes modos de acción, alta eficacia del herbicida sobre los biotipos sensibles y la residualidad en el suelo del herbicida (Tranel y Wright, 2002).

animales es muy baja (ej. el clorsulfuron en ratas tiene un LD₅₀ de aproximadamente 6 g por kg de peso).

Las imidazolinonas presentan en su estructura un núcleo 4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il unido en la posición 2 a un anillo aromático (usualmente heterocíclico) (Figura 1.6). Son herbicidas menos eficaces que las sulfonilureas, utilizándose dosis de campo entre 100 y 1000 g ha⁻¹. Esta diferencia no se debe a su eficacia inhibidora sobre la enzima, ya que se requieren concentraciones para la inhibición *in vitro* en el rango µM; puede que su efectividad en campo sea debida a una combinación de varios factores, entre los que están su fácil translocación, bajo metabolismo y persistencia en el suelo. Son herbicidas que controlan un amplio espectro de malas hierbas y se usan de forma generalizada en cultivos de cereales, leguminosas y en plantaciones forestales. Como se mencionó anteriormente, son compuestos que se translocan en la planta y se absorben tanto por vía radicular como foliar, estando su uso indicado generalmente para aplicaciones en post-emergencia, aunque también se pueden usar para tratamientos en pre-emergencia (Shaner *et al.*, 1990). La toxicidad en animales es similar a la encontrada para sulfonilureas.

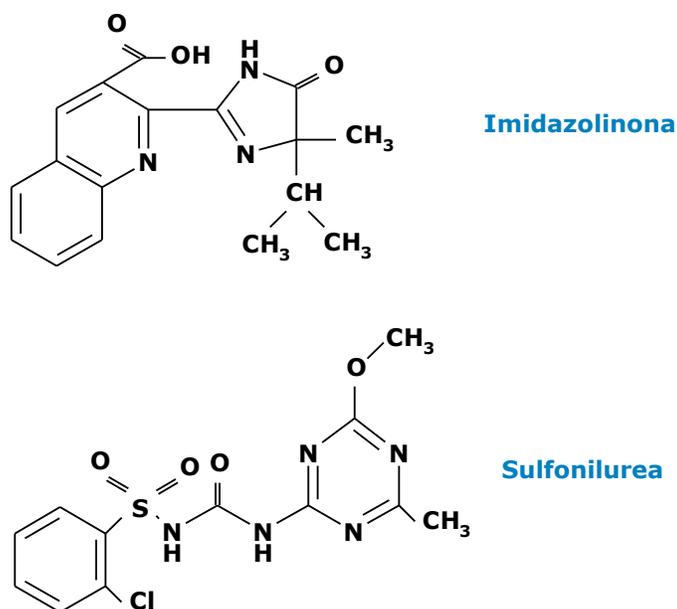


Figura 1.6. Estructura de las sulfonilureas e imidazolinonas.

El conocimiento sobre el sitio de unión del herbicida a la enzima es muy limitado. Algunos estudios han demostrado que estos inhibidores se unen con una cinética lenta y el sitio está fuera de los sitios de unión de los sustratos, por lo que deben actuar como factores alostéricos (Schloss *et al.*, 1988; Ibdah *et al.*, 1996). En algunos casos se ha encontrado que estas mutaciones afectan la afinidad por el sustrato o la sensibilidad por la regulación feedback por los aminoácidos producto de esta ruta. (Devine y Shukla, 2000).

1.7. Resistencia de las malas hierbas a herbicidas

En 1946, con la introducción del 2,4-D y el MCPA, se mostró a los agricultores europeos y norteamericanos el potencial de los herbicidas para controlar eficaz y económicamente las malas hierbas de hoja ancha en cereales. El éxito de estas auxinas sintéticas impulsó la investigación de nuevas moléculas mediante la inversión de cantidades millonarias, que posibilitaron la obtención de nuevos herbicidas comercialmente disponibles para control de malas hierbas en distintos cultivos.

La comprobada eficacia de los herbicidas permite a los agricultores producir sus cultivos de forma reiterada y rentable en los mismos terrenos y optimizar sus ingresos. Sin embargo, una de las desventajas del uso de estos productos es el crecimiento exponencial que está experimentando la cantidad de biotipos resistentes de malas hierbas.

Aunque existen varios herbicidas de acción total o no selectivos, activos frente a cualquier tipo de planta, los herbicidas más importantes son los específicos o selectivos, capaces de controlar un amplio espectro de malas hierbas sin afectar a los cultivos a los que se aplican. La selectividad puede deberse a causas físicas o, más frecuentemente, bioquímicas (Jäger, 1983), siendo en este último caso consecuencia de las diferencias genéticas existentes entre distintas especies vegetales.

La acción selectiva supone que determinadas especies de plantas cultivadas, o de malas hierbas, son capaces de vivir y crecer a las dosis recomendadas de aplicación agrícola del herbicida, aunque puedan ser controladas a dosis varias veces superiores. Este tipo de respuesta es conocido como tolerancia natural, y según el Comité de Acción para la Resistencia a los Herbicidas (HRAC) es 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.

Sin embargo, debido a la variabilidad genética intraespecíficamente en ciertas poblaciones de especies malas hierbas, junto a la presión de selección causada por la aplicación continua de herbicidas en la agricultura moderna, ha sido evidente la aparición de biotipos no controlados por herbicidas específicos, los cuales originalmente eran sensibles a este producto (Tharayil-Santhakumar, 2004). Esta respuesta que le permite a un individuo dentro de una población de una especie mala hierba, sobrevivir y reproducirse después de la aplicación de la dosis agrícola de un herbicida, que controlaba normalmente la población cuando era sensible, es conocida como resistencia.

Esta constituye una característica desarrollada a partir de la variabilidad genética generada por una mutación natural o a partir de plantas resistentes pre-existentes en una población en baja proporción; cuya frecuencia génica incrementada en una generación determinada hace dominante los individuos resistentes sobre los sensibles, debido a la presión de selección ejercida por el uso inadecuado de herbicidas (Duke *et al.*, 1991). La resistencia a herbicidas ha sido definida por la HRAC como la habilidad/aptitud heredable de una especie vegetal para sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con un herbicida a dosis normalmente letales para la misma especie susceptible. Las plantas resistentes, a diferencia de las plantas tolerantes, además de sobrevivir a la dosis de aplicación agrícola del herbicida también, pueden sobrevivir a dosis superiores (De Prado *et al.*, 1996).

La resistencia puede ocurrir naturalmente o puede ser inducida por técnicas como la ingeniería genética o selección de variantes resistentes obtenidas por cultivos de tejidos o mutagénesis. Este término es adjetivado con diversos modificadores de acuerdo a los mecanismos de resistencia que posee un individuo y a los herbicidas a que éste es resistente. Así tienen lugar los conceptos de resistencia cruzada y resistencia múltiple, que se definen asociados al mecanismo de resistencia, según diferentes autores (Jutsum y Graham, 1995):

- Resistencia cruzada: aquella por la que un individuo es resistente a dos o más herbicidas debido a un sólo mecanismo de resistencia.
- Resistencia múltiple: aquella por la que un individuo posee más de un mecanismo de resistencia a uno o varios herbicidas.

La resistencia cruzada negativa se refiere a aquellos casos en los que un biotipo resistente a un herbicida exhibe un aumento en la sensibilidad a otros herbicidas con distinto modo de acción o de degradación (De Prado *et al.*, 1992; Tharayil-Santhakumar, 2004). Uno de los aspectos más recientes en el campo de la resistencia a herbicidas, es el desarrollo de cultivos resistentes a herbicidas, los

cuales tienen genes incorporados artificialmente que les confieren resistencia a determinado herbicida, al que originalmente eran sensibles.

El término “tolerancia” se usa frecuentemente no sólo para referirse a variaciones entre especies, sino también en relación con la variabilidad dentro de una especie (LeBaron y Gressel, 1982). En este caso, tolerancia y resistencia son expresiones que denotan diferencias en intensidad de un mismo fenómeno, considerándose la resistencia como un caso extremo y menos frecuente de tolerancia (Holt y LeBaron, 1990) o considerando la tolerancia como un mecanismo poligénico y la resistencia uno monogénico (Gressel, 1985).

Aunque los herbicidas han sido beneficiosos para el desarrollo de la agricultura (Valverde *et al.*, 2000), la aspersión repetida de herbicidas con el mismo ingrediente activo, mismo grupo químico o con igual sitio de acción, en interacción con otros factores (bióticos y abióticos) como el suelo, clima, prácticas culturales, sistema de cultivo, especie de maleza, y el no uso de otras medidas alternativas de control ha conducido a la evolución de resistencia en las poblaciones de especies infestantes (Kendig y Fishel, 2009; Tharayil-Santhakumar, 2004; Friesen *et al.*, 2000; Lebaron y Gressel, 1982).

1.7.1. Biotipos resistentes a herbicidas

La resistencia es el resultado de la introducción y uso de diferentes plaguicidas para reducir el impacto del daño económico causado por distintas especies plagas en los rendimientos agrícolas. Los insectos fueron los primeros en desarrollar resistencia a plaguicidas, reportado en 1908; seguido más tarde por la aparición de hongos resistentes a fungicidas en 1940 (Graves, 1994; Tharayil-Santhakumar, 2004). Existen más de 400 especies plagas agrícolas con resistencia a uno o varios de estos plaguicidas (Graves, 1994). Una situación similar ocurre con otros tipos de plaguicidas, desde antibióticos a rodenticidas, en los que la aparición de resistencia se ha producido en un tiempo relativamente corto desde su

introducción (Conway y Toenniessen, 1999). Comparadas con los insectos y patógenos, las malas hierbas tienen ciclos de reproducción relativamente largos lo que ha contribuido a la “aparente” lenta evolución de la resistencia a herbicidas (Tharayil-Santhakumar, 2004).

La resistencia a herbicida es un carácter heredable inherente a algunas especies de planta, con el cual pueden sobrevivir y reproducirse después de ser tratadas con la dosis normal de un herbicida que las controlaba eficazmente (Prather *et al.*, 2000). Aunque la resistencia fue reportada tempranamente contra el herbicida 2,4-D en Hawaii (Hilton, 1957), el primer reporte oficial (1970) fue el de *Senecio vulgaris* resistente a la familia herbicida de las triazinas detectado en Estados Unidos de Norteamérica en 1968. Estos herbicidas se habían aplicado una o dos veces al año durante 10 años. La resistencia era tan grave que plántulas provenientes de semillas recolectadas en sitios que utilizaron estos herbicidas intensamente, no fueron controladas al aplicar 8 kg de i.a. ha⁻¹, mientras que plántulas provenientes de semillas recolectadas en otros sitios que recibieron tratamiento esporádico necesitaron entre 0.6 a 1.1 kg i.a. ha⁻¹ para ser controladas (Ryan, 1970).

Desde que fue reportado este primer caso de resistencia, la cantidad de biotipos resistentes a herbicidas ha incrementado anualmente a tasa creciente en el mundo, experimentando un crecimiento exponencial a partir de los años ochenta con tendencia a incrementarse en años próximos (Figura 1.7). Este aumento en especies y biotipos, amenaza a muchas regiones agrícolas del mundo, especialmente en aquellas donde existen casos de malas hierbas que presentan resistencia múltiple.

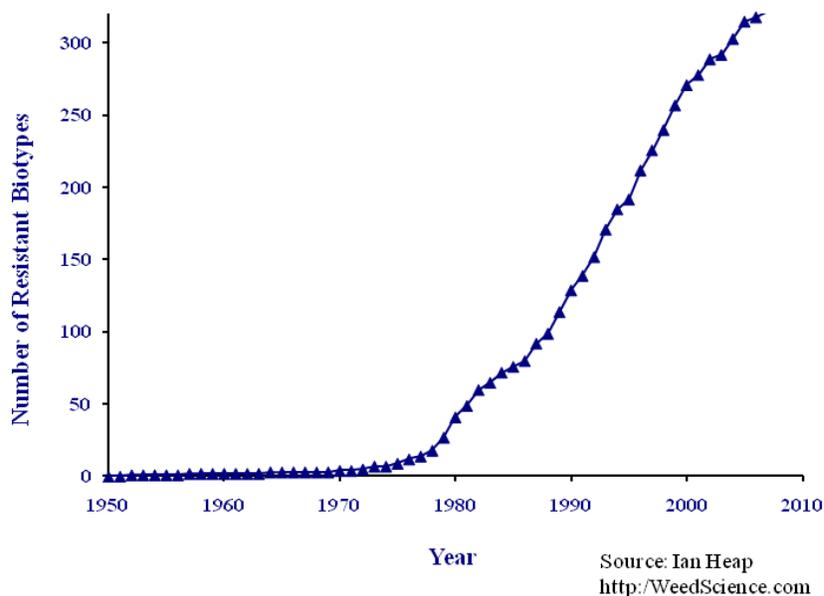


Figura 1.7. Malas hierbas resistentes a herbicidas durante 2010.

Un problema más serio es el rápido desarrollo de malas hierbas resistentes a herbicidas inhibidores de las enzimas acetolactato sintasa (ALS) y acetil coenzima A carboxilasa (ACCase). Estos herbicidas ejercen gran presión de selección sobre las malas hierbas, al ser productos selectivos. Existen aproximadamente 15 grupos químicos inhibidores de la acetolactato sintasa, pero solo 5 de estos grupos químicos están disponibles comercialmente: sulfonilureas (p.e. tribenurón-metil), imidazolinonas (p.e. imazamox), triazolopirimidinas (p.e. florasulam), pirimidil-tiobenzosatos (p.e. bispiribac-sodio) y las sulfonil-aminocarbonil-triazolinonas (p.e. flucarbazone-sodio). Estos grupos de herbicidas químicos son muy importantes en el control de malezas de hojas anchas, ciperáceas y gramíneas, importantes en cultivos para la alimentación humana.

El amplio uso de estos herbicidas es debido a su alta eficacia biológica a bajas dosis de aplicación, amplio espectro de acción contra diferentes especies malas hierbas, bajos efectos toxicológicos en mamíferos, reducido impacto ambiental, efectos pre-emergente y post-emergente y alta selectividad en diversos

cultivos (Tranel y Wright, 2002). Los primeros casos de resistencia se presentaron en Norte América, en condiciones de monocultivo. En la actualidad, es común encontrar malas hierbas resistentes en cultivos de rotación, en especial si los inhibidores de la ALS se aplican en cultivos sucesivos bajo ese sistema. La resistencia a este grupo de herbicidas es la que ha aumentado más rápidamente en los últimos tres lustros, ocupando más de un 30 % del total de biotipos resistentes a estos herbicidas (Heap, 2010) (Figura 1.8).

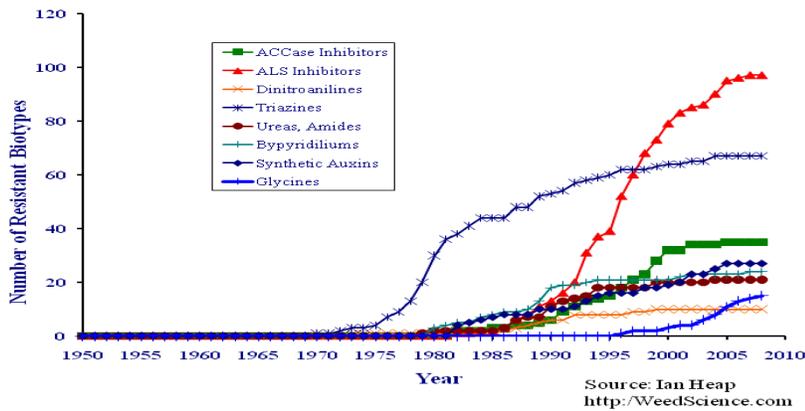


Figura 1.8. Número de biotipos resistentes a familias de herbicidas.

A nivel mundial, han sido reportado 357 biotipos resistentes en 197 especies (115 dicotiledóneas y 82 monocotiledóneas) en alrededor de 430,000 campos (Heap, 2010). La mayoría de estos biotipos fueron descubiertos en Europa y Norte América, pero el número de casos detectados en otras regiones del mundo es relativamente alto (Figura 1. 9).

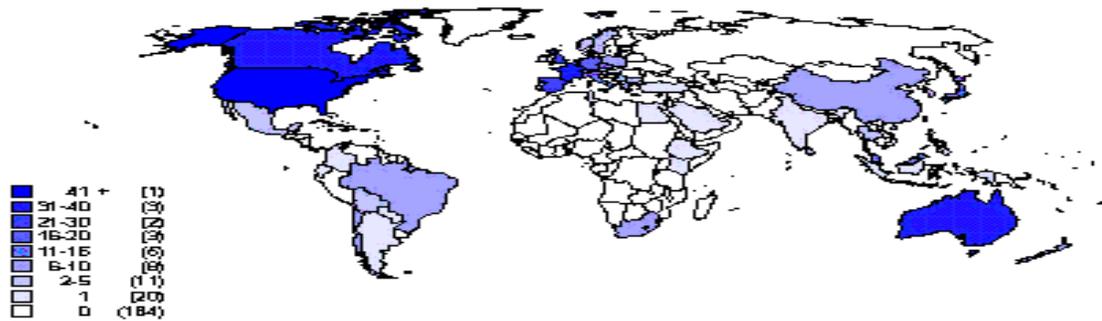


Figura 1.9. Mapa mundial de la distribución del número de especies de malas hierbas resistentes a herbicidas en el mundo.

1.7.2. Mecanismos de resistencia a herbicidas

Es fundamental conocer los procesos fisiológicos responsables de la resistencia a herbicidas en las malas hierbas, con el propósito de diseñar estrategias de control eficientes. De acuerdo al mecanismo de resistencia que posea, la mala hierba presentará un patrón de resistencia específico, que variará desde un alto grado de resistencia a determinados compuestos dentro de la misma familia química, hasta una resistencia moderada a varios herbicidas.

El conocimiento de los mecanismos de resistencia es de gran importancia en la Malherbología, ya que el carácter resistente puede ser usado como una herramienta para entender los procesos bioquímicos básicos y los medios fundamentales con los cuales las plantas se defienden de los químicos xenobióticos tóxicos; contribuir en el desarrollo de nuevos métodos de manejo de poblaciones de malezas resistentes y aplicarse en la obtención de cultivos resistentes a herbicidas, mediante la transferencia de los genes identificados, permitiendo así el uso de herbicidas alternativos en estos cultivos (Tharayil-Santhakumar, 2004).

Los medios de defensa de las plantas ante los herbicidas pueden considerarse como mecanismos de resistencia herbicida en el sitio de acción (SA) y mecanismos de resistencia herbicida fuera del sitio de acción (No-SA). La resistencia en el SA existe cuando un herbicida alcanza el sitio de acción, normalmente una enzima, a la dosis letal y han ocurrido cambios en el sitio de acción del herbicida que le impiden unirse y desencadenar los efectos fitotóxicos correspondientes. La resistencia No-SA implica mecanismos fuera del sitio de acción que reducen la cantidad de herbicida que llega hasta el sitio de acción (enzima). El mecanismo en el SA, en las principales malezas es una pérdida de afinidad del herbicida por el sitio de acción o enzima; el mecanismo No-SA puede

incluir modificaciones metabólicas y reducciones de la absorción y translocación del herbicida (Powles y Yu, 2010).

Bajo un enfoque general, existen cinco mecanismos, no necesariamente excluyentes, descritos en las plantas como medio de defensa o resistencia a los herbicidas (Sherman *et al.*, 1996):

a) Pérdida de afinidad por el sitio de acción

Los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su actuación sobre un sitio de acción primario, generalmente una proteína, de especial relevancia biológica. En plantas sensibles este sitio primario suele ser específico y la acción del herbicida sobre él (efecto primario), desencadena el desarrollo de efectos secundarios de naturaleza mucho más general, que normalmente acaban produciendo la muerte de la planta (Corbett *et al.*, 1994). Por otro lado, una o varias mutaciones en la secuencia aminoacídica del sitio primario de acción pueden resultar en una pérdida de afinidad del herbicida por éste, imposibilitando la unión efectiva de ambos y, continuando así el proceso vital mediado por dicho sitio (Devine y Shimabukuro, 1994; Gronwald, 1994; Saari *et al.*, 1994; De Prado *et al.*, 1997). Este tipo de mecanismo, caracterizado en la mayoría de los biotipos resistentes descritos hasta el momento, confiere un alto grado de resistencia al herbicida empleado, pudiéndose extender ésta a otras moléculas pertenecientes a la misma familia química (resistencia cruzada).

b) Metabolización a compuestos no tóxicos

La degradación de los herbicidas a compuestos no tóxicos es la base de la selectividad que presentan muchas materias activas en cultivos tolerantes frente a las malas hierbas sensibles. En los procesos de detoxificación metabólica, los cuales se caracterizan por ser procesos biológicos en los que las moléculas tóxicas son metabolizadas a compuestos inocuos o menos tóxicos, los biotipos resistentes son capaces de degradar el herbicida antes de que éste cause daños irreversibles.

La velocidad de degradación enzimática puede variar con factores endógenos y exógenos tales como el estadio de crecimiento de la planta, las condiciones climáticas, entre otros.

Los procesos de detoxificación metabólica de herbicidas en tejidos vegetales pueden dividirse en tres fases (Tabla 1.5) (Shimabukuro, 1985; Hatzios, 1991). En la fase I (conversión) las propiedades iniciales del plaguicida de partida son transformadas a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis para producir un compuesto más soluble en agua y menos tóxico. La segunda fase implica la conjugación del herbicida o sus metabolitos con un azúcar, aminoácido o glutatión, incrementando su solubilidad en agua y reduciendo la toxicidad del compuesto. Generalmente, los metabolitos formados en la fase II tienen poca o nula fitotoxicidad y pueden ser almacenados en organelos celulares. La fase III implica la transformación de los metabolitos de la fase anterior a conjugados secundarios con nula toxicidad (Hatzios, 1991). Esta división no constituye una regla general dado que alguna de las fases puede no estar presente en los procesos de detoxificación; o la molécula herbicida puede ser un pro-herbicida inactivo que debe ser enzimáticamente convertido en un compuesto activo; o a veces ciertos procesos de conjugación son de carácter reversible, por lo que sólo afectan de manera parcial a la cantidad de herbicida libre intracelular.

Tabla 1.5. Resumen de las tres fases del metabolismo de plaguicidas

Características	Propiedades iniciales	Fase I	Fase II	Fase III
Reacciones	Compuesto inicial	Oxidación, hidrólisis, reducción	Conjugación	Conjugación secundaria o incorporación a biopolímeros
Solubilidad	Lipofílico	Anfófilico	Hidrofílica	Hidrofílicas o
Fitotoxicidad	Tóxico	Modificado o menos tóxico	Muy reducida o no tóxico	insoluble No tóxico
Movilidad	Selectiva	Modificada o reducida	Limitada o inmóvil	Inmóvil

Adaptado de Shimabukuro, 1985; De Prado et al., 2004.

Fase I o conversión

Algunos herbicidas pueden ser conjugados directamente. Sin embargo, otros no poseen sustituyentes disponibles en sus moléculas (grupos amino, hidroxilo, sulfihidrido, etc.) que puedan reaccionar para formar conjugados con constituyentes celulares. Dichos herbicidas deberán ser convertidos en metabolitos mediante algunas de las siguientes reacciones:

a) Hidrólisis: Estas reacciones están catalizadas por enzimas hidrolíticas (esterasas, fosfatasas o amidasas, dependiendo del sustrato). En las transformaciones hidrolíticas se rompen los enlaces de un sustrato por adición a cada producto de H u OH proveniente del H₂O. Hay muchas enzimas hidrolíticas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos, particularmente aquellas que contienen grupos funcionales amida, carbamato o éster. Estas enzimas pueden estar compartimentalizadas o ser extracelulares y, las reacciones pueden ocurrir tanto en condiciones aerobias como anaerobias. La hidrólisis de enlaces éster de herbicidas han sido ampliamente estudiadas y analizadas en plantas y microorganismos (Inclendon y Hall, 1997; Hoagland y Zablotowicz, 1998). La hidrólisis del enlace éster es llevada a cabo por esterasas y en menor medida por lipasas y proteasas. Con respecto a la hidrólisis de enlaces amida, el propanil es el herbicida más estudiado. La base de la selectividad del arroz (*Oryza sativa* L.) es debida a los altos niveles que posee de la enzima aril acilamidasa, la cual rompe el enlace amida formando ácido propiónico y 3,4-dicloroanilina (Frear y Still, 1968).

b) Reducciones: La metabolización reductora de herbicidas es un proceso que raramente se da en plantas, pudiéndose destacar únicamente la desaminación reductora de las S-triazinonas (metamitrona y metribuzina), en cultivos tolerantes y malas hierbas resistentes (Fedtke, 1983).

c) Oxidaciones, oxigenaciones e hidroxilaciones: Todas ellas se pueden incluir dentro del grupo denominado transformaciones oxidativas. La oxigenación es el primer paso más frecuente en la biotransformación de herbicidas siendo las hidroxilaciones las más observadas en plantas. La detoxificación por hidroxilación y la posterior formación de un conjugado glicósido, son especialmente importantes como mecanismo de selectividad y resistencia a herbicidas en monocotiledóneas. Muchas de estas reacciones están mediadas por enzimas oxidativas, *p.e.* citocromo P-450, que son las enzimas más importantes en la primera fase del metabolismo de un herbicida (Barrett, 2000). La regulación y expresión de P-450 no se conocen bien en plantas, principalmente porque en células que no están expuestas a estrés fisicoquímico, fisiológico o xenobiótico las cantidades que se encuentran de esta enzima son muy pequeñas. Los agroquímicos pueden influir en los sistemas citocromo P-450 actuando como efectores, modificando o regulando así el metabolismo de los herbicidas en una planta.

Además de las enzimas citocromo P-450 monooxigenasa las plantas producen otras enzimas oxidativas (peroxidasas, polifenoloxidasas, lacasas y tirosinasas) las cuales catalizan la polimerización de varias anilinas y fenoles (Dec y Bollag, 2001). Por ejemplo, las peroxidasas que median el metabolismo de herbicidas que funcionan de manera similar a las citocromo P-450 monooxigenasa incluye descarboxilaciones, oxidaciones sulfúricas, *N*-desmetilaciones, hidroxilaciones del anillo y oxidaciones aromáticas del grupo metilo (Lamoureux y Frear, 1979). En plantas, a menudo las enzimas peroxidasas funcionan en la tercera fase del metabolismo, *p.e.* formación de residuos ligados. *Amorocia laphathifolia* Gilib. contiene en las raíces gran cantidad de peroxidasas.

Fase II ó conjugación

Los conjugados suelen ser los metabolitos finales en los procesos de detoxificación de herbicidas. La naturaleza de estos conjugados suele ser muy

diversa, con azúcares, aminoácidos, péptidos y lignina como grupos orgánicos y enlaces de tipo éster, éter, tioéter, amida o glicosídico.

a) Conjugación con glutatión: Constituye un mecanismo de detoxificación de gran importancia en muchos tejidos vegetales. Se trata de una sustitución nucleofílica en el que el anión glutatión GS^- sirve de nucleófilo, actuando los grupos cloro, *p*-nitrofenol o alquil-sulfóxido como posibles grupos a sustituir en la molécula herbicida (Lamoureux y Frear, 1987). La conjugación con el tripéptido glutatión está catalizada por una familia de enzimas denominadas glutatión-S-transferasas más o menos específicas que se encuentran de manera constitutiva o inducible en muchos tejidos vegetales (Devine *et al.*, 1993).

b) Conjugación con aminoácidos: la hidrólisis de glutatión en este tipo de conjugados, normalmente produce un conjugado de cisteína, el cual puede ser posteriormente malonizado. Sin embargo, en el caso del herbicida clorfemprop sólo el conjugado de cisteína y no el de glutatión se ha descrito en trigo (Pont y Collet, 1980), siendo posible que la cisteína pueda actuar como nucleófilo en una reacción de conjugación similar a la descrita en el glutatión.

c) Conjugación con azúcares: Los conjugados glicósidos más frecuentemente hallados en plantas son los β -D-glucopiranosidos, junto con los N-glicósidos, O-glicósidos y ésteres de glucosa. Este tipo de reacciones está catalizado por glucosil-transferasas, que utilizan UDP-glucosa como donante de glucosa (De Prado *et al.*, 2010). De todas estas reacciones, la formación de O-glicósidos es la más común, la cual sigue normalmente a la introducción de grupos hidroxilo en la molécula herbicida por monooxigenación.

Fase III o deposición

La ruta metabólica seguida por un herbicida afecta de gran manera el uso final de los metabolitos terminales y conjugados. Los conjugados glicósidos son

depositados en la vacuola donde quedan almacenados, mientras que los conjugados de origen aminoacídico son excretados a la pared celular donde se integran en el componente de lignina de éstas, formando un residuo insoluble (Pillmoor y Caseley, 1984). Cabe mencionar que estos procesos de deposición no son completamente irreversibles, la reentrada de los aglicones herbicidas o sus productos de conversión en el pool de herbicida activo intracelular es muy lenta (Devine *et al.*, 1993).

La resistencia de malas hierbas a herbicidas mediante detoxificación es uno de los procesos metabólicos más frecuentes. Sin embargo, este mecanismo viene asociado a fenómenos de resistencia cruzada, lo que implica que un mismo individuo tiene la capacidad de metabolizar moléculas muy diferentes pertenecientes a diversas familias químicas (De Prado *et al.*, 2010) Esta moderada resistencia a un amplio espectro de productos hace extremadamente difícil el control de estos biotipos de malas hierbas mediante el sólo uso de métodos químicos.

a) Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción

Una condición necesaria para lograr la efectividad de un herbicida es que alcance su sitio de acción en una concentración suficiente para que su efecto sea letal. La falta de movimiento de un herbicida posibilitará reducir la concentración de éste en el sitio de acción, lo que permitirá al último mantenerse funcional. Estas bajas concentraciones pueden lograrse ya sea mediante una reducción en la penetración, absorción o translocación o por la existencia de fenómenos de secuestro en organelos celulares más o menos translocables. La falta de absorción/penetración/translocación de herbicidas es básicamente un mecanismo de tolerancia existente en numerosos cultivos y algunas malas hierbas (Hess, 1985; De Prado *et al.*, 2001; Ruiz-Santaella *et al.*, 2004; Michitte *et al.*, 2007; Cruz-Hipólito *et al.*, 2009). Aun cuando pueden estudiarse por separado, estos mecanismos resultan difíciles de diferenciar entre sí, dado que una absorción

diferencial suele implicar una translocación diferencial, y una translocación diferencial puede derivar de la diferente degradación del herbicida en el sitio de absorción, la cual resulta en metabolitos más o menos translocables.

b) Resistencia asociada a procesos de secuestro o compartimentación.

Son mecanismos de resistencia o tolerancia poco conocidos, pues las evidencias que los apoyan son en muchos casos circunstanciales (Coupland, 1991; Owen, 1991). Los pocos casos recogidos en la bibliografía relacionan este tipo de mecanismos de resistencia con herbicidas de acción hormonal e inhibidores del fotosistema I, justificando la resistencia tanto en líneas de cultivos celulares como en plantas enteras como un incremento en la capacidad de secuestrar el herbicida o los metabolitos potencialmente fitotóxicos dentro de la vacuola celular. Sin embargo, los procesos subyacentes a estos mecanismos de secuestro son todavía desconocidos.

c) Reparación de efectos fitotóxicos

Algunos herbicidas ariloxifenoxipropanoatos (inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa), como diclofop-metil y haloxifop, despolarizan el potencial de la membrana plasmática en células parenquimáticas de *Avena sativa*, *Triticum aestivum*, *Lolium rigidum*, etc. La capacidad despolarizadora del diclofop-metil se atribuye al flujo específico de protones que este compuesto produce hacia el interior de la célula. Se han identificados biotipos de malas hierbas cuyo mecanismo de resistencia al diclofop-metil parece ser debido a la capacidad de recobrar el potencial de membrana una vez que se ha retirado el herbicida causante de la despolarización (De Prado *et al.*, 1999).

La absorción reducida del herbicida es debida a modificaciones en la morfología de la vía de entrada del herbicida en la planta. En el caso de absorción foliar, es importante la morfología y composición de las ceras epicuticulares, así como las características foliares (densidad de tricomas, densidad de estomas y

espesor de la cutícula), que podrían afectar el ángulo de contacto de las gotas y la retención de la solución de herbicida, incidiendo en la cantidad de herbicida que entra en la planta (Rosario *et al.*, 2010a).

1.7.3. Resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa

Las malas hierbas resistentes a este grupo de herbicidas han aparecido principalmente en cereales, rotaciones maíz/soja, arroz, márgenes de las autovías y en plantaciones forestales. El primer herbicida inhibidor de la ALS fue el herbicida clorsulfurón comercializado en 1982. En 1987, fue descrito el primer caso de resistencia a herbicidas inhibidores de ALS en la especie *Lactuca serriola* resistente al clorsulfurón (Mallory-Smith *et al.*, 1990; Primiani *et al.*, 1990).

Dentro de las especies malas hierbas con mayor incremento en la cantidad de biotipos resistentes, a nivel mundial son *Kochia scoparia*, *Avena fatua* y *Salsola ibérica*. La dispersión geográfica de estas especies ha contribuido de manera fundamental a la expansión de la resistencia a esta familia de herbicidas. La aparición de resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS se atribuye a la aplicación continua durante un período mínimo de tres años consecutivos (Rubin, 1996).

A la fecha, han sido caracterizados 108 biotipos resistentes a inhibidores de ALS en 34 países, entre los cuales Australia, Estados Unidos y Canadá son los que tienen mayor incidencia de biotipos resistentes, con 20, 43 y 20 especies, respectivamente. En Europa existen 47 especies resistentes a inhibidores de la ALS, siendo los casos más importantes: *Stellaria media*, *Cyperus difformis*, *Alopecurus myosuroides*, y *Papaver rhoeas*, las cuales son infestantes en diversos cultivos (Heap, 2010).

España, según Heap (2010), en total tiene 31 especies de malas hierbas resistentes a herbicidas con diferentes modos de acción, de las cuales 4 tienen resistencia a los inhibidores de ALS: *Alisma plantago-acuática*, *Cyperus difformis*,

Papaver rhoeas y *Sinapis alba* (Durán-Prado *et al.*, 2004; Ruiz-Santaella *et al.*, 2004; Calha *et al.*, 2007; Cruz-Hipolito *et al.*, 2008).

Dentro de las especies que han desarrollado resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS, las quince más importantes, ordenadas por la frecuencia con que aparecen en diferentes países, son presentadas en la Tabla 1.6, que recoge aquellas especies reportadas en más de tres países. En consecuencia, las tres malas hierbas más invasivas y agresivas son *Stellaria media*, *Cyperus difformis*, *Alopecurus myosuroides*, y *Papaver rhoeas*.

Tabla 1.6. Malas hierbas más importantes resistentes a herbicidas inhibidores de la ALS.

Especie	País
<i>Stellaria media</i>	Canadá, Dinamarca, Nueva Zelanda, Irlanda, Holanda, Reino Unido, Noruega, África y EE.UU.
<i>Papaver rhoeas</i>	España, Grecia, Italia, Reino Unido y Dinamarca
<i>Cyperus difformis</i>	EE.UU., Australia, España, Italia, Brasil y K. del Sur
<i>Alopecurus myosuroides</i>	Reino Unido, Francia, Bélgica, Alemania y Turquía
<i>Avena fatua</i>	Sudáfrica, Canadá, Reino Unido, EE.UU., España
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Israel, EE.UU., Canadá y Yugoslavia
<i>Sinapis arvensis</i>	Canadá, EE.UU. Australia y Turquía
<i>Alisma plantago-acuatica</i>	Italia, Portugal, España y Chile
<i>Sagittaria montevidensis</i>	EE.UU., Australia, Brasil y China
<i>Lolium rigidum</i>	Australia, Sudáfrica, Francia y Chile
<i>Alisma plantago-acuatica</i>	Italia, Portugal, España y Chile
<i>Apera spica-venti</i>	República Checa, Alemania y Polonia
<i>Conyza canadensis</i>	Israel, Polonia y EE.UU.
<i>Monochoria korsakowii</i>	Japón, Korea del Sur y China
<i>Scirpus mucronatus</i>	Italia, EE.UU. y Chile

Especies tomadas de Heap, 2010.

Otros biotipos resistentes a inhibidores de la ALS, reportados por Osuna *et al.* (2001) en España, aparecen en la Tabla 1.7, cuyo mecanismo de resistencia más frecuente es una enzima ALS alterada, y menos común la detoxificación metabólica rápida.

Tabla 1.7. Biotipos resistentes a herbicidas inhibidores de la ALS en España.

Especie	Origen	Cultivo	Mecanismo	Referencia
<i>Alopecurus myosuroides</i>	Lérida	Trigo	Metabolismo	De Prado y Menéndez, 1997
<i>Aster squamatus</i>	Sevilla	No cultivo	ALS insensible	Ruiz <i>et al.</i> , 2000
<i>Avena fatua</i>	Huesca	Trigo	ALS insensible	Taberner, 2001 ^a
<i>Avena ludoviciana</i>	Huesca	Trigo	ALS insensible	Taberner, 2001 ^a
<i>Conyza albida</i>	Sevilla	No cultivo	ALS insensible	Osuna <i>et al.</i> , 1999
<i>Lolium rigidum</i>	Córdoba	Cebada	Metabolismo	Alarcón, 1998
<i>Scirpus maritimus</i>	Badajoz	Arroz	ALS insensible	Sattin <i>et al.</i> , 1999

El patrón de resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de ALS, presente en algunos casos, apoya la hipótesis de que las diferentes familias de estos herbicidas se unen a diferentes sitios en la molécula de ALS (Saxena y King, 1990; Eberlein *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1998).

Existen pocos casos de inhibidores de la ALS en los que la absorción y/o translocación del herbicida al sitio de acción contribuya a la resistencia a los herbicidas (Saari *et al.*, 1994). Un ejemplo es la selectividad del triasulfuron en cultivos de trigo (resistente) y *Lolium perenne* (sensible). Hay pequeñas diferencias en el porcentaje de ¹⁴C-triasulfuron (aplicado foliarmente) absorbido y translocado en ambas especies. Sin embargo, si existen diferencias cuando el herbicida es aplicado vía radicular. Esto sugiere que la reducción en la absorción y translocación juega un papel importante en la resistencia del trigo en los tratamientos de pre-emergencia con triasulfuron, pero es más importante la rápida inactivación metabólica que ocurre en el trigo tanto en tratamientos de pre-emergencia como de post-emergencia (Meyer y Muller, 1989; Frear *et al.*, 1991).

En la mayoría de los casos, la resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS es debida a una mutación en el sitio de acción, aunque existen algunos casos en los que el mecanismo responsable es una detoxificación rápida del herbicida (Saari *et al.*, 1994; De Prado y Menéndez, 1997; Devine y Eberlein, 1997; Alarcón, 1998).

1.7.3.1. Bases moleculares de la resistencia a herbicidas inhibidores de ALS

En la actualidad se conocen varias enzimas que son el sitio de acción de diferentes herbicidas como, por ejemplo, glutamina sintetasa, acetolactato sintasa (ALS), acetil CoA carboxilasa (ACCase), y enolpiruvato-sikimato fosfato sintasa (EPSPS). Se conoce más sobre estas enzimas que son sitio de acción de los herbicidas que de otras enzimas de las plantas. Los genes que codifican estas proteínas han sido los primeros genes secuenciados y usados en programas transgénicos.

El gen de la acetolactato sintasa tiene un tamaño aproximado de 2,1 kb y codifica una proteína que contiene entre 650 y 700 aminoácidos. Las mutaciones que confieren resistencia tienen lugar fundamentalmente en 5 dominios conservados (llamados A, B, C, D y E; Devine y Eberlein, 1997). Estos dominios están agrupados en 2 zonas en la molécula: una comprende de los aminoácidos 124 a 205 (usando la secuencia de *Arabidopsis* como patrón para la numeración de aminoácidos) y otra que va de los aminoácidos 574 a 653 (Figuras 1.10). A pesar de que los sitios aparecen alejados uno del otro, con una larga secuencia no conservada entre ellos, forman un dominio de unión para el herbicida que parece ser diferente del sitio catalítico. La Figura 1.10 muestra las mutaciones más comunes encontradas hasta el momento y las secuencias de aminoácidos conservados. Los aminoácidos subrayados corresponden a aquellos que sufren variaciones entre plantas sensibles y resistentes.

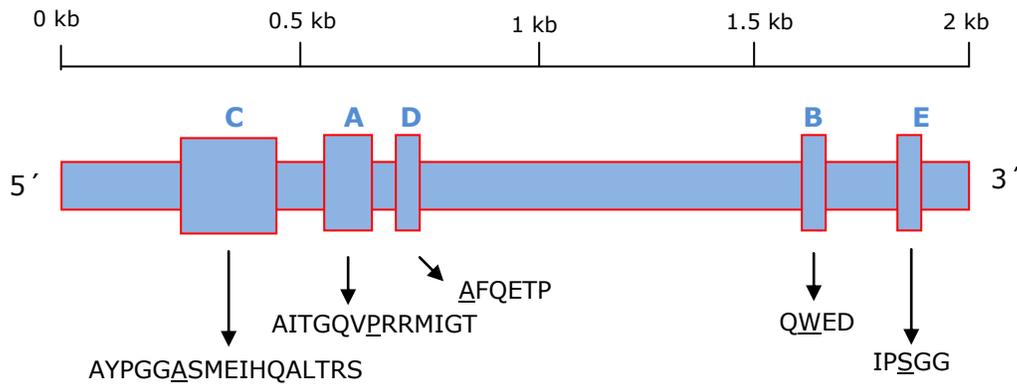


Figura 1.10. Estructura del gen ALS con los 5 dominios conservados.

En la resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS, en la mayoría de los casos estudiados esta resistencia es debida a una mutación dominante o semi-dominante en la subunidad catalítica del gen. Se han realizado múltiples mutaciones en laboratorio en *E. coli* y levadura, las cuales han servido como base para intentar explicar el sitio de unión del herbicida. A pesar del gran número de mutaciones encontradas en organismos unicelulares en laboratorio, solo existen 5 sitios que ocurren de forma natural en el campo (Tabla 1.8) y el resto han sido generados por mutagénesis de sitio directo en el laboratorio. Tres de estos cinco aminoácidos (Ala₁₂₂, Pro₁₉₇ y Ala₂₀₅) están localizados cerca del extremo amino terminal, y los otros dos (Trp₅₇₄ y Ser₆₅₃) están localizados cerca del extremo carboxi terminal (Figura 1.10).

Tabla 1.8. Principales mutaciones en los dominios conservados del gen ALS, conferidoras de resistencia a herbicidas sulfonilureas (SU) e imidazolinonas (IM). (Tranel y Wright, 2002).

Aminoácido ¹	Sustitución	Especie	Resistencia ²		Referencia
			SU	IM	
Ala 122	Thr	<i>Xanthium strumarium</i>	S	R	Bernasconi <i>et al.</i> , 1995
	Thr	<i>Amaranthus hybridus</i>	S	R	Milliman <i>et al.</i> , 2000
	Thr	<i>Solanum ptycanthum</i>	S	R	Riechers, com. Personal
Pro 197	His	<i>Lactuca serriola</i>	R	R	Guttieri <i>et al.</i> , 1992
	Thr	<i>Kochia scoparia</i>	R	S	Guttieri <i>et al.</i> , 1995
	Arg	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	Guttieri <i>et al.</i> , 1995
	Leu	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	Guttieri <i>et al.</i> , 1995
	Gln	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	Guttieri <i>et al.</i> , 1995
	Ser	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	Guttieri <i>et al.</i> , 1995
	Ala	<i>Kochia scoparia</i>	R	ND	Guttieri <i>et al.</i> , 1995
	Ala	<i>Brassica tournefortii</i>	R	S	Boutsalis <i>et al.</i> , 1999
	Ile	<i>Sisymbrium orientale</i>	R	R	Boutsalis <i>et al.</i> , 1999
	Leu	<i>Amaranthus retroflexus</i>	R	R	Sibony <i>et al.</i> , 2001
	Ala 205	Val	<i>Xanthium strumarium</i>	R	R
Trp 574	Leu	<i>Xanthium strumarium</i>	R	R	Bernasconi <i>et al.</i> , 1995
	Leu	<i>Amaranthus rudis</i>	R	R	Woodworth <i>et al.</i> , 1997
	Leu	<i>Amaranthus hybridus</i>	R	R	Schmenk <i>et al.</i> , 1997
	Leu	<i>Kochia scoparia</i>	R	R	Foes <i>et al.</i> , 1999
	Leu	<i>Sisymbrium orientale</i>	R	R	Boutsalis <i>et al.</i> , 1999
	Leu	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	R	R	Patzoldt <i>et al.</i> , 2001
	Leu	<i>Ambrosia trifida</i>	R	R	Patzoldt y Tranel, 2002
	Ser 653	Thr	<i>Amaranthus powelli</i>	S	R
Thr	<i>Amaranthus retroflexus</i>	S	R	McNaughton <i>et al.</i> , 2001	
	Asn	<i>Amaranthus rudis</i>	S	R	Patzoldt y Tranel, 2001
		<i>Amaranthus rudis</i>	S	R	Patzoldt y Tranel, 2001
Gly654	Asp	<i>Setaria viridis</i>	r	R	Laplante <i>et al.</i> , 2009

¹Numeración de aminoácidos de acuerdo con la de *A. thaliana*; ²S, r y R resistencia baja o no resistencia (sensible), resistencia moderada (menor 10 veces respecto al S) y alta resistencia (mayor de 10).

Las mutaciones que causan resistencia a las diferentes familias de herbicidas inhibidores de la ALS, varían dependiendo de la sustitución, lo cual sugiere que, la unión de las sulfonilureas y de las imidazolinonas se producen en diferentes zonas en la ALS. La interacción de Trp₅₉₁ es mayoritariamente hidrofóbica con los anillos aromáticos de los herbicidas. Al sustituir Trp por Leu, se elimina esta interacción hidrofóbica dando como resultado, resistencia cruzada entre sulfonilureas e imidazolinonas. Sustituciones en Ala₁₂₂ dan lugar a resistencias solo a imidazolinonas (Bernasconi *et al.*, 1995). Así, este aminoácido debe estar situado próximo al lugar de unión de las imidazolinonas.

Las sustituciones a nivel de Pro₁₉₇ dan lugar, normalmente, a una alta resistencia a sulfonilureas con poca o ninguna resistencia a imidazolinonas (Saari, 1992). Sin embargo, algunas mutaciones, también dan lugar a resistencia a imidazolinonas (Boutsalis *et al.*, 1999). Las sustituciones en Pro₁₉₇ podrían cambiar la estructura terciaria de la proteína ALS y podría quitar del lugar un aminoácido esencial para la unión de las sulfonilureas. Dependiendo de la sustitución que se produzca a nivel de Pro₁₉₇ y la interferencia con la unión a imidazolinonas podría ocurrir también.

Como se mencionó anteriormente la resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS está controlada por un solo gen, codificado en el núcleo y que se puede heredar en forma dominante o semidominante (Devine *et al.*, 1993; Boutsalis *et al.*, 1999; Tranel y Wright, 2002). Aunque la ALS es funcionalmente activa en los cloroplastos, debido a que es regulada nuclearmente, el carácter de resistencia se transmite tanto por semilla como por el polen, heredándose según las leyes de Mendel, hasta en forma heterocigótica. La variabilidad natural de la ALS en especies de malas hierbas influye en la probabilidad de encontrar una mutación de esta enzima con el carácter resistente. Mientras mayor sea la variabilidad, existirá mayor posibilidad de ocurrencia de ALS resistente. La heredabilidad de este carácter y la variabilidad del gen ALS, explica la alta frecuencia con que ocurre la resistencia de malas hierbas a herbicidas inhibidores de la ALS (Tranel y Wright, 2002). Las plantas heterocigóticas muestran a menudo síntomas cuando son tratadas con inhibidores de la ALS, pero no llegan a morir (Mallory-Smith *et al.*, 1990).

1.7.3.2. Principales familias herbicidas inhibidoras de la ALS

1.7.3.2.1. Sulfonilureas

Las sulfonilureas es la primera familia de herbicidas inhibidores de la ALS, descubierta por DuPont, en 1975 (Levitt, 1978). Clorsulfurón metil fue el primer herbicida comercialmente disponible para el control de malezas de hojas anchas en

cereales, como el cultivo de trigo. Es la primera familia herbicida con muy alta actividad específica a bajas dosis agrícolas (gramos/ha.) de ingrediente activo, baja toxicidad en mamíferos, amplio espectro de control de especies malas hierbas y altamente selectivos en varias especies cultivadas de importancia alimenticia (trigo, arroz, avena, cebada, soja, maíz, etc.). Se aplican vía foliar para el control pre-emergente postemergente de malas hierbas de hojas anchas anuales y perennes, gramíneas y ciperáceas (Beyer *et al.*, 1988).

Muchos herbicidas miembros de esta familia tienen diferente estructura química y grados de selectividad muy diferentes en las plantas. Las sulfonilureas tienen la estructura química $R_1(-R_3)-SO_2-NH-C=O-NH-R_2$, en la que la sustitución orto (R_3) en el anillo es clave para producir cambios importantes de selectividad en la planta cuando se asperjan con diferentes sulfonilureas que presentan estas sustituciones estructurales.

La mayoría de las sulfonilureas son rápidamente absorbidas por las hojas y las raíces. Comúnmente, el patrón de distribución de los herbicidas del grupo sulfonilureas ocurre tanto por vía apoplástica como simplástica. El sitio de absorción es crítico en el patrón de movimiento y distribución en la planta. La absorción radicular influye en el patrón de translocación y los síntomas del daño observado, diferente a cuando el sitio de absorción es vía foliar. Una vez absorbido, el herbicida rápidamente se transloca a las aéreas de crecimiento activo (zonas meristemáticas y ápices), donde ejerce su efecto inhibitorio en plantas sensibles.

Estos herbicidas se unen en algún de la enzima acetolactato sintasa (ALS) de plantas muy sensibles, inhibiendo la ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina, generando una deficiencia de proteínas, que causa la muerte de la planta por inanición, reforzado por los efectos secundarios desencadenados (producción de 2-ketobutirato, alteración del transporte de fotosintatos y interrupción de la síntesis de proteínas indispensables en el crecimiento de la planta. Existen otras familias inhibitorias de la ALS, como las triazolo-primidinas, pirimidinil-tiobenzoatos y sulfonil-aminocarbonil-triazolinonas e

imidazolinonas, que a excepción de esta última son relativamente nuevas en el mercado. Ambas, poco después de la aplicación cesan el crecimiento en las especies susceptibles, debido a que la falta de proteínas por la carencia de aminoácidos interrumpe la división y elongación celular.

La base de la selectividad de los herbicidas sulfonilureas entre especies de plantas surge de alteraciones en el metabolismo y en el sitio de unión del herbicida, que confieren resistencia en las plantas. Las especies de plantas tienen diferentes mecanismos de detoxificación metabólica, en correspondencia con los diferentes miembros de esta familia de herbicidas.

1.7.3.2.2. Imidazolinonas

La estructura básica de las imidazolinonas consiste en un anillo aromático, un ácido carboxílico o un carboxiester y un anillo orto-imidazolinona contiguo (Figura 1.11).

Las propiedades físicas, químicas y estructurales de algunas imidazolinonas se resumen a continuación:

- La solubilidad en agua y la presión de vapor de los ácidos carboxílicos de las imidazolinonas son bajas.
- Las imidazolinonas son débilmente absorbidas en suelos alcalinos, pero la adsorción se incrementa con la acidez de los suelos y con el aumento del contenido en arcilla y materia orgánica. La sorción de las imidazolinonas es reversible. La actividad microbiana es el principal medio de degradación de las imidazolinonas en el suelo. La actividad herbicida de las imidazolinonas es muy grande a temperaturas muy frías porque los herbicidas son muy rápidamente desactivados vía metabólica a temperaturas muy cálidas.

Los herbicidas de esta familia controlan las plantas muy lentamente por inhibición de la acetolactato sintasa o acetohidroxiácido sintasa, la cual es la primera enzima de retroalimentación (Mifflin, 1971), común en la biosíntesis de aminoácidos esenciales de cadena ramificada como valina, leucina e isoleucina (Anderson y Hibberd, 1985; Shaner *et al.*, 1984).

Los niveles disminuidos de valina, leucina e isoleucina causan una interrupción de la síntesis de proteínas, llevando a una interferencia en la síntesis del ADN e impidiendo el desarrollo de la célula. El crecimiento de la región meristemática se detiene a las pocas horas de la aplicación. Los síntomas fitotóxicos usualmente aparecen una o dos semanas después del tratamiento, en forma de clorosis en las regiones meristemáticas, seguida por una necrosis foliar desarrollada lentamente.

Las reacciones metabólicas de imidazolinonas en plantas, siguen trayectorias comunes que incluyen ciclación, hidrólisis, reducción, hidroxilación alifática, y conjugación de carbohidratos. Los compuestos presentes en este grupo poseen diferentes estructuras de anillos como por ejemplo, anillo de piridina sustituida con grupo alquílico en imazetapir e imazapic, anillo de piridina en imazapir, anillo de benceno sustituido con grupo alquílico en imazametabenz-metil y el anillo de quinoleína en imazaquín, siendo el imazametabenz el único compuesto que contiene un éster carboximetil, mientras que los otros contienen un ácido carboxílico libre.

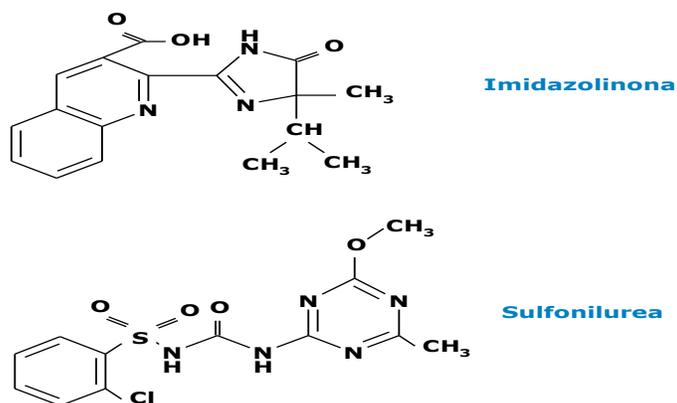


Figura 1.11. Estructura química de las sulfonilureas e imidazolinonas.

El tribenuron metil es la sulfonilureas mas aplicada en diferentes cultivos en el suroeste español, donde hace aproximadamente quince años es utilizado para control de la especie mala hierba *Sinapis alba* L. Tiene actividad sistémica, se absorbe principalmente por hojas, y en menor proporción por las raíces. Es translocado con rapidez vía floema y xilema, hasta alcanzar los puntos de desarrollo de la planta, impidiendo la división celular. Las aplicaciones son dirigidas al follaje en postemergencia precoz, y es eficaz en el control de dicotiledóneas anuales. Tribenuron es selectivo en varios cultivos, tales como avena, cebada, centeno, trigo, triticale y olivo, a dosis de g/ha del producto comercial. En olivo, se debe aplicar en los pasillos o ruedos del cultivo.

En trigo y en cebada, la selectividad esta basada en la metabolización hasta productos no tóxicos, cuando se aplican dosis normales o no excesivas. Las dosis de aplicación varían de 10 a 37.5 g/ha, según el formulado comercial y la facilidad de control de la especie mala hierba.

Las especies contra las que el tribenuron es efectivo son: *Anagallis arvensis*, *Artemisa montana*, *Caléndula arvensis*, *Capsella bursa-pastoris*, *Polygonum aviculare*, *Fallopia convolvulus*, *Lamium purpureum*, *Moricardia arvensis*, *Rumex*

obtusifolius, *Viola arvensis*, *anthemis arvensis*, *Chrysanthemum segetum*, *Fumaria officinalis*, *Gallium aparine*, *Polygonum aviculare* y *Sinapis* spp.

1.7.4. Estudios de la superficie foliar.

Para una mejor comprensión del proceso de absorción de los herbicidas y su relación con la resistencia a herbicidas, es necesario examinar el papel que desempeñan en dicho proceso algunas características morfológicas de la cara adaxial foliar, como la naturaleza física de la superficie de las ceras epicuticulares, densidad de estomas, densidad de tricomas y espesor de la cutícula de las hojas.

La superficie de las hojas está cubierta por una capa delgada llamada cutícula, compuesta por lípidos y funciona como una barrera protectora de las células de la epidermis, evitando la pérdida de agua, e impidiendo la entrada de patógeno y agentes contaminantes. Sobre la cutícula se depositan ciertas ceras conocidas como ceras epicuticulares, que dificultan o previenen el contacto de las gotas del pulverizado y la cutícula. La cutícula está presente aun en las células guardas y en las células de la cavidad estomática; su grosor varía con la especie, las condiciones ambientales donde crece la planta y la edad de la hoja (Kogan y Pérez, 2003).

Las características de la superficie y la anatomía foliar pueden afectar la eficacia de los herbicidas por la influencia en la adherencia, retención y absorción en diversas especies de malezas (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991; Devine *et al.*, 1993; Kogan y Pérez, 2003; Huangfu *et al.* 2009). Se ha observado que poblaciones silvestres resistentes a herbicidas, por lo general, tuvieron mayor grosor de hojas, grosor de cutícula y densidad de tricomas en la epidermis de la superficie adaxial, pero menor espesor de tejido esponjoso y números de ases vasculares, respecto a poblaciones sensibles. Estas diferencias morfológicas entre los biotipos producen una respuesta diferencial en la eficacia del glifosato (Huangfu *et al.* 2009).

La cutícula está compuesta desde afuera hacia adentro por ceras epicuticulares hidrofóbicas, ceras sub-superficiales hidrofóbicas embebidas en la matriz de cutina y la cutina semilipoidal, que tiene propiedades lipofílicas e hidrofílicas. Entre la cutícula y la pared de las células epidérmicas se encuentra una capa de pectina, que es de carácter hidrofílico (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991; Kogan y Pérez, 2003). Un mayor grosor de la cutícula está relacionado con una mayor resistencia a la penetración de los herbicidas (Kogan y Pérez, 2003), así como de otras sustancias. La capa de ceras epicuticulares condiciona en gran medida la absorción de compuestos que se depositan en la superficie foliar. Debido a su característica principal, la cristalinidad, las ceras son fuertemente hidrofóbica, y funcionan como barreras moleculares en la superficie vegetal (Heredia *et al.*, 1998).

El hecho de que las ceras cuticulares constituyan la principal barrera limitante a la difusión de solutos a través de la cutícula, se debe principalmente a su estructura molecular y composición química. Por tanto, las características químicas de la capa mas externa de la cutícula (las ceras epicuticulares) son de mayor importancia que la cantidad de ella (espesor de la cutícula) en la retención y absorción de sustancias, como los herbicidas. En general, superficies foliares lisas y carentes de ceras epicuticulares cristalinas, por ejemplo *Amaranthus retroflexus*, son fáciles de mojar. Sin embargo, especies con superficies foliares cubiertas por ceras epicuticulares cristalinas, como es el caso de *Chenopodium álbum* y varias especies gramíneas, son difíciles de mojar. No obstante, hay casos en que una mayor cantidad de ceras produce mayor tolerancia o resistencia al herbicida. Se ha demostrado que una mayor cantidad de ceras causa mayor tolerancia al 2,4-D en *Cirsium arvense* (Kogan y Pérez, 2003). De acuerdo con el modelo propuesto por Riederer y Schreiber (1995) las ceras cuticulares están organizadas en tres zonas estructurales que presentan distinta composición y grado de ordenación. Atendiendo a las propiedades de transporte la fracción más importante de ceras es la cristalina (zona A), que puede observarse mediante microscopia de luz polarizada y la difracción de rayos X. Esta fracción cristalina se halla dispuesta en

el seno de las ceras. La longitud de las cadenas alifáticas de esta zona no es homogénea por lo que algunas de estas cadenas sobresalen por los extremos del cristal. Así se origina una zona sólida amorfa (zona B), localizada entre dos láminas adyacentes de la zona cristalina (A).

Se ha demostrado teórica y experimentalmente, que la permeabilidad de la barrera es proporcional a la cantidad, extensión lateral y grosor de las láminas cristalinas. La fracción amorfa de las ceras es considerada homogénea en relación a sus propiedades de transporte (Riederer y Schreiber, 1995). Las ceras epicuticulares son importante en la retención y distribución de los productos químicos aplicados sobre la superficie foliar (Holloway, 1970). Debido a que la cutícula se encuentra en continuo contacto con productos tóxicos presentes en la atmosfera (la mayoría de origen antropogénico), se puede producir una interacción entre ambos que conduzca a la degradación de la cutícula afectándose así seriamente su función de barrera protectora (Heredia *et al.*, 1998).

Además, la fase lipídica de la membrana cuticular actúa como sumidero de microcontaminantes de naturaleza orgánica que se acumulan, fundamentalmente, en las ceras epicuticulares. Si en el interior de estas se producen determinadas reacciones (por ejemplo, entre los óxidos de nitrógeno y las ceras), se originará una pérdida notable de su cristalinidad, lo que estará facilitando la penetración de otros compuestos. Otros factores que pueden afectar a dicha entrada, tales como factores físicos (temperatura, humedad relativa, etc.), el estadio en que se encuentre la planta (en algunas etapas de su desarrollo las plantas pueden ser más susceptibles a la entrada de compuestos).

Los tricomas son estructuras diminutas altamente especializadas que se pueden encontrar a lo largo de cualquier superficie vegetal, principalmente en tallos y hojas. Varias especies pueden presentar enormes diferencias en el tipo de tricoma sobre la superficie foliar. La facilidad de una hoja de ser mojada puede estar asociada al tamaño, tipo y densidad de tricomas; aunque el desarrollo cuticular en

los tricomas, frecuentemente es diferente respecto a la células epidérmicas normales en la hoja. Hay evidencias de entrada preferencial de herbicidas por el perímetro de los tricomas ubicados sobre las venas (Kogan y Pérez, 2003). Los rasgos o características de la hoja que favorecen el contacto entre las gotas de la aspersión herbicida y la superficie refuerzan o aumentan la retención del herbicida. La retención, usualmente, es mayor en superficies irregulares de las hojas que sobre superficies lisas, y mayor sobre superficies cubiertas de pelos o tricomas (Spillman, 1984). En situaciones particulares, la retención diferencial de la aspersión herbicida puede contribuir a la selectividad entre diferentes especies (Sharma *et al.*, 1978; Harper y Appleby, 1984).

En relación a los estomas, estos son de vital importancia en las actividades de intercambio gaseoso de las plantas, por tanto, influyen enormemente las funciones fisiológicas. Normalmente, se encuentran en mayor cantidad en la superficie abaxial de la hoja, pero su densidad es variable y depende de la especie. Se considera que no son de vital importancia en la absorción foliar de los herbicidas, ya que especies como *Cyperus* spp. y *Gallium aparine* no poseen estomas en la cara adaxial de la hoja, que es donde ocurre la mayor deposición del pulverizado y donde ocurrirá la absorción foliar. A pesar de ello, se ha demostrado que los herbicidas son absorbidos con menor dificultad a través de las células de guarda de la cavidad estomática, debido a las interacciones con el exterior que influye en la apertura y cierre estomático, especialmente déficit hídrico, estrés de temperaturas y humedad relativa, tanto dentro como fuera de la cavidad estomática (Kogan y Pérez, 2003).

La retención y el ángulo de contacto de las gotas del pulverizado de un herbicida son otros de los factores que pueden incidir en la absorción herbicida. El ángulo de contacto de las gotas del pulverizado está influenciado por la inclinación de la hoja, la pilosidad y la presencia de ceras epicuticulares en la superficie foliar. Se ha establecido la existencia de diferencias en el ángulo de contacto de las gotas en la superficie foliar de especies con biotipos sensibles y resistentes a herbicidas

(González *et al.*, 2010; y Michitte *et al.*, 2007). Esta diferencia se expresa en la cantidad de herbicida que la planta retiene e influye en la absorción del herbicida en la planta; por lo que en ciertos casos, puede ser un factor influyente en la expresión de resistencia o sensibilidad a un herbicida (Kogan y Pérez, 2003; García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991).

Es conocido, que la morfología y pilosidad de la superficie foliar varía con las especies. Determinadas estructuras morfológicas, por ejemplo, superficies muy rugosas y pilosas, favorecen la retención del herbicida aplicado en gotas de tamaño muy pequeño. La mayor o menor pilosidad, por si misma, no es indicativa de baja retención; normalmente, los pelos rígidos y lipofílicos retienen menos herbicida (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991). Ciertos compuestos lipofílicos, como algunos herbicidas, son transportados más fácilmente dentro de una cutícula cubierta con una capa densa de ceras que en cutícula cubierta con pequeñas cantidades de cera (Baker *et al.* 1992).

En determinadas especies vegetales cultivadas, como en cultivares de *Lycopersicon sculentus*, la variada tolerancia al herbicida acifluorfen depende de la densidad estomática y de la pilosidad. Sin embargo, la composición de las ceras epicuticulares no influye en la sensibilidad (Ricotta and Masiunas 1992). Bukoyac (1976), considera que los estomas y los pelos desempeñan una función menos importante debido a que las materias activas se absorben básicamente en forma directa a través de la cutícula.

En lo que concierne a la fotosíntesis, es necesario considerar que el piruvato es uno de los productos de la fotosíntesis precursor común de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina. La acetolactato sintasa (ALS) cataliza la primera etapa de las reacciones en esta ruta biosintética, condensando dos moléculas de piruvato para formar CO_2 y 2-acetolactato, que es el precursor de valina y leucina. También puede desarrollar la misma reacción con piruvato y 2-ketobutirato para producir CO_2 y 2-acetohidroxibutirato, un precursor de isoleucina.

Estos aminoácidos son péptidos importantes en la formación de proteínas esenciales en la vida de la planta (Devine *et al.* 1993).

La reacción catalizada por la ALS incluye la descarboxilación irreversible del piruvato y la condensación del acetaldehído con una segunda molécula de piruvato para dar 2-acetolactato, o con una molécula de 2-cetobutirato para dar 2-acetohidrobutirato. La inhibición de la ALS tiene efectos primarios y secundarios, que culminan con la muerte de la planta sensible por inanición, debida a la carencia de estos aminoácidos y la deficiencia de proteínas esenciales en el crecimiento y desarrollo (Tranel y Wright, 2002).

Las plantas responden armónicamente a los estímulos del entorno con expresiones de sensibilidad o tolerancia, que directa o indirectamente influyen o no en el proceso de producción de energía primaria para la continuidad de la vida vegetal. Aunque el mecanismo principal de acción de un herbicida particular no sea la inhibición de la fotosíntesis, este proceso indirectamente es afectado, disminuyendo la producción de bio-nutrientes y energía que termina en la carencia nutricional y posible muerte de la planta.

Los herbicidas inhibidores de la ALS interrumpen el metabolismo del piruvato y los sustratos utilizados por esta enzima para la síntesis proteica, por lo cual hay un balance energético precario en la planta que termina en su muerte, que pudiera evitarse si la fotosíntesis no resultara afectada. Además, la reducción de la actividad fotosintética implica una inhibición o disminución en la síntesis de clorofilas en la planta.

Las clorofilas son los principales pigmentos cloroplásticos responsables de la captación de la radiación solar que durante el proceso de fotosíntesis es convertida en energía química en forma de ATP y NADPH (Marenco y Lopes, 2005). La determinación de los valores de clorofila de la hoja es importante porque la

actividad fotosintética de la planta depende en parte de la capacidad de la hoja para absorber la luz.

1.8. Detección de resistencia a herbicidas

Desde el punto de vista del reconocimiento y de la detección de biotipos resistentes a herbicidas, la resistencia puede definirse como la capacidad evolucionada que tiene una población de maleza que era susceptible a un herbicida para resistir la dosis agrícola de ese herbicida y completar su ciclo de vida (Heap,, 2010). Para la confirmación del carácter resistente en poblaciones de malas hierbas es necesario desarrollar un proceso con suficiente rigor científico, que empieza por verificar si las fallas en el control son atribuibles a causas distintas a las que determinan la aparición de la resistencia. Si después de inspeccionar distintos lotes y reunir suficiente información sobre las condiciones en que se usa el herbicida se mantiene la sospecha de resistencia, se procede a la recolección de muestras (prospección) de semillas de la maleza considerada problema en diferentes condiciones y cultivo dentro de la zona en la que se han denunciado las fallas en el control con un herbicida particular. Los criterios de la prospección y técnicas experimentales para confirmar la resistencia sospecha se exponen sucintamente a continuación:

1.8.1. Prospección

La prospección consiste en cosechar semillas de malas hierbas que han escapado al control con determinado herbicida en condiciones de campo, con la finalidad de estudiar en condiciones controlables (invernadero y laboratorio) la respuesta de las referidas malas hierbas a la aplicación de la dosis agrícola recomendada del herbicida al cual han escapado. La presencia de malas hierbas sospechosas de tener resistencia se convierte en motivo de preocupación entre científicos, técnicos y agricultores, debido a su impacto para los obtentores o

distribuidores del herbicida; así como en la sostenibilidad del manejo de malezas y del agroecosistema en cuestión.

La prospección es aconsejable cuando los herbicidas han fallado en la eficacia por más de una campaña. En ciertas ocasiones cuando se realiza la prospección en campos durante el primer año, al estudiarlos en laboratorio y hacer las pruebas preliminares correspondientes, puede resultar que los individuos sean sensibles y las causas de tal efecto sean consecuencia de una mala aplicación, época inadecuada de aplicación del herbicida, uso de dosis subletales, y mala calidad del agua de aplicación.

Es importante realizar una rigurosa observación en campo para evaluar y verificar la eficacia de los herbicidas. Esta es la forma más adecuada para detectar la resistencia en campo. La ineficacia de un herbicida en el control de malas hierbas específicas puede ser atribuida a algunos factores de los enumerados a continuación:

- Aplicación del herbicida (dosis inapropiadas o momento inoportuno; mala aspersión, calidad del agua, etc.).
- Condiciones del suelo (humedad, adsorción).
- Condiciones climáticas (pluviometría; temperatura, humedad relativa).
- Factor de malas hierbas (tamaño, germinación sucesiva, niveles altos de infestación).

Otro aspecto importante en la prospección de malas hierbas sospechosas de resistencia, es la recolección de las semillas. La confiabilidad de los datos de ensayos con platas completas depende de la calidad del muestreo para la cosecha de semilla. Semillas de baja calidad tienen bajo porcentaje de germinación o las plántulas pueden tener poco vigor, respondiendo en forma variable a la aplicación del herbicida. Las principales recomendaciones al realizar la prospección son:

- Recolectar las semillas cuando la mayoría están maduras. La recolección muy temprana o demasiado tardía podría causar que las muestras tengan baja viabilidad.
- Recoger las semillas maduras cuidadosamente, frotando la inflorescencia sobre una bolsa o bandeja. Las semillas de malas hierbas de alto porte, como la avena loca, son fácilmente recogidas sosteniendo inflorescencias dentro de una bandeja grande y sacudiendo enérgicamente. La técnica de recolección, generalmente, depende de la especie invasiva.
- Recolectar en un área de al menos 100 m de longitud por 50 m de ancho, en donde se haya observado el problema, a no ser que la tolerancia/resistencia sea limitada a una o varias áreas pequeñas aisladas dentro de una finca, por ejemplo cercano a la zona de riego (goteros).
- Evitar áreas que no hayan sido tratadas (solo biotipo sospechoso). La muestra tiene que ser representativa del campo donde se haya observado el problema o el área donde se sospecha.
- Recolectar semillas de muchos y variados individuos.
- Hacer un mapa georeferenciado, si es posible, del área cosechada.
- Cosechar semillas de áreas aledañas en donde nunca se hayan aplicado herbicidas, para que sirva de control sensible o testigo.

La calidad de las semillas es más importante que la cantidad. La cantidad dependerá del tamaño y facilidad de recolección; sin embargo, se deben muestras con un tamaño aproximado de 1000 semillas maduras (potencialmente viables). Beckie *et al.* (2000) sugiere:

- No cosechar semillas en condiciones muy húmedas. La cosecha es muy difícil y las semillas de algunas especies pueden presentar alta latencia, además el riesgo elevado de contaminación por microorganismos.
- Tener cuidado con el calentamiento rápido que ocurre con muestras recién colectadas, no almacenarlas en bolsas de polietileno. La mejor forma de guardar y almacenar las semillas es en sobres de papel para el transporte y

el almacenaje o en su defecto en pequeños sacos de tela, que permitan el intercambio gaseoso y la pérdida de humedad en las semillas.

- Etiquetar el sobre con el nombre de campo, finca y fecha de colecta, de ser posibles las coordenadas geográficas.
- Airear las semillas lo antes posible, tras su recolección con el fin de que pierdan la humedad. Cuando las muestras son pequeñas pueden ser secadas en los sobres, simplemente abriendo y dejándolos en un sitio aireado a temperatura ambiente, sacudiendo el sobre a diario. Muestras grandes lo mejor es secarlas en bandejas, en ambiente bien ventilado, pero no ventoso. En la mayoría de las especies, las semillas podrían secarse en una semana, aproximadamente.
- Es necesario limpiar las muestras para quitar semillas de mala calidad. La mejor técnica para limpiar muestras varía con la especie, se deben cribar para quitar los restos grandes o restos de planta, otra técnica es pasarlas por flujo de aire para quitar semillas de peso ligero.

Cuando las semillas están secas, se puede dar inicio a los ensayos en condiciones controlables (invernadero o laboratorio) para reafirmar o rechazar la resistencia en las muestras de las plantas sospechosas en campo.

1.8.2. Detección de resistencia (screening y dosis respuesta)

El material vegetal sospechoso colectado in situ se procesa en laboratorio, y una vez las semillas son viables se realiza el estudio de verificación de pérdida de eficacia del herbicida respecto a la maleza problema. Durante la conducción de esta prueba (Screening) las plantas de las muestras colectadas crecen en invernadero o en cámara de crecimiento hasta el estado de crecimiento en el que se hará el tratamiento con el herbicida. Al final del experimento se cuantifica el peso fresco y se expresa en porcentaje respecto al testigo. El propósito del Screening es determinar si hay diferencias en la respuesta de las muestras colectadas, comparándolas con un testigo no tratado, con lo cual se puede concluir

si las fallas del control denunciadas han ocurrido por la pérdida de eficacia del herbicida.

Existen otras pruebas rápidas para verificar la pérdida de eficacia herbicida sobre una especie maleza en particular, cuyo objetivo más importante es concluir de manera rápida, fiable y económica si estamos frente a un nuevo caso de resistencia a herbicida en una especie mala hierba particular. Las pruebas referentes a placas Petri, implican la germinación de semillas en agar o papel de filtro, adicionando dosis infinitesimales crecientes de herbicidas (Heap, 1994). El estudio de Screening es un trabajo de rutina e incluye gran número de poblaciones sensibles y resistentes (Heap, 1994). Diferentes métodos de prueba rápida para detección de resistencia han sido descritos por Moss *et al.*, (1999); Letouzé *et al.*, (1997) y Beckie *et al.*, (2000).

Otras pruebas de resistencia incluyen la germinación de semillas en macetas y la aplicación de herbicidas sobre las plantas. Estas pruebas proporcionan información acerca de la resistencia cruzada y múltiple. Asimismo, es posible estudiar cuáles podrían ser los herbicidas alternativos más apropiados para controlarlas. Otras pruebas que se basan en la germinación de polen en agar (Richter y Powles, 1993) o en el crecimiento de hijuelos en un medio herbicida (Letouzé *et al.*, 1997) han sido documentadas.

A nivel bioquímico, han sido documentadas pruebas rápidas, que investigan la actividad de varias enzimas claves como la acetolactato sintasa, inhibidas por sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil-tiobenzoatos y sulfonilaminocarbonil-triazolinonas (Singh *et al.*, 1988; Warwick *et al.*, 2005) o la enzima acetil coenzima A carboxilasa (ACCase) que es inhibida por los herbicidas ariloxifenoxipropanoatos, ciclohexanodionas y fenil pirazolinas (Raffel *et al.*, 2006; Porter *et al.*, 2005).

Otro método novedoso, se basa en las respuestas de las raíces a las sulfonilureas (inhibidores de la acetolactato sintasa), principalmente bensulfurón-metil (Hamamura *et al.*, 2003). Sin embargo, otros herbicidas con modos de acción diferentes, evidenciaron la incapacidad del método para distinguir los biotipos resistentes, al inhibirse el crecimiento de las raíces tanto para el biotipo sensible como el resistente. Además del inconveniente añadido del tiempo de espera, al menos 14 días, para poder evidenciar los síntomas. No obstante, tiene la ventaja de describir de manera muy precisa los factores de resistencia en biotipos resistentes a sulfonilureas (*Scirpus juncooides*, *Lindernia dubia*, etc.).

En los ensayos de respuesta a dosis, la dosis efectiva 50 (ED₅₀), definido como la dosis de herbicida capaz de reducir en un 50% el peso fresco de las plantas tratadas, es normalmente el mejor estimador posible de la sensibilidad de una planta a un herbicida y es útil para realizar comparaciones entre diferentes experimentos de dosis respuesta (Streibig y Kudsk, 1993).

1.9. Descripción general de *Sinapis alba* L.

Es la forma silvestre de la mostaza cultivada para fines culinarios y medicinales. Conocida científicamente con los sinónimos *Brassica hirta* Moench o *Brassica alba* (L.) Rabenh. Según el país donde prolifera, las principales denominaciones en español son Mostaza amarilla, mostaza blanca, jaramago, ajenabo y mostacilla pilosa. Mientras que en inglés es llamada white mustard, kedlock y charlock. Las categorías taxonómicas a la que pertenece son las siguientes:

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Dilleniidae

Orden: Capparales

Familia: Cruciferae o brassicaceae

Género: *Sinapis*

Especie: *Sinapis alba* L.

Esta especie tiene como centro de origen a Eurasia (Rollins, 1981), posiblemente el Mediterráneo. Y como centro de dispersión geográfica tiene las zonas altas de México y Centroamérica, Sudáfrica, norte de África y el oeste de Asia (Rollins, 1981). *S. alba* tiene frutos característicos muy pilosos, con ápices largos y la parte baja hirsuta, así como olor típico a mostaza, cuando se le estruja. Estas características morfológicas en el fruto permiten distinguirla de la especie hermana (*Sinapis arvensis*), cuyos frutos son de otra forma y glabros o sin pelos. Las características botánicas principales, según Muenscher (1955) son:

Hábito y forma de vida: Hierba anual, erecta, ramificada, hirsuta.

Tamaño: De 30 a 80 cm.

Tallo: Pubescente hispido, raramente glabro, pelos rígidos en toda la parte aérea.

Hojas: Hojas alternas; las inferiores son anchas, lobulado-pinnadas o pinnatífidas y pecioladas, con un lóbulo terminal grande. Las superiores son más pequeñas, de pecíolos cortos, pinnatipartidas, con lóbulo terminal más grande.

Inflorescencia: racimosa.

Flores: Color amarillo claro, cuatro sépalos divergentes, de 4 a 5 mm, cuatro pétalos de 8 a 10 mm de longitud (Figura 1.12).

Frutos y semillas: Fruto una silícula de 20 a 45 mm, generalmente hispido en su parte inferior, el pico ensiforme (en forma de espada) aplanado y frecuentemente tan largo como la parte fértil. Las valvas son trinervadas. Semilla 1.8 a 2.5 mm, color amarillo pardo (Figura 1.12).

Plántulas: Cotiledones conduplicados.

Raíz: Delgada y fusiforme.

Características especiales: Tiene un sabor y olor a mostaza al estrujarse.



Figura 1.12. Flores y frutos característicos de *Sinapis alba* L.

Esta especie se propaga por semilla, utilizando como medios principales de dispersión el viento, el agua, animales, el hombre y maquinarias agrícolas. Las semillas germinan en primavera y las plantas florecen en verano. Prefiere suelos ricos en nitrógeno; se puede encontrar en hábitats ruderales e invadiendo, colonizando y persistiendo en ecosistemas alterados por el hombre, comportándose como mala hierba. En el suroeste español se le encuentra como infestante en diversos cultivos, especialmente en lotes cultivados con trigo y cebada (Rosario *et al.* 2010b).

1.10. Objetivos

La aspersión de herbicidas en los ecosistemas agrícolas o en área de interés para el hombre, causa gran impacto sobre las especies de malas hierbas, las cuales han desarrollado adaptaciones que les permiten sobrevivir y persistir en los ambientes disturbados. La aplicación continua de herbicidas con el mismo mecanismo de acción durante varios años selecciona biotipos naturalmente resistentes dentro de ciertas especies, que terminan dominando la población después de algunas generaciones, por lo que el herbicida resulta ineficaz.

Tribenuron metil es un herbicida con amplio espectro de control de malas hierbas. El principal mecanismo de selectividad en especies tolerantes, como el trigo (*Triticum aestivum*), se debe a la capacidad de metabolizar rápidamente el herbicida antes de que alcance el sitio de acción (ALS). El fenómeno de resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS en malas hierbas fue descrita por primera vez en 1987 (Mallory-Smith *et al.*, 1990; Primiani *et al.*, 1990).

Sinapis alba, es una especie infestante muy invasiva en diversos cultivos alimenticios del suroeste de España, especialmente en fincas dedicadas a la producción de trigo, donde ha sido controlada por más de 15 años con aspersiones de herbicidas sulfonilureas, como el tribenuron metil, (Rosario *et al.* 2010a).

Durante 2007, las denuncias sobre las fallas del control de Jaramago (*S. alba*) después de las aspersiones con tribenuron metil (Granstar®) se incrementaron, con problemas registrados en diferentes cultivos del suroeste español (Málaga). Se hizo una inspección y se prospectaron semillas de *S. alba* en Ronda, Málaga, para verificar la falla de control, reportándose en 2008 el primer biotipo de *S. alba* resistente a tribenuron metil (Cruz-Hipólito *et al.*, 2008).

La resistencia de malas hierbas a herbicidas causa modificaciones en el sistema de cultivo, dificulta las prácticas culturales, afecta la sostenibilidad del manejo de malas hierbas, incrementa el costo de producción y reduce los ingresos

y la calidad de vida de los agricultores. Profundizar investigaciones sobre la resistencia del jaramago (*S. alba*) al herbicida tribenuron metil y a otros inhibidores de ALS, generaría información útil para prevenir el incremento y dispersión geográfica de este tipo de resistencia. Y hacer sostenible el manejo de *S. alba* y otras especies malas hierba; así como para contribuir a la sostenibilidad de la producción agrícola en esta región española.

1.10.1. Objetivos generales

Los objetivos generales planteados en el presente proyecto de investigación son:

1.10.1.1. Desarrollar estudios en condiciones controladas para el conocimiento de los posibles mecanismos de resistencia de *S. alba* al herbicida tribenuron metil.

1.10.1.2. Evaluar la eficacia de herbicidas alternativos para el control de *S. alba* resistente en condiciones de campo.

1.10.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos que soportan este proyecto se describen a continuación:

- Determinar el grado de sensibilidad de *Sinapis alba* L. al herbicida tribenuron metil, y establecer niveles y patrones de resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de la ALS, mediante:
 - Ensayo de respuesta de poblaciones (screening) de *S. alba* al tribenuron en invernadero

-
- Ensayos de dosis-respuesta al tribenuron metil y a otros herbicidas inhibidores de ALS en dos poblaciones de *S. alba*, en invernadero
 - Ensayos de inhibición de la actividad enzimática, para la determinación de niveles y patrones de resistencia a herbicidas inhibidores de ALS
 - Estudiar posibles mecanismos de resistencia al tribenuron metil en la mala hierba *S. alba*, para esclarecer la causa principal de la resistencia, mediante las siguientes actividades:
 - Ensayos de absorción y translocación
 - Ensayo de metabolismo
 - Secuenciación del gen ALS y detección de posibles mutaciones
 - Estudiar rasgos morfológicos en la superficie adaxial de biotipos resistente y sensible de *S. alba*, mediante las actividades enumeradas:
 - Cuantificación de la densidad de estomas
 - Determinación de la densidad de tricomas
 - Cuantificación del espesor de la cutícula
 - Estudio del ángulo de contacto y retención de las gotas de aspersión
 - Medir del efecto del tribenuron sobre la actividad fotosintética y la concentración de clorofila en biotipos resistente y sensible de *S. alba*.
 - Identificar herbicidas alternativos para el control de *S. alba* resistente a tribenuron metil, en condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Material vegetal

Para la realización de este estudio se prospectaron semillas de plantas de *S. alba*, que habían escapado al control con tribenuron metil en lotes cultivados de trigo (*Triticum aestivum*), haba (*Vicia faba*) y garbanzos (*Cicer arietinum*), localizados en Arriate, Málaga, durante 2008 (Fig. 2.1).

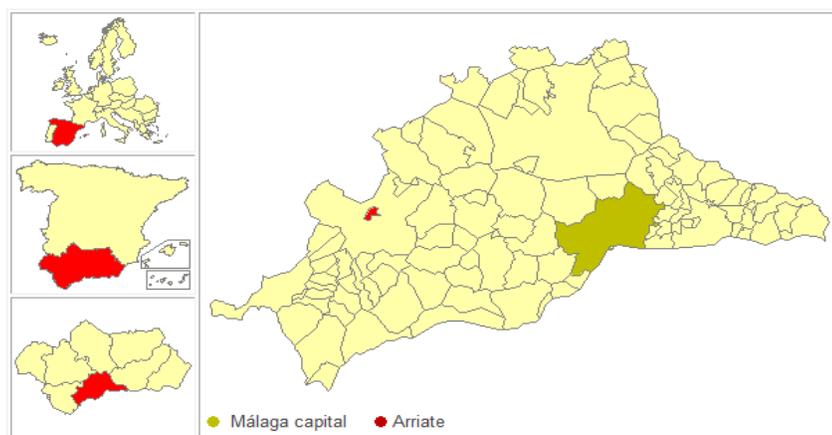


Fig. 2.1. Zona de prospección de poblaciones de *S. alba*.

Se tomaron muestras de semillas de *Sinapis* en 14 lotes con problemas de control, considerando las poblaciones obtenidas como sospechosas de ser resistentes a tribenuron. Semillas de *Sinapis* cosechadas a orilla de la carretera principal en dirección a Málaga, fueron consideradas como población sensible nunca tratada con este herbicida. También, fueron incluidas semillas cosechadas en invernadero a partir de una población reportada como resistente en 2008. Estas poblaciones fueron denominadas por su lugar de origen (Arriate, España) como AR₁ (población de *Sinapis* nunca tratada sensible a tribenuron metil) y las poblaciones colectadas en lotes denunciados con problemas de control, incluida la población reportada en 2008, fueron identificadas con códigos comprendido entre AR₂ y AR₁₆ (poblaciones no controladas y probablemente resistentes a la aplicación de tribenuron metil).

2.1.1. Condiciones de crecimiento

Las semillas fueron germinadas sobre papel filtro Watman 5 en cajas Petri de 9 centímetros de diámetro. En cada caja se depositaron 5 ml de agua destilada y 25 semillas de cada población de *S. alba* (Fig. 2.2).

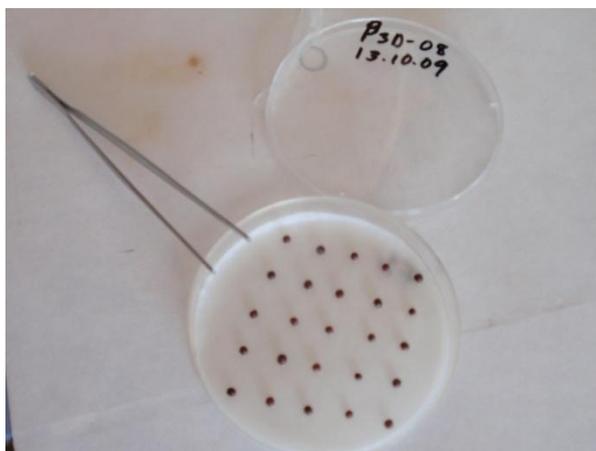


Fig. 2.2. Germinación de semillas de *S. alba*.

Las semillas fueron incubadas a 4°C en oscuridad durante 48 horas, luego se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Cuando comenzaron a germinar se trasplantaron a 0.5 cm de profundidad en macetas de 10 cm de diámetro completadas con sustrato de suelo, turba, vermiculita y arena en proporción 3:2:2:2 v/v. El sustrato se mezcló con un fertilizante de liberación lenta 26-13-00 a razón de 150 g por 75 litros del preparado. El riego fue realizado diariamente hasta dejar el sustrato a capacidad de campo. Las plantas crecieron en invernadero a 18/14 °C día/noche; 16 horas de fotoperíodo y 230 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz suplementada.

2.2. Herbicidas ensayados

Para los ensayos en invernadero con tratamientos herbicidas (Screening, dosis-respuesta a herbicidas, fotosíntesis y clorofila) se utilizaron productos formulados (Tabla 9). Para ensayos in-vitro a nivel enzimático fueron utilizados los

mismos herbicidas, pero con grado técnico (pureza superior al 95%). Los experimentos de absorción, translocación y metabolismo se desarrollaron con los correspondientes productos marcados radiactivamente.

Tanto en los estudios in-vivo de dosis-respuesta a herbicidas como in-vitro para estudio de la actividad de la ALS, fueron utilizados herbicidas pertenecientes a cinco familias de herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa: florasulam (triazolopirimidinas=TP); flucarbazone (sulfonilaminocarboniltriiazolinonas=SCT); tribenuron metil, mesosulfuron metil y iodosulfuron metil (sulfonilureas=SU); imazamox (imidazolinonas=IMI) y bispiribac sodio (pirimidiniltiobenzoatos= PTB) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Herbicidas ensayados en condiciones de invernadero y laboratorio.

Formulado	Herbicida	Sitio acción	(WSSA)	g. i.a./ha*
Granstar 75 WG	Tribenuron metil	ALS	SU	15.0
Autum 10 WG	Iodosulfuron metil-sodio	ALS	SU	30.0
Osprey 4,5 WDG	Mesosulfuron metil 4,5%	ALS	SU	14.8
Pulsar 40 SC	Imazamox 4% p/v. SL.	ALS	IMI	60.0
G.F. 25 WG	Florasulam 25% PV. SC	ALS	TP	140.6
Regent 40 EC	Bispiribac sodium 40%	ALS	PTB	10.0
Everest 70 WDG	Flucarbazone 70%	ALS	SCT	61.3

*Dosis agrícolas herbicidas recomendadas en gramos de ingrediente por hectárea

En los experimentos de campo los formulados utilizados fueron Granstar 50 SG (tribenuron metil 50%), Granstar Combi (tribenuron metil 50% + MCPP), Nikos (florasulam al 5%), Doble Sal (MCPA-sal amina + 2,4-D), MCPA (MCPA 40% sal amina) y Buctril EC (Octanoato 2,6-dibromo-4-cianofenilo). Granstar 50 SG, también fue aplicado en mezclas con MCPA y Buctril EC (Tabla 2.2).

En los diferentes experimentos llevados a cabo en este trabajo el tribenuron metil fue el herbicida principal de este estudio, por ser causa de denuncias de fallas de control y sospechas de resistencia. Para la determinación de ángulos de contacto y retención foliar de las gotas de la solución herbicida en biotipos resistente y sensible de *S. alba*, estudio de fotosíntesis y clorofila, así como para el

examen de otras características morfofisiológicas potencialmente asociadas al carácter de resistencia, se utilizó el herbicida Granstar 75 WG® (tribenuron metil 75%) (Tabla 2.1).

Tabla 2.2. Herbicidas aplicados sobre *S. alba L.*, en campo.

Formulado	Herbicida	WSSA	g. i.a. ha ⁻¹
Granstar 50 SG	Tribenuron metil	Sulfonilurea	18.75
Granstar Combi ²	MCPP +Tribenuron 50%	Auxínico +sulfonilurea	800.0 + 0.1
Nikos	Florasulam 5% P/V. SC	Triazolopirimidina	7.5
Doble Sal	MCPA-sal amina + 2,4-D	Auxínico	722.03
MCPA ²	MCPA-sal amina	Auxínico	450 g e.a.
Buctril ²	Octanoato 2,6-dibromo-4-cianofenilo	Inhibidor fotosíntesis en el fotosistema II	168.0-240.0

¹Dosis agrícolas herbicidas recomendadas en gramos de ingrediente activo por hectárea;

²Herbicidas aplicados en mezcla con tribenuron metil

2.2.1. Características de los herbicidas

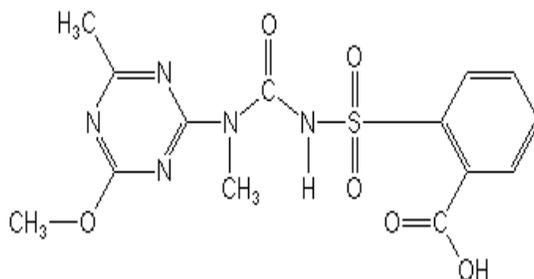
2.2.1.1. Sulfonilureas

2.2.1.1.1. Tribenuron metil

Tribenuron metil fue introducido en España en 1986. La forma activa es triazinilsulfonilurea, con estándar de calidad ISO 1750; es una sulfonilurea perteneciente a los inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS). Los herbicidas formulados, de grado técnico (<95% pureza) y marcado radiactivamente fueron suministrados por la empresa DuPont. Tribenuron es selectivo y sistémico, absorbido por las hojas y por las raíces, con rápida translocación vía floema y xilema hacia las regiones meristemáticas donde se acumula. Se aplica en postemergencia a dosis de 8.8-17.5 g i.a./ha en cultivos de trigo y cebada,

controlando malezas anuales de hojas anchas, entre ellas *Kochia scoparia*, *Lattuca serriola* y *Sinapis* spp.

Estructura del tribenuron metil:



Principales propiedades físicas y químicas:

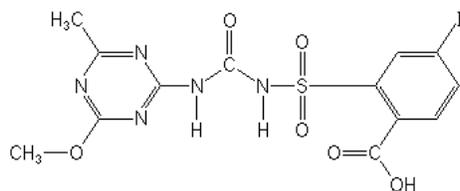
- Masa molecular: 395.39
- Estado físico: solido marrón claro
- pKa: 5.0
- Solubilidad: agua 48 mg/L pH 5.0 y 2040 mg/L a pH 7.0

Tribenuron detiene el crecimiento de plantas sensibles pocas horas después del tratamiento. Las áreas meristemáticas se hacen gradualmente cloróticas y necróticas, hasta que los síntomas se generalizan y la planta muere. En plantas tolerantes es rápidamente degradado mediante reacciones oxidativas catalizadas por las enzimas del citocromo P-450. El mecanismo de resistencia es un sitio de union herbicida alterado en la enzima ALS (Senseman, 2007).

2.2.1.1.2 Iodosulfuron

Iodosulfuron es un herbicida sulfonilurea inhibidor de la ALS, de aplicación en postemergencia para control de malezas de hojas anchas en cereales a 10 g i.a./ha. Es fabricado por Aventis, y el formulado viene en mezcla con mefenpir-dietil. Es absorbido por el follaje y las raíces, y la translocación ocurre por el floema. El mecanismo de resistencia es un sitio de acción alterado (ALS) (Senseman, 2007).

Estructura del iodosulfuron:



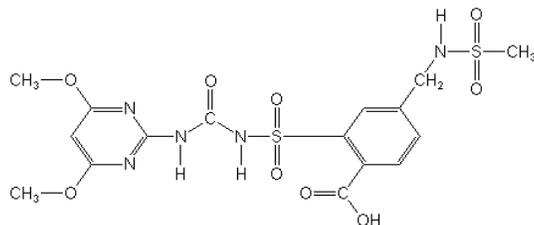
Algunas de las propiedades físicas y químicas del producto puro son:

- Masa molecular: 529.24
- Estado físico: color blanco ligero y polvo cristalino
- Densidad: 0.7 g mL
- pKa: 3.22

2.2.1.1.3. Mesosulfuron metil

Es activo como pirimidinilsulfonilurea, inhibiendo la ALS, con lo que se detiene el desarrollo y se produce la muerte de la planta. Es de aplicación en postemergencia en cereales, para control de malas hierbas gramíneas y hojas anchas. Algunas de las malas hierbas que controla en postemergencia temprana son *Alopecurus myosuroides*, *Avena fatua*, *Apera spica-venti*, *Avena sterilis*, *Bromus sp.*, *Lolium spp.*, *Amaranthus Anagallis arvensis*, *Sinapis arvensis* y *Stellaria media*, entre otras. En España, este herbicida es formulado con iodosulfuron metil y se utiliza en siembra de trigo (Senseman, 2007).

Estructura del mesosulfuron metil:



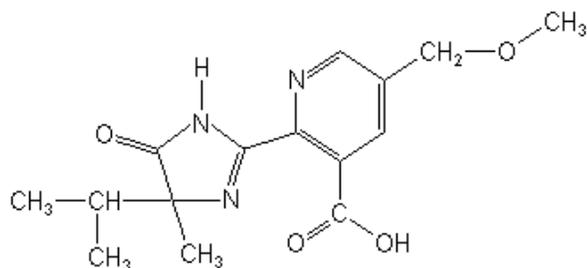
2.2.1.2. Imidazolinonas

2.2.1.2.1. Imazamox

Este herbicida es una imidazolinona, que inhibe la ALS. Se usa en aplicaciones de postemergencia en dosis de 35-45 g i.a./ha, para control de especies malezas gramíneas y de hojas anchas. El formulado Pulsar 40 SC (imazamox 4% p/v SL) y el imazamox de grado técnico (96.5% pureza) utilizados fueron suministrados por BASF.

Imazamox es rápidamente absorbido en el follaje, la absorción radicular es menor; translocándose por el xilema y por el floema. Detiene el crecimiento de plantas susceptibles pocas horas después del tratamiento, y los síntomas aparecen 1-2 semanas después, presentando aéreas meristemáticas cloróticas, seguida por desarrollo lento de clorosis y necrosis foliar general. La tolerancia en soja es debida al rápido metabolismo del herbicida en las plantas. Las malezas susceptibles lo metabolizan lentamente o incluso pueden no metabolizarlo (Senseman, 2007).

Estructura química del imazamox:



Algunas de las propiedades físicas y químicas del producto puro son:

- Peso molecular: 322.4 (ácido)
- Estado físico: sin olor, sólido (polvo)
- Densidad: 1.39 g/mL a 20°C
- pKa: 2.3, 3.3 y 10.8 (pH de 5-9)
- Solubilidad: muy soluble en agua

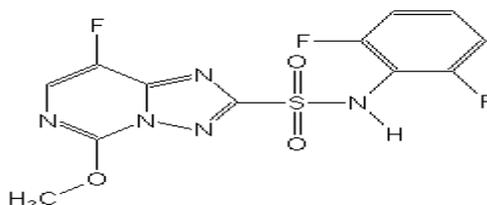
2.2.1.3. Triazolopirimidinas

2.2.1.3.1. Florasulam

Tiene actividad herbicida a dosis muy bajas en un rango de 2.5-7.5 g i.a. ha⁻¹. Se absorbe por las raíces y el follaje y se transloca por el xilema y el floema hacia los puntos de crecimiento. En postemergencia es selectivo y eficaz en cereales para control de malezas Compositae, Polygonaceae, Caryophyllaceae, Rubiaceae y Cruciferae. El formulado comercial de florasulam utilizado en laboratorio e invernadero fue G.F. 25 WG; en campo se aplicó Nikos. La aplicación es dirigida principalmente al follaje, aunque tiene actividad en el suelo, pero la residualidad es muy corta.

Los síntomas y efectos son similares a los demás inhibidores de ALS en plantas sensibles. En trigo la tolerancia se basa en la rápida metabolización del herbicida hasta formas de productos no tóxicos, en este cultivo el florasulam es metabolizado en tres horas. En Estados Unidos de Norteamérica, *Galepsis tetrahit*, *Galium spurium* y *Stellaria media* son malezas reportadas resistentes a florasulam. Estas especies se podrían manejar con mezclas de tanque (Senseman, 2007)

Estructura del florasulam:



Algunas de las propiedades físicas y químicas del florasulam puro son:

- Peso molecular: 359.3
- Estado físico: color blanco/amarillo y sólido
- Densidad relativa: 1.0318 g L⁻¹

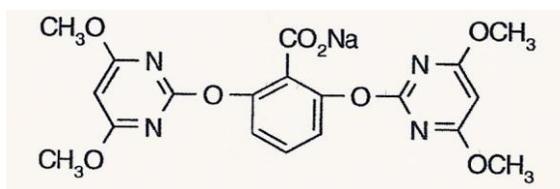
- pKa: 4.54
- Solubilidad: agua (6360 mg/L, pH 7.0) y 121 mg/L en agua destilada

2.2.1.4. Pirimidiniltiobenzoatos

2.2.1.4.1. Bispiribac-sodio

Es un herbicida pirimidiniltiobenzoato, inhibidor de la ALS. Es sistémico y selectivo; en post-emergencia es absorbido por el follaje y las raíces. Se utiliza contra malas hierbas de hoja ancha, gramíneas y ciperáceas en arroz, especialmente *Echinochloa* sp, a dosis de 15-45 g/ha (Senseman, 2007). El formulado comercial del bispiribac utilizado fue V10029 80 WP (80%) (Valentine U.S.A Corporation). El bispiribac técnico (95% pureza) utilizado fue proporcionado por la misma casa comercial.

Estructura del bispiribac-sodio:



Algunas de las propiedades físicas y químicas del producto puro son:

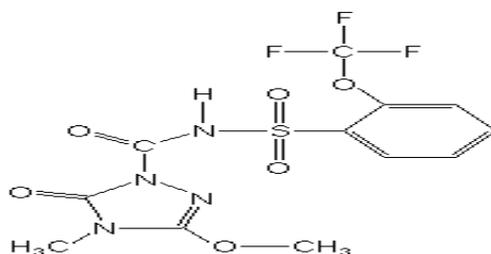
- Masa molecular: 452.4
- Estado físico: color blanco y sólido
- Densidad: 0.07037 g l⁻¹
- pKa: 3.05

2.2.1.5. Sulfonilaminocarboniltriazolinonas

2.2.1.5.1. Flucarbazone-sodio

Flucarbazone-sodio aplicado en postemergencia en cultivo de trigo controla malezas gramíneas y malezas de hojas anchas, como *Avena fatua* y *Setaria viridis*. La dosis agrícola recomendada es 30 g i.a. /ha. Es absorbido por el follaje y por las raíces. El herbicida se transloca acropetal y basipetalmente. Las malezas sensibles cesan de crecer y competir con el cultivo poco después de la aplicación. Los síntomas aparecerán 1-4 semanas después, dependiendo de las condiciones ambientales, causando descoloración y necrosis (Senseman, 2007).

Estructura del flucarbazone-sodio:



Principales propiedades físicas y químicas:

- Peso molecular: 418.3
- Estado físico: polvo cristalino
- Densidad relativa: 1.59 g/mL
- pKa: 1.9
- Solubilidad: 121.0 mg/L en agua destilada y 123.0 mg/L en acetona

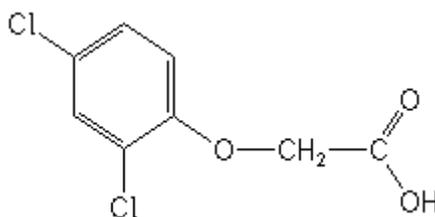
2.2.1.6. Otros herbicidas aplicados en campo

2.2.1.6.1. 2,4-D

Es un herbicida aplicado al follaje como postemergente en rango de dosis 0.56-2,24 kg a.e./ha para control de malezas de hojas anchas en cereales, como trigo, cebada, avena, sorgo y maíz. Es sistémico y se transporta primariamente vía el simplasto (floema, plasmalema), acumulándose principalmente en los puntos de crecimiento de los tallos y raíces.

Es un herbicida auxínico, cuya acción primaria parece implicar la plasticidad de la pared celular y el metabolismo de ácidos nucleicos. Se cree que el 2,4-D acidifica la pared celular al estimular la actividad de una bomba de ATP-asa que transporta protones en la membrana. La reducción en el pH apoplásmico induce la elongación de la célula, incrementando la actividad de ciertas enzimas responsables de la desaparición de la pared celular. El metabolismo en plantas ocurre lentamente, mediante reacciones de hidroxilación, descarboxilación, dealkilación y declorinación, conjugación con amino ácidos (Senseman, 2007).

Estructura química del 2,4-D:



Principales características:

Peso molecular: 221.04

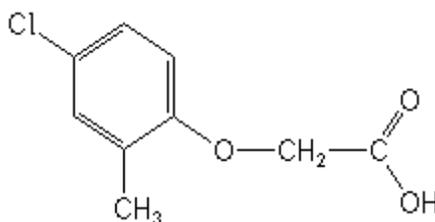
Solubilidad: 900 mg/L a 25°C en agua

pKa: 2.8

2.2.1.6.2. MCPA

Es un herbicida ácido fenoxiacético, fenoxi o ácido fenoxialkanoico, aplicado en postemergencia dirigido al follaje en rango de dosis 0.26-1.7 kg a.e./ha en trigo, cebada y avena. Controla varias malezas de hojas anchas, desarrollando síntomas típicos de herbicidas auxínicos. La muerte de las plantas sensibles ocurre lentamente, 3-5 semanas después. La absorción ocurre fácilmente por las hojas, a la vez que MCPA es considerado uno de los herbicidas fenoxis más móviles en los tejidos de las plantas, principalmente por vía simplástica, acumulándose en los puntos de crecimiento. En plantas tolerantes la translocación parece ser menor, en forma similar a como ocurre con 2,4-D (Senseman, 2007).

Estructura química del MCPA:



Principales características del MCPA:

Peso molecular: 200.62 (ácido); 245.71 (sal) y 312.84 (éster)

Estado físico: sólido marrón claro (producto técnico) y sólido cristalino (puro)

Densidad: 1.56 g/mL

Solubilidad: 825 mg/L a 25°C (ácido); 866.0 mg/L (sal amina) y 270.0 mg/L (sal sodio)

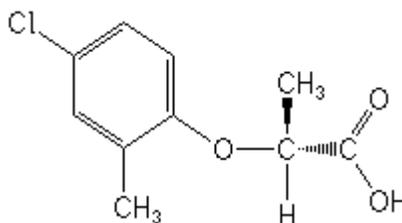
pKa: 3.12

2.2.1.6.3. Mecoprop

Es un herbicida fenoxi o ácido fenoxialkanoico, cuyo producto puro puede ser mecoprop en forma ácida o sal dimetilamina. Es aplicado en postemergencia

dirigido al follaje en dosis de 1.5-2.7 kg a.e./ha en trigo, cebada, avena y otros cereales para el control de malezas de hojas anchas anuales y perennes. Los síntomas son los característicos de otros auxínicos y penetra lentamente a través del follaje. El mecanismo de acción y de resistencia es similar a los demás herbicidas auxínicos (Sensema, 2002).

Estructura química del mecoprop:



Principales características:

Peso molecular: 214.65 (ácido); 259.73 (sal Dma) y 252.74 (sal k)

Estado físico: sólido cristalino

Densidad: no disponible

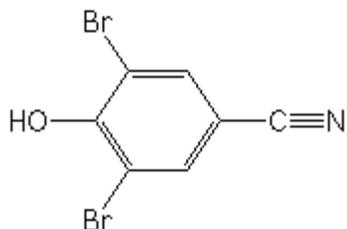
Solubilidad: a 20°C 620 mg/L en agua (ácido); 660.0 mg/L (sal Dma)

pKa: 3.11

2.2.1.6.4. Bromoxinil

Es un inhibidor de la fotosíntesis en el fotosistema II aplicado en postemergencia dirigido al follaje en dosis variables de 0.21-0.56 kg a.e./ha en trigo, cebada, avena y otros cereales para el control malezas hojas anchas anuales. En campo se aplicó el formulado Buctril. Es fácilmente absorbido por las hojas, con poco o ningún movimiento basipetal hacia otras partes de la planta. Los síntomas con clorosis aparecen 1-2 días y la necrosis foliar completa se desarrolla 3-6 días después de la aplicación. Es metabolizado por hidrólisis del grupo nitrilo, seguido por la producción de grupo carboxilo (Senseman, 2007).

Estructura química de bromoxinil:



Principales características:

Peso molecular: 276.91 (ácido) y 403.11 (octanoato ester)

Estado físico: polvo crema claro (ácido) y sólido crema oloroso (octanoato ester)

Solubilidad: a 20°C 130 mg/L en agua (ácido); en acetona 10.0 g/100 mL a 25°C (octanoato ester)

pKa: 4.06

2.3. Ensayos en condiciones controladas

2.3.1. Respuesta de poblaciones de *S. alba* a tribenuron metil (Screening)

Estos ensayos se realizaron para determinar el efecto del tribenuron metil sobre el peso fresco e indagar posibles diferencias entre las respuestas de las poblaciones de *S. alba* (AR₁ a AR₁₆).

Las plantas, cultivadas como se explicó en el apartado anterior, cuando alcanzaron el estado de 4-5 hojas fueron tratadas con 20.0 g ha⁻¹ de tribenuron metil, utilizando una máquina de aplicación experimental de herbicida (DEVRIES MANUFACTURING, HOLLANDALE, MINNESOTA, USA) equipada con boquilla de abanico plano Tee Jet 80.02 EVS (apertura uniforme de 80° y un volumen de 0.2 galones/min.), ajustada a 200 kPa y volumen de aplicación en campo de 140,25 L ha⁻¹ (Fig. 2.3).



Fig. 2.3. Aplicación de tribenuron metil sobre poblaciones de *S. alba*.

Las plantas fueron cortadas a nivel del suelo 21 días después del tratamiento herbicida (DDT) y se determinó el peso fresco promedio expresado en porcentaje respecto al control no tratado.

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 16 tratamientos (poblaciones) y 10 repeticiones (plantas). Los datos fueron utilizados para análisis de varianza y comparación de medias mediante el programa Statistix 8.0 (USDA-NRCS, 2007).

2.3.2. Ensayos de dosis-respuesta a herbicidas inhibidores de ALS

Estos ensayos fueron realizados con el objetivo de determinar niveles y patrones de resistencia cruzada a las cinco familias de herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa. Se escogieron las poblaciones de *S. alba* AR₁ y AR₈ sensible (S) y resistente (R) al tribenuron metil, respectivamente, ya que en el ensayo de screening de poblaciones sospechosas resultaron las más homogéneas en su respuesta al herbicida.

Cuando las plantas de ambas poblaciones alcanzaron el estado de crecimiento de 4 a 5 hojas fueron tratadas con las formulaciones comerciales de los herbicidas tribenuron metil (SU), iodosulfuron (SU), mesosulfuron (SU), imazamox

(IMI), florasulam (TP), bispiribac-sodio (PTB) y flucarbazone (SCT), a un rango de dosis seleccionado en función de las recomendaciones del suplidor (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Herbicidas inhibidores de ALS usados en ensayos de dosis-respuesta.

Herbicida	Dosis (g i. a. ha ⁻¹) por biotipo de <i>S. alba</i>	
	Biotipo resistente (R)	Biotipo sensible (S)
Tribenuron	0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.8, 6.4, 12.8, 25.6	0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8
Iodosulfuron	0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.8, 6.4, 12.8, 25.6	0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8
Mesosulfuron	0, 16, 28, 40, 64, 80, 128, 160	0, 8, 16, 32, 40, 52, 64, 80
Imazamox	0, 1.8, 3.6, 7.2, 14.4, 28.8, 57.6, 115.2	0, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8
Florasulam	0, 2.5, 3.75, 5, 7.5, 10, 15, 20	0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 3.75, 5, 7.5
Flucarbazone	0, 14, 28, 56, 84, 112, 168, 224	0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84
Bispiribac sodio	0.0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0	0.0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0

De acuerdo a las recomendaciones, a cada solución herbicida preparada se le adicionó el coadyuvante correspondiente: concentrado de aceite de petróleo (florasulam y iodosulfuron), surfactante no iónico (flucarbazone y tribenuron-metil), y aceite de semilla metilado más nitrato de urea y amonio (imazamox).

La aplicación de las dosis de los herbicidas se hizo en la misma forma utilizada para el experimento de screening con las dieciséis poblaciones. Las plantas permanecieron en invernadero hasta 21 DDT, determinándose el peso fresco igual que en el apartado anterior. Los pesos frescos fueron expresados en porcentajes respecto al control no tratado, y se utilizaron para estimar la dosis herbicida que redujo el peso de las plantas de cada biotipo al 50% (ED₅₀), en comparación con el control no tratado.

Los datos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal log-logistic, con el paquete estadístico Sigma Plot 8.0 (Seefeldt *et al.*, 1995). Los valores de ED₅₀ correspondientes a cada biotipo fueron usados para calcular el factor de resistencia (FR) de cada herbicida, dividiendo la ED₅₀ del biotipo R entre la ED₅₀ del S (FR=ED₅₀ AR₈/ ED₅₀ AR₁).

Ecuación del modelo de regresión no lineal log-logistic:
$$Y = c + \frac{(d-c)}{1+(x/g)^b}$$

Donde Y es el peso fresco de los tejidos aéreos, expresado como el porcentaje del control no tratado, c y d son coeficientes correspondientes a los límites menor y mayor de la asíntota, b es la pendiente de la línea de respuesta, g es la dosis herbicida en la mitad del punto de inflexión, entre los límites menor y mayor de la asíntota, representando la ED_{50} ; x (variable independiente) es la dosis del herbicida.

Cada herbicida a diferentes dosis fue tratado como un experimento por separado, constituyendo un estudio de tipo factorial en que los tratamientos se originaron al combinar las dosis herbicidas y los biotipos de *S. alba*. Los tratamientos fueron arreglados bajo un diseño completamente al azar, con tres repeticiones.

2.3.3. Estudios de retención y ángulo de contacto

Fue preparada una solución de Granstar 75 WG (20.0 g de tribenuron metil por hectárea), la cual se mezcló con una solución de 100 mg de fluoresceína por litro de hidróxido de sodio 5 mM. Diez plantas de cada población (AR_1 y AR_8) de *S. alba* en estado de 4-5 hojas fueron asperjadas con esta solución, utilizando el mismo equipo de aplicación que en los ensayos de respuesta a dosis en invernadero. Una vez secado el follaje, las plantas tratadas fueron cortadas a nivel de sus bases e introducidas en matraces con 50 mL de NaOH 5mM, y agitadas durante 30 segundos para lavar la solución herbicida que permaneció en los tejidos del follaje. Los tejidos cortados fueron empacados en sobres de celulosa y secado en un horno a 80°C durante 72 horas. La absorbancia de la fluoresceína fue determinada en un espectrofluorímetro a 490 nm de excitación y 510 nm de emisión. La retención fue expresada en μL de tribenuron g^{-1} de materia seca.

Para el estudio del ángulo de contacto se utilizaron plantas de ambos biotipos y en el mismo estado de crecimiento que las utilizadas en el ensayo anterior. Se estudiaron diez repeticiones (plantas) por biotipo y se cortó la cuarta

hoja de cada planta y se fijó con cinta adhesiva invisible en forma horizontal sobre una superficie de madera (10 cm x 5 cm).

De una solución de Granstar 75 WG (11.25 g de tribenuron metil ha⁻¹), disuelto proporcionalmente en un volumen de aplicación en campo de 140.25 L ha⁻¹, se depositó una gota de un μL en el centro de la superficie adaxial de la hoja, utilizando una microjeringa no biselada de 25 μL Hamilton Microliter[®] (Hamilton Bonaduz AG, CH-7402 Bonaduz/Switzerland).

Luego, las gotas fueron observadas en un microscopio Leica MZ6 1,8X-4X, situado en forma horizontal. Las imágenes de las gotas fueron capturadas con una cámara fotográfica Leica Digilux y un lente supermacro Leica Digimacro 4.3, ambos dispositivos adaptados al microscopio. El análisis digital de las imágenes fue realizado mediante el programa computarizado ImageJ (Grangeot *et al.*, 2006), que calcula la tangente del ángulo (ángulo teta "C") formado cuando la gota se une con la superficie de la hoja.

El ángulo de contacto de cada gota de la solución herbicida se obtuvo al determinar la diferencia entre el ángulo llano (180°) y el valor de teta "C". Los datos obtenidos fueron utilizados para buscar diferencias entre los biotipos R y S de *S. alba*, mediante comparación de medias con el programa Statistix 8.0 (USDA-NRCS, 2007).

2.3.4. Absorción y translocación de tribenuron metil

El objetivo de este ensayo fue determinar si la penetración foliar y la translocación de ¹⁴C-tribenuron representa un mecanismo que explique la resistencia detectada en *Sinapis alba* L.

Se utilizaron plantas de *S. alba* en estado de 4-5 hojas correspondientes a los biotipos AR₈ y AR₁, resistente y sensible a tribenuron metil, respectivamente; germinadas y cultivadas en invernadero según fue explicado previamente. Se

preparó una solución de Granstar 75 WG® (p/p, Du Pont, Nemours, Paris, Francia) de manera similar a las recomendaciones seguidas en aplicación de campo, y se mezcló con el compuesto radiactivo ^{14}C -tribenuron metil (Du Pont de Nemours, Francia), con radiactividad de 1666.66 Bq (100,000 dpm/ μL). De esta solución se tomó una alícuota de 0,5 μL y se mezcló en un vial con 0,5 mL de líquido de centelleo Packard® (Packard Bioscience Company, Switzerland) y se leyó en el cuantificador de centelleo Beckman Coulter LS 6500® (USA) para determinar la radioactividad de la solución. Se aplicaron aproximadamente 833.33 (50,000 dpm/planta). se tomó una alícuota y se colocó en un vial lavado y se le agregaron 10.0 mL^{-1} de cocktail Última Gold XR™ para centelleo de muestras acuosas y no acuosas con ^{14}C (Packard BioScience Company, Research Parkway, Meriden, USA).

Plantas de ambos biotipos AR₈ y AR₁ de *S. alba* en estado de 4-5 hojas, fueron tratadas en la cara adaxial de la cuarta hoja, aplicando una gota de 1 μL de la solución marcada (^{14}C -Tribenuron metil + Granstar 75 WG®), usando un microaplicador Labmate® (HTL Company) de 0,5-10 μL (Fig. 2.4).

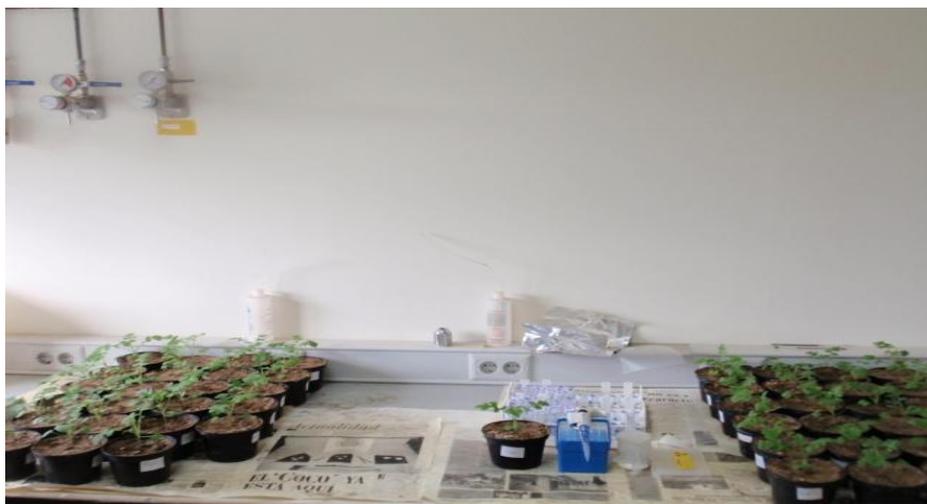


Fig 2.4. Plantas de *S. alba* tratadas con la solución de ^{14}C -tribenuron.

Las hojas tratadas fueron lavadas con una solución de acetona y agua (1:1), haciendo dos lavados por hoja, cada uno de 1 ml (microaplicador Labmate® de 100-1000 μL , HTL Company). La radioactividad lavada fue recogida en un vial de 5

ml, y se le agregaron 3 ml de líquido de centelleo Packard® (Packard Bioscience Company, Switzerland), luego fue cuantificada como se explicó en el apartado anterior para determinar el herbicida que no entró en la hoja.

Las plantas de cada biotipo AR₈ y AR₁ fueron divididas en hoja tratada (HT), resto de planta (RP) y raíces; cuantificándose la absorción y translocación 24, 48, 72, 96 y 120 horas después del tratamiento (HDT). Cada parte de la planta fue introducida en conos de celulosa Packard® (Packard Bioscience Company, Switzerland), depositada en sobre de papel de aluminio, y secada a 80°C en estufa P-Selecta® (J.P. Selecta S.A., U.E.) durante 48 horas. Las muestras se quemaron en un oxidador biológico automático Sample Oxidizer® modelo 307 (Perkin Elmer Precisely, Packard Instrument Company of USA), en una atmósfera rica en oxígeno (Fig. 2.5).



Fig. 2.5. Combustion de muestras en el oxidador biológico.

El ^{14}C es convertido en $^{14}\text{CO}_2$, el cual es atrapado y mezclado automáticamente con los reactivos de centelleo Permafluor E® (Perkin Elmer Precisely, Inc., USA) + Carbosorb® (Perkin Elmer Precisely, Inc., USA), en la proporción 2:1 v/v (15 ml). La radiactividad del lavado recogido, y la presente en cada parte en que fueron divididas las plantas fue determinada en el cuantificador de centelleo Beckman Coulter LS 6500® (USA).

La radiactividad (^{14}C -tribenuron) absorbida fue calculada según la siguiente fórmula:

$$\text{Absorción} = \left[\frac{\text{radiactividad combustionada}}{\text{radiactividad Lavada} + \text{radiactividad combustionada}} \right] * 100$$

Radiactividad combustionada = radiactividad H. T. + radiactividad R. P. + Radiactividad R.

Radiactividad Lavada = radiactividad en el lavado de la H.T.

La radiactividad fue medida en dpm (desintegraciones por minuto).

La translocación se expresó como el porcentaje de radiactividad presente en cada segmento de la planta, con respecto a la radiactividad total presente en el interior de la planta:

$$\text{Translocación (\%)} = \left[\frac{\text{radiactividad segmento}}{\text{radiactividad total en el interior de la planta}} \right] * 100$$

Para determinar cualitativamente la distribución del ^{14}C -tribenuron en la planta, se utilizaron dos plantas por biotipo y tiempo y, fueron secadas (50°C , 4 días), colocadas en una película con cristales de fósforo (AGFA-CURIX) por seis horas y analizadas en el Phosphor-Imager (Cyclone, Perkin Elmer, Packard Bioscience BV).

El experimento fue factorial y los tratamientos se obtuvieron combinando biotipo*tiempo*segmento de planta; se utilizó un diseño completamente al azar y cuatro repeticiones. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias (DMS, Fisher al 0.05) con el programa Statistix 8.0.

2.3.5. Estudios en la superficie adaxial de *S. alba*

El objetivo de estos estudios fue determinar si algunos rasgos o parámetros morfológicos de la superficie foliar influían en el proceso de absorción de tribenuron, como posible mecanismo de resistencia en la mala hierba *S. alba*, así como estudiar posibles efectos de este herbicida sobre la actividad fotosintética y la cantidad de clorofila en la hoja. Los métodos y materiales utilizados en estas actividades se describen a continuación:

2.3.5.1. Estudios de fotosíntesis y clorofila (SPAD)

El objetivo propuesto en este trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación de tribenuron sobre la actividad fotosintética y valores SPAD (como medidas relativas de clorofila) y su relación con la resistencia detectada en plantas de *S. alba*, bajo condiciones de invernadero.

Plantas de los biotipos AR₈ (resistente) y AR₁ (sensible) fueron tratadas con una solución de Granstar 75 WG (20 g de tribenuron metil ha⁻¹), de la misma forma que se describió en el ensayo de dosis-respuesta; la aplicación herbicida se hizo a las 6:00 am. Fueron evaluados la actividad fotosintética y el contenido relativo de clorofila, mediante la cuantificación de la fotosíntesis líquida y valores SPAD en los tiempos 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después del tratamiento herbicida, realizando lecturas en la quinta hoja de plantas tratadas y no tratadas en estado de 5-6 hojas. Las mediciones fueron realizadas en forma no destructiva e in situ (invernadero) con plantas vivas.

Los valores de SPAD (Soil Plant Analysis Development) son medidas relativas del contenido de clorofila en la hoja, los cuales fueron medidos entre 650 nm (rojo) y 940 nm (infrarrojo), utilizando un clorofilómetro (SPAD-502, Minolta, Japan) calibrado para obtener un valor digital promedio del contenido de clorofila en tres sitios de cada hoja. El SPAD emite energía radiante que atraviesa la hoja y

es detectada por un receptor que la convierte en señales eléctricas, y las expresa como señales digitales o valores de SPAD.

La tasa de fotosíntesis fue medida según la metodología descrita por Ribeiro *et al.* (2007), con algunas modificaciones. Se utilizó un equipo portátil de sistema abierto (Model 6400XT, Li-Cor, Lincoln, NE, USA), el cual es útil para analizar en infrarrojo el intercambio de gases sobre hojas de vegetales vivos. Antes de la primera lectura, todos los días durante el estudio, el fluorómetro de la cámara de la hoja (FCH) fue calibrado, poniendo las hojas a leer dentro del FCH a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintética activa (RFA); $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 ; 25°C ; $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ de flujo de aire en unidades relativas de 50%. Estos parámetros ambientales dentro de la cámara fueron mantenidos estables durante el proceso de lectura. Se tomaron diez medidas de fotosíntesis en cada hoja por planta de los biotipos R y S de *S. alba*, con intervalo de cinco minutos entre medidas.

El equipo Li-Cor 6400XT® estima la tasa de fotosíntesis líquida según los cambios en las concentraciones de CO_2 por unidad de tiempo, usando la ecuación desarrollada por von Caemmerer y Forquhar, en 1981:

$$A = \frac{F(C_a - C_r)}{100S} - C_aE$$

Donde A es la tasa de asimilación líquida de CO_2 en la hoja ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); F es la tasa de flujo de aire ($\mu\text{mol de aire s}^{-1}$); C_a y C_r son las concentraciones de CO_2 ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol de aire}^{-1}$) de la muestra y de la referencia; S es el área foliar (cm^{-2}); y E es la tasa de respiración ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Los datos de fotosíntesis y los valores de APAD se expresaron en porcentaje respecto al testigo no tratado. Fue verificado el cumplimiento de los supuestos estadísticos, y los datos se sugirieron para análisis de varianza y comparación de medias con el método de DMS de Fisher, con el programa Statistix 8.0.

El estudio se realizó con dos biotipos de *S. alba*, dos dosis de tribenuron, diez repeticiones (plantas) y siete tiempos de medición, utilizando una distribución factorial con diseño completo al azar.

2.3.5.2. Densidad de estomas

Se cortaron fragmentos de 2 x 1 cm (L x a) en la parte central de la tercera y cuarta hojas de plantas R y S de *S. alba*, cultivadas en invernadero como se explicó antes. El número de estomas se estimó mediante la técnica de la huella de la superficie adaxial. Para ello se colocó un segmento de celo invisible sobre un portaobjetos humedecido con etanol 99,5%. Seguidamente, esta cinta fue pulverizada con acetona para ablandarla y sobre ella se situó la cara adaxial del fragmento de hoja. Sobre la hoja se colocó una bola de plastilina de 1cm de diámetro y encima una pieza de madera de 6 x 3 cm sobre la que se aplicó presión durante 3 segundos.

Las huellas de la superficie adaxial de cada hoja de las plantas de los biotipos investigados, se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico (Nikon UFX II-Labophot-2, Japan), usando el objetivo de 20x. Se midió el área del campo óptico, se contaron los estomas del corte foliar; y se calculó la densidad estomática (Nº. de estomas/mm²).

El estudio de estomas se realizó con seis repeticiones por biotipo y dos muestras por plantas. Los datos se sometieron a análisis estadístico de varianza y comparación de media con el programa Statistix 8.0

2.3.5.3. Densidad de tricomas

Este estudio fue realizado con la misma técnica aplicada para la cuantificación de la densidad de estomas, utilizando la huella de la superficie adaxial de cada hoja estudiada para cuantificar la densidad de tricomas. Las

huellas de la superficie adaxial se observaron al microscopio óptico (Nikon UFX II-Labophot-2, Japan), con el objetivo de 4x. Se midió el área del campo óptico, se contaron los tricomas del corte foliar; y se calculó la densidad de tricomas (No. tricomas/mm²) para los biotipos S y R de *S. alba*.

El estudio de tricomas se realizó con seis repeticiones por biotipo y dos muestras por plantas. Los datos se sometieron a análisis estadístico de varianza y comparación de media con el programa Statistix 8.0.

2.3.5.4. Medición del espesor de la cutícula

Muestras de la porción central de hojas de los biotipos S y R de *S. alba* fueron cortadas y fijadas en solución FAA (1:1:8, Formaldehído 37% v/v, ácido acético glacial y etanol 50% v/v) durante 24 horas y conservadas en alcohol al 70%. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol (hasta 100%). Se incluyeron en GMA (JB-4, Polysciences Inc.) mediante un gradiente etanol/GMA (2:1, 1:2 v/v, y 100% GMA). Los fragmentos de las hojas se colocaron en cápsulas de gelatina (5mm de diámetro) y se procedió a la polimerización térmica. Para ello se sometieron a una temperatura creciente desde 40°C hasta 80 °C, durante 24 h. Los bloques así obtenidos se cortaron en un microtomo Leica Autocut 2055, a 3 µm de grosor con cuchillas de vidrio. Los cortes fueron fijados en un portaobjetos y se tiñeron con Auramina O al 0,1%. Las preparaciones se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico (Nikon UFX II-Labophot-2, Japan) con luz UV de 360 nm.

El espesor de la cutícula de la superficie adaxial de las hojas de ambos biotipos de *S. alba* se determinó con el programa Image Tool, midiendo el tamaño de la cutícula en la región epidérmica celular central de cada preparación. El experimento fue repetido en el tiempo; los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de comparación de media con el programa Statistix 8.0.

2.3.5.5. Estudio de la forma de la superficie adaxial

Fue utilizada la cuarta hoja de plantas en etapa de 4-5 hojas, pertenecientes a los biotipos AR₈ (R) y AR₁ (S) de *S. alba*. Se realizaron cortes de 0,5 cm x 0,5 cm (0,25 cm²), los cuales fueron fijados por inmersión en glutaraldehído al 2% (Sigma) y se conservaron a 4°C hasta la realización del estudio. Los cortes fueron lavados primero con agua y después con acetona, cada lavado duro cinco minutos y se repitió tres veces. Luego, fueron desecados a presión mediante ciclos alternos de 15 minutos con frío y calor, utilizando una cámara secadora de punto crítico CPD-030 Balzer®. Posteriormente, cada corte fue colocado sobre una base cilíndrica de metal y cubierto con una capa de oro de 0,05 μM en una cámara sombreadora SCD-005 (BAL-TEC-BU 800247 E/1).

Los cortes cubiertos de oro fueron observados al microscopio electrónico de barrido JSM.6300 (Scanning Microscope JEOL-Japan), realizándose imágenes para examinar la forma de la superficie foliar adaxial de los biotipos estudiados.

El estudio fue realizado en el Laboratorio Central de Microscopía de la Universidad de Málaga, con el objetivo de establecer si la forma de la superficie adaxial foliar tenía alguna relación con el patrón de absorción de tribenuron en biotipos de *S. alba*.

2.3.6. Metabolismo de tribenuron metil en *S. alba*

Los ensayos de metabolismo con ¹⁴C-tribenuron metil fueron realizados con el propósito de verificar si entre los biotipos AR₁ y AR₈ de *S. alba* existían diferencias que pudieran explicar la resistencia a tribenuron metil detectada esta especie de mala hierba.

Se utilizaron plantas que crecieron en iguales condiciones y se sometieron al mismo procedimiento experimental establecido para los ensayos de absorción y translocación, excepto que cada hoja tratada fue lavada 96 horas después de

aplicada la solución herbicida marcada para lavar la radioactividad no absorbida en la superficie adaxial.

Las plantas completas fueron divididas en tejidos foliares y raíces, y almacenadas a -40 °C hasta la extracción. Los tejidos foliares congelados fueron molidos en un mortero con 3 mL de una solución de metanol + agua destilada (4:1 v/v).

El residuo homogenizado fue lavado dos veces con 3 mL de una solución de metanol + agua destilada (4:1 v/v) y se puso a 20000 g y a 4 °C durante 10 min en una centrífuga (Sigma 3K3, con un rotor Nr 1257). Los sobrenadantes fueron mezclados y la radioactividad total se extrajo a partir de una alícuota de 100 µL mediante espectrometría en un cuantificado de centelleo líquido (Beckman LS 6500 TA, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA).

Las mezclas de los sobrenadantes fueron secadas a temperatura ambiente bajo un flujo de nitrógeno líquido (0.25 atm). El extracto seco fue suspendido en 200 µL de isopropanol y se procedió a la separación del ¹⁴C-tribenuron metil y sus metabolitos mediante cromatografía de capa fina (TLC, Thin Layer chromatography) en una placa 20 cm x 20 cm x 250 µm de gel silica (silica gel 60, Merck, Darmstadt, Germany), con 1-propanol:etilacetato:amoníaco: H₂O (10:6:3:1, V:V:V:V).

Las zonas radioactivas fueron detectadas mediante radiocromatograma obtenido con el uso de scanner. La radioactividad de los productos separados fue cuantificada con un equipo analizador lineal de placas (Berthold LB 2821, Wildbald, Germany), mientras que la naturaleza química de los separados se determinó por comparación con los productos estándares (tribenuron metil, metsulfuron metil, metsulfuron metil hidroxilado). El experimento fue realizado por duplicado, con dos plantas por repetición muestreadas en el período de cuantificación.

2.3.7. Actividad de ALS en dos biotipos de *S. alba*.

El protocolo de esta actividad siguió la metodología descrita por Osuna y De Prado (2003), con ligeras modificaciones para investigar la respuesta *in vitro* y el grado de inhibición de la actividad de la enzima acetolactato sintasa en presencia de herbicidas inhibidores.

2.3.7.1. Extracción de la enzima ALS.

Se cosecharon tres gramos de tejidos foliares de plantas pertenecientes a las poblaciones AR₈ y AR₁ de *S. alba*, en estado de crecimiento de 4-5 hojas. Para la extracción de la enzima ALS, los tejidos de cada biotipo fueron congelados y pulverizados con nitrógeno líquido en morteros individuales, adicionando 0.5 g de polivinil-polipirrolidona (PVPP), continuando el macerado hasta lograr una mezcla homogénea. A esta mezcla se agregaron 2 mL de extracción buffer por cada gramo de tejido foliar y se agitó en frío (4°C) durante diez minutos, luego se filtró y centrifugó a 15,000 rpm durante 20 minutos. La extracción buffer se preparó a partir de fosfato de potasio 1M (KH₂PO₄/ K₂HPO₄) con pH 7.5; piruvato de sodio 10 mM; MgCl₂ 5 mM, pirofosfato tiamina (TPP) 50 mM; flavin adenin dinucleótido 100 µM (FAD); ditioneitol 12 mM (DTT) y glicerol (1:9, v/v).

El sobrenadante obtenido representó el extracto crudo de la enzima, el cual fue usado inmediatamente para la realización de los ensayos de inhibición de actividad enzimática, sin que fuera necesaria la precipitación con nitrato de amonio y el paso a través de una columna. Todo el proceso de extracción de la enzima se realizó en frío.

2.3.7.2. Ensayos de medición de la actividad enzimática

Se realizaron mezclas de ensayo en un volumen total de 0.25 ml, conteniendo 0.11 mL de tampón de ensayo [tampón fosfato, 0.08 M, pH 7.5;

piruvato sódico, 0.15 M; $MgCl_2$, 1.5 mM; tiamina pirofosfato (TPP), 0.5 mM; flavin adenin dinucleótido (FAD) 1mM], 0.09 ml del extracto crudo de la enzima, 0.02 mL de las diferentes concentraciones de los herbicidas en grado técnico y 0.02 mL del solvente correspondiente.

Previo a la adición del extracto de la enzima, a los eppendorfs del blanco se le agregó 0.05 mL de una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; 1:50 v/v) para detener la actividad enzimática desde el principio del ensayo. Después de preparada la mezcla y de realizar el incubado a 37 °C por 1 hora, a cada eppendorf se adicionó 0.05 mL de H_2SO_4 (3 M), excepto a los del blanco, para detener la reacción.

Para facilitar la descarboxilación de acetolactato hasta acetoína los tubos de reacción (eppendorf) fueron incubados a 60°C por 15 minutos. Luego, a cada tubo se adicionó 0.25 mL de una solución recién preparada de creatina en agua (5 g L^{-1}) y 0.25 mL de una solución de naftol e hidróxido de sodio (50 g de naftol por litro de NaOH 5 M), y se volvió a incubar a 60°C por 15 minutos.

Se determinó la absorbancia a 520 nm, usando un espectrofotómetro (Beckman Coulter, DU 640). Los valores de absorbancia se transformaron en valores de concentración de acetoína, usando el coeficiente de extinción molar obtenido a partir de la curva patrón de acetoína. La actividad ALS fue medida mediante la estimación de la cantidad de acetolactato convertida en acetoína (Fig. 2.6), la cual fue detectada como un complejo coloreado (Fig. 2.7). Dicha actividad se expresó en porcentaje respecto al control sin herbicida (X°).

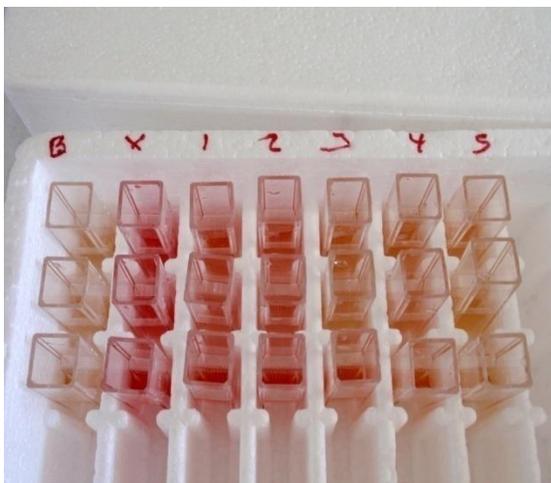


Fig. 2.6. Color del complejo después conversión



Fig. 2.7. Medición absorbancia acetoina

Se realizaron 3 ensayos por biotipo, cada uno con extracto procedente de la mezcla de tejido foliar de tres plantas; cada muestra a cada concentración de herbicida fue realizada por triplicado. Para cada herbicida y biotipo de *S. alba*, fue estimada la concentración herbicida necesaria para reducir la actividad ALS en un 50% (I_{50}) respecto al control no tratado, ajustando los datos al modelo de regresión no lineal log-logistic descrito previamente.

Con el fin de conocer los niveles y patrones de resistencia de *S. alba* a los herbicidas inhibidores de ALS estudiados, se determinó la relación entre la I_{50} del biotipo R y la del S ($R I_{50} / S I_{50}$), obteniéndose los factores de resistencia in-vitro.

2.3.7.3. Determinación de la Proteína

El contenido de proteína total en el extracto crudo fue medido mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), siguiendo las instrucciones proporcionadas en el kit comercial para determinación de proteínas de Sigma (Procedimiento No. P5656). Los valores de absorbancia a 595 nm se transformaron en cantidad de proteína utilizando el coeficiente de extinción molar obtenido a partir de la curva de calibrado realizado con seroalbumina bovina.

2.3.8. Bases moleculares de la resistencia en *S. alba*

La resistencia a herbicidas inhibidores de ALS, salvo algunas excepciones, es debida a una mutación en el sitio de unión del herbicida en el gen ALS, lo que ha sido confirmado en los cinco dominios conservados A, B, C, D y E de esta enzima. Diferentes sustituciones nucleotídicas pueden ocurrir en algunos aminoácidos del gen ALS (Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Ala₂₀₅, Trp₅₇₄ y Ser₆₅₃), causando una mutación en el punto que confiere resistencia cruzada a uno o a varios herbicidas de las familias inhibidoras de ALS. Prolina 197 es el aminoácido que más frecuentemente presenta sustituciones en el sitio de unión herbicida en la enzima ALS, con alto nivel de resistencia a herbicidas sulfonilureas (Tranel y Wright, 2002).

En *S. arvensis*, especie emparentada taxonómicamente con *S. alba*, fue detectado este mecanismo de resistencia a herbicidas sulfonilureas e imidazolinonas (inhibidores de ALS), con sustitución nucleotídica que causa el cambio de Prolina 197 (CCT) a Serina (TCT) en el dominio A en el sitio de acción ALS; y la mutación de Triptófano 574 (TGG) a Leucina (TTG) en el dominio B (Warwick *et al.*, 2005).

Esta actividad fue desarrollada con el objetivo de diagnosticar la posible mutación responsable de la resistencia confirmada al herbicida tribenuron, inhibidor de la enzima acetolactato sintasa en jaramago (*Sinapis alba*, L). De esta forma es posible prever la ocurrencia de futuros casos de resistencia a otros herbicidas que actúan en el mismo sitio que el tribenuron, con lo cual se pueden establecer estrategias de manejo que prevengan el incremento y dispersión de este tipo de resistencia.

2.3.8.1. Material vegetal y Extracción de ADN

Fueron estudiados los biotipos AR₁ (S) y AR₈ (R) de *S. alba*, utilizando de cada biotipo 15 plantas cultivadas en condiciones similares y en el mismo estado de crecimiento que las utilizadas en el estudio de absorción y translocación de

tribenuron. Se cosechó la cuarta hoja de cada planta y se conservó en frío (-80 °C) hasta el momento del estudio de secuenciación del gen ALS.

Después, las plantas fueron tratadas con una solución de Granstar 75 WG (20 g de tribenuron/ha, diluido en un volumen de 140 l ha⁻¹), aplicada en la misma forma del estudio de dosis-respuesta. Inmediatamente, las plantas fueron trasladadas al invernadero, donde permanecieron hasta los 21 días después del tratamiento para confirmar la respuesta de resistencia o sensibilidad de cada planta a utilizar en la secuenciación del gen ALS.

El ADN genómico fue extraído a partir de muestras de 100 mg de hojas de cada planta de los biotipos correspondientes, congelándolas y pulverizándolas con nitrógeno líquido en tubo de reacción de 1.5 mL. Cada muestra por biotipo fue procesada con el kit Speedtools Plant DNA Extraction Kit Cat No. 21.171/2 (Biotools B&M Labs .S.A). La concentración de ADN de cada muestra se midió en un espectrofotómetro NANODROP Thermoscientific, con una excitación de 260 y una emisión de 280 nm. Cada muestra fue diluida con el kit de extracción hasta una concentración final de 10 ng µL⁻¹ para el desarrollo de la reacción de polimerasa en cadena (PCR).

2.3.8.2. Amplificación por PCR

Esta técnica fue utilizada para la amplificación de los fragmentos de interés del ADN extraído. En los dominios BE se amplificó un fragmento de 639 pb y en los dominios C, A y D el fragmento amplificado fue de 501 pb.

La amplificación se realizó mediante reacción en cadena de polimerasa en un termociclador (My Cyclor BIORAD), con un volumen final de 20 µL, conteniendo 10 ng de ADN, 0.2 µM de cada combinación de primers, 200 µM dNTPs, 2 µl de tampón y 2.5 U de Taq DNA polimerasa. Para el estudio se diseñaron dos parejas de primers o cebadores descritos en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Cebadores utilizados en la secuenciación del gen ALS

Cebadores	Secuencia 5´-3´
ÁLS 3B	TCARTACTWAGTGCKACCATC
ALS3F	GGRGAAGCCATTCTCC
P1	GAAGCCCTCGARCGTCAAGG
P2	CATAGGTTGWTCCCARTTAG

Ambas parejas de cebadores fueron sometidas a los programas de ciclo de PCR indicados en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Programas de amplificación por PCR de los dominios conservados del gen ALS.

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)

Los productos de PCR amplificados fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en tampón TBE (Tris-borato 89 mM pH 8 EDTA-Na 2 mM, desarrollado en un sistema de gel electroforético (Thermo Midicell Primo EC 330), en cubetas horizontales con voltaje de 1-4 voltios/cm. Antes de cargar las muestras de ADN en el gel, estas se mezclaron en proporción 4:1 (v/v) con el tampón de carga para ADN (azul de Bromofenol 0.5%, Cianol de Xileno 0.25% y glicerol 30% disuelto en agua destilada).

Para visualizar la separación del ADN en el gel, se usó bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 30 minutos. Los fragmentos de ADN de interés fueron observados con luz ultravioleta (320 nm) en una campana (ALPHA DIGI DOC Pro instrument, Alpha Innotec), y separados (Fig. 2.8 y 2.9) para la purificación posterior.

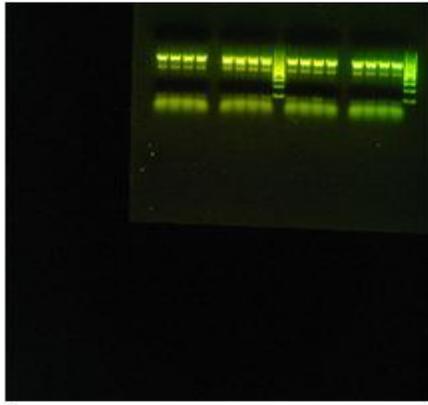


Fig. 2.8. ADN amplificado por PCR

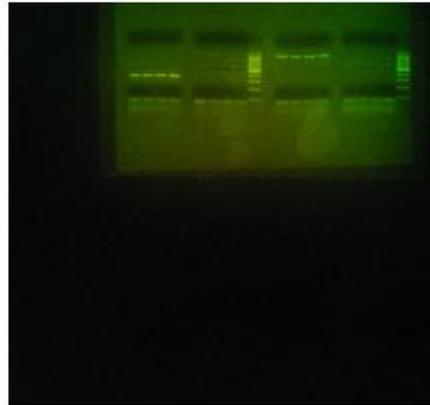


Fig. 2.9. Fragmentos de ADN separados

2.3.8.3. Purificación y secuenciación del ADN genómico

Los fragmentos de interés fueron purificados con la técnica Speed tools PCR Clean Up Kit (Biotools B&M LABS S.A), eliminando impurezas como los restos de cebadores, sales y Taq-polimerasa remanentes después de la PCR (Fig. 2.10). Los cebadores ALS3B/ALS3F fueron utilizados para secuenciar los dominios C, A y D (región 1) y los cebadores P1/P2 para los dominios B y E (región 2). La secuenciación de las muestras de ADN genómico purificado fue realizada en la Unidad de Genómica del Servicio Central de Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Las secuencias del gen ALS fueron obtenidas para cada una de las 15 plantas de las poblaciones AR₁ y AR₈ de *S. alba* prospectadas en Arriate, Málaga, España.

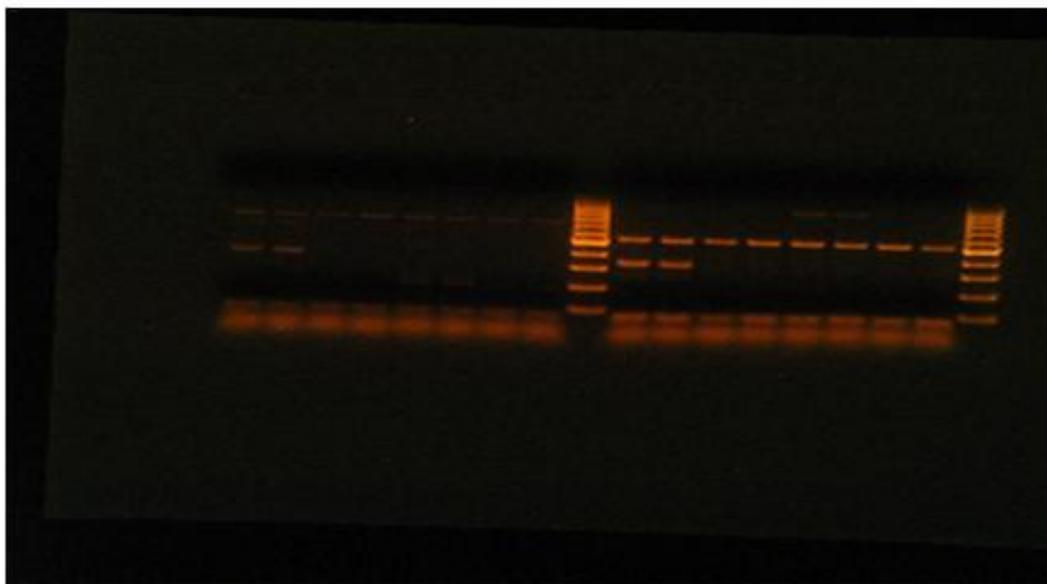


Fig. 2.10. Fragmentos de ADN purificados de 501 (izquierda) y 639 (derecha) pb (P1/P2), digeridos durante 3 h

2.3.9. Respuesta de *S. alba* a tribenuron y a otros herbicidas en campo

S. alba es una mala hierba que invade predominantemente diversos cultivos en varias regiones de Andalucía, como es el caso de Málaga, España. En esta zona, los problemas de eficacia del Granstar (tribenuron-metil) aplicado durante muchos años en trigo para control de malas hierbas hojas anchas, ha causado preocupaciones entre los agricultores, quienes incrementaron las dosis y/o hicieron mezclas con otros herbicidas, sin obtener un control satisfactorio. Esta falla en el control ha sido detectada en Arriate, cerca de Ronda, Málaga, existiendo alta probabilidad de que la resistencia de *S. alba* al tribenuron, reportada en 2008, sea dispersada dentro de Málaga y hacia otras zonas geográficas vecinas, como son las provincias de Huelva y Sevilla. Este problema es una amenaza a la sostenibilidad del control de malezas y a la producción de trigo de España, afectando la rentabilidad de los productores.

El objetivo de este estudio fue identificar herbicidas alternativos eficaces en el control de la población resistente de jaramago (AR₈), mediante la evaluación de

la eficacia de tratamientos preparados a base de herbicidas con modos de acción diferentes al tribenuron metil, y aplicados tanto solo como en mezclas de tanque. Dicho estudio fue desarrollado en un competitivo cultivo de trigo infestado con *S. alba* resistente a tribenuron metil, localizado en Arriate, Málaga, suroeste de España.

Se condujo un experimento durante 2008-2009 y se repitió en el periodo de cultivo 2009-2010. El trigo fue sembrado mecánicamente a una profundidad de 3 cm y una distancia de 15 cm entre hileras (70-75 kg/ha de semilla). Fueron evaluados siete tratamientos herbicidas y un control no tratado (Tabla 2.6), en un diseño de bloques completos al azar, tres repeticiones y parcelas de 10.0 m².

Tabla 2.6. Tratamientos herbicidas aplicados sobre *S. alba* en campo.

Tratamientos	Materia activa	Dosis (g o l/ha)
Control sin aplicación	---	---
Granstar 50 SG+A390	Tribenuron metil 50%	37,5 g
Granstar Combi+A390	Tribenuron metil 50% + MCPP	1090 g
Granstar 50 SG + Butril+ A390	Tribenuron metil 50% + Octanoato 2,6-dibromo-4-cianofenilo	22,5 g + 1,0 l
Granstar 50 SG+MCPA+A390	Tribenuron metil 50% + MCPA-sal amina	37,5 g + 1,0 l
Nikos	Florasulam	0,15 l g
Doble Sal	MCPA-sal amina + 2,4-D	1,5 l
MCPA	MCPA-sal amina	1,0 l
Buctril	Octanoato 2,6-dibromo-4-cianofenilo	1,0 l

Los tratamientos herbicidas se aplicaron cuando el cultivo estaba en fase reproductiva (encañado), utilizando un aspersor de neumático manual equipado con un aguilón de cuatro boquillas de abanico plano 11002E, calibrada a 276 kPa y una altura de aplicación de 50 cm, liberando 140.25 l ha⁻¹ (Fig. 2.11). El manejo de los experimentos fue responsabilidad del agricultor, y consistió en dos fertilizaciones, una en pre-siembra con 80 kg/ha de urea, y otra aplicada al

momento de la siembra con 100 kg/ha de fosfato diamónico; así como en mantener controladas las poblaciones de otras plagas que inciden normalmente en la producción de trigo.



Fig. 2.11. Aplicación de tratamientos herbicidas en campo.

Después de marcar el experimento y antes de aplicar los tratamientos, se realizó una aspersion de graminicida (fenoxaprop-p etil) para eliminar la competencia de las monocotiledóneas no controladas por estos productos. La eficacia de los herbicidas se estudió sobre la población resistente de *S. alba* L. Dicha evaluación se realizó 30 días después del tratamiento (DDT) y de forma visual, con una escala de 0-100% con respecto al control sin aplicación, 0% (no hay efectos visibles) y 100% (todas las plantas están muertas).

A final del ciclo del cultivo (96 DDT), se lanzó un cuadro metálico de 0,25 m² y se cosecharon las plantas vivas de *S. alba* contenidas en el mismo, para evaluar el efecto de los herbicidas sobre el peso seco de los tejidos aéreos cortados a nivel de la base de las plantas de jaramago. Las muestras se guardaron en sobres de celulosa y se secaron en un horno grande P-Selecta, a 80°C durante 96 horas. Los resultados obtenidos se expresaron en g de materia seca por m² y se comparó la producción de materia seca en porcentaje respecto al control.



Fig. 2.12. Evaluación de la biomasa seca del jaramago y rendimiento de trigo

Las cosechas de trigo fueron realizadas manualmente en Junio de 2009 y 2010, en un área útil de 0.25 m² dentro de las unidades experimentales, justo donde creció el jaramago (Fig. 2.12).

El trigo cosechado fue secado a temperatura ambiente, pesado y el rendimiento de granos ajustado al 13.5% de humedad, expresado en kilogramos de trigo seco por hectárea (kg ha⁻¹). Los datos de ambos experimentos fueron fusionados y sugeridos para análisis de varianza y separación de medias con el método de diferencias mínimas significativas de Fisher (DMS; 0.05), usando el paquete Statistix 8.0.

III. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Respuesta de poblaciones de *S. alba* a tribenuron metil (Screening)

Se investigó la respuesta de 16 poblaciones de *S. alba* a la aplicación de tribenuron metil (Granstar 75 WG, DuPont) en condiciones de invernadero, para determinar el efecto del tribenuron metil sobre el peso fresco, indagar posibles diferencias entre las poblaciones de *S. alba* (AR₁ a AR₁₆) e identificar biotipos resistentes al referido herbicida.

Las poblaciones de *S. alba* prospectadas en fincas cultivadas de trigo (*Triticum aestivum*), haba (*Vicia faba*) y garbanzos (*Cicer arietinum*), localizadas en Arriate, Málaga, 21 DDA de tribenuron metil (Granstar 75 WG) en invernadero presentaron diferencias significativa en la reducción del peso fresco de los tejidos aéreos en comparación con el control no tratado (P 0.0000), estos valores oscilaron entre 5.7 y 91.3% (Tabla 3.1).

La mayor sensibilidad a tribenuron metil fue observada en las poblaciones AR₁, AR₂ y AR₃, cuyas pérdidas de peso fresco variaron entre 90.9 y 91.3%. Sin embargo, en las poblaciones desde AR₄ hasta la AR₁₆ el tribenuron causó una reducción del peso fresco entre 5.7% y 30% (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Peso fresco para poblaciones de *S. alba* tratadas con tribenuron metil.

Población de <i>S. Alba</i> ¹	Peso fresco control	Peso fresco 20 g i.a. ha ⁻¹	Reducción Peso fresco 21 DDT	
			Gramos	Porcentaje
AR ₁	12,6	01,1	11,5	90,9±2,3a
AR ₂	15,4	01,3	14,1	90,9±2,1a
AR ₃	20,7	01,2	19,4	91,3±1,8a
AR ₄	19,6	13,6	06,0	30,0±2,3b
AR ₅	13,9	11,9	02,0	13,1±3,1c
AR ₆	07,9	06,9	01,0	11,6±2,1cd
AR ₇	19,0	16,7	02,4	11,9±2,2cd
AR ₈	16,4	14,5	01,9	10,9±2,7de
AR ₉	19,0	16,8	02,2	11,1±2,2d
AR ₁₀	16,7	14,9	01,8	10,2±1,2de
AR ₁₁	16,4	14,8	01,6	9,0±2,2ef
AR ₁₂	14,0	12,9	01,2	7,9±2,8fg
AR ₁₃	08,6	07,9	00,7	7,7±2,7fg
AR ₁₄	19,4	18,0	01,4	6,6±1,8gh
AR ₁₅	16,4	15,3	01,1	6,4±2,2gh
AR ₁₆	17,8	16,7	01,1	5,7±1,8h
DMS Fischer: alfa 0,05				1.9675

¹AR: accesiones de *S. alba* colectadas en Arriate, Málaga, Suroeste de España, 2007

La pérdida de peso fresco de la población AR₄ fue 30%, cuyas plantas sufrieron poco daño y se recuperaron con el tiempo. Todas las plantas de las poblaciones AR₄ hasta la AR₁₆ sobrevivieron a la aplicación del tribenuron metil (Granstar 75 WG), mientras que las plantas de las poblaciones AR₁, AR₂ y AR₃ no sobrevivieron 21 después de la aplicación del referido herbicida (Fig. 3.1).



Fig. 3.1. Respuesta de poblaciones de *S. alba* prospectadas en Arriate, Málaga

3.2. Ensayos de dosis-respuesta a herbicidas en invernadero.

En estos experimentos se utilizaron las poblaciones AR₈ (R) y AR₁ (S), ya que en el ensayo de screening resultaron más homogéneas en cuanto al crecimiento y desarrollo de las plantas 21 DDA del tribenuron metil.

Los valores de peso fresco de ambos biotipos AR₈ (R) y AR₁ (S) se ajustaron bien al modelo de regresión no lineal log-logistic de cuatro parámetros, permitiendo estimar las dosis efectivas que reducen al 50% (ED₅₀) el peso fresco producido por las plantas tratadas con los formulados de cada herbicida evaluado. Las ED₅₀ de tribenuron, mesosulfuron, iodosulfuron, florasulam y flucarbazone para el biotipo R resultaron varias veces mayores que las ED₅₀ del biotipo S, con factores de resistencia (FR) de 9.8, 11.9, 17.5, 65.2 y 8.5, respectivamente.

Los factores de resistencia más pequeños se observaron en los herbicidas bispiribac-sodio e imazamox, con valores de 0.16 y 4.5, respectivamente. Solo se encontró fuerte resistencia cruzada a tres de las cinco familias de herbicidas inhibidores de ALS disponibles en el mercado (sulfonilurea, Triazolopirimidina y sulfonilaminocarboniltriazolinona). El biotipo AR₈ de *S. alba* mostró baja o ninguna resistencia a las familias herbicidas imidazolinona (imazamox) y pirimidiniltiobenzato (bispiribac-sodio).

El patrón de resistencia de *S. alba* a los diferentes herbicidas aplicados fue: florasulam>>iodosulfuron>mesosulfuron>tribenuron>flucarbazone>>imazamox (Tabla3.2).

Tabla 3.2. Parámetros estimados de la ecuación de regresión y factores de resistencia (FR) a herbicidas inhibidores de ALS en biotipos R y S de *S. alba*.

Herbicida	Parámetros de regresión log-logistic							
	B	C	D	b	ED ₅₀ (g a. i. ha ⁻¹)	R ² aj.	Valor P	FR
Tribenuron	R	14.970	100.45	0.81	1.760	0.985	<0.0001	9.8
	S	2.113	101.09	1.66	0.180	0.993	<0.0001	
Imazamox	R	5.267	100.03	1.78	1.905	0.997	<0.0001	4.5
	S	2.184	100.64	1.18	0.423	0.987	<0.0001	
Iodosulfuron	R	0.456	98.09	0.97	2.462	0.975	<0.0001	17.5
	S	2.035	100.30	1.96	0.141	0.997	<0.0001	
Florasulam	R	5.008	99.81	3.34	2.771	0.989	<0.0001	66.0
	S	2.083	100.00	0.89	0.042	0.999	<0.0001	
Flucarbazone	R	7.147	100.00	0.50	203.091	0.998	<0.0001	8.5
	S	3.730	100.26	1.48	23.878	0.979	<0.0001	
Mesosulfuron	R	9.043	100.00	6.39	18.175	0.997	<0.0001	11.9
	S	0.600	100.00	1.23	1.529	0.999	<0.0001	
Ispiribac sodium	R	10.857	101.83	1.90	0.107	0.963	<0.0001	0.16
	S	3.312	88.88	1.75	0.66	0.883	<0.0001	

B= biotipo de jaramago, C= límite inferior, D= límite superior, b= pendiente de Hill, ED₅₀= dosis efectiva requerida para reducir la respuesta de las plantas al 50%, FR= Factor de resistencia (ED₅₀ R / ED₅₀ S), R² =1 - (sumas de cuadrados de la regresión/sumas de cuadrados total corregida). Valor P= nivel de probabilidad de significancia del modelo de regresión no lineal.

**Fig. 3.2.** Efecto tribenuron en biotipos AR₁ y AR₈.**Fig.3.3.** Efecto florasulam en biotipos AR₁ y AR₈.**Fig. 3.4.** Efecto mesosulfuron en AR₁ y AR₈.**Fig. 3.5.** Efecto bispiribac en AR₁ y AR₈.

3.3. Estudios de retención y ángulo de contacto

Se cuantifico la cantidad retenida de solución herbicida (tribenuron metil), y el ángulo de contacto formado por las gotas en la superficie adaxial de hojas pertenecientes a los biotipos resistente (AR_8) y sensible (AR_1) de *S. alba*, para determinar si estos parámetros están relacionados con la absorción, como posible mecanismo asociado a la resistencia de esta especie mala hierba.

La retención de la aspersion de tribenuron metil sobre las hojas de *S. alba* resultó estadísticamente diferente entre los biotipos resistente y sensible ($P=0.0068$). La retención foliar de tribenuron fue 125.6 y 166.1 μL de herbicida g^{-1} de materia seca para AR_1 y AR_8 , respectivamente (Tabla 3.3).

Los ángulos de contacto de las gotas de la solución de tribenuron metil fueron estadísticamente diferentes en las superficies adaxiales de las hojas de plantas del biotipo de *S. alba* ($P<0.0001$), con una confiabilidad del 95%. El valor del ángulo calculado fue consistentemente mayor en hojas del biotipo AR_8 (55.6°) en comparación con el biotipo AR_1 (17.6°) (Tabla 3.3; Figuras 3.6 y 3.7).

Tabla 3.3. Retención de tribenuron ($\mu\text{L g}^{-1}$ de peso seco) y ángulos de contacto de las gotas en plantas AR_8 (R) y AR_1 (S) de *S. alba*.

Biotipo	Retención aspersion* (μL tribenuron g^{-1} materia seca)	Ángulos de contacto *
AR_8	125.6b	55.6°a
AR_1	166.1a	17.6°b

Las medias con letras distintas son significativamente diferentes una de la otra en un mismo parámetro, según la DMS al 5% de Fisher.

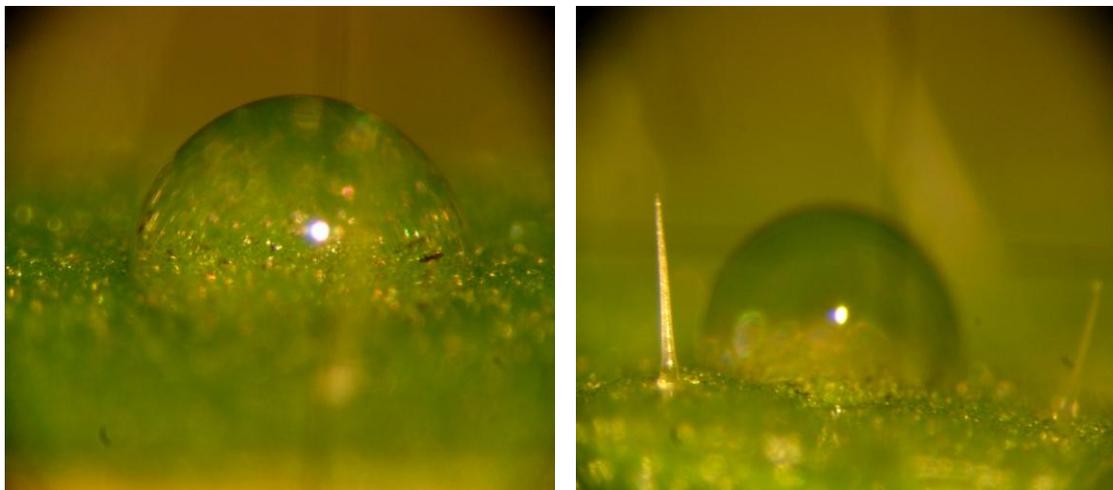


Fig.3.6 Angulo de contacto AR₁ (17.6°).

Fig. 3.7. Angulo de contacto AR₈ (55.6°).

3.4. Absorción y translocación de tribenuron metil

3.4.1. Análisis cuantitativo

Se analizó cuantitativamente el herbicida ¹⁴C-tribenuron metil y la distribución hacia hoja tratada (HT), resto de planta (RP) y raíz. La absorción se estudió a diferentes tiempos (24, 48, 72, 96 y 120 HDT), medida en desintegraciones por minuto (dpm) y expresada como el porcentaje de herbicida en el interior de la planta respecto al total aplicado, no encontrándose diferencias estadísticas significativas entre los biotipos de *S. alba* AR₁ y AR₈ (P 0.6029). La interacción entre biotipos y tiempos de medición de la absorción, no resultó estadísticamente significativa (P 0.9381).

De acuerdo a la cuantificación realizada, los valores de la penetración de ¹⁴C-tribenuron durante los tiempos de medición oscilaron entre 19.1% y 43.5% en el biotipos AR₁(S); en el biotipo AR₈ varió de 19.7% a 41.9% (Fig. 3.8). La Figura 3.9, revela el comportamiento del porcentaje de herbicida que se absorbe desde las 24 HDT (19.4%) hasta las 120 HDT (42.7%).

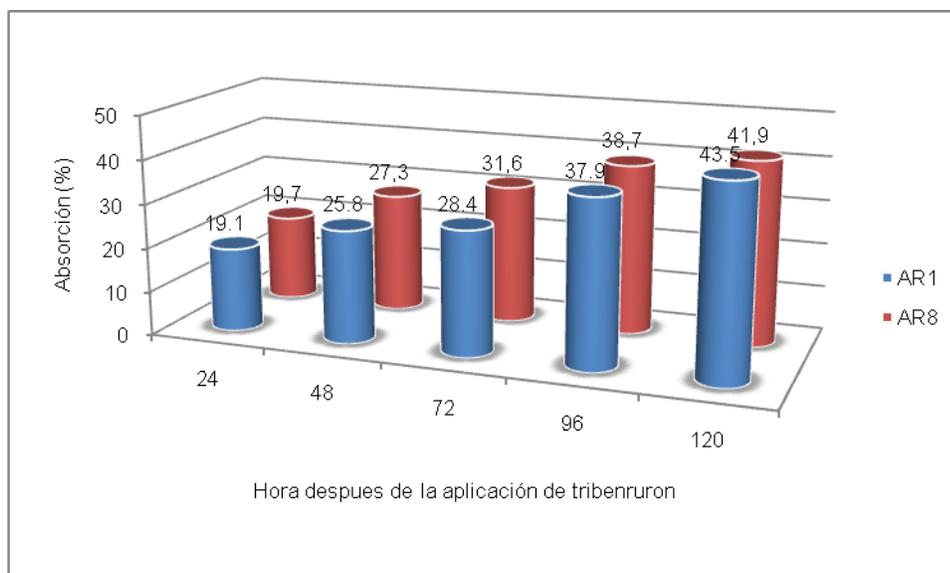


Fig. 3.8. Absorción de ^{14}C -tribenuron metil en dos biotipos de *S. alba*.

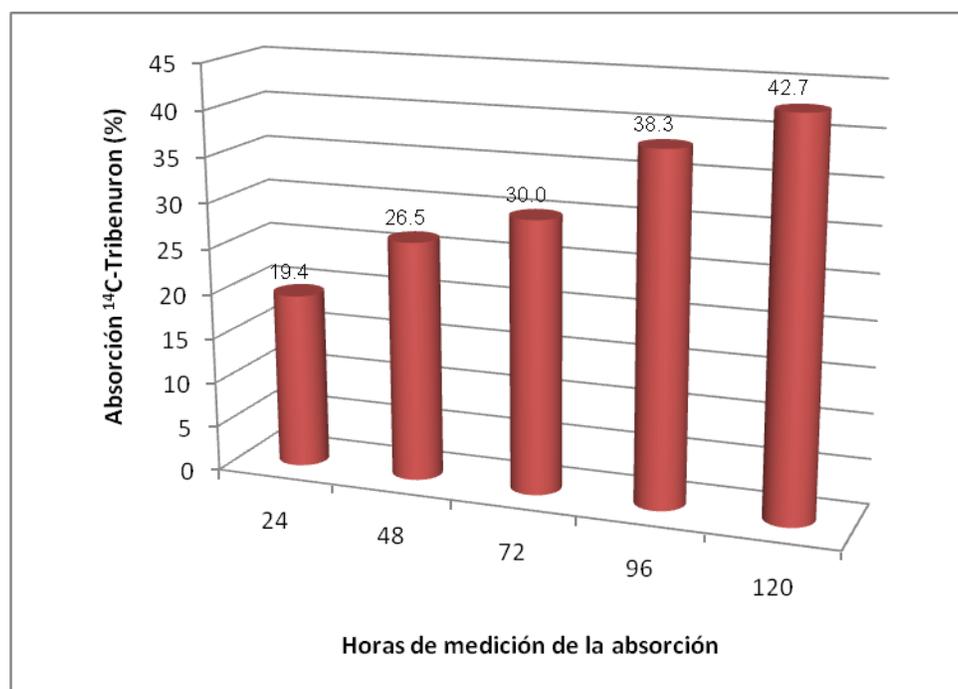


Fig.3.9 Penetración de ^{14}C -tribenuron metil a través del tiempo en *S. alba*.

La translocación de ^{14}C -tribenuron metil hacia los fragmentos en que fueron divididas las plantas tratadas fue estadísticamente similar en ambos biotipos de *S. alba* (AR₁ y AR₈): HT (P 0.0731), RP (P 0.0603) y raíces (P 0.6390).

Según la distribución del ^{14}C -tribenuron metil en los fragmentos de tejidos de las plantas, desde el inicio hasta el final de las mediciones (24 y 120 HDT, respectivamente), los porcentajes del herbicida en la HT variaron entre 93.7% y 83.4%, y entre 94.0% y 78.6%, para AR₁ y AR₈, respectivamente. El movimiento desde HT hacia el resto de la planta (RP) varió entre 5.2% y 15.8% en el biotipo AR₁, mientras que en AR₈ varió de 5.2 a 20.5%. La cantidad de herbicida transportada hacia las raíces resultó igual o inferior a 1.1% en ambos biotipos (Fig. 3.10).

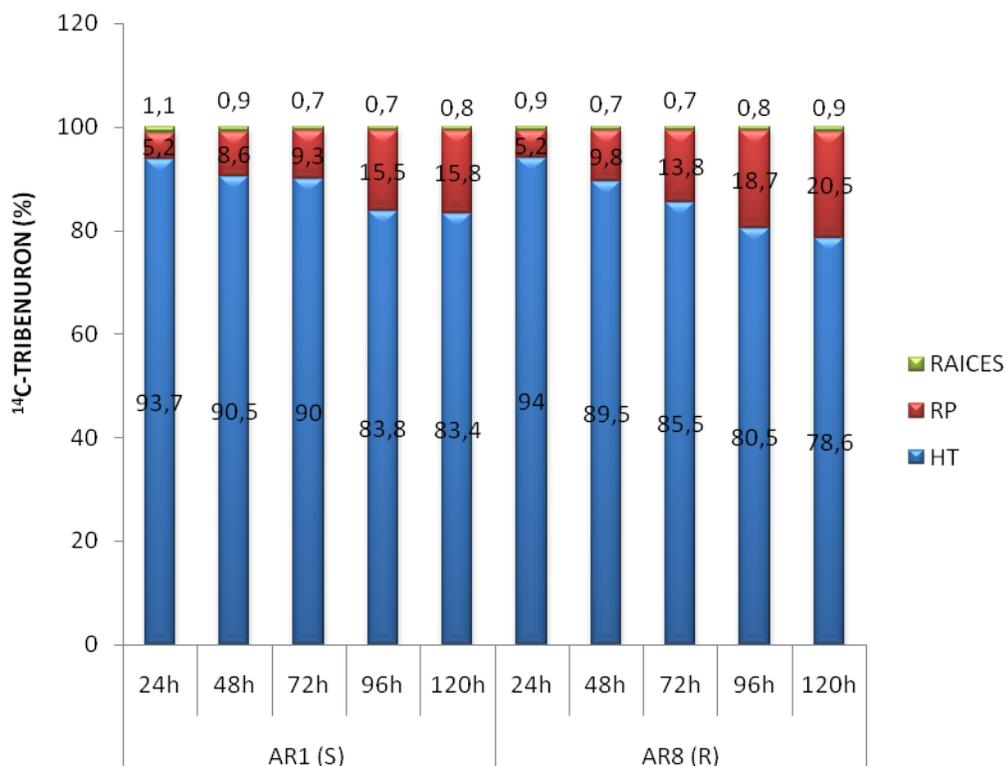


Fig. 3.10. Distribución porcentual de ^{14}C -Tribenuron en biotipos de *S. alba*.

3.4.2. Análisis cualitativo

El análisis cualitativo se realizó mediante autorradiografías. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 3.11 y 3.12. Las zonas coloreadas de rojo indican la radiactividad presente en los tejidos de las plantas de *S. alba*. En ambos biotipos la radiactividad fue detectada principalmente en la hoja tratada 24 HDT, observándose variaciones mínimas. Durante las primeras 48 HDT la mayor parte

del ^{14}C -tribenuron permanece en la hoja tratada de ambos biotipos S y R de *S. alba* (>89.5%). Entre 48 y 96 HDT el herbicida se mueve en proporciones mayores desde la HT hacia el RP y las raíces en los biotipos S y R.

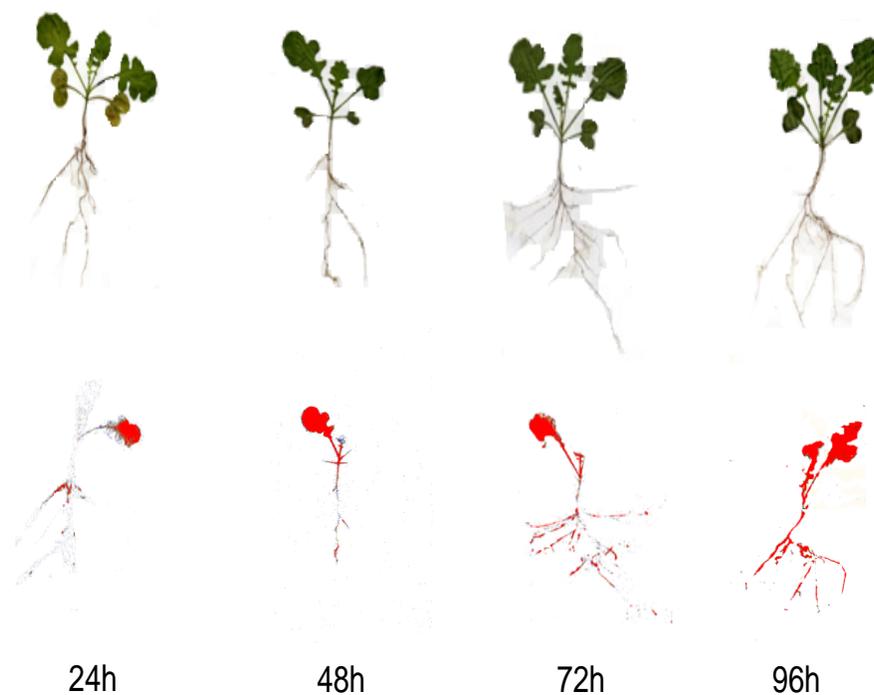


Figura 3.11. Autorradiografías de plantas AR₁ (S), tratadas con ^{14}C -tribenuron metil.

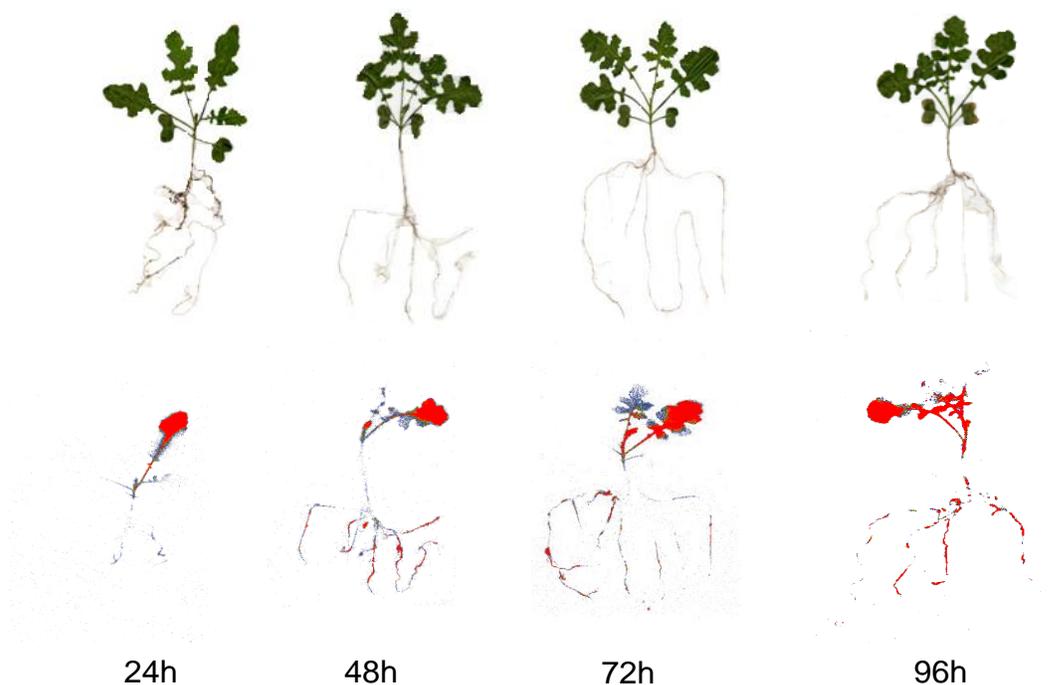


Fig. 3.12. Autorradiografías de plantas AR₈ (R), tratadas con ¹⁴C-tribenuron metil.

3.5. Estudios de fotosíntesis y clorofila (SPAD)

La fotosíntesis medida en plantas tratadas con tribenuron metil, expresada como porcentaje de actividad fotosintética respecto al control no tratado, resultó estadísticamente diferente entre los biotipos de *S. alba* ($P < 0.0000$). Durante las primeras 6 HDT la actividad fotosintética fue de $98.9 \pm 1.2\%$ y $99.4 \pm 1.1\%$ en los biotipos AR₁ y AR₈, respectivamente (Tabla 3.4). Sin embargo, 12 HDT en el biotipo AR₁ (S) la fotosíntesis se reduce a $79.5 \pm 7.1\%$ y en el AR₈ (R) a $98.7 \pm 1.9\%$. A partir de las 24 HDT, la actividad fotosintética del biotipo S disminuyó hasta cerca del 1.0% 144 HDT y la del R se mantuvo por encima del 97.0% a través de los tiempos de evaluación (Tabla 3.4; Fig 3.13).

Para la medida indirecta de la clorofila en la hoja, cuantificada como valores SPAD expresados en porcentaje, el análisis estadístico detectó diferencias significativas entre ambos biotipos de *S. alba* AR₁ y AR₈ ($P = 0.0000$). Los valores

relativos porcentuales de clorofila 6 HDT fueron $86.4\pm 11.9\%$ y $97.7\pm 4.2\%$ en las plantas AR₁ y AR₈, respectivamente. 12 HDT en las plantas AR₁ el porcentaje promedio de clorofila fue de $78.4\pm 7.0\%$, manteniéndose relativamente constante en las evaluaciones siguientes hasta 72 HDT; a partir de las 96 HDT el contenido de clorofila de las hojas en las plantas AR₁ disminuye a un valor mínimo de 33.1 ± 6.7 144 HDT. En cambio, los valores SPAD para AR₈ oscilaron entre $97.7\pm 4.2\%$ (6 HDT) y $98.3\pm 3.0\%$ 96 HDT, observándose una ligera disminución entre 120 y 144 HDT (Tabla 3.4; Fig. 3.14).

Tabla 3.4. Efectos de tribenuron en los Valores SPAD (%) y la fotosíntesis en biotipos de *S. alba*.

HDT	Valores SPAD/biotipo (%)		Actividad fotosintética/biotipo (%)	
	AR ₁	AR ₈	AR ₁	AR ₈
6	86.4±11.9b	97.7±4.2a	98.9±1.2a	99.4±1.1a
12	78.4±7.0cd	98.9±2.3a	79.5±7.1b	98.7±1.9a
24	78.3±6.9cd	99.6±0.6a	39.0±9.1c	98.1±2.9a
48	74.7±7.0de	99.3±0.6a	37,2±6.0c	97.2±3.0a
72	78.0±8.9de	98.9±2.2a	29.9±10.8d	98.8±7.1a
96	72.1±9.9e	98.3±3.0a	25.8±5.8d	99.5±6.2a
120	53.7±6.3f	84.7±8.7a	1.4±0.5e	99.3±0.9a
144	33.1±6.7g	75.2±6.2a	1.1±0.4e	98.1±2.9a
DMS (5%):		1.976		1.977

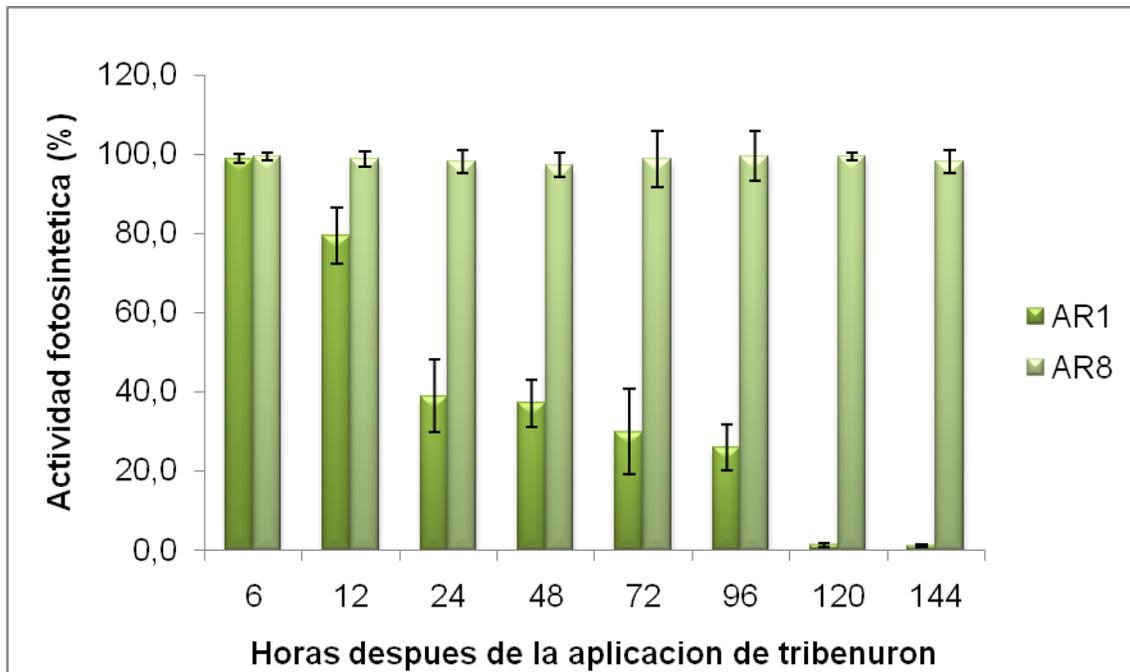


Fig. 3.13 Actividad fotosintética de biotipos S y R de *S. alba* tratados con tribenuron.

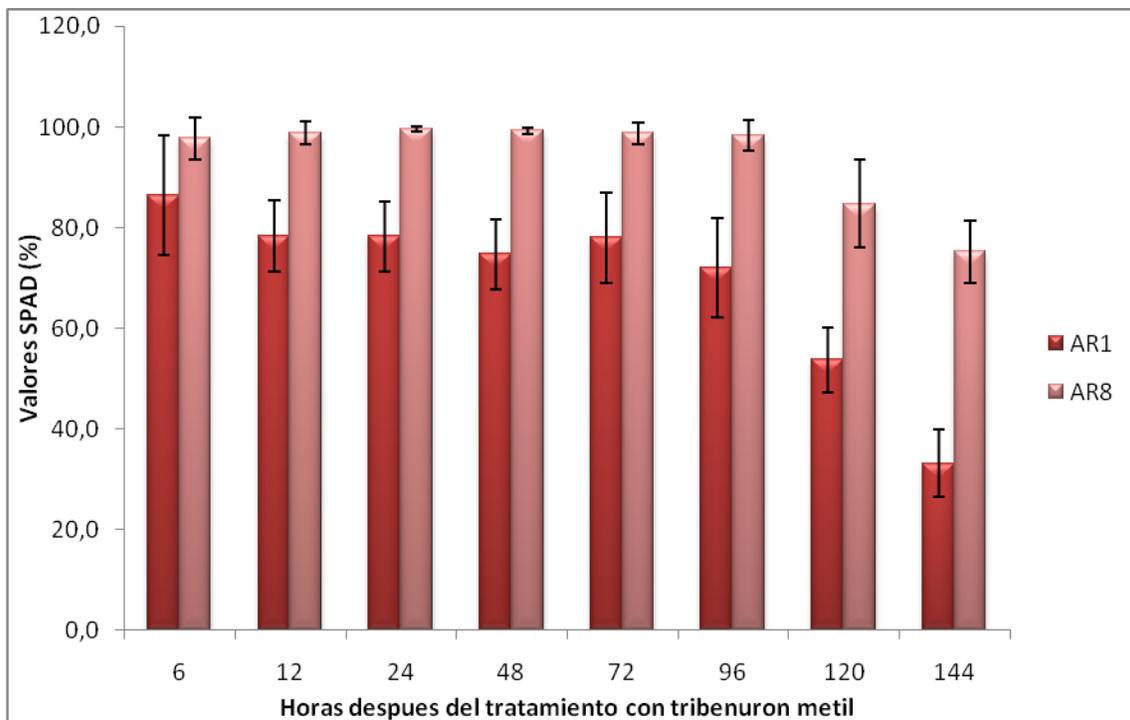


Fig. 3.14 Valores SPAD (%) en biotipos S y R de *S. alba* tratados con tribenuron.

3.6. Densidad de estomas

Los datos fueron analizados mediante el método no paramétrico de Kruskal-Wallis. No se detectaron diferencias estadísticas significativas entre ambos biotipos de *S. alba* (P 0.2684). Las densidades estomáticas resultantes fueron 1.0 ± 0.24 y 1.1 ± 0.30 estomas mm^{-2} para AR₁ y AR₈, respectivamente (Figuras 3.15 y 3.16).

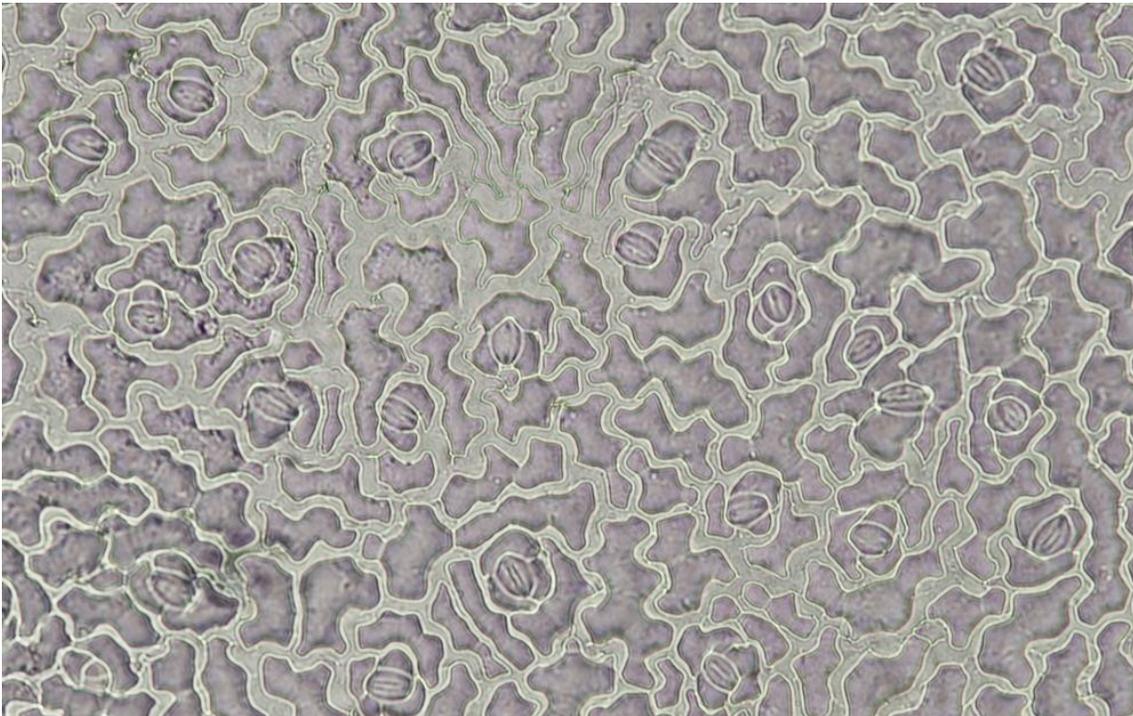


Fig. 3.15. Densidad de estomas en el biotipo AR₁ (S) de *S. alba*.

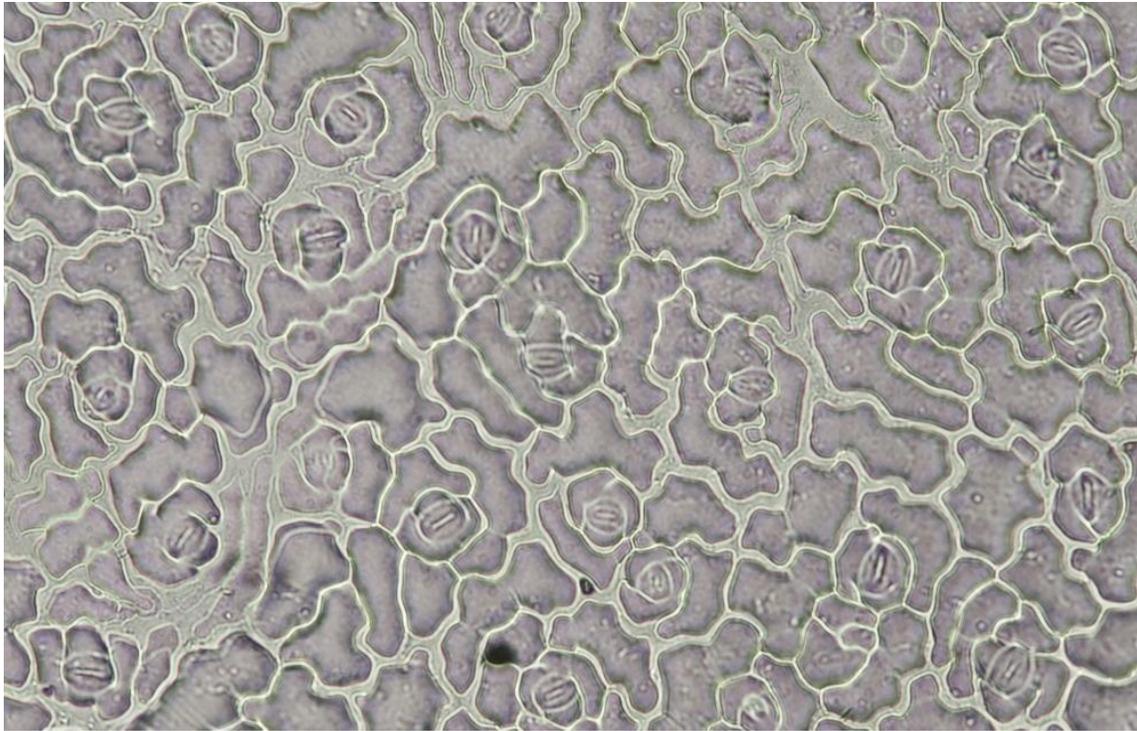


Fig. 3.16. Densidad de estomas en el biotipo AR₈ (R) de *S. alba*.

3.7. Densidad de tricomas

Los datos fueron analizados mediante el método no paramétrico de Kruskal-Wallis. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambos biotipos de *S. alba* (P 0.9173). Las densidades de tricomas fueron $4.46.0 \pm 1.37$ y 4.34 ± 0.47 tricomas mm^{-2} para AR₁ y AR₈, respectivamente (Figuras 3.17 y 3.18).

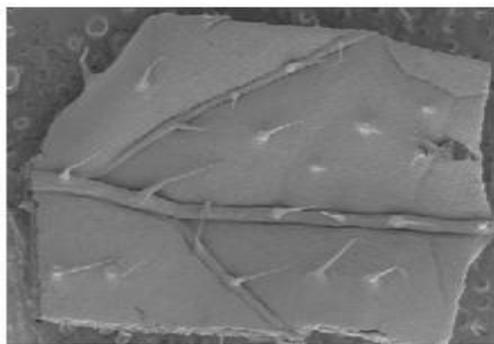


Fig. 3.17. Densidad de tricomas en el biotipo AR₁

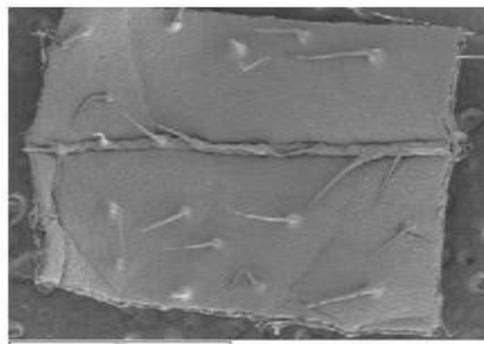


Fig. 3.18. Densidad de tricomas en el biotipo AR₈

3.8. Medición del espesor de la cutícula

Los datos del espesor de cutícula fueron estandarizados mediante la transformación estadística de raíz cuadrada. Se encontraron diferencias estadísticas significativas en el espesor de cutícula de los biotipos AR₁ y AR₈ ($P = 0.0008$). El grosor de la cutícula fue $1.21 \mu\text{m}$ (AR₁) y $1.59 \mu\text{m}$ (AR₈) (Figuras 3.19 y 3.20).

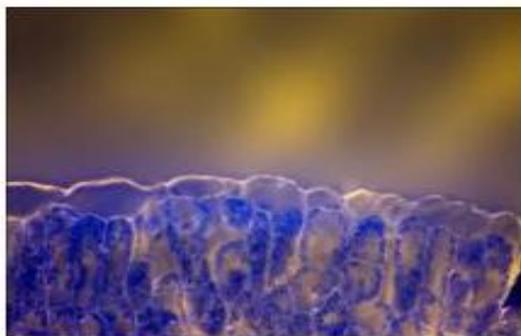


Fig. 3.19. Espesor de cutícula en el biotipo AR₁

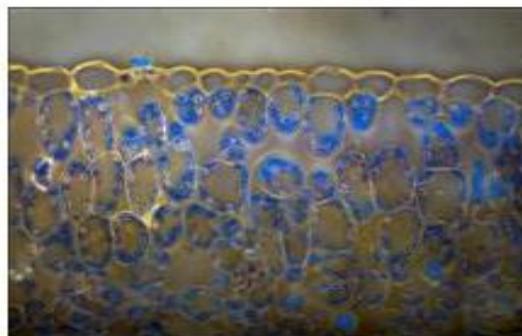


Fig. 3.20. Espesor de cutícula en el biotipo AR₈

3.9. Estudio de la forma de la superficie adaxial

El examen visual de las imágenes del barrido microscópico realizado sobre hojas de *S. alba*, mostró que la forma de la superficie adaxial de las hojas en los biotipos AR₁ y AR₈ es irregular o rugosa y similar, dejando surcos o canales que

facilitan la penetración y limitan el escurrimiento de la solución herbicida (Figuras 3.21 y 3.22).

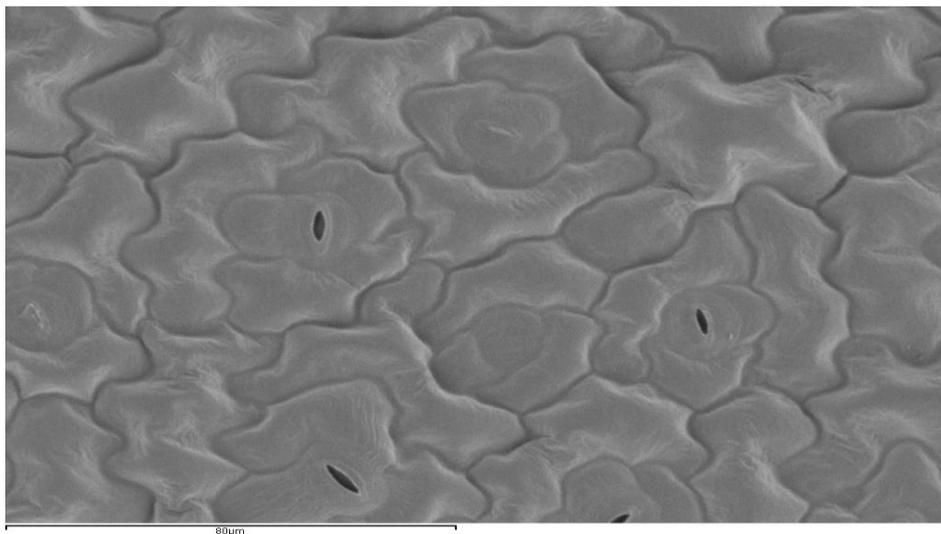


Fig.3.21. Forma de la superficie adaxial en *S. alba* (S); SEM F3 X600 1:80 μm.

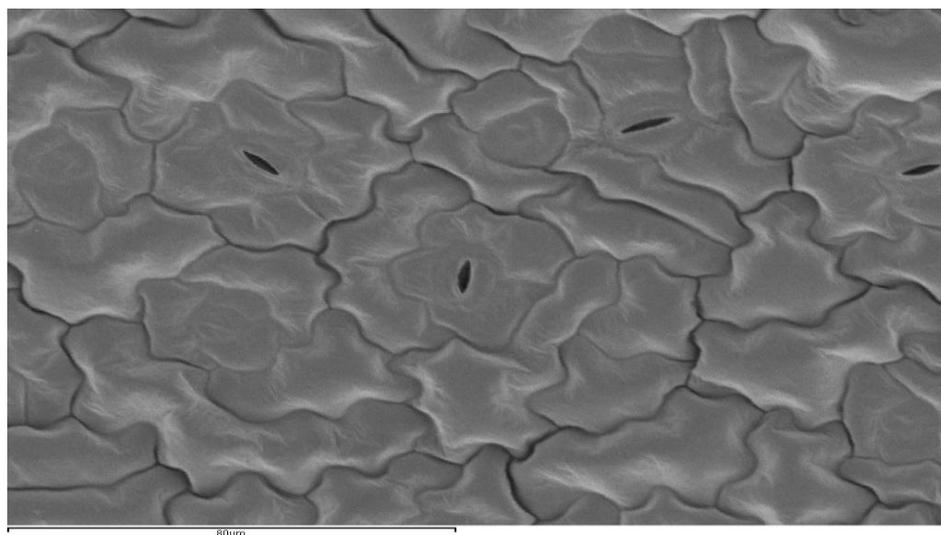


Fig. 3.22. Forma de la superficie adaxial en *S. alba* (R); SEM F3 X600 1:80 μm.

3.10. Metabolismo de tribenuron metil en *S. alba*

Los estudios para investigar el metabolismo de tribenuron metil marcado y saber si contribuye a explicar la resistencia en plantas de *S. alba*, demostraron que el patrón metabólico del ^{14}C -tribenuron metil fue similar 96 horas después del

tratamiento herbicida en ambos biotipos susceptible (AR₁) y resistente (AR₈) de dicha especie. En los biotipos AR₁ y AR₈ los porcentajes de herbicida tóxico fueron 94,4% y 91,6%, respectivamente (Tabla 3.5).

Los análisis de TLC revelaron la presencia del herbicida tribenuron metil y de los metabolitos metsulfuron metil, metsulfuron metil hidroxilado y metsulfuron metil conjugado (Tabla 3.5). La N-demetilación de tribenuron metil a la forma metsulfuron metil (otro herbicida sulfonilurea activo en el control de *S. alba* susceptible) representó la principal ruta metabólica. Después, el herbicida metsulfuron metil fue metabolizado primariamente a través de la hidroxilación del anillo fenil del metsulfuron metil hidroxilado mediante la conjugación de este con carbohidratos. Los dos últimos metabolitos (el metsulfuron hidroxilado y el metsulfuron conjugado con carbohidratos) son productos no tóxicos para las plantas metabolizantes del herbicida tribenuron metil.

Tabla 3.5. Radioactividad residual absorbida (%) presente en tejidos de plantas AR₁ (S) y AR₈ (R) de *S. alba*, correspondiente a los productos metabólicos detectados mediante TLC 96 horas después de la aplicación foliar de ¹⁴C-tribenuron metil.

Biotipos de <i>S. alba</i>	Metabolitos ^a			
	TM	MM	OH-MM	MM-conjugado
AR ₁ (S)	83.4±1.4	11.0±1.1	6.8±0.7	nd
AR ₈ (R)	79.6±2.1	12±1.3	7.2±1.0	1.1±0.6

^aValores promedios ± error estándar. Nd, metabolito no detectado. TM. Tribenuron-metil; MM. Metsulfuron-metil; OH-MM. Metsulfuron-metil hidroxilado.

3.11. Actividad ALS en dos biotipos de *S. alba*.

Se estudió el efecto de diferentes herbicidas sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos y sulfonilaminocarboniltriaolinonas sobre la actividad ALS de extractos obtenidos a partir de tejidos foliares de plantas AR₁

(S) y AR₈ (R) de *S. alba*, en estado de crecimiento de 4-5 hojas, para determinar niveles y patrones de resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de la referida enzima. Los rangos de I₅₀ fueron determinados a nivel nM para la mayoría de los herbicidas, excepto para imazamox, que fue µM.

In-vitro, la actividad específica de ALS en plantas AR₈ (R) y AR₁ (S) de *S. alba* no presentó diferencias significativas, registrando valores de 340 (±19) y 366 (±24) nmol de acetoína mg⁻¹ de proteína h⁻¹, respectivamente.

Los datos de actividad ALS de ambos biotipos AR₈ (R) y AR₁ (S) fueron analizados con el mismo procedimiento estadístico aplicado en los experimentos de dosis respuesta. Para el biotipo AR₈ (R), las concentraciones herbicidas estimadas que redujeron la actividad ALS al 50% (I₅₀) para tribenuron, mesosulfuron, iodosulfuron, florasulam, flucarbazone, imazamox y bispiribac sodio resultaron muchas veces más grandes que las I₅₀ del biotipo AR₁ (S) (Tabla 3.6).

In-vitro, las plantas AR₈ de *S. alba* resultaron altamente resistentes a los herbicidas inhibidores de ALS pertenecientes a las sulfonilureas, tales como tribenuron metil, mesosulfuron y iodosulfuron, cuyos factores de resistencia calculados (I₅₀ AR₈ / I₅₀ AR₁) fueron 4128, 884 y 839. Esta población de *S. alba*, también fue muy resistente a los herbicidas flucarbazone (sulfonilaminocarbonil triazolinona) y florasulam (triazolopirimidina), con FR de 86 y 24, respectivamente. Los valores de resistencia más bajos fueron detectados en los herbicidas bispiribac-sodio (pirimidiniltiobenzoato) e imazamox (imidazolinona), los cuales tuvieron FR de 0.16 y 4.5, respectivamente (Tabla 3.6).

Los resultados in vitro de inhibición de ALS, indican que solo se encontró fuerte resistencia cruzada a tres de las cinco familias de herbicidas inhibidores de ALS disponibles en el mercado (sulfonilurea, sulfonilaminocarbonil triazolinona y triazolopirimidina). Sin embargo, *S. alba* mostró baja o ninguna resistencia cruzada a las familias herbicidas imidazolinona y pirimidiniltiobenzoato, respectivamente.

S. alba registró el siguiente patrón de resistencia cruzada: tribenuron metil>>mesosulfuron>iodosulfuron>>flucarbazone>>florasulam>>imazamox>bispiri bac sodio (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Parámetros estimados de la ecuación de regresión y factores de resistencia (FR) a herbicidas inhibidores de ALS en biotipos R y S de *S. alba*.

Herbicida	B	C	D	B	I_{50}	$R^2_{aj.}$	valor P	FR
Tribenuron	R	3.07	100.66	0.37	908.15	0.91	<0.0001	4128
	S	0.0	99.78	0.63	0.22	0.89	<0.0001	
Imazamox	R	19.46	101.04	1.76	7.80	0.97	<0.0001	1.8
	S	36.70	100.84	2.10	4.39	0.97	<0.0001	
Iodosulfuron	R	18.95	100.03	2.69	427.96	0.97	<0.0001	839
	S	15.95	100	0.56	0.51	0.99	<0.0001	
Florasulam	R	30.23	100.14	0.77	72.10	0.97	<0.0001	24
	S	37.89	101.00	2.99	3.07	0.98	<0.0001	
Flucarbazone	R	24.66	96.84	5.80	3780.37	0.98	<0.0001	86
	S	51.64	100.02	2.67	43.87	0.96	<0.0001	
Mesosulfuron	R	5.25	100.00	1.33	11833.57	0.99	<0.0001	884
	S	69.59	97.57	1.66	13.39	0.90	<0.0001	
Bispiribac s.	R	23.54	100.25	1.26	9.00	0.98	<0.0001	1.6
	S	13.05	100.93	1.29	5.73	0.93	0.0010	

B= biotipo de jaramago, C= límite inferior, D= límite superior, b= pendiente de Hill, I_{50} = concentración efectiva requerida para reducir la respuesta de las plantas al 50%, FR= Factor de resistencia ($I_{50} R/I_{50} S$), $R^2 = 1 - (\text{sumas de cuadrados de la regresión}/\text{sumas de cuadrados total corregida})$. Valor P= nivel de probabilidad de significancia del modelo de regresión no lineal.

3.12. Bases moleculares de la resistencia en *S. alba*

De acuerdo al ADN genómico amplificado, los primers ALS3B/ALS3F y P1/P2 generaron fragmentos de 639 y 501 pares de bases, ambos correspondientes a las regiones de los dominios B y E y C, A y D, respectivamente.

Las secuencias de la región que contiene los dominios B y E del gen ALS de plantas del biotipo AR₈ (R) no difieren de las secuencias de dicho gen encontradas en el biotipo AR₁ (S). La secuencia de la región que contiene los dominios C, A y D del gen ALS del biotipo R difieren de las encontradas en el biotipo S (Figura 3.23).

```

R3P1      GCATAGCGAC TTCAGGTCCC GGAGTACCA ACCTCGTCAG CGGTTTAGCC GACGCGATGC
R7P1      GCATAGCGAC TTCAGGTCCC GGAGTACCA ACCTCGTCAG CGGTTTAGCC GACGCGATGC
R8P1      GCATAGCGAC TTCAGGTCCC GGAGTACCA ACCTCGTCAG CGGTTTAGCC GACGCGATGC
R5P1      GCATAGCGAC TTCAGGTCCC GGAGTACCA ACCTCGTCAG CGGTTTAGCC GACGCGATGC
S1P1      GCATAGCGAC TTCAGGTCCC GGAGTACCA ACCTCGTCAG CGGTTTAGCC GACGCGATGC
R4P1      GCATAGCGAC TTCAGGTCCC GGAGTACCA ACCTCGTCAG CGGTTTAGCC GACGCGATGC
R6P1      GCATAGCGAC TTCAGGTCCC GGAGTACCA ACCTCGTCAG CGGTTTAGCC GACGCGATGC
Clustal Co *****
*****

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 GACAGGTCTC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
R4P1      TTGACAGTGT TCCTCTTGTC GCTATTACAG GACAGGTCTC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
R6P1      TTGACAGTGT TCCTCTTGTC GCTATTACAG GACAGGTCTC TCGTCGGATG ATTGGTACTG
Clustal Co *****
*****

R3P1      ACGCGTTCCA AGAGACACCA ATCGTTGAGG TAACGAGGTC TATTACAAAA CATAACTATC
R7P1      ACGCGTTCCA AGAGACACCA ATCGTTGAGG TAACGAGGTC TATTACAAAA CATAACTATC
R8P1      ACGCGTTCCA AGAGACACCA ATCGTTGAGG TAACGAGGTC TATTACAAAA CATAACTATC
R5P1      ACGCGTTCCA AGAGACACCA ATCGTTGAGG TAACGAGGTC TATTACAAAA CATAACTATC
S1P1      ACGCGTTCCA AGAGACACCA ATCGTTGAGG TAACGAGGTC TATTACAAAA CATAACTATC
R4P1      ACGCGTTCCA AGAGACACCA ATCGTTGAGG TAACGAGGTC TATTACAAAA CATAACTATC
R6P1      ACGCGTTCCA AGAGACACCA ATCGTTGAGG TAACGAGGTC TATTACAAAA CATAACTATC

```

Figura. 3.23 Secuencias de los dominios CAD del gen ALS en plantas AR₈ y AR₁.

En los resultados de 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 AR₈, respecto al biotipo AR₁ (Figura 3.23). La secuenciación de la región de los dominios C y D fueron similares en ambos biotipos R y S de *S. alba*.

3.13. Respuesta de *S. alba* a tribenuron y a otros herbicidas en campo

Se identificó un lote dedicado a la producción de trigo (*Triticum aestivum* L.) en Arriate, Ronda, Málaga, el cual estaba infestado por plantas de una de las poblaciones prospectadas de *S. alba*, que habían escapados y sobrevividos al control con el herbicida sulfonilurea tribenuron metil (Granstar®). Se estableció un experimento repetido en cosechas distintas para verificar la resistencia de campo de *S. alba* a la aplicación de tribenuron metil solo y a otros herbicidas inhibidores

de ALS; así como para identificar herbicidas alternativos eficaces para controlar el problema de resistencia confirmado. Fueron evaluadas las variables control visual de *S. alba*, peso seco de tejidos aéreos de *S. alba* y los rendimientos de trigo. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 3.7 y 3.8.

3.13.1. Control visual de *S. alba*.

El análisis estadístico detectó diferencias significativas entre los tratamientos herbicidas, respecto al control no tratado, en las evaluaciones de control visual de *S. alba* realizadas 30 DDT ($P < 0.0001$) y 96 DDT ($P < 0.0001$). Los tratamientos con mejor control de *S. alba* (30 DDT) fueron (Granstar 50 SG) + Buctril (Octanoato 2,6-dibromo-4-cianofenilo) y Buctril (Octanoato 2,6-dibromo-4-cianofenilo), con 95.6% y 93.3% de control visual, respectivamente. Los herbicidas inhibidores de ALS Nikos 5 SC (florasulam) y Granstar 50 SG (tribenuron metil) aplicados solos presentaron el más bajo control visual de *S. alba* (20.5% y 31.3%, respectivamente). En esta evaluación, el resto de tratamientos controlaron deficientemente (<80%) el biotipo AR₈ de esta maleza (Tabla 3.7 y Figuras 3.24 a 3.27).

En la evaluación 96 DDT, los resultados indicaron que los tratamientos herbicidas con mejor control fueron Granstar combi (MCPA + Tribenuron metil 50%), tribenuron metil Granstar 50 SG (tribenuron metil) + Buctril (Octanoato 2,6-dibromo-4-cianofenilo), Doble Sal, Granstar 50 SG (tribenuron metil) + MCPA y MCPA-sal amina (MCPA), los cuales tuvieron control visual entre 96.5% y 100%. Granstar 50 SG (Tribenuron metil) y Nikos 5 SC (florasulam), resultaron los tratamientos menos eficaces (16.2% y 43.9%, respectivamente) (Tabla 3.7 y Figuras 3.28 a 3.31).

Tabla 3.7. Control herbicida de *S. alba* en cultivo de trigo. Arriate, Málaga, España.

Tratamiento	WSSA (Familia)	Control (%) de <i>S. alba</i> *	
		30 DDT	96 DDT
Control		0.0±0.0a	0.0±0.0a
Florasulam	Triazolopirimidina	20.5±4.2b	43.9±9.12c
Tribenuron metil 50%	Sulfonilurea	31.1±6.9b	16.2±9.29b
MCPP+Tribenuron metil 50%	Auxínico + sulfonilurea	66.7±6.2c	100±0.0d
Tribenuron metil + Octanoato 2,6-dibromo-4-cianofenilo	Auxínico + sulfonilurea	95.6±4.2d	100±0.0d
Tribenuron metil + MCPA	Sulfonilurea + auxínico	70.0±4.1c	98.3±0.61d
MCPA-sal amina + 2,4-D	Auxínico	60.0±17.8c	100±0.0d
MCPA-sal amina	Auxínico	70.0±8.2c	96.5±1.2d
Octanoato 2,6-dibromo-4-cianofenilo	Inhibidor fotosíntesis en el fotosistema II	93.3±4.7d	97.5±0.96d
DMS Fischer, α:0.05		16.96052	9.07208

Medias de tratamientos herbicidas con letras distintas son estadísticamente diferentes (DMS al 5%)

*Promedios de ensayos realizados durante 2008-2009 y 2009-2010.



Fig. 3.24. *S. alba* (AR₈) sin herbicida



Fig. 3.25. Control de *S. alba* con tribenuron



Fig. 3.26. Efecto de florasulam sobre AR₈



Fig. 3.27. Control de *S. alba* con bromoxinil

3.13.2. Efecto de herbicidas en el peso seco de tejidos aéreos de *S. alba*

Los tratamientos herbicidas mostraron diferencias estadísticas significativas en el peso seco de los tejidos aéreos (g m^{-2}) de *S. alba* resistente en campo, respecto al control no tratado ($P < 0.0001$). La mayor producción de biomasa aérea seca se observó en el control no tratado (71.5 g m^{-2}), seguido de Granstar 50 SG (64.5 g m^{-2}) y Nikos (43.3 g m^{-2}). El menor peso seco de tejidos aéreos de *S. alba*, correspondió a las mezclas herbicidas Granstar combi, Granstar 50 SG + Buctril, y Doble Sal, obteniendo control total de dicha mala hierba. Igualmente, Granstar 50 SG + MCPA (1.3 g m^{-2}), Buctril (1.9 g m^{-2}) y MCPA (2.7 g m^{-2}) causaron una fuerte reducción del crecimiento de esta especie (Tabla 3.8 y Figuras 28, 29, 30 y 31).

3.13.3 Efecto de herbicidas sobre el rendimiento de trigo

Los tratamientos herbicidas evaluados tuvieron diferencias estadísticas significativas sobre los rendimientos de trigo, respecto al testigo no tratado ($P < 0.0009$). Los tratamientos con mayor rendimiento fueron Granstar 50 SG + MCPA ($4023.0 \text{ kg ha}^{-1}$), Granstar 50 SG + Butril ($4018.0 \text{ kg ha}^{-1}$), Granstar combi ($3925.0 \text{ kg ha}^{-1}$), D-Sal ($3900.0 \text{ kg ha}^{-1}$), y Buctril ($3798.5 \text{ kg ha}^{-1}$), según se observa en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Efecto de herbicidas en el peso seco de *S. alba* y el rendimiento de trigo (*Triticum aestivum*). Arriate, Málaga, España**.

Tratamiento	WSSA (familia)	Peso seco* (g m^{-2})	Rendimiento* (kg ha^{-1})
Control		71.5±14.9d	2188.0±6.0a
Florasulam	Triazolopirimidina	43.3±7.0b	2329.0±39.0a
Tribenuron metil 50%	Sulfonilurea	64.5±7.2c	2196.0±262.0a
MCPP + Tribenuron metil 50%	Auxínico + sulfonilurea	0.0±0.0a	3925.0±159.0b
Tribenuron metil + Octanoato 2,6-dibromo-4- cianofenilo	Auxínico + sulfonilurea	0.0±0.0a	4018.0±125.0b
Tribenuron metil + MCPA	Sulfonilurea + auxínico	1.3±0.5 ^a	4023.0±145.0b
MCPA-sal amina + 2,4-D	Auxínico	0.0±0.0a	3997.5±572.5b
MCPA-sal amina	Auxínico	2.7±0.9 ^a	3900.0±200.0b
Octanoato 2,6-dibromo-4- cianofenilo	Inhibidor fotosíntesis en el fotosistema II	1.9±0.7 ^a	3798.5±198.5b
DMS Fischer, $\alpha:0.05$		6.99553	792.63611

*Letras distintas implican diferencias estadísticas significativas al 5%; **Promedios de ensayos realizados durante 2008-2009 y 2009-2010.



Fig. 3.28. Sinapis sin herbicida



Fig. 3.29. Control de tribenuron+buctril



Fig. 3.30. Control de tribenuron



Fig. 3.31. Control de florasulam

IV. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Después de la aplicación de herbicidas, la presencia de plantas no controladas no es un criterio suficiente para que el fracaso de la aplicación sea atribuido a la capacidad de estas plantas para resistir los herbicidas asperjados. El fracaso del control herbicida puede ser explicado por factores como la aplicación incorrecta y la ocurrencia de condiciones ambientales inapropiadas para la buena eficacia del producto.

La existencia de resistencia en plantas que han escapado al control con herbicidas debe ser confirmada mediante un proceso de observación de campo, recopilación de información y análisis de las posibles causas asociadas al fracaso del control. Solo después de este proceso se recomienda realizar las investigaciones para esclarecer y documentar la evolución de un nuevo caso de malezas con resistencia a herbicida.

En el caso de *S. alba*, las denuncias de fallas en el control con tribenuron metil en campo fueron verificadas mediante ensayos de screening con plantas tratadas y no tratadas en invernadero, las cuales pertenecían a las poblaciones prospectadas. De acuerdo al efecto del tribenuron sobre el peso fresco de las plantas de las 16 poblaciones estudiadas 3 (AR₁, AR₂ y AR₃) mostraron alta sensibilidad al tribenuron, debido a una fuerte reducción de la producción de biomasa (reducción del crecimiento mayor al 90%). Las plantas de estas poblaciones (AR₁, AR₂ y AR₃) presentaron clorosis, necrosis y muerte posterior 21 DDT. Esto se explica por la alta eficacia biológica del tribenuron en su sitio activo al aplicarse sobre biotipos sensibles.

Las plantas de la población AR₄ desarrollaron síntomas moderados de fitotoxicidad y una reducción de crecimiento de 30%, considerándola tolerante. Sin embargo, la reducción del crecimiento de las poblaciones de AR₅ hasta AR₁₆ fue menos del 13.0%, mostrándose resistentes al tribenuron metil. Todas las plantas de

las poblaciones desde AR₄ hasta AR₁₆ sobrevivieron al tratamiento con tribenuron. Las respuestas de *S. alba* al tratamiento con tribenuron metil revela que el 75% de las poblaciones prospectadas en los diferentes sistemas de producción agrícola donde fue realizada la prospección de semillas, presentaron pérdida de sensibilidad al tribenuron. Las poblaciones de *S. alba* AR₁ [sensible (S)] y AR₈ [resistente (R)] al tribenuron metil, resultaron las más homogéneas en su respuesta al herbicida. La resistencia a tribenuron ha sido confirmada en *S. arvensis*, una especie taxonómicamente emparentada con *S. alba* (Warwick *et al.*, 2005; Christoffer *et al.*, 2006) y en *Galium aparine* (Jian *et al.*, 2011); así como a otros herbicidas inhibidores de la ALS en diferentes especies (Heap, 2010).

Esta pérdida de eficacia de tribenuron se debe a que dicho herbicida ha sido aplicado de forma continua durante los últimos 15 años como método único para el control de *S. alba* en lotes dedicados a la producción de trigo en Arriate, Málaga. Con el tiempo, el uso repetido de este herbicida sulfonilurea ha seleccionado la resistencia detectada en esta especie de mala hierba (Rosario *et al.*, 2010a). Esto ha sido documentado en varias especies de malas hierbas, que resultaron resistentes después de ser controladas con herbicidas inhibidores de ALS durante un periodo extenso (Heap, 2010).

Los niveles y patrones de resistencia cruzada estudiados con las poblaciones AR₁(S) y AR₈ (R) de *S. alba*, permitieron observar diversas respuestas a los herbicidas inhibidores de ALS. El grado de resistencia en las respuestas de *S. alba* osciló entre 66.0 y 0.16 (factor de resistencia; FR). El mayor FR (66.0) *S. alba* lo presentó al herbicida florasulam, que pertenece a la triazolopirimidina. Mientras que en relación a bispiribac-sodio (pirimidiniltiobenzoato) el biotipo AR₈ no resultó resistente, FR de 0.16, mostrando un efecto de control contrario al observado en los demás herbicidas que actúan en el mismo sitio de acción ALS (tribenuron metil, iodosulfuron, mesosulfuron, imazamox y flucarbazone).

El biotipo AR₈ fue altamente resistente a la familia triazolopirimidina (florasulam) y sulfonilurea (tribenuron metil, iodosulfuron, mesosulfuron). Sin embargo, la resistencia en este biotipo solo fue moderada a la sulfonilaminocarboniltriazolinona (flucarbazone) y baja a la familia imidazolinona (imazamox); no encontrándose resistencia a la familia pirimidiniltiobenzoato (bispiribac-sodio).

Respecto al tribenuron metil, el biotipo AR₈ (R) de *S. alba*, necesitó una dosis 9.8 veces mayor que el biotipo AR₁ (S) para reducir en 50% el peso fresco de los tejidos aéreos de las plantas (ED₅₀). Biotipos de *Descurainia sophia* (L.) prospectados en diversos lugares de China, y asperjados con tribenuron a dosis desde 2,8 hasta 1440 g i.a. ha⁻¹, mostraron nivel de resistencia a tribenuron (FR de 118) mayor a los de *S. alba* encontrados en nuestra investigación (Xu *et al.*, 2010). En estudios de dosis-respuesta a tribenuron con la misma mala hierba *Descurainia sophia* (L.), pero colectada en distintos sitios de la provincia Shaanxi, China, se encontraron FR tan alto como 1670.34 (Hai-lan *et al.*, 2009), que son mucho más altos que el FR reportado para *S. alba* en este estudio.

El patrón de resistencia observado *in-vivo* indica que *S. alba* tiene alta resistencia cruzada a florasulam, iodosulfuron, mesosulfuron, tribenuron y a flucarbazone, mientras que a los herbicidas imazamox (imidazolinona) y bispiribac-sodio (pirimidiniltiobenzoato) presento baja o ninguna resistencia cruzada, respectivamente. Patrones de resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de ALS distintos a los encontrados en *S. alba*, han sido reportados en otras especies malas hierbas y en diversos cultivos (Kut *et al.*, 2003a; Kut *et al.*, 2003b; Cruz-Hipólito *et al.*, 2009).

La respuesta diferencial a herbicidas efectivos en el mismo sitio de acción (ALS) se debe a las características propias de cada herbicida, que determinan su modo de acción y una interacción fisiológica distinta en la planta. En condiciones de invernadero, solo fue posible detectar resistencia cruzada a 4 de las 5 familias de

herbicidas inhibidores de ALS disponibles en el mercado. La aplicación de diferentes herbicidas con el mismo sitio de acción (ALS) y pertenecientes a distintas familias químicas, en el caso de *S. alba*, no ha sido garantía para que esta especie resulte resistente a todos los herbicidas estudiados (Mallory-Smith *et al.*, 1990). Durante la última década, la aplicación intensiva de tribenuron metil en diversos cultivos del suroeste español, especialmente en trigo, ha ejercido alta presión de selección causante de pérdida de sensibilidad y resistencia en *S. alba*, a este y otros herbicidas inhibidores de ALS.

A pesar de que actualmente los biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas inhibidores de ALS son los que se incrementan más rápidamente (Heap, 2010), la resistencia a tribenuron solo ha sido documentada científicamente en *Descurainia sophia* L. (Hai-lan *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010), *G. aparine* (Jian *et al.*, 2011), *S. arvensis* (Warwick *et al.*, 2005), *Papaver rhoeas* (Kaloumenos *et al.*, 2009), y en *S. alba* (Cruz-Hipólito *et al.*, 2008).

Aspectos bioquímicos, moleculares, morfológicos, y agronómicos pueden estar relacionados con la expresión de resistencia a herbicidas en diferentes especies malas hierbas. Los estudios de ángulos de contacto de las gotas de la solución de tribenuron metil, consistentemente fueron mayores en el biotipo AR₈ (R) de *S. alba* (55.6°), por lo tanto, la superficie de contacto entre las gotas del herbicida y las hojas fue mucho más pequeña que en el biotipo AR₁ (S) (17.6°). Así, la cantidad de solución herbicida retenida resulta menor sobre las hojas de *S. alba* AR₈ (125.6 µL de herbicida g⁻¹ de materia seca) en comparación con el biotipo sensible AR₁ (166.1 AR₁). La retención foliar diferencial de tribenuron entre biotipos de jaramago, podría ser un factor determinante en la cantidad de herbicida que entre en las hojas de las plantas, lo que podría contribuir en la resistencia y selectividad presentes en especies de malas hierbas y en plantas cultivadas (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991; Kogan y Pérez, 2003).

Determinada la resistencia a nivel fenotípico (in-vivo) y establecida las diferencias de ángulos de contacto y retención del tribenuron en ambos biotipos de

S. alba, se estudian los posibles mecanismos asociados a la resistencia de *S. alba* a inhibidores de ALS. Al respecto, los principales mecanismos propuestos son: disminución de la absorción y/o translocación del herbicida, metabolismo del herbicida y/o modificación del sitio de acción del herbicida (Holt *et al.*, 1993). Estos tres mecanismos principales de resistencia han sido estudiados para describir este carácter de *S. alba*, respecto al tribenuron metil. Así como también estudios en la superficie adaxial foliar y estudios de fotosíntesis, utilizando plantas de biotipos R y S que podrían ayudar a esclarecer la base de la resistencia en *S. alba*.

Los estudios de absorción y translocación y de autorradiografías de tribenuron metil en *S. alba*, demuestran que estos procesos siguieron patrones similares en los biotipos AR₁ (S) y AR₈ (R). En ambos biotipos se encontró una baja tasa de absorción de tribenuron (<44.0%), y en los estudios de translocación se observó que 120 HDT la mayoría del herbicida permaneció en la hoja tratada (78 a 81%). Al concluir el estudio, menos del 21% del tribenuron que penetró en la hoja tratada se movió hacia los tejidos aéreos no tratados, y muy poco herbicida se translocó hacia las raíces (menos del 2%), coincidiendo con la distribución similar del ¹⁴C-tribenuron en los tejidos de las plantas de ambos biotipos, observada mediante imágenes autorradiográficas. Por esta razón, estos procesos no pueden explicar el alto nivel de resistencia a tribenuron encontrado en el biotipo AR₈ de *S. alba*.

Resultados similares a los de *S. alba*, han sido reportados en biotipos de otras especies de malas hierbas, como es el caso de biotipos R y S de *Aster squamatus* (Osuna *et al.*, 2003), y de *Conyza albida* (Osuna and De Prado, 2003), en los cuales la absorción y translocación de imazapir fueron similares y no contribuyeron a explicar la resistencia en estas especies. Estos procesos, tampoco contribuyeron en la expresión de resistencia a bensulfuron metil detectada en *S. mucronatus* (Cruz-Hipólito *et al.*, 2009). Por el contrario, la absorción y translocación diferentes en biotipos S y R de *Bromus tectorum* si contribuyó en la

evolución de resistencia al herbicida propoxycarbazone-sodio, un inhibidor de la ALS (Park *et al.*, 2004).

En muchos casos de biotipos resistentes de malas hierbas a herbicidas, esta resistencia viene determinada por bajos niveles de absorción y/o translocación. Sin embargo, en el caso de los herbicidas inhibidores de la ALS se conocen pocos casos donde estos mecanismos sean los responsables de la aparición de resistencia (Saari *et al.*, 1994).

Los estudios realizados en la superficie adaxial de plantas de biotipos R y S en *S. alba* mostraron que en el caso de la fotosíntesis medida en plantas no tratadas y tratadas con tribenuron metil la actividad fotosintética no es afectada durante las primeras 6 HDT en ambos biotipos AR₁ (98.9±1.2%) y AR₈ (99.4±1.1%). Esto puede deberse a que en ambos biotipos, el herbicida es absorbido y translocado igual y lentamente durante las primeras horas después de la aplicación, sin que llegue al sitio activo, donde desencadenaría consecuencias fitotóxicas letales para las plantas del biotipo S. A partir de las 12 HDT la fotosíntesis cae hasta hacerse casi cero en el sensible 144 HDT, mientras que el resistente fue prácticamente del 100%. Estas diferencias contrastantes en la actividad fotosintética entre ambos biotipos se correlaciona con la alta eficacia biológica del tribenuron observada *in-vitro* sobre la ALS del biotipo sensible AR₁, lo que podría implicar que aunque el tribenuron no es un inhibidor directo de la fotosíntesis en plantas sensibles afecta la ruta de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada en la que el piruvato es un sustrato importante, por lo cual se produce una carencia energética y nutricional que conlleva la segura muerte de las plantas.

Los resultados de fotosíntesis fueron similares a las medidas relativas de clorofila obtenidas con el SPAD, las cuales indicaron diferencias entre ambos biotipos de *S. alba*. El tribenuron redujo el porcentaje de clorofila hasta 33.1±6.7% 144 HDT en el biotipo sensible, pero en el biotipo resistente el herbicida no tuvo

efecto sobre los valores SPAD y los porcentajes de clorofila se mantuvieron próximos al 100% hasta 144 HDT.

Ambas mediciones de actividad fotosintética y clorofila mostraron una tendencia similar en los biotipos estudiados, lo que resulta lógico ya que las clorofilas son los principales pigmentos cloroplásticos responsables de la captación de la radiación solar, que es convertida en energía química en forma de ATP y NADPH durante el proceso de fotosíntesis (Marengo y Lopes, 2005). Y como se observó durante la conducción del estudio las plantas tratadas del biotipo sensible mostraron clorosis inicial a partir de las 72 HDT, evidenciando que el herbicida tribenuron había interrumpido el metabolismo del piruvato y los sustratos utilizados por esta enzima para la síntesis proteica, por lo cual hay un desbalance energético y carencia nutricional en la planta que termina en su muerte. Es claro que el tribenuron metil no es un inhibidor directo de la fotosíntesis y de la síntesis de clorofila en hojas de la planta, pero sí de las reacciones catalizadas por la ALS (Devine *et al.* 1993), con lo cual afecta negativamente y de forma indirecta dichos procesos.

Respecto a las características morfológicas medidas en la superficie adaxial de hojas de *S. alba*, la densidad de estomas fue similar en ambos biotipos AR₁ y AR₈, lo mismo que la densidad de tricomas. Esto implica que en el caso de esta especie dicotiledónea, la densidad estomática y pilosa no influyo en el proceso de absorción de tribenuron y, por tanto, no contribuyeron en el desarrollo de la resistencia identificada. En este sentido, este resultado coincide con Bukoyac (1976), que considera que los estomas y los pelos desempeñan una función menos importante debido a que las materias activas se absorben básicamente en forma directa a través de la cutícula. Esto último fue documentado en especies como *Cyperus spp.* y *G. aparine*, las cuales no poseen estomas en la cara adaxial de la hoja, que es donde ocurre la mayor deposición del pulverizado y donde ocurrirá la absorción foliar (Kogan y Pérez, 2003). Resultados contrarios se encontraron en cultivares de *Lycopersicon sculentus*, en los que la variada tolerancia al herbicida

acifluorfen se explicó a partir de la densidad estomática y de la pilosidad (Ricotta y Masiunas 1992).

El espesor de la cutícula resultó mayor en el biotipo AR₈ (1.59 µm) que en el AR₁ (1.21 µm). Aunque la cutícula es la principal barrera a vencer por cualquier compuesto activo depositado en la superficie foliar, el grosor diferente de esta estructura morfológica no fue suficiente para que la absorción de tribenuron resultara diferente entre los biotipos de *S. alba*, por lo cual no contribuye en la expresión de la resistencia a este herbicida. Ricotta y Masiunas (1992), trabajando con *Lycopersicon sculentus* encontraron que la composición de las ceras epicuticulares no influía en la sensibilidad al acifluorfen. Más importante que el espesor de cutícula (cantidad de ceras), es la estructura molecular y composición química de las ceras epicuticulares, con lo cual podría limitarse la difusión de solutos a través de la cutícula y, por tanto, la retención y absorción de herbicidas (Kogan y Pérez, 2003).

Por otro lado, la microscopía de barrido sobre la superficie foliar de *S. alba* mostró que la forma de la superficie adaxial es irregular o rugosa en los biotipos AR₁ y AR₈. Esta forma similar del relieve de las hojas contribuye a que la penetración de tribenuron haya sido igual y que no constituya un mecanismo de resistencia en esta especie.

El incremento del metabolismo del herbicida es otro mecanismo que conlleva al desarrollo de resistencia o tolerancia a herbicidas en las plantas. Los estudios metabólicos conducidos para investigar el metabolismo de tribenuron en los biotipos AR₁ (S) y AR₈ (R) de *S. alba* mostraron que 96 HDT tribenuron se metaboliza en niveles similares en los biotipos S (94.4%) y R (91.6). En los biotipo S y R tribenuron se transforma primero en metsulfuron metil (metabolito formado por demetilación y que es tóxico para *S. alba*), luego ocurre la hidroxilación de metsulfuron metil, que es no tóxico para *S. alba*. La formación de compuesto conjugado de metsulfuron metil solo ocurrió en tejidos del biotipo R. ción con un

carbohidrato (posiblemente una glucosa), previniendo las consecuencias fitotóxicas que terminan en la muerte de las plantas *S. alba* sensible.

Similares resultados son reportados en biotipos R y S de *C. albida* tratados con imazapir (Osuna and De Prado, 2003) y de *Aster squamatus* (Osuna *et al.*, 2003) entre los cuales no se encontraron diferencias metabólicas. Biotipos S y R de *S. mucronatus*, también presentaron igual metabolismo de bensulfuron metil (Cruz-Hipólito *et al.*, 2009). Lo mismo que en *S. alba*, el metabolismo en las especies referidas no constituye un mecanismo que explique la resistencia a los mencionados herbicidas. En cambio, la resistencia detectada en *S. arvensis* es debida a un rápido metabolismo del herbicida etametsulfuron metil respecto al biotipo sensible (Veldhuis *et al.*, 2000). Este mecanismo de resistencia ha ocurrido con poca frecuencia en biotipos de malezas resistentes a herbicidas inhibidores de ALS (Saari *et al.*, 1994). El metabolismo rápido del herbicida ha sido confirmado en *Lolium rigidum* resistente a chlorsulfuron (Christopher *et al.*, 1992), en *S. arvensis* (Veldhuis *et al.*, 2000). También, este mecanismo se ha detectado en *L. rigidum* con resistencia múltiple a glifosato, ACCasa y a herbicidas inhibidores de ALS (Yu *et al.*, 2009).

La eliminación de los anteriores mecanismos como responsables de la resistencia de *S. alba*, sugiere la posible ocurrencia de cambio en el sitio de acción de los herbicidas estudiados, la ALS. La hipótesis de posible cambio en la ALS ha sido confirmada a nivel enzimático mediante ensayos de actividad *in vitro* y mediante la secuenciación del gen que regula la expresión de la ALS. En los ensayos de actividad *in vitro* se determinaron las I_{50} para las poblaciones R y S, y a partir de ahí el factor de resistencia [$I_{50}(R)/I_{50}(S)$].

In-vitro, la actividad específica de ALS fue similar en ambos biotipos AR₈ (R) y AR₁ (S) de *S. alba*, con 340 ± 19 y 366 ± 24 nmol de acetoína mg^{-1} de proteína h^{-1} , respectivamente. Por lo tanto, la resistencia a tribenuron en *S. alba* puede no haber sido causada por una sobre expresión del sitio de acción herbicida (ALS), Igual a

lo encontrado en *Monochoria vaginalis*, cuya resistencia a inhibidores de ALS no se debió a la sobre expresión de esta proteína (Kuk *et al.*, 2003a).

El más alto nivel de resistencia del biotipo AR₈ fue detectado en los herbicidas sulfonilureas tribenuron (FR de 4128), mesosulfuron (FR de 884) y iodosulfuron (FR de 839), debido a una más fuerte inhibición de la actividad enzimática en las plantas del biotipo sensible de *S. alba*, a baja concentración del herbicida (Brown y Cotterman, 1994; Saari *et al.*, 1992). Según los FR, el biotipo AR₈ necesitó una concentración de tribenuron metil 4128 veces mayor que el AR₁ para reducir la actividad ALS al 50%; este factor de resistencia es mucho mayor que el FR obtenido en el ensayo de dosis-respuesta con tribenuron (9.1) porque el herbicida es aplicado directamente sobre el sitio de acción, sin que deba absorberse y translocarse hasta allá para ejercer la acción fitotóxica.

Diferente a como sucedió en los ensayos in-vivo, *S. alba* en los ensayos in-vitro mostró alta resistencia cruzada a tres de las cinco familias herbicidas inhibidoras de la acetolactato sintasa (SU, TP y SCT). Sin embargo, la resistencia cruzada fue muy baja a las familias IMI y PTB, igual a lo sucedido con *Papaver rhoeas*, que tuvo bajo nivel de resistencia a imidazolinonas y alto nivel de resistencia a sulfonilureas (Durán-Prado *et al.*, 2004).

Se ha observado que la resistencia a un compuesto de una clase particular de herbicidas inhibidores de ALS no es garantía para que se detecte resistencia cruzada a todos los miembros de esa familia química (Mallory-Smith *et al.*, 1990). Un biotipo originalmente seleccionado resistente a bensulfuron metil tuvo menos oportunidad de ser resistente al herbicida bispiribac-sodio, respecto a otros inhibidores de ALS (Merotto *et al.*, 2010).

Resultados distintos fueron reportados en varias especies malezas resistentes a herbicidas inhibidores de ALS, tales como *A. plantago-aquatica*, *S. mucronatus*, *Monochoria vaginalis*, *Cyperus difformis*, *Amaranthus retroflexus* (Kuk

et al., 2003a; Kuk *et al.*, 2003b; Tabacchi *et al.*, 2004; Scarabel *et al.*, 2005; Cruz-Hipolito *et al.*, 2009; Merotto *et al.*, 2010), que presentaron patrones de resistencia diferentes a los de *S. alba*.

La alta resistencia cruzada in vitro de *S. alba* a herbicidas sulfonilureas, como tribenuron, iodosulfuron y mesosulfuron, así como a otros herbicidas inhibidores de ALS puede atribuirse a que el sitio de unión del herbicida (ALS) donde se realiza la acción fitotóxica haya sido alterado (Tranel y Wright, 2002), por lo cual se ha perdido la sensibilidad al herbicida.

Como los ensayos enzimáticos demostraron que la resistencia cruzada de *S. alba* podría estar asociada a cambio en el sitio de acción, especialmente por la fuerte resistencia a los herbicidas sulfonilureas, se procedió a realizar la extracción de la enzima ALS y a la amplificación y secuenciación del gen, con la finalidad de identificar el cambio aminoacídico en la ALS que posibilitara explicar la resistencia al tribenuron en *S. alba*.

La secuenciación del gen ALS detectó una sustitución nucleotídica de citosina (C) por timina (T) en el codón CCT del residuo Prolina en el dominio A. Esta sustitución generó un cambio de **CCT** a **TCT** que estableció la mutación Pro por Ser en la posición 197 de la región del dominio A del gen ALS en el biotipo AR₈ de *S. alba*, según la numeración de la secuencia de aminoácidos de *Arabidopsis thaliana*. La mutación Pro₁₉₇/Ser en el sitio de acción ALS de especies malezas es la causa de alto nivel de resistencia a herbicidas sulfonilureas, y usualmente baja o ninguna resistencia cruzada a herbicidas IMI (Devine y Eberlein, 1997). Esta mutación Pro a Ser fue evidente en los biotipos Starbuck y Birch River de *S. arvensis* que resultaron resistentes a los herbicidas sulfonilureas ethametsulfuron y tribenuron:tifensulfuron (Warwick *et al.*, 2005). En *Kochia scoparia* (L.) Schrad, se detectaron las seis posibles mutaciones en el gen ALS, donde Pro es sustituida por Thr, Ser, Arg, Leu, Gln o Ala, desarrollando resistencia a SUs y IMIs (Guttieri *et al.* 1995). La resistencia del biotipo AR de *Bromus tectorum* a primisulfuron y

sulfosulfuron (SU) y propoxycarbazone sodio (SCT), se debió a un sitio de acción alterado, causado por la mutación Pro/Ser en la posición 197 (Park y Mallory-Smith, 2004), lo que coincide con los resultados obtenidos en *S. alba*. Ocho poblaciones de *Raphanus raphanistrum* resultaron altamente resistentes al herbicida sulfonilurea clorsulfuron y a la triazolopirimidina metosulam y moderadamente resistente a metsulfuron, y también poco o no resistente a imidazolinonas (imazetapir e imazapir), debiéndose esta resistencia a la mutación Pro/Ser en el dominio A del gen ALS (Yu *et al.*, 2004). Contrario a los resultados con *S. alba*, en el biotipo R1 de *S. mucronatus*, con alta resistencia cruzada a SU y a IMI, pero baja resistencia a pirimidiniltiobenzoato (bispiribac-sodio), dicha resistencia se debió al cambio Pro/His (Cruz-Hipólito *et al.*, 2009).

Comunmente, las sustituciones en los sitios de unión de los herbicidas inhibidores de ALS Pro₁₉₇, Al₂₀₅, Asp₃₇₆, Trp₅₇₄, Ser₆₅₃ and Gly₆₅₄ evoluciona resistencia a herbicidas seleccionada en campo (Tranel y Wright, 2002). La mutación en el sitio de acción es considerado el principal mecanismo de resistencia a herbicidas inhibidores de ALS en especies de malas hierbas (Tranel and Wright, 2002; McCourt *et al.*, 2006; Powles and Yu, 2010). Las sustituciones del aminoácido Pro₁₉₇ confieren resistencia al herbicida tribenuron en malezas como *Papaver rhoeas* L (Kaloumenos *et al.*, 2009); *G. aparine* (Jian *et al.*, 2011), igual a como ha sido reportado para *s. alba* en el presente informe. Otras mutaciones, como Trp₅₇₄/Gly, también ha causado resistencia a tribenuron en *G. aparine* (Jian *et al.*, 2011).

Según los resultados de los estudios de absorción, translocación y metabolismo de tribenuron, estos procesos no constituyen un mecanismo fuera del sitio de acción, que pueda explicar la fuerte resistencia confirmada en *S. alba*. Mas bien, de acuerdo con los resultados de los ensayos de actividad ALS, que demostraron alta resistencia a las SU, TP y SCT, así como baja o ninguna resistencia a IMI y PTB, se establece que el único mecanismo identificado para explicar la evolución de resistencia es la mutación Pro₁₉₇/Ser en el dominio A del gen ALS.

En lo que concierne al estudio de la respuesta de *S. alba* a tribenuron y a otros herbicidas, con el fin de identificar tratamiento herbicida alternativo para el control de *S. alba* resistente en condiciones de campo, se observó que el efecto de los tratamientos fue diferente sobre las variables porcentaje de control de *S. alba*, peso seco de los tejidos aéreos, y rendimiento en grano del trigo. El control de *S. alba* fue superior al 93.3% 30 DDT, con los tratamientos a base de Granstar 50 SG + Buctril y Buctril aplicado solo. Mientras que los herbicidas Nikos 5 SC y Granstar 50 SG, ambos inhibidores de ALS mostraron no ser eficaces para controlar *Sinapis* resistente, pues, su eficacia fue solo cercana al 30%. Los restantes tratamientos registraron una eficacia inferior al 80%, por lo que el control resultó no adecuado.

En la segunda evaluación 96 DDT, los tratamientos Granstar combi (MCPA +Tribenuron metil 1%), Granstar 50 SG + Buctril, Doble Sal, Granstar 50 SG + MCPA y MCPA-sal amina registraron una eficacia próxima al 100%. Igual que en la primera evaluación 30 DDT el más bajo control de *S. alba* se observó con los inhibidores de ALS Granstar 50 SG y Nikos 5 SC, con 16.2% y 43.9%, respectivamente. En consecuencia los tratamientos en los cuales hubo una mayor producción de biomasa de *S. alba* fueron Granstar 50 SG y Nikos 5 SC. Los demás tratamientos formulados con otros ingredientes activos, como Granstar combi, Granstar 50 SG + Buctril, Doble Sal, Granstar 50 SG + MCPA, y MCPA resultaron altamente efectivo en reducir la producción de biomasa seca de *Sinapis*, logrando un control casi total.

Las plantas de *S. alba* resistente a tribenuron metil únicamente sufrieron ligeros síntomas fitotóxicos, y formaron flores, frutos y semillas. Sin embargo, cuando estas plantas fueron asperjadas con tratamientos basados en mezclas de inhibidores de ALS y MCPA o Buctril se hicieron evidentes fuertes síntomas fitotóxicos hasta reducir la capacidad de crecimiento para aumentar la producción de peso seco de los tejidos aéreos.

Los tratamientos mejores para el control de *Sinapis* fueron los formulados a base de ingredientes activos con sitio de acción distinto a los inhibidores de ALS (Granstar 50 SG y Niko 5 SC), cuyos rendimientos de trigo fueron cercanos a 4000 kg ha⁻¹. En los tratamientos a base de mezclas de Granstar 50 SG con otros ingredientes activos de mecanismos de acción diferente, el buen efecto del control de *Sinapis* no se debió al efecto del Granstar 50 SG (tribenuron metil), el cual demostró que aplicado sin mezclar era ineficaz para controlar *S. alba* en condiciones de campo.

En experimentos de campo conducidos con avena cv. Duke en trigo cv. Roblin, durante 1989 y 1990, el control de la población resistente con herbicidas sulfonilurea (clorosulfuron, metsulfuron-metil, triasulfuron, amidosulfuron y tifensulfuron) fue pobre. Pero, se obtuvo un control de bueno a excelente cuando se aplicaron tratamientos herbicidas con mecanismos de acción distintos a las sulfonilureas, como cianazina + MCPA; linuron, metribuzina, mecoprop, bentazon, metribuzina + MCPA; linuron + MCPA; y mecoprop + bentazon (O' Donovan *et al.*, 1994).

Estos resultados confirmaron la pérdida de eficacia de tribenuron metil para el control de la población resistente de *S. alba*. Y evidenciaron que las aplicaciones de herbicidas inhibidores de ALS (tribenuron y florasulam) son ineficaces, mientras que otros ingredientes activos (MCPA y bromoxinil) controlaron eficazmente este biotipo resistente.

La aplicación de formulaciones comerciales de tribenuron metil para control de *S. alba* resistente, es una práctica agronómica no económica para los productores de trigo donde esta presente el biotipo resistente de *S. alba*. Por tanto, es muy necesario cambiar la estrategia actual de control químico, sustituyendo el herbicida ineficaz por herbicidas con diferentes modos de acción (Kudsk *et al.*, 1995).

V. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

A partir de las actividades de investigación realizadas y de los resultados alcanzados se obtienen las siguientes conclusiones:

- Las respuestas de las poblaciones de *S. alba* prospectadas en Arriate, Málaga, después de tratadas con el formulado Granstar 50 SG® (tribenuron metil), permitieron confirmar que esta especie ha perdido sensibilidad al referido herbicida, por lo cual escapó al control después de la aspersion bajo invernadero.
- Los ensayos de crecimiento en condiciones de invernadero (*in-vivo*) y de actividad enzimática *in-vitro* confirmaron el carácter resistente de *S. alba* al tribenuron y a otros herbicidas inhibidores de ALS.
- Según los factores de resistencia obtenidos *in-vitro*, *S. alba* mostró fuerte resistencia cruzada a tres de las cinco familias herbicidas inhibidoras de ALS disponibles en mercado: sulfonilurea (tribenuron, mesosulfuron y iodosulfuron), sulfonil-aminocarbonil-triazolinona (flucarbazone-sodio) y a la triazolopirimidina (florasulam). Mientras, a las familias imidazolinona (imazamox) y pirimidiniltiobenzoato (bispiribac-sodio) el nivel de resistencia cruzada fue muy bajo.
- Ensayos realizados con ¹⁴C-tribenuron-metil en *S. alba* R y S descartan fenómenos de absorción, translocación y metabolismo del herbicida como mecanismos responsables de resistencia en el biotipo R.
- La retención foliar y el ángulo de contacto de las gotas de la aspersion, aunque fueron diferentes en ambos biotipos R y S de *S. alba*, no contribuyeron para que la penetración de tribenuron fuera un mecanismo base de la evolución de resistencia en *S. alba*.

- El espesor de la cutícula no influyó en el proceso de absorción foliar del tribenuron metil en los biotipos R y S de *S. alba*, y no contribuye en la expresión de resistencia a dicho herbicida en esta especie.
- La densidad de estomas y de tricomas, así como la forma de la superficie adaxial no influyeron sobre la absorción foliar del tribenuron ni fueron determinante en la expresión del carácter resistente en *S. alba*.
- La aplicación del herbicida tribenuron metil (Granstar 75 WG) disminuyó los valores relativos de clorofila y la actividad fotosintética en plantas sensibles de *S. alba*, debido a su alta eficacia biológica en el sitio de acción ALS.
- Los ensayos de actividad enzimática in-vitro, realizados con extractos preparados a partir de plantas R y S de *S. alba*, indicaron que el mecanismo de resistencia en *S. alba* podría ser la falta de afinidad del tribenuron metil en el sitio de acción (ALS).
- 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 (**CCT** por **TCT**) responsable de la mutación Pro₁₉₇/Ser en el dominio A del gen, la cual es el mecanismo que explica la evolución de resistencia a tribenuron y a otros herbicidas inhibidores de ALS en esta especie.
- Los ensayos con herbicidas a nivel de campo comprobaron la resistencia de *S. alba* al tribenuron metil y a otros herbicidas inhibidores de ALS; identificándose los herbicidas MCPA, Buctril, Granstar combi y D-Sal (MCPA + 2,4-D) como tratamientos alternativos eficaces para el control de *S. alba* resistente en campo.

VI. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- Alarcón, R. (1998) Mecanismos de resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa en biotipos de *Lolium rigidum*. Proyecto Fin de Carrera, E.T.S.I.A.M., Universidad de Córdoba, España.
- Anderson, P.C.; Hibberd, K.A. (1985) Evidence for the interaction of an imidazolinone herbicide with leucine, valine and isoleucine metabolism. *Weed Sci.* 33, 479-483.
- Baker, E.A.; Hayes, A. L.; Butler R.C. (1992) Physico-chemical properties of agrochemicals: their effects on foliar penetration. *Pest. Sci.*, 34:167-182.
- Barrett, M. (2000) The role of cytochrome P450 enzymes in herbicide metabolism. Pages 25–37 in A. H. Cobbs and R. C. Kirkwood, eds. *Herbicides and Their Mechanisms of Action*. Sheffield, Great Britain: Sheffield Academic.
- Bastida, F.; Menéndez, J. (2001) Producción integrada y manejo integrado de malas hierbas. En: *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI* (eds. R De Prado y J Jorrín), pp. 307-316, Universidad de Córdoba, España.
- Beckie, H.; Heap, I.; Smeda, R.; Hall, L. (2000) Screening for Herbicide Resistance in Weeds. *Weed Sci.*14:428-445.
- Bernasconi, P., Woodworth, A.R., Rosen, B.A., Subramanian, M.V. y Siehl, D.L. (1995) A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *Journal of Biological Chemistry* 270: 17381-17385.
- Berner, D.A.; Ikie, F.O.; Green, L.M. (1997) ALS-inhibiting herbicide seed treatment control *Striga hermonthica* in ALS-modified corns (*Zea mays*). *Weed Technol.* 11:704-707.

- Beyer E.M.; Duffy M.J.; Hay J.V.; Schlueter DD (1988) Sulfonylureas. En: Herbicides-Chemistry, Degradation, and Mode of Action (eds. PC Kearney y DD Kaufman), pp. 117-189, Marcel Dekker, New York.
- Boutsalis P.; Karotam, J.; Powles, S. B. (1999) Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. Pestic. Sci. 55,507–516.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254.
- Brown, H. M.; Cotterman, J. C. (1994) Recent advances in sulfonylurea herbicides. In: Chemistry of Plant Protection, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, 10: 49-81.
- Bukoyac, M. (1976) Herbicide entry into plants. In L.J. Audus et al. (ed.) Herbicides. Physiology, Biochemistry, Ecology. Academic Press. London, Vol. 1.: 335-364.
- Calha, I.M.; Osuna, M.D.; Serra, C.; Moreira, I.; De Prado, R.; Rocha, F. (2007) Mechanism of resistance to bensulfuron methyl in *Alisma plantago-aquatica* biotypes from portugues rice paddy fields. Weed Res., vol. 47:231-240.
- Christopher, J.T.; Powles, S. B.; Holtum, J. A. M. (1992) Resistance to acetolactate synthase inhibitor herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). Plant Physiol. 100, 1909-1913.
- Christoffers, J.M.; Nandula, V.K.; Howatt, K. A.; Wehking, T. R. (2006) Target-site resistance to acetolactate synthase inhibitors in wild mustard (*Sinapis arvensis*). Weed Sci., 54:191-197

- Coble, H.D. (1996) Weed management tools and their impact on the agroecosystem. Proceedings of the 2nd International Weed Control Congress: pp. 1143-1146.
- Conway, G.; Toenniessen, G. (1999) Feeding the world in the twenty-first century. *Nature*, 402: C55-8.
- Corbett, C. L. (1994) DNA-based diagnostic tests for the detection acetolactate sintase-inhibiting herbicides resistance in *Amaranthus sp.* MSc thesis. University of Guelph.
- Coruzzi, G.; Last, R. (2000) Amino acids. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds. B Buchanan, W. Gruissem y RL Jones), pp 358-411, John Wiley & Sons, New York.
- Coupland, D. (1991) The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. In: "Herbicide Resistance in Weeds and Crops", (eds. Caseley JC, Cussans GW y Atkin RK), Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, pp. 263-278.
- Cruz-Hipólito, H. E.; Osuna, M. D.; Domínguez-Valenzuela, J. A.; González, F.; Medina-Pitalúa, J. L.; De Prado, R. (2008) Resistencia de *Sinapis alba* a inhibidores de la ALS: primer caso en el mundo. In: XXIX Congreso de la ASOMECIMA. Chiapas, México. 22-24 de octubre.
- Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M.D.; Vidal, R.A.; De Prado, R. (2009) Resistant mechanism to bensulfuron-methyl in biotypes of *Scirpus mucronatus* L. collected in Chilean rice fields. *J. Agric. Food Chem.* 57:4273-4278.
- Dec, J.; Bollag, J.M. (2001) Use of enzymes in bioremediation. In: "Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganism: Similarities and Divergences", (eds. Hall JC, Hoagland RE y Zablotowicz RM), ACS

- Symposium Series 777, Washington DC, American Chemical Society, pp. 182-193.
- Dekker, J. (1997) Herbicides. ALS inhibitors: sulfonilureas. Weeds Biology Laboratory, Iowa State University. USA. Consultado octubre 21, 2010. <http://www.agron.iastate.edu/~weeds/Ag317/manage/herbicide/su.html>
- De Prado, R.; De Prado, J. L.; Osuna, M.D.; Taberner, A.; Heredia, A. (2001) Is diclofop-methyl resistance in *Lolium rigidum* associated with a lack of penetration? Proc. Crop Prot. Conf. Weeds 8A:545–550.
- De Prado, J. L.; De Prado, R.; Shimabukuro, R. H. (1999) The effect of diclofop on membrane potential, ethylene induction and herbicide phytotoxicity in resistant and susceptible biotypes of grasses. Pest. Biochem. *Physiol.* 63: 1-14.
- De Prado, R. y Menéndez J (1997) Cross-resistance and herbicide metabolism in *Alopecurus myosuroides*. En: *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants* (ed. KK Hatzios), pp. 351-366, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- De Prado, R.; Sanchez, M.; Jorrín, J.; Dominguez, C. (1992) Negative cross-resistance to bentazone and pyridate in atrazine-resistant *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus hybridus* biotypes. Pest. Sci. 35: 131-136.
- De Prado, R.; Cruz-Hipólito; Rosario, J. M. (2010) Mecanismos de Resistencia de las malas hierbas a los herbicidas. En: 46^{ta} Reunión Anual de la Sociedad Caribeña de Cultivos Alimenticios. Boca Chica, República Dominicana. 11-17 de Julio.

- De Prado, R.; Franco, A. (2004) Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Sci.*, 52:441-447.
- De Prado, R.; López-Martínez, N.; Gimenez-Espinosa, R. (1997) Herbicide-resistant weeds in Europe: agricultural, physiological and biochemical aspects. En: *Weed and Crop Resistance to Herbicides* (eds. R De Prado, J Jorrín y L García-Torres), pp. 17-27, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- De Prado, R.; Plaisance, K.L.; Menendez, J.; Gronwald, J.W. (1996) Effect of graminicide herbicides on growth and ACCase activity in a chlortoluron-resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. In: *Proceedings of the International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides* (eds. R De Prado, J Jorrín, L García-Torres y G Marshall), pp. 59-61, Universidad de Córdoba, España.
- Devine, M.D.; Duke, S. O.; Fedtke, C. (1993) *Physiology of herbicide action*, (eds. Prentice Hall), Englewood Cliffs, USA. 441 pp.
- Devine, M.D.; Eberlein, C. V. (1997) Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites. In: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology* (eds. RM Roe, JD Burton y RJ Kuhr), pp. 159-185, IOS Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Devine, M. D.; Shimabukuro, R. H. (1994) Resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. En: "Herbicide Resistance in Plants", (eds. Powles SB y Holtum JAM), CRC Press, Boca Raton, pp. 141-170
- Devine, M. D.; Shukla, A. (2000) Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection* 19: 881-889.

- Duke, S. O.; Christy, A. L.; Hess, F. D.; Holt, Z. S. (1991) "Herbicide- Resistant Crops". Comments from CAST 1991-1, Council of Agricultural Science and Technology, Ames, I. A.
- Durán-Prado, M.; Osuna, M. D.; De Prado, R.; Franco, A. R. (2004) Molecular basis of resistance to sulfonylureas in *Papaver rhoeas*. Pesticide Biochem. and Physiol., 79:10-17.
- Eberlein, C. V.; Guttieri, M.J.; Mallory-Smith, C.A.; Thill, D.C. (1997) Effects of mutation for ALS-inhibitor resistance on ALS activity in resistant and susceptible near-isonuclear *Lactuca*-lines. In: Weed and Crop Resistance to Herbicides (eds. R De Prado, J. Jorrín y L. García-Torres), pp. 191-196, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Fedtke, C. (1983) Leaf peroxisomes deaminate as-triazinone herbicides. Naturwissenschaften, 70: 199-200.
- Frear, D. S.; Still, G. G. (1968) The metabolism of 3,4-dichloropropionanilide in plants. Partial purification and properties of an aryl acylamidase from rice. Phytochemistry, 7: 913-920.
- Frear, D.S.; Swanson, H.R. and Thalacker, F.W. (1991) Induced microsomal oxidation of diclofop, triasulfuron, clorsulfurón and linuronin wheat. Pesticide Biochem. and Physiol., 41: 274-287.
- Friesen, L. E.; Jones, T. L.; Van A., R. C.; Morrison, I. (2000) Identification of *Avena fatua* populations resistant to imazamethabenz, flamprop, and fenoxaprop-P. Weed Sci., 48:532-540.
- García, L.; Fernández-Quintanilla, C. (1991) Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas, 348 p., Mundi-Prensa, Madrid.

- González-Torralva, F.; Cruz-Hipolito, H.; Bastida, F.; Malleder, N.; Smeda, R.J.; De Prado, R. 2010. Differential Susceptibility to Glyphosate among the Conyza Weed Species in Spain. *J. Agric. and Food Chem.*, 58 (7), 4361-4366.
- Grangeot, M.; Chauvel, B.; Gauvrit, C. 2006. Spray retention, foliar uptake and translocation of glufosinate and glyphosate in *Ambrosia artemisiifolia*. *Weed Res.* 46:152-162.
- Graves, J. B. (1994) Insecticide resistance management strategies. Proceedings of the Beltwide Cotton Production Research Conference: 43-45.
- Gressel, J. (1985) Herbicide tolerance and resistance: alteration of site of activity. En: *Weed Physiology*, Vol II (ed. SO Duke), pp. 160-184, CRC Press, Boca Raton.
- Gronwald, J. W. (1994) Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. En: "Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry", (eds. Powles SB y Holtum JAM), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 27-60.
- Guttieri M. J.; Eberlein, C. V.; Thill, D. C. (1995) Diverse mutations in the acetolactate synthase gene confer chlorsulfuron resistance in *Kochia scoparia* biotypes. *Weed Sci.*, 43: 175-178
- Haigh, T. (2000) Weed competition and control. Visitado septiembre 2010. <http://www.uws.edu.au/vip/haight/vegintrroduction.htm>.
- Hai-lan, C.; Chao-xian, Z.; Hong-jun, Z.; Hong-juan, H.; Shou-hui, W.; Xue, L., Gui-qi, W; Yan, L. (2009) Tribenuron-methyl resistant Flixweed (*Descurainia sophia*). *Agricultural Science in China*, 10 (1):86-91. Science Direct, available online at www.sciencedirect.com. April, 2009.

- Hamamura, K.; Muraoka, T.; Hashimoto, J.; Tsuruya, A.; Takahashi, H.; TAKESHITA, T. (2003) Identification of sulfonylurea-resistant biotypes of paddy field weeds using a novel method based on their rooting responses. *Weed Biol. Manag.* 3, 242–246.
- Harker, K. N. (2004) My View. *Weed Sci.*, 52:183-184.
- Harper, D. R.; Appleby, A. P. (1984) Selectivity factors relative to asulam for *Senecio jacobaea* L. control in *Medicago sativa*". *Weed Res.*, 24, 85-92.
- Hatzios, K. K. (1991) Biotransformations of herbicides in higher plants. En: "Environmental Chemistry of Herbicides", (eds. Grover R and Cessna AJ), Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 141-185
- Hawkes, T. R. (1989) Studies of herbicides which inhibit branched chain amino acid biosynthesis. *Brighthon Crop Protection Conference Monography* 42: 131-38.
- Hawkes, T. R.; Howard, J. L.; Pontin, S. E. (1989) Herbicides that inhibit the biosynthesis of branched chain amino acids. En: *Herbicides and Plant Metabolism* (ed. A. D. Dodge), pp. 113-136, Cambridge University Press, Cambridge.
- Heap, I. (1994) Identification and documentation of herbicide resistance. *Phytoprotection* 7 (Suppl.): 85-90.
- Heap, I. (2002) International survey of herbicide resistant weeds. Annual Report Internet. <http://www.weedscience.com>
- Heap, I. (2010) International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Annual Report Internet. In: www.weedscience.com. visitado. May 29, 2010.

-
- Heredia, A.; Casado, C. G.; Laguna, L.; Reina, J. J.; Serrano, J. M.; Domínguez, E. (1998) La cutícula vegetal: estructura y funciones. *Ecología* N° 12: 293-305.
- Hess, F. D. (1985) Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerance and susceptibility. En: "Weed Physiology: Herbicide Physiology", vol. II, (eds. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, pp. 192-214.
- Hilton, H. W. (1957) Herbicide tolerant strain of weeds. *Hawain Sugar Planters Association Annual Reports*, pp.69
- Hoagland, R. E.; Zablotowicz, R. M. (1998) Biotransformation of fenoxaprop-ethyl by fluorescent pseudomonas. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4759-4765.
- Holm, L.; Doll, J.; Holm, E.; Pancho, J.; Herberger, J. (1997) *World weed: natural histories and distribution*. John Wiley & Sons. Holt, J.S. and LeBaron, H.M. (1990) Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technol.* 4: 141-149.
- Holloway, P. J. (1970) Surface factors affecting the wetting of leaves. *Pesticide Science.* 1:156-163.
- Holt, J. S.; LeBaron, H. M. (1990) Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology* 4: 141-149.
- Holt, J. S., Powles, S. B.; Holtum, J. A. M. (1993) Mechanism and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 44: 203-229.
- HRAC (2008) Classification of herbicides according their mode of action. <http://www.plantprotection.org/HRAC>.

- Huangfu, C.; Song, X.; Qiang, S. (2009) Morphological disparities in the epidermal and anatomical features of the leaf among wild *Brassica juncea* populations. *Weed Biol. and Manag.* 9, 234-242.
- Ibdah, M.; Bar-Ilan, A.; Livnhan, O.; Schloss, J. V.; Barak, Z.; Chipman, D. M. (1996) Homology modelling of the structure of bacterial acetohydroxy acid synthase and examination of the active site by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 35: 16282-16291.
- Inclendon, B. J.; Hall, J. C. (1997) Enzymatic de-esterification of xenobiotics in plants. En: "Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants", (eds. Hatzios KK), NATO ASI Series, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 67-82.
- Jäger, G. (1983) Herbicides. In: *Chemistry of pesticides* (ed. KH Büchel), pp. 322-392, John Wiley & Sons, New York.
- Jian, S.; Jin-xin, W.; Hong-jun, Z.; Jun-liang, L.; Sheng-nan, B. Study on mutations in ALS for resistance to tribenuron-methyl in *Galium aparine* L. *Agricultural Science in China*, 10 (1):86-91. Science Direct, available online at www.sciencedirect.com. January, 2011.
- Jutsum, A. R.; Graham, J. C. (1995) Managing weed resistance: the role of the agrochemical industry. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Weeds*: 557-566.
- Kaloumenos, N. S.; Dordas, C. A.; Diamantidis, G. C.; Eleftherohorinos, I. G. (2009) Multiple Pro₁₉₇ substitutions in the Acetolactate synthase of corn poppy (*Papaver rhoeas*) confer resistance to tribenuron. *Weed Sci.*, 57, 362-368.
- Kendig, A.; Fishel, F. Herbicide Resistance in Weeds. Visited May, 2009. <http://extension.missouri.edu/publications/DisplayPub.aspx?P=G4907>.

- Kishore, G. M.; Shah, D. M. (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. of Biochem.* 57: 27-63.
- Kogan A. M.; Pérez J. A. (2003) *Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción.* Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 333 p.
- Kuk, Y. I.; Jung, H. I.; Kwon, O. D.; Lee, D. J., Burgos, N. R.; Guh, J. O. (2003a) Sulfonylurea herbicide-resistant *Monochoria vaginalis* in Korean rice culture. *Pest Manag Sci* 59:949-961.
- Kuk, Y. I.; Kim, K. H.; Kwon, O. D.; Lee, D. J.; Burgos, N. R.; Jung, S.; Guh, J. O. (2003b) Cross-resistance pattern and alternative herbicides for *Cyperus difformis* resistant to sulfonylurea herbicides in Korea. *Pest Manag Sci* 60:85-94.
- Kudsk, P.; Mathiassen, S. K.; Cotterman, J. C. (1995) Sulfonylurea resistance in *Stellaria media* (L.) Vill. *Weed Res.*, 35:19-24.
- Lamoureux, G. L.; Frear, D. S. (1979) Pesticide metabolism in higher plants: *in vitro* enzyme studies. En: "Xenobiotic Metabolism: In Vitro Methods", (eds. Paulson GD, Frear DS y Marks EP), ACS Symposium Series 97, Washington DC, American Chemical Society, pp. 77-128.
- LeBaron, H. M.; Gressel, J. (1982) *Herbicide Resistance in Plants.* Homer M. Lebaron and Jonathan Gressel (eds.). Wiley-Interscience publication. John Wiley & sons, Inc. United states of America. Page 3.
- Letouze, A.; Gasquez, J.; Vaccara, D. (1997) Development of new reliable quick tests and state of grassweed herbicide resistance in France. En: "Proceedings Brighton Crop Protection Conference –Weeds", pp. 325-330.

- Levitt, G. (1978) Herbicidal sulfonamides. US patent 4127405.
- Mallory-Smith, C. A., Thill, D. C.; Dial, M. J. (1990) Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technol.* 4: 163-168.
- Marenco, R. A.; Lopes, N. F. (2005) *Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*. Viçosa-MG, Editora UFV. 451p.
- McCourt, J. A.; Pang, S. a.; Scott, J. K.; Guddat, L. W.; Duggleby, R. G. (2006) Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *PNAS* January 17, 103 (3), 569-573.
- Menéndez, J. (1997) *Mecanismos de resistencia a herbicidas en biotipos de Alopecurus myosuroides Huds.* Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba.
- Merotto, A.; Jasieniuk, M.; Fischer, A. J. (2010) Distribution and cross-resistance patterns of ALS-inhibiting herbicide resistance in smallflower umbrella sedge (*Cyperus difformis*). *Weed Sci.* 58:22–29
- Meyer, A. M.; Muller, F. (1989) Triasulfuron and its selective behaviour in wheat and *Lolium perenne*. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Weeds*: 441-448.
- Michitte, P.; Prado, R. De; Espinoza, N.; Ruiz-Santaella, J.P.; Gauvrit, C. (2007) Mechanisms of resistance to glyphosate in ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Sci.*, 55:435-440
- Mifflin, B. J. (1971) Cooperative feedback control of barley acetohydroxyacid synthase and leucine, isoleucine and valine, *Arch. Biochem. Biophysiol.* 146, 542-551.

- Moss, S.; Clarke, J.; Blair, A. (1999) The occurrence of herbicide-resistant grassweed in the United Kingdom and a new system for designating resistance in screening assays. En: "Proceedings Brighton Crop Protection Conference-Weeds", pp. 179-184.
- Muenscher, C.M. (1955) Weeds (2a ed.). Macmillan, New York, New York.
- Rollins, R. C. (1993). The Cruciferae of Continental North America. Stanford University Press, Stanford, California.
- O' Donovan, J. T., Jeffers, G. M., Maurice, D., Sharma, M. P. (1994) Investigation of a chlorsulfuron-resistant chickweed [*Stellaria media* (L.) Vill.] population. *Can. J. Plant Sci.* 74, 693-697.
- Osuna, M.D., Ruiz, A.M.; De Prado, R. (2001) Resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS. En: Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI (eds. R De Prado y J Jorrín), pp. 299-306, Universidad de Córdoba, España.
- Osuna, M. D.; De Prado, R. (2003) *Conyza albida*: a new biotype with ALS inhibitor resistance. *Weed Res.*, 43:221–226.
- Osuna, M. D.; Fischer, A. J.; De Prado, R. (2003) Herbicides resistance in *Aster squamatus* conferred by a less sensitive form of acetolactate synthase. *Pest Manag Sci* 59:1210-1216.
- Owen, W.J. (1991) Herbicide metabolism as a basis for selectivity. In: "Target Sites for Herbicide Action", (eds. Kirkwood RC), Pleum Press, New York, pp. 285-314.
- Park, K. W.; Mallory-Smith, C. A. (2004) Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotypes. *Weed Res.*, 44, 71-77.

- Pillmoor, J. B.; Caseley, J. C. (1984) The influence of growth stage and foliage or soil application on the activity of AC 222,293 against *Alopecurus myosuroides* and *Avena fatua*. *Annu. Appl. Biol.* 105:517–527.
- Pont, V.; Collet, G. F. (1980) Métabolisme du chloro-2-(*p*-chlorophényl)-3 propionate de méthyle et problème de sélectivité. *Phytochem.* 19:1361-1363.
- Porter, D.; Kopec, M.; Hofer, U. (2005) Pinoxaden—a new selective postemergence graminicide for wheat and barley. *Weed Sci. Soc. Am* 45:95.
- Powles, S. B; Yu, Q. (2010) Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010.61:317-347.
- Prather, T. S.; Ditomaso, J. M.; Holt, J. S. (2000) Herbicide Resistance, Definition and Management Strategies. Publication of Div. of Ag. and Natural Resources. UC Davis USA. Publication 8012.
- Primiani, M. M., Cotterman, J. C.; Saari, L. L. (1990) Resistance of *Kochia scoparia* to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Weed Technol.* 4: 169-172.
- Pujadas Salva, A.; Hernández Bermejo, J. E. (1988) “Concepto de la mala hierba”. Burgess Publishing Company. Minneapolis
- Radosevich, S.; Holt, J.; Ghersa, C. (1997) *Weed Ecology. Implications for Management*, 589 p., John Wiley and Sons, New York.
- Raffel, H.; Ntelsen, P.; Rueegg, W. (2006) AXIAL™ - Influence of the application timing on the reliable control of grass weeds in cereals. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1039-46. Stuttgart, Germany.
- Ray, T. B. (1984) Site of action of chlorsulfuron. *Plant Physiol.*, 75: 827-831.

- Ribeiro, D. N.; Christoffoleti, P. J.; De Prado, R.; Vargas, L.; Vivian, R.; Martins, B. A. B. (2007) Photosynthesis and respiration rate of *Lolium multiflorum* (italian ryegrass) biotypes Resistant to glyphosate. In: National Meeting and Exposition of American Chemical Society. Chicago, EE.UU. P. 11.
- Ricotta, J. A.; Masiunas, J. B. (1992) Relationship of leaf surface characteristics to acifluorfen tolerance in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) and related species. *Weed Sci.*, 40: 402-407.
- Richter, J.; Powles, S. B. (1993) Pollen expression of herbicide target site resistance genes in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Plant Physiol.* 102: 1037-1041.
- Riederer, M.; Schreiber, L. (1995) Waxes: The transport barriers of plant cuticles. En: *Waxes: Chemistry, molecular biology and functions* pp. 131-156, Hamilton RD, Ed. The Oily Press Dundee.
- Rollins, R. C. (1981) Weeds of the Cruciferae (Brassicaceae) in North America. *J. Arnold Arb.* 62: 517-540.
- Rosario, J. M.; Cruz-Hipolito, H.; Smeda, R. J.; Prado, R. De (2010a) Chemical Control of White Mustard (*Sinapis alba*, L). 62nd. International Symposium on Crop Protection. Ghent University, Ghent, Belgium. May 18th, 2010.
- Rosario J. M.; Cruz-Hipólito; Prado, R. De, (2010b) Resistencia de *Sinapis alba* (mostaza blanca) a inhibidores de acetolactato sintasa y control con herbicidas alternativos en España. En: 46^{ta} Reunión Anual de la Sociedad Caribeña de Cultivos Alimenticios. Boca Chica, República dominicana. 11-17 de Julio, 2010.

- Rubin, B. (1996) Herbicide-resistant weeds the inevitable phenomenon: mechanism, distribution and significance. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* XV: 17-32.
- Ruiz-Santaella, J. P.; Bakkali, Y; Osuna, M. D.; De Prado, R. 2004. *Commun. Appl. Biol. Sci.*, vol. 69 (3):91-96.
- Ryan, G. F. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci.*, 18: 614-616
- Saari, L. L. (1992) Sulfonylurea herbicide resistance in common chickweed, perennial ryegrass, and russian thistle. *Pest. Biochem. and Physiol.*, 42: 110-118.
- Saari, L. L., Cotteaman, J. C.; Thill, D. C. (1994) Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: *Herbicide Resistance in Plants* (eds. SB Powles y JAM Holtum), pp. 83-140, CRC Press, Boca Raton.
- Saari, L. L.; Mauvais, C. J. (1996) Sulfonylurea herbicide resistant-crops. In: *Herbicide Resistant Crops* (ed. SO Duke), pp. 127-143, CRC Press, Boca Raton.
- Saxena, P. K.; King, J. (1990) Lack of cross-resistance of imidazolinone-resistant cell lines of *Datura innoxia* P. Mill. to chlorsulfuron. Evidence for separable sites of action on the target site enzyme. *Plant Physiol.*, 94: 1111-1115.
- Scarabel, L.; Varotto, S.; Sattin, M. 2005. An italian population of *Amaranthus retroflexus* resistant to ALS-inhibiting herbicides: resistance pattern and molecular basis. <http://www.weedscience.org/paper/Sattinamare.doc>. Accessed February 18, 2010.
- Schloss, J. V.; Ciskanik, L. M.; Van Dyk, D. E. (1988) Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. *Nature*, 331: 360-362.

- Schreiber, L.; Riederer, M. (1996) Determination of diffusion coefficients of octadecanoic acid in isolated cuticular waxes and their relationship two cuticular water permeabilities. *Plant Cell Enviromnt.* 19:1075-1082.
- Seefeldt, S.; Jensen, J.; Fuerst, E. (1995) Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships, *Weed Technol.* 9:218–227.
- Senseman, S. A. (2007) *Herbicide Handbook*. 9th edition. WSSA. Lawrence, KS 66044-8897. USA. 458 p.
- Sharma, M. P.; Vanden Bonr, W. H.; McBeath, 1978. “Spray retention, foliar penetration, translocation and selectivity of asulam in wild oats and flax”. *Weed Res.*, 18, 169-73.
- Shaner, D. L.; Anderson, P. C.; Stidham, M. A. (1984) Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.*, 76: 545-546.
- Shaner, D. L.; Robson, P. A. (1985) Absorption, translocation and metabolism of imazapyr in soybean (*Glicine max*), common cocklebur (*Xanthium strumarium*) and velvetleaf (*Abutilon teophrasti*). *Weed Sci.*, 33: 469-475.
- Shaner, D. L., Singh, B. K.; Stidham, M.A. (1990) Interaction of imidazolinone with plant acetohydroxyacid synthase: evidence for in vivo binding and competition with sulfometuron methyl. *J. Agric. Food Chem*, 38: 1279-1282.
- Sherman, T. D.; Vaughn, K. C.; Duke, S. O. (1996) Mechanism of action and resistance to herbicides. En: “Herbicide Resistant Crops”, (eds. Duke SO), CRC Press, Boca Raton. Pp. 14-28.
- Shimabukuro, R. H. (1985) Detoxification of herbicides. In: “Weed Physiology”, Vol. 2, (eds. Duke SO), Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 215-240.
- Singh, B .; Stidham, M.; Shaner, D. (1988) Assay of acetohydroxyacid synthase. *Anal. Biochem* 171:173–179.

- Spillman, J. J. (1984) "Spray impaction, retention, and adhesión: an introduction to basic characteristics." *Pest. Sci.* 15, 97-106
- Streibig, J.; Kudsk, P. (1993) *Herbicide Bioassays*. CRC Press. Boca Ratón, FL. pp. 270.
- Tabacchi, M.; Scarabel, L.; Sattin, M. (2004) Herbicide resistance in italian rice crops: a late developing but fast-evolving story. Proc. MED-RICE Conference, Torino, Italy. 13th to-15th, February.
- Tharayil-Santhakumar, N. (2004) Mechanism of Herbicides Resistance in Weeds. Plant & Soil Sciences University of Massachusetts Amherst, MA. On line book. <http://www.weedscience.com>
- Tranel, P. J.; Wright, T. R. (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Sci.* 50: 700-712.
- Valverde, B. E.; Riches, C. R.; Caseley, J. C. (2000) Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en Centro América con *Echinochloa colona*. Traducción del inglés por Bernal E. Valverde. 1a. ed. San José, C.R. Cámara de Insumos Agropecuarios. 136 p.
- Veldhuis, L. J.; Hall, L. M.; O`Donovan, J. T.; Dyer, W.; Hall, J. C. Metabolism-based resistance of a wild mustard (*S. arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2986-2990.
- Warwick, I. S.; Sauder, C.; Beckie, H. J. (2005) Resistance in Canadian biotypes of wild mustard (*Sinapis arvensis*) to acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Weed Sci.*, 53:631-639.
- Wright, T. R.; Bascomb, N. F.; Sturner, S. F.; Penner, D. (1998) Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in

-
- Wyse, D. L. (1978) Weed Science, Lecture notes. Dept. of Agronomy and plant genetics. University of Minnesota. 189 pp.
- Xu, X.; Wang, G. Q.; Chen, S. L.; Fan, C. Q.; Li, B. H. 2010. Confirmation of Flixweed (*Descurainia sophia*) resistance to tribenuron-methyl using three different assay methods. *Weed Sci.*, 58:56–60
- Yu, Q., Abdallah, I., Han, H., Owen, M.; Powles, S. (2009) Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta*, 230, 713–723
- Yu, Q.; Zhang, X. Q.; Hashem, A.; Walsh, M. J. Stephen, B. P. (2003) ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Sci.*, 51, 831-838.
- Zadoks, J. C. (1992) The cost of change in plant protection. *Journal of Plant Protection in the Tropics* 9 (2): 151-159.
- Zorner, P. S.; Evans, S. L.; Savage, S. D. (1993) The effect of photosynthesis inhibitors on oxygen evolution and fluorescence of illuminated *Chlorella*. *International Journal of Biochemistry and Biophysics* 66: 196-205
- Zwerger, P. (1996) Integrated pest management in developed nations. *Proceedings of the 2nd International Weed Control Conference*: 933-942.