

**MECANISMOS DE RESISTENCIA  
A UREAS-SUSTITUIDAS,  
FOPS Y GLICINAS  
EN  
*Lolium rigidum***

**José Luis de Prado Ruiz-Santaella**

TITULO: *Mecanismos de resistencia a ureas-sustituidas, FOPS y Glicinas en Lolium rigidum*

AUTOR: *José Luis de Prado Ruiz-Santaella*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

ISBN-13: 978-84-695-1682-9



**TÍTULO DE LA TESIS:**

**MECANISMOS DE RESISTENCIA A UREAS-SUSTITUIDAS,  
FOPS Y GLICINAS EN *Lolium rigidum*.**

**DOCTORANDO/A:**

**D. JOSE LUIS DE PRADO RUIZ-SANTAELLA**

**LOS DIRECTORES DE LA TESIS INFORMAN:**

Que el presente trabajo de investigación titulado “**MECANISMOS DE RESISTENCIA A UREAS-SUSTITUIDAS, FOPS Y GLICINAS EN *Lolium rigidum***”, constituye la memoria que presenta **D. José Luis De Prado Ruiz-Santaella**, para aspirar al grado de Doctor en “Biociencias y Ciencias Agroalimentarias”, habiendo sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba, bajo nuestra dirección y supervisión. Consideramos que el doctorando cumple los requisitos legales para optar al grado de Doctor en “Biociencias y Ciencias Agroalimentarias”.

A continuación se presenta una relación de trabajos publicados relacionados con la tesis:

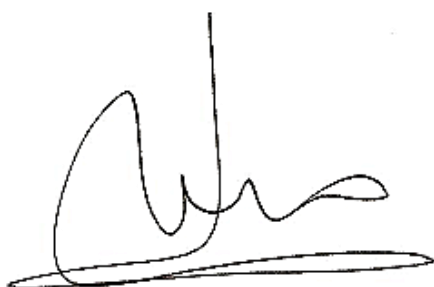
- De Prado, R., De Prado, J.L., Menéndez, J. (1997). Resistance to substituted urea herbicides in *Lolium rigidum* biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **57**: 126-136.

- De Prado, J.L., De Prado, R., Shimabukuro, R.H. (1999). The effect of diclofop-methyl membrane potential and ethylene induction in resistant and susceptible biotypes of grasses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **57**: 126-136.
- De Prado, J.L., Osuna, M.D., Heredia, A., De Prado, R. (2005). *Lolium rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 2185-2191.
- De Prado, J.L., González-Torralva, F., Cruz-Hipólito, H.E., De Prado, R. (2011). Glyphosate efficacy in *Avena sterilis*, *Eleusine indica*, *Lolium rigidum* and *Paspalum distichum* from Spain. *Pest Management Science*. Sometido.

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

Córdoba, 10 de Octubre de 2011

Firma del/de los director/es



Fdo.: R. De Prado



Fdo.: M.D. Osuna

*"Y al hombre dijo: Por cuanto obedeciste a la voz de tu mujer, y comiste del árbol de que te mandé diciendo: No comerás de él; maldita será la tierra por tu causa; con dolor comerás de ella todos los días de tu vida. Espinos y cardos te producirá, y comerás plantas del campo "*

*(Génesis 3: 17- 18).*

Deseo expresar mis agradecimientos a todos aquellos que han contribuido a la realización de esta tesis.

A los Directores del presente trabajo, por la formación que de ellos he recibido, por su tiempo y dedicación.

A todas las personas que forman parte del Departamento de Química Agrícola, por su amabilidad y ayuda.

Al Departamento "Agronomy and Plant Genetics" (St. Paul, MN, USA), en el que he desarrollado parte del trabajo de esta tesis, aprendiendo mucho más de lo que esperaba, y en los que tengo buenos amigos.

A mis amigos, porque siempre han estado ahí, apoyándome y contribuyendo a levantar mi ánimo.

A mi gran familia por estar siempre a mi lado, ayudándome a buscar metas altas

A todos, muchas gracias.

**A mis padres, a  
Macarena, Carmen,  
Emila, Julia y José Luis**

# INDICE GENERAL

Indice de figuras .....	1
Indice de tablas .....	3
Abreviaturas .....	5
Resumen .....	7
Abstract .....	9

## CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. MALAS HIERBAS .....	12
1.1.1. Generalidades .....	12
1.1.2. Importancia agronómica .....	13
1.1.3. Métodos de control.....	15
1.1.3.1. Control preventivo .....	15
1.1.3.2. Control cultural.....	16
1.1.3.3. Control físico.....	16
1.1.3.4. Control biológico .....	17
1.1.3.5. Control químico.....	17
1.2. HERBICIDAS .....	19
1.2.1. Generalidades .....	20
1.2.2. Clasificación y modo de acción de los herbicidas .....	22
1.2.3. Importancia de los herbicidas en la agricultura actual .....	25
1.3. RESISTENCIA DE LAS MALAS HIERBAS A LOS HERBICIDAS .....	27
1.3.1. Generalidades .....	27
1.3.2. Mecanismos de resistencia a herbicidas .....	29
1.4. BIOTIPOS RESISTENTES A HERBICIDAS A NIVEL MUNDIAL .....	41
1.5. REFERENCIAS .....	45

## CAPITULO II

1. INTRODUCCIÓN.....	54
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
2.1. Productos químicos. ....	56
2.2. Material vegetal.....	56
2.3. Condiciones de crecimiento.....	57
2.4. Aislamiento de cloroplastos y medidas de la reacción de Hill.....	57
2.5. Absorción y translocación de clortolurón. ....	57
2.6. Metabolismo del clortolurón. ....	58
2.7. Efecto de ABT sobre el metabolismo.....	59
3. RESULTADOS.....	59
3.1. Respuesta del crecimiento a herbicidas.....	59
3.2. Reacción de Hill.....	61
3.3. Absorción y translocación de clortolurón. ....	61
3.4. Metabolismo de clortolurón. ....	62
3.5. Efecto del ABT en el metabolismo.....	64
4. DISCUSIÓN .....	64
5. REFERENCIAS .....	67

## CAPITULO III

1. INTRODUCCIÓN.....	73
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
2.1. Productos químicos. ....	74
2.2. Material vegetal.....	74
2.3. Ensayos de crecimiento con DM. ....	75
2.4. Penetración de <sup>14</sup> C-DM.....	75
2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	76
2.6. Metabolismo de <sup>14</sup> C-DM. ....	76



2.7. Efecto de ABT sobre el metabolismo de DM. ....	77
2.8. Los ensayos de ACCasa. ....	77
2.9. Western Blotting.....	78
2.10. Determinación de la proteína. ....	78
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>78</b>
3.1. Crecimiento ensayos con DM. ....	78
3.2. Penetración de DM.....	79
3.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	80
3.4. Los estudios del metabolismo de DM. ....	82
3.5. Ensayos de ACCasa.....	84
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>85</b>
<b>5. REFERENCIAS .....</b>	<b>87</b>

## **CAPITULO IV**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>94</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>96</b>
2.1. Productos químicos. ....	96
2.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento. ....	97
2.3. Ensayos dosis-respuesta.....	97
2.4. Ensayo de retención foliar .....	98
2.5. Acumulación de ácido shiquímico. ....	98
2.6. Absorción y translocación de <sup>14</sup> C-glifosato. ....	99
2.7. Visualización de <sup>14</sup> C-glifosato.....	99
2.8. Ensayos de campo. ....	99
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>100</b>
3.1. Ensayos dosis-respuesta.....	100
3.2. Ensayos de retención foliar. ....	101
3.3. Acumulación de ácido shiquímico. ....	102
3.4. Ensayos de absorción y translocación. ....	103
3.5. Ensayos de campo. ....	105

<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>106</b>
---------------------------	------------

<b>5. REFERENCIAS .....</b>	<b>108</b>
-----------------------------	------------

## **CAPITULO V**

<b>1. CONCLUSIONES.....</b>	<b>114</b>
-----------------------------	------------

## **CAPITULO VI**

<b>1. CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>116</b>
---------------------------------	------------

<b>2.PUBLICACIONES.....</b>	<b>121</b>
-----------------------------	------------

# INDICE DE FIGURAS

## CAPITULO I

**Figura 1.1.** Interrelaciones de 6 disciplinas fundamentales en Malherbología (Tomado de Radosevich *et al.*, 1997).

**Figura 1.2.** Avances de la agricultura, hasta el descubrimiento de los primeros herbicidas.

**Figura 1.3.** Secuencia de sucesos desde la entrada en la planta del herbicida hasta la muerte de la planta.

**Figura 1.4.** Mercado mundial de plaguicidas 2007 (Wood Mackenzie, 2009).

**Figura 1.5.** Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas dependiente del sitio de acción.

**Figura 1.6.** Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas independiente del sitio de acción.

**Figura 1.7.** Esquema de secuencias de la entrada de un herbicida desde su absorción / penetración hasta la unión a la proteína de enlace y posterior muerte de la planta (Adaptado de Devine *et al.*, 1993).

**Figura 1.8.** Ruta metabólica de detoxificación de isoproturón en *Lolium rigidum*.

**Figura 1.9.** Ruta metabólica de detoxificación de fenoxaprop-etilo en *Lolium rigidum*.

**Figura 1.10.** Ruta metabólica de detoxificación de pendimetalina en *Lolium rigidum* resistente a dinitroanilinas.

**Figura 1.11.** Rutas metabólicas de detoxificación de herbicidas en malezas (Adaptado de De Prado y Franco, 2004).

**Figura 1.12.** Penetración y translocación de  $^{14}\text{C}$ -glifosato en plantas sensibles (izquierda) y tolerantes (derecha) a glifosato (Cruz-Hipólito *et al.*, 2009b).

**Figura 1.13.** Representación gráfica de los múltiples efectos ocurridos en gramíneas tratadas con diclofop-metil (Adaptado de Shimabukuro y Hoffer, 1997).

**Figura 1.14.** Incremento del número de malas hierbas resistentes a herbicidas hasta el año 2010.

**Figura 1.15.** Número de biotipos resistentes a distintas familias de herbicidas desde que se encontró el primer caso de resistencia hasta el año 2010, distribuido según modo de acción.

**Figura 1.16.** Mapa mundial de la distribución del número de especies de malas hierbas resistentes a herbicidas en el mundo.

## CAPITULO II

**Figura 2.1.** Evolución del crecimiento de diferentes biotipos de *L. rigidum* tratados con clortolurón (2.0 Kg a.i. ha<sup>-1</sup>) e isoproturón (1.0 g a.i. ha<sup>-1</sup>), datos procesados a diferentes tiempos después de la aplicación. Plantas control (○). Plantas tratadas con clortolurón (□). Plantas tratadas con isoproturón (●).

**Figura 2.2.** Absorción y translocación de <sup>14</sup>C-clortolurón en diferentes biotipos de *L. rigidum*. <sup>14</sup>C-tallos (líneas blancas). <sup>14</sup>C-raíces (líneas oscuras).

**Figura 2.3.** Distribución de <sup>14</sup>C-clortolurón y sus metabolitos en biotipos de *L. rigidum* resistentes (R1 y R3) y sensibles (S y R2). La figura muestra los datos de un experimento. La duración de la incubación es expresada como horas de la planta en solución de herbicida / horas en solución nutritiva. <sup>14</sup>C-clortolurón (barras punteadas). <sup>14</sup>C-clortolurón conjugado (barras blancas). Metabolito <sup>14</sup>C- monodemetilado (barras negras). Metabolito <sup>14</sup>C-hidroximetilfenil (barras de líneas).

## CAPITULO III

**Figura 3. 1.** Penetración en diferentes biotipos de *L. rigidum*.

**Figura 3. 2.** Microscopía electrónica de la superficie adaxial de hojas de *L. rigidum* resistente (inferior) y sensible (superior) a DM.

**Figura 3.3.** Distribución de <sup>14</sup>C-DM y sus metabolitos en biotipos de *L. rigidum* preincubados (+ ABT) o no preincubados (-ABT) en 7,5 mg L<sup>-1</sup> de 1. Datos de un experimento típico.

## CAPITULO IV

**Figura 1.** Visualización de <sup>14</sup>C-glifosato en dos biotipos de *L. rigidum* T (izquierda) y NT (derecha) después de 96 horas de tratamiento. Las flechas muestran el lugar del tratamiento.

## INDICE DE TABLAS

### CAPITULO I

**Tabla 1.1.** Número de semillas por planta producidas por algunas especies de malas hierbas.

**Tabla 1.2.** Clasificación de los herbicidas según su modo de acción.

**Tabla 1.3.** Venta mundial de plaguicidas en 2006 y 2007.

**Tabla 1.4.** Resumen de las tres fases del metabolismo de plaguicidas

### CAPITULO II

**Tabla 2.1.** Valores de ED50 de diferentes biotipos de *L. rigidum* tratados con clortoluron (C) e isoproturon (I).

**Tabla 2.2.** Valores de I50 de diferentes biotipos de *L. rigidum* tratados con clortoluron(C) e isoproturon (I).

**Tabla 2.3.** Efecto de ABT (70  $\mu$ M) sobre el metabolismo de <sup>14</sup>C-clortoluron en hojas de biotipos resistentes (R1 y R3) y sensibles (S y R2) de *L. rigidum*.

### CAPITULO III

**Tabla 3. 1.** Efecto de la aplicación de DM sobre el crecimiento de los diferentes biotipos de *L. rigidum*.

**Tabla 3. 2.** Metabolismo de <sup>14</sup>C-DM en biotipos de *L. rigidum* resistentes (R2) y susceptibles (S) 6, 12, 24 y 48 h después del tratamiento.

**Tabla 3. 3.** Efecto de diclofop ácido sobre diferentes fracciones de ACCasa obtenidas por filtración de Sephacryl S400 y cromatografía TMAE de intercambio aniónico de biotipos de *L. rigidum* resistentes (R3) y susceptibles (S) a diclofop-metil.

### CAPITULO IV

**Tabla 4. 1.** Tratamientos con herbicidas y su correspondiente abreviatura.

**Tabla 4. 2.** Parámetros del modelo estadístico usado para la obtención de los valores ED50, (dosis de glifosato requerida para la reducción del 50% del peso fresco) de cada especie de gramínea.

**Tabla 4. 3.** Retención foliar del herbicida glifosato sobre las diferentes especies estudiadas.

**Tabla 4. 4.** Acumulación de ácido shiquímico ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso fresco) en plantas tratadas (T) y no tratadas (NT) después de la aplicación de glifosato a una dosis de 200 g de ia ha<sup>-1</sup>.

**Tabla 4. 5.** Absorción y translocación de <sup>14</sup>C-glifosato en las cuatro especies de gramíneas estudiadas después de 96 h de la aplicación de glifosato.

**Tabla 4. 6.** Evaluación del glifosato y sus mezclas en *Lolium rigidum* (visual y cuantitativa) durante las campañas 2007 y 2008.

## ABREVIATURAS

a.e.	ácido equivalente
ACCasa	acetil CoA carboxilasa
AHAS	acetohidroxiácido sintasa
AIA	ácido indolacético
ALS	acetolactato sintasa
ARMS	amplification refractory mutations system
ASPCR	allele-specific PCR
cit P450	citocromo P450
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide
2,4-D	ácido 2,4-dicloro fenoxi acético
DDA	días después de la aplicación
ddNTP	dideoxinucleótidos
DDT	días después del tratamiento
DHP	dihidropterato sintetasa
DMS	diferencia mínima significativa
DTT	ditiotreitól
ECPA	European Crop Protection Association
ED <sub>50</sub>	dosis de herbicida capaz de reducir en un 50% el peso fresco de las plantas frente al control
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EPSPS	enolpiruvato-sikimato fosfato sintasa
FAA	solución de formaldehído, ácido acético y alcohol
FAD	flavin adenin dinucleótido
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FR	factor de resistencia a herbicida
g	gramo (s)
HDT	hora después del tratamiento
HETPP	hidroxietil tiamina pirofosfato
4-HPPD	4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa
HRAC	Herbicide Resistance Action Committe

I <sub>50</sub>	dosis de herbicida capaz de reducir en un 50% la actividad enzimática
i.a.	ingrediente activo
IM	imidazolinonas
Kb	kilobase
Kg	kilogramo (s)
LD <sub>50</sub>	dosis letal
m.a.	materia activa
MIP	manejo integrado de plagas
nd	no detectado
No-SA	Resistencia fuera del sitio de acción herbicida
PASA	PCR amplification of specific alleles (amplificación por PCR específica de alelo)
PBO	piperonil butóxido
PCR	polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PDS	fitoeno desaturasa
PM	peso molecular
PPO	protoporfirinógeno oxidasa
PSII	fotosistema II
PVPP	polivinilpolipirrolidona
SU	sulfonilureas
TLC	thin layer chromatography (cromatografía de capa fina)
TP	triazolopirimidinas
TPP	tiamina pirofosfato



## RESUMEN

Dos poblaciones de *Lolium rigidum* (R1 y R2) procedentes de un monocultivo de trigo de invierno fueron tratadas con diclofop-metil, mientras que otra población de *L. rigidum* (R3) fue tratada con diclofop-metil + clortolurón o diclofop-metil + isoproturón. El biotipo R1 es resistente a clortolurón y isoproturón (valores de ED50 R1/ED50 S de 6.5 y 4.2, respectivamente), mientras que R3 también exhibe resistencia a clortolurón e isoproturón (valores ED50 R3/ED50 S de 9.26 y 5.53, respectivamente). Biotipo R2, resistente a diclofop-metil, también era sensible a ambas ureas sustituidas igual que el biotipo susceptible (S). El mecanismo de resistencia en los biotipos R1 y R3 no se debe a una afinidad reducida de su diana de acción para herbicidas. No hubo diferencias en la absorción y translocación de [<sup>14</sup>C]-clortolurón en los biotipos resistentes y susceptibles. Los biotipos de *L. rigidum* producían el mismo patrón de metabolitos, pero los biotipos R1 y R3 resistentes destoxificaron el clortolurón a clortolurón-conjugado a una tasa más alta que los biotipos R2 y S susceptibles. En todos los biotipos tratados con 1-aminobenzotriazol, un inhibidor de citocromo P450, N-dealkylation, no se vió afectado, mientras que la hidroxilación de metil de anillo fue fuertemente inhibida. Estos datos sugirieron que el mecanismo de resistencia en ambos biotipos se debe a un metabolismo de clortolurón mediante oxidación de alquil, y esto es mayor en R3 que en R1. La enzima P450 citocromo podría estar involucrada en esta reacción oxidativa.

Tres biotipos de *Lolium rigidum* (R1, R2 and R3) resistentes a diclofop metil (DM) fueron encontrados en campos de trigo invernal en España continuamente tratados con DM, DM + clortolurón, o DM+isoproturón. Se determinaron tasas de herbicida inhibiendo el 50% (ED<sub>50</sub>) del crecimiento de los brotes para DM. Se encontró que los diferentes biotipos exhibieron diferentes rangos de resistencia a este herbicida; los factores de resistencia fueron 7.2, 13 y 36.6, respectivamente. La absorción, metabolismo y efectos en isoformas de ACCasa del DM fueron examinados en estos biotipos de *L. rigidum*. El biotipo más altamente resistente, R3, contenía una isoforma de ACCasa alterada. En el biotipo R2, que mostraba un nivel de resistencia medio, existía una tasa aumentada de oxidación del anillo del aril del diclofop, dicha reacción siendo probablemente catalizada por una enzima citocromo P450. En el otro biotipo,

R1, la penetración del DM fué de modo significativo menor que aquella observada en los biotipos resistentes (R2 y R3) y susceptibles (S). Un análisis de la superficie de la cutícula foliar mediante microscopía electrónica de barrido reveló una mayor densidad de cera epicuticular en las cutículas foliares del biotipo R1 que en los otros biotipos.

Ensayos de laboratorio, invernadero y de campo fueron realizados con el fin de evaluar los niveles de tolerancia de cuatro gramíneas (wild oat (*Avena sterilis*), goosegrass (*Eleusine indica*), rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) y knotgrass (*Paspalum distichum*)) a glifosato. Ensayos *in vivo* sobre plantas enteras no mostraron diferencias a glifosato entre las poblaciones de T (plantas tratadas con glifosato) y NT (plantas no tratadas con glifosato) de *P. distichum*, *E. indica* y *A. sterilis*. Sin embargo, *A. sterilis* fue aproximadamente 3 veces más tolerante que las otras dos especies, mientras que la población de *L. rigidum* T fue 5 veces más resistente a glifosato que la población NT de la misma especie. Los resultados de retención foliar, acumulación de shikimato, y penetración / translocación de glifosato están involucrados en la tolerancia natural de *A. sterilis*. La resistencia mostrada por el biotipo de *L. rigidum* es debida a la combinación de una menor penetración foliar de glifosato y a una menor translocación de éste a la proteína de enlace la EPSPS. Ensayos de campo realizados sobre una población resistente, muestran que glifosato a 1.250 g ai ha<sup>-1</sup> no controlaba *L. rigidum* T (reducción de 51,8%). Sin embargo, glyphosate + flazasulfurón (99.6% reducción), glyphosate + clethodim (97.1% reducción) y glyphosate + quizalafop-p-ethyl (95.1% reducción) resultó en un alto control de *L. rigidum* T. Podemos concluir: 1. Que todas las poblaciones de *Eleusine indica* y *P. distichum* y *L. rigidum* NT son susceptibles; 2. Que todas las poblaciones de *A. sterilis* son tolerantes; y 3. Que la población de *L. rigidum* T es resistente a glifosato.

## ABSTRACT

Two populations of *Lolium rigidum* (R1 and R2) from a monoculture of winter wheat were treated with diclofop-methyl, whereas another population of *L. rigidum* (R3) was treated with diclofop-methyl plus chlorotoluron or diclofop-methyl plus isoproturon. The R1 biotype is resistant to chlorotoluron and isoproturon (ED<sub>50</sub> R1/ED<sub>50</sub> S values of 6.5 and 4.2, respectively), while the R3 also exhibits resistance to chlorotoluron and isoproturon (ED<sub>50</sub> R3/ED<sub>50</sub> S values of 9.26 and 5.53, respectively). The diclofopmethyl-resistant R2 biotype was similarly sensitive to both substituted ureas, as was the susceptible (S) biotype. The resistance mechanism in the R1 and R3 biotypes is not due to reduced target site affinity for herbicides. There was no difference in the absorption and translocation of [<sup>14</sup>C]chlorotoluron in the resistant and susceptible biotypes. *L. rigidum* biotypes produced the same pattern of metabolites, but the R1 and R3 resistant biotypes detoxified the chlorotoluron to conjugated chlorotoluron at a higher rate than the R2 and S susceptible biotypes. In all biotypes treated with 1-aminobenzotriazole, a cytochrome P450 inhibitor, N-dealkylation was not affected, while ring methyl hydroxylation was strongly inhibited. These data suggested that the resistance mechanism in both biotypes is due to chlorotoluron metabolism via alkyl oxidation, and this is greater in R3 than R1. The cytochrome P450 enzyme could be involved in this oxidation reaction.

Three diclofop-methyl (DM) resistant biotypes of *Lolium rigidum* (R1, R2, and R3) were found in different winter wheat fields in Spain, continuously treated with DM, DM + chlortoluron, or DM + isoproturon. Herbicide rates that inhibited shoot growth by 50% (ED<sub>50</sub>) were determined for DM. There were found that the different biotypes exhibited different ranges of resistance to this herbicide; the resistant factors were 7.2, 13, and 36.6, respectively. DM absorption, metabolism, and effects on ACCase isoforms were examined in these biotypes of *L. rigidum*. The most highly resistant, biotype R3 contained an altered isoform of ACCase. In biotype R2, which exhibited a medium level of resistance, there was an increased rate of oxidation of the aryl ring of diclofop, a reaction most likely catalyzed by a cytochrome P450 enzyme. In the other biotype, R1, DM penetration was significantly less than that observed in the resistant

(R2 and R3) and susceptible (S) biotypes. Analysis of the leaf cuticle surface by scanning electron microscopy showed a greater epicuticular wax density in the leaf cuticles of biotype R1 than in the other biotypes.

Greenhouse, laboratory and field experiments were conducted to investigate differences in glyphosate tolerance among grass weeds with a large distribution in Spain: wild oat (*Avena sterilis*), goosegrass (*Eleusine indica*), rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) and knotgrass (*Paspalum distichum*). In vivo testing on whole plants showed no differences between populations T (treated-glyphosate) and NT (untreated-glyphosate) to *P. distichum*, *E. indica* and *A. sterilis*. However, *A. sterilis* was approximately three times more tolerant to glyphosate than the other two grass weed species. The *L. rigidum* T was 5 times more resistant to glyphosate than NT biotypes of the same species. Spray retention tests, shikimate accumulation and penetration / translocation of <sup>14</sup>C-glyphosate are involved in the innate tolerance of *A. sterilis*. Furthermore, glyphosate-resistance in *L. rigidum* was due primarily of the combined action of two traits: limited penetration and impaired translocation to the herbicide. In field trials, glyphosate at 1,250 ai g ha<sup>-1</sup> resulted in bad control of *L. rigidum* T biotypes (51.8 % reduction). However, glyphosate + flazasulfuron (99.6% reduction), glyphosate + clethodim (97.1% reduction) and glyphosate + quizalafop-p-ethyl (95.1% reduction) resulted in the highest *L. rigidum* T control. Therefore, we conclude that three situations have been found for glyphosate efficacy: 1. All populations of *Eleusine indica* and *P. Distichum* and *L.rigidum* NT are susceptible; 2. All populations of *A.sterilis* are natural tolerants; and 3. *L. rigidum* T population is resistant to glyphosate.

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. MALAS HIERBAS

Muchas son las definiciones encontradas en la bibliografía, que definen el concepto de mala hierba, basados en conceptos antropogénicos; es decir, aquellos que incluyen la interferencia que tienen con los objetivos o intereses del hombre, o bien en términos ecológicos basados en las características comunes observadas en especies que repetidamente muestran un comportamiento invasivo de las zonas cultivadas.

Una de las definiciones más aceptadas es la de Anderson (1996), la cual dice que una mala hierba es una “Planta que crece en un lugar no deseado y que interfiere con los intereses del hombre”

### 1.1.1. Generalidades

De las 250,000 especies vegetales existentes en el mundo, sólo 250 se consideran como las principales malas hierbas de la agricultura y de éstas, 76 se han considerado como las “peores malas hierbas del mundo” (Holm *et al.*, 1977). Un 72% de las principales malas hierbas están incluidas en 12 familias botánicas, en las que por número de especies destacan las gramíneas (poaceae) y compuestas (asteraceae).

El carácter invasivo de las malas hierbas, se deben a una serie de características fisiológicas que les confieren mayor capacidad de adaptación, supervivencia y crecimiento con respecto a los cultivos. Entre ellas podemos destacar:

- 1) Fase vegetativa corta y capacidad de reproducción en un estadio muy corto, lo que tiene lugar antes de que se produzca la recolección del cultivo.
- 2) Más de un modo de propagación o dispersión de las diásporas o propágulos: raíces (*Cirsium* spp.), tubérculos (*Cyperus* spp.), rizomas (*Sorghum halepense*), bulbos (*Allium* spp.), estolones (*Cynodon dactylon*), etc.
- 3) Semillas con letargo y gran longevidad.
- 4) Germinación discontinua (escalonada).
- 5) Gran capacidad de producción de semillas (Tabla 1.1)

- 6) Semillas de tamaño similar a las del cultivo.
- 7) Capacidad de regenerarse a partir de tejidos vegetativos.
- 8) Alta capacidad de crecer bajo condiciones adversas. Así por ejemplo *Kochia* spp. es tolerante a suelos muy salinos, *Polygonum aviculare* es tolerante a suelos ácidos y básicos, etc.
- 9) Aspecto poco llamativo, olor y sabor desagradable
- 10) Gran capacidad de competitividad por luz, agua y nutrientes.
- 11) Producción de toxinas (aleloquímicos)
- 12) Hospederas de plagas de las plantas cultivadas.
- 13) De difícil control, con muchos casos de resistencia a herbicidas

**Tabla 1.1.** Número de semillas por planta producidas por 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

### 1.1.2. Importancia agronómica

Las dos citas con las que inicio esta tesis, están recogidas en la Biblia y dan una idea de los escritos antiguos en los que se nombran a las malas hierbas, la primera de ellas, los cardos. La segunda usada en una parábola se trata de *Lolium temulentum*. Desde que el hombre se hizo agricultor tuvo la necesidad de combatir las malas hierbas, al alterar el sistema y cultivar una sola especie en un área determinada. Siendo el origen de las grandes dificultades que conlleva su control, ésta es una característica común bastante notoria, si bien es cierto sobretodo cuando de especies perennes se trata, persistiendo y

adaptándose al laboreo del suelo, al corte (alfalfa, céspedes, prados), a las fechas de siembra y a otras prácticas agrícolas. Los daños ocasionados por las malas hierbas se dividen en 2 grandes grupos: daños directos e indirectos.

Los directos son los que están relacionados con la economía del agricultor, el aumento de los costes de producción, la disminución de las cosechas y pérdida de la calidad de las mismas (Radosevich *et al.*, 1997). Las malas hierbas al compartir características similares a las plantas cultivadas demandan las mismas necesidades (espacio, luz, agua, nutrientes, entre otros factores básicos).

Los daños indirectos que ocasionan es que sirven de refugio y alimento a artrópodos (plagas) y agentes causales de enfermedades (hongos, bacterias, virus y otros agentes).

Se estima que los daños originados por las malas hierbas suponen un 12% de la producción agrícola mundial, ascendiendo este porcentaje hasta un 25-30% en los países menos desarrollados (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991). Estas pérdidas globales se deben a diversas causas (Wyse, 1978).

A continuación se enumeran algunos perjuicios ocasionados por las malas hierbas:

1.- Reducción de los rendimientos: De un modo genérico, las pérdidas de rendimiento debidas a la presencia de malas hierbas en un cultivo dependerán de factores tales como la especie de mala hierba, la densidad de población infestante y el tiempo de contacto entre población y cultivo. Estas pérdidas se asocian a dos tipos de efectos:

- A. Pérdidas de tipo competitivo: Competencia entre mala hierba y cultivo por factores limitantes como agua, nutrientes, luz, etc.
- B. Pérdidas de tipo no competitivo: Desarrollo de fenómenos alelopáticos entre mala hierba y cultivo.

2.- Interferencia en la recolección: Esta interferencia se deriva de los atascos originados en la maquinaria debidos a la existencia de material vegetal verde proveniente de malas hierbas con ciclo diferente al del cultivo.

3.- Incrementos en los costes de producción: Estos incrementos se repartirían entre labores de tipo mecánico (incremento en el número de labores, equipo utilizado y carburante consumido) y en tratamientos herbicidas u otros medios de control.



4.- Reducción en la calidad de los productos: La reducción de la calidad puede expresarse en aspectos tales como:

- A. Transferencia al producto de sabores y olores desagradables procedentes de las poblaciones infestantes.
- B. Presencia en el producto de sustancias tóxicas.
- C. Pérdida de la calificación de semilla certificada.

5.- Reducción en el valor de la tierra: Parcelas intensamente infestadas y/o con un gran banco de semillas sufren un decremento en su valor de venta de hasta un 50%.

### **1.1.3. Métodos de control**

El control de malas hierbas se basa en encontrar la información y las herramientas necesarias para suprimirlas en los cultivos, plantaciones forestales, etc., donde éstas no son deseables, por las razones anteriormente descritas. Para el control de malas hierbas se utilizan medios preventivos, físicos, culturales, biológicos y/o químicos. Estas actividades dan lugar a la modificación o alteración del hábitat de otros organismos, tanto plagas como no plagas. Por otra parte, la presencia de malas hierbas también influye en los hábitats de estos organismos. Entonces, es importante considerar las malas hierbas, así como su control, un componente de los programas de manejo que involucren otros organismos tanto beneficiosos como no beneficiosos. Así, los principales métodos utilizados para el control de malas hierbas son los siguientes:

#### **1.1.3.1. Control preventivo**

Son todos aquellos que evitan la introducción, establecimiento y desarrollo de especies de malas hierbas en áreas no infestadas. Estas medidas pueden ser el uso de semilla certificada libre de semillas ó propágulos de malas hierbas, la eliminación de malas hierbas de balsas, canales de riego y caminos, la limpieza de aperos y maquinaria agrícola usada en áreas infestadas y evitar el acceso del ganado de zonas con alta infestación de malas hierbas a zonas libres. Otra medida de prevención es la restricción de material vegetal entre provincias y países por medio de la cuarentena.

### 1.1.3.2. Control cultural

Son todas aquellas prácticas de manejo que incluyen la selección, rotación de cultivos, sistema, densidad y fecha de siembra, etc. que promueven un mejor desarrollo de la especie cultivada para hacerla más competitiva respecto a la mala hierba. Dicho en otros términos, el control cultural se basa en la utilización de prácticas agrícolas rutinarias que hacen al agroecosistema menos favorable para el crecimiento de malas hierbas.

- A) 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. Son muchos los beneficios de esta práctica ya que, 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.
- B) Cubiertas vegetales: se crecen dos cultivos simultáneamente, aunque uno de ellos es más importante desde el punto de vista económico. Con esto se minimiza la presencia de suelo descubierto, reduciendo la germinación, emergencia y desarrollo de malas hierbas.
- C) Recolección o corte: aunque no es considerado como un método de control en sí, la recolección puede promover cierto nivel de supresión de malas hierbas. Así, por ejemplo, es común recolectar alfalfa varias veces durante el periodo de crecimiento. El ritmo de las operaciones de recolección puede afectar a la disponibilidad de agua así como cambiar ciertas condiciones necesarias para la germinación de la mala hierba.

### 1.1.3.3. Control Físico

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. Consisten, entre otras, en labrar, la retirada manual, quemar, segar, inundar, etc.

#### 1.1.3.4. Control Biológico

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

- a) Pastoreo: Es el método más tradicional y más comúnmente usado para el control biológico de malas hierbas. Se pueden usar gran variedad de animales que sirvan las plantas como alimento: rumiantes, granívoros, insectos, roedores, etc.
- b) Micoherbidas: El uso de patógenos en plantas ha sido ampliamente usado para el control de malas hierbas. Dentro de las ventajas de usar microorganismos están, que estos organismos se obtienen en medios artificiales de una forma barata y fácil. Además estos patógenos pueden ser aplicados en el campo de la misma forma que se aplican los herbicidas. Si el organismo es un hongo, se le da el nombre de micoherbicida. El mayor inconveniente es su especificidad y su sensibilidad al ambiente.
- c) Alelopatía: Es cualquier efecto dañino producido, de forma directa o indirecta, por una planta sobre otra a través de la producción y liberación de sustancias al medio, impidiendo la germinación, emergencia o desarrollo de una mala hierba.

#### 1.1.3.5. 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:

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

- d) Control residual de malas hierbas al aplicar un herbicida de gran persistencia en el suelo.

El uso de herbicidas ha sido la principal herramienta para el control de malas hierbas en sistemas agrícolas de los últimos años.

Un uso inapropiado de los herbicidas reviste severos riesgos en la agricultura. Para evitar dichos problemas es necesario tomar una serie de medidas en las que destacan elegir el producto adecuado, hacer una buena aplicación, respetando las dosis recomendadas por el fabricante, etc.

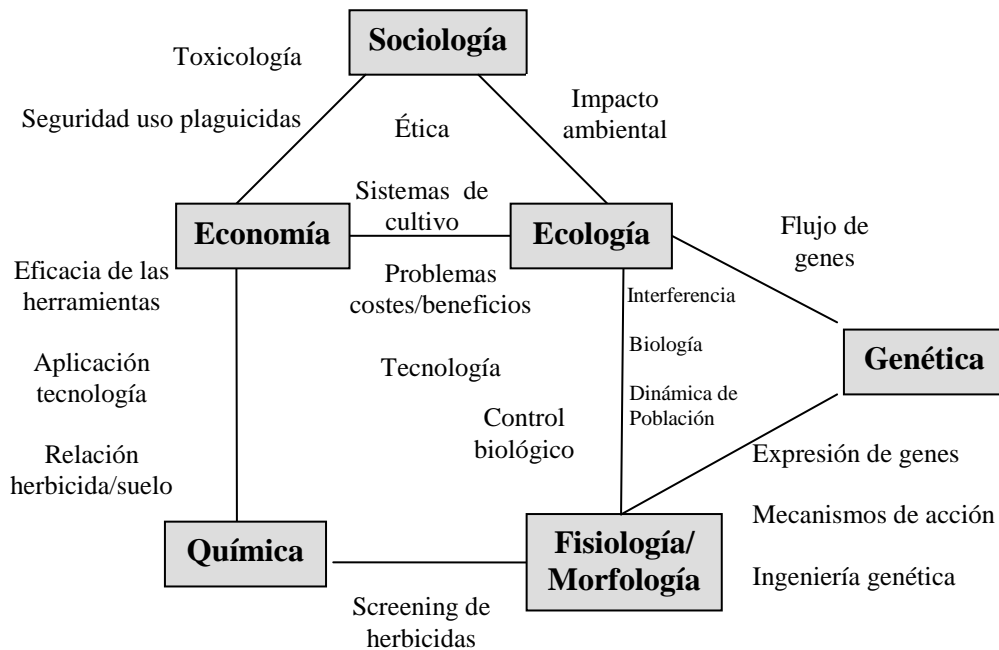
La Malherbología es la ciencia que se dedica al estudio de las malas hierbas y al control de las mismas. Como ciencia, con la entomología agrícola y la fitopatología, forma la protección de cultivos. Esta disciplina, empieza a dibujarse sobre los años 40 del siglo XX, coincidiendo con el descubrimiento del 2,4-D, el primer herbicida orgánico sintetizado.

La Malherbología está relacionada con muchas disciplinas en las que destacan: Sociología, Economía, Ecología, Química, Fisiología/Morfología, Genética (Figura 1.1).

La Malherbología juega un papel importante en el desarrollo de herramientas y tácticas para el control de malas hierbas. Aunque las malas hierbas han estado presentes en las civilizaciones humanas desde el principio de la agricultura, la historia de la Malherbología está ampliamente relacionada con la historia del control químico de malas hierbas. En la actualidad esta ciencia incluye tres áreas principales: tecnología para el control de malas hierbas, biología de las malas hierbas y el contexto social que rodea a las malas hierbas, sus herramientas de control. Por ello los principales puntos en los que se enfoca esta ciencia son los siguientes (Hess, 1994):

- 1) Incrementar el conocimiento del impacto económico y ecológico de las malas hierbas en diferentes cultivos
- 2) Mejorar el conocimiento de la biología, ecología y genética de las malas hierbas para optimizar su manejo
- 3) Optimizar el uso en el campo de agentes biológicos y de productos naturales
- 4) Estudiar poblaciones de malas hierbas resistentes a herbicidas para mejorar su control

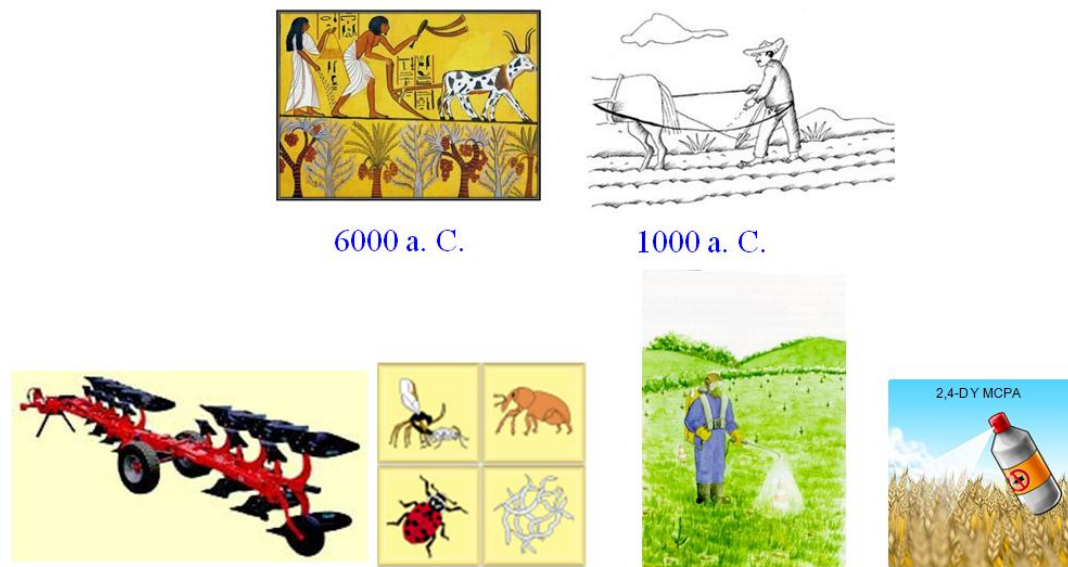
- 5) Desarrollar nuevas tecnologías para la aplicación de herbicidas con el fin de mejorar su actuación y minimizar su efecto en el medio ambiente
- 6) Desarrollar mejores métodos para detectar residuos de herbicidas en agua, suelo y vegetación.



**Figura 1.1** Interrelaciones de 6 disciplinas fundamentales en Malherbología (Tomado de Radosevich *et al.*, 1997).

## 1.2. HERBICIDAS

El manejo y control de malas hierbas ha tenido grandes avances, siendo limitado en la actualidad por la aparición de poblaciones resistentes. Cronológicamente las malas hierbas tienen un impacto negativo desde el inicio de la agricultura, y con el paso del tiempo se llega a la mecanización y el descubrimiento de los herbicidas (Figura 1.2). Los herbicidas han sido una herramienta indispensable en el manejo y control de especies nocivas de malas hierbas, inicialmente en países desarrollados y más recientemente en países en vías de desarrollo. La fiabilidad de estas sustancias en el control de malas hierbas es debida a la eficacia y la facilidad en el manejo, entre otras.



**Figura 1.2.** Avances de la agricultura, hasta el descubrimiento de los primeros herbicidas

### 1.2.1. Generalidades

Desde su implantación en los sistemas de cultivo moderno, los herbicidas han llegado a convertirse en la principal herramienta en todos los programas de lucha contra malas hierbas de la agricultura moderna. Son muchas las razones que justifican el incremento en el uso de éstas moléculas (Coble, 1996; Menéndez, 1997; Bastida y Menéndez, 2001):

- 1) Son productos altamente fiables y eficaces. 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.

A pesar de estas características, en la actualidad existe una gran controversia sobre los efectos dañinos que producen los plaguicidas. En este contexto, las iniciativas persiguen un progresivo reemplazo de agroquímicos por una serie de alternativas, entre las que se encuentran parte de los otros medios de control citados en el apartado anterior y entre las que destacan (Zadoks, 1992):

- 1) 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).
- 2) Control biológico de plagas. Los plaguicidas provenientes de fuentes naturales derivan de materiales naturales como son animales, plantas, hongos, bacterias o minerales.
- 3) 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.
- 4) 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. En la actualidad, tras más 20 años de la introducción de este concepto en EE.UU., todavía no existe una definición aceptada de MIP. Unos lo definen como parte de un amplio enfoque que conduce a una “agricultura sin química”, mientras que otros lo ven como un sistema que incluye un uso más eficiente de los plaguicidas sintéticos. Concretando los conceptos anteriores, se define MIP

como la combinación de diversas medidas de control directas (medidas de tipo mecánico, químico o biológico) e indirectas (métodos culturales, siembra y fertilización) para mantener las poblaciones de malas hierbas bajo un umbral económicamente admisible (Zwerger, 1996).

Estas iniciativas, han sido aplicadas con éxito en el control de insectos y patógenos, pero parecen ser viables en el control de malas hierbas (Zorner *et al.*, 1993). Las principales objeciones con respecto al 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 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 debidos al incremento en el consumo de productos modificados genéticamente tanto para animales como para humanos.

### **1.2.2. Clasificación y modo de acción de los herbicidas**

Existen diversos criterios para la clasificación de los herbicidas, todos ellos tienen alguna utilidad, pero puede que ninguno sea completo. Entre los criterios utilizados podemos destacar:

- i) uso según cultivos
- ii) efecto observado (quemaduras, clorosis...)
- iii) tiempo de aplicación (pre-siembra, pre-emergencia, post-emergencia...)
- iv) comportamiento en la planta (translocación, contacto...)
- v) comportamiento en suelo (persistencia, lixiviación...)
- vi) estructura química (según analogía en la estructura química)
- vii) modo de acción

La clasificación más aceptada mundialmente es la que tiene como base el modo de acción de los herbicidas en las plantas, divididos en 25 grupos (Tabla 1.2). Esta clasificación es la que proporciona más información sobre la interacción última entre herbicida y planta, y consecuentemente expresa el efecto fitotóxico del herbicida. También permite ayudar a elegir herbicidas de diferentes modos de acción y planificar



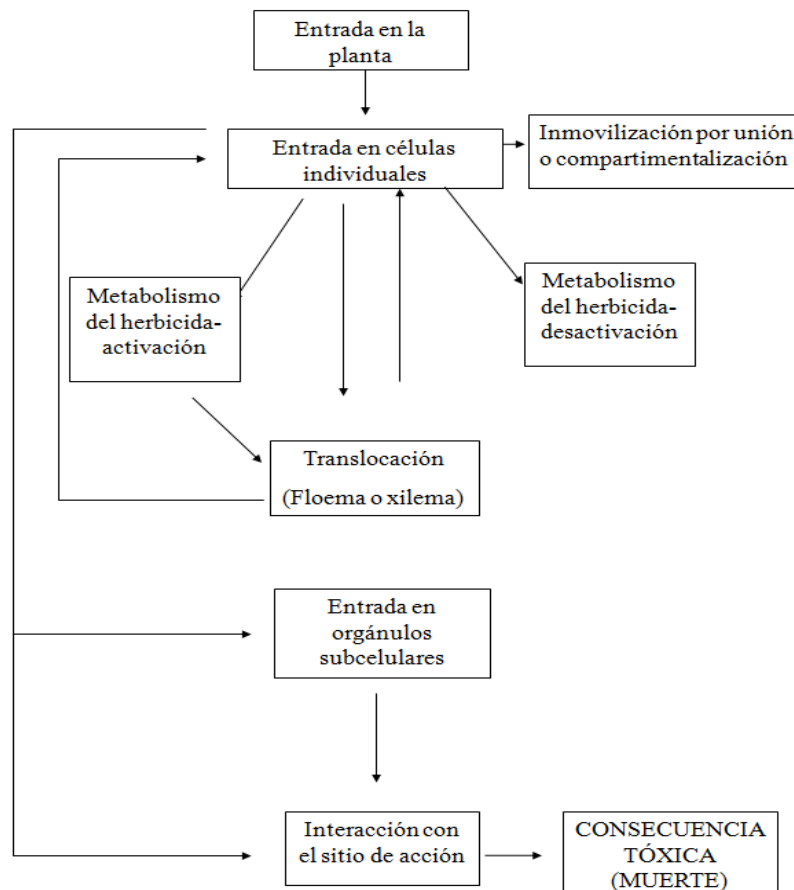
rotaciones o mezclas para evitar o retrasar el fenómeno de resistencia de las malas hierbas.

**Tabla 1.2.** Clasificación de los herbicidas según su modo de acción (HRAC, 2008)

<b>Grupo</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Familia química</b>
A	Inhibición de la acetil CoA carboxilasa (ACCase)	Ariloxifenoxipropionatos, ciclohexanodionas, fenilpirazolinas
B	Inhibición de la acetolactato sintasa (ALS)	Imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos, sulfonilaminocarboniltrizolinonas
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	Ácido 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 ACCase)	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	Ácido arilamino propiónico, organoarsenicales, otros

La mayoría de los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su actuación sobre un sitio primario de especial relevancia biológica. Esta actuación suele conducir a una serie de efectos secundarios y terciarios que acaban produciendo la muerte de la planta. En la figura 1.3, 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 produciendo la muerte de la planta. La acción del herbicida se puede estudiar en dos fases: la primera fase conlleva el movimiento del herbicida al sitio de acción, mientras la segunda fase conlleva las consecuencias metabólicas que resultan de la interacción con este sitio. La primera fase empieza con la aplicación 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 orgánulos subcelulares. La interacción del herbicida con el sitio de acción se puede considerar como el primer paso de la segunda fase; esto está seguido por una serie de consecuencias tóxicas que producen la muerte de la planta.



**Figura 1.3** Secuencia de sucesos desde la entrada en la planta del herbicida hasta la muerte de la planta

### 1.2.3. Importancia de los herbicidas en la agricultura actual

Los herbicidas juegan un papel primordial en la agricultura actual, ya que sin la ayuda de estos plaguicidas sería muy difícil el cultivo de grandes extensiones y mantener al cultivo libre de competencia con las malas hierbas. Bien gestionados ofrecen grandes beneficios a los agricultores. En la actualidad se han desarrollado más de 200 moléculas con potencial herbicida (WSSA, 2007).

El mercado mundial de plaguicidas supone cantidades millonarias de dólares a nivel mundial, en las que Norteamérica y Europa gastan más de la mitad del total (Figura 1.4). 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.

Latinoamérica ocupa el tercer lugar en ventas de agroquímicos, la distribución en ventas para todos los casos el primer lugar es ocupado por los herbicidas, seguido por insecticidas y fungicidas.

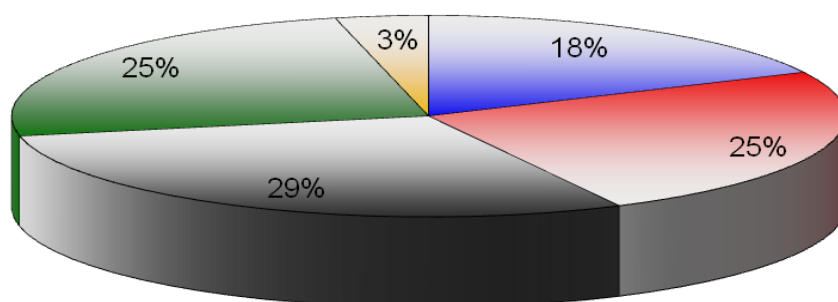
El mercado mundial de plaguicidas ascendió a más de 30 millones de dólares en el año 2006 y más de 33 millones en 2007 (tabla 1.3). Las ventas de herbicidas representaron la mayor parte de los gastos totales (más del 40%), seguido por los insecticidas, fungicidas, y otros plaguicidas, respectivamente.

**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%
Fungicidas	\$7 180	23,5%	\$8 105	24%
Otros	\$1 060	3,5%	\$1 154	3,5%
Total	\$30 425	100%	\$33 390	100%

AEPLA, 2009

■ América Latina ■ Norteamérica ■ Europa ■ Asia ■ Africa/Oriente Medio



**Figura 1.4** Mercado mundial de plaguicidas 2007 (Wood Mackenzie, 2009)

### **1.3. RESISTENCIA DE LAS MALAS HIERBAS A LOS HERBICIDAS**

#### **1.3.1. Generalidades**

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. La aplicación entusiasta de estas auxinas sintéticas por parte de los agricultores estimuló a las compañías de agroquímicos, que invirtieron sumas cuantiosas en investigación para producir nuevos herbicidas para distintos cultivos y malas hierbas. La comprobada eficacia de los herbicidas modernos les 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 están experimentando las malas hierbas resistentes a herbicidas.

Existe un número de herbicidas generales o totales que resultan activos frente a cualquier tipo de planta. Sin embargo, en la actualidad, los más importantes son los herbicidas específicos o productos 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.

Tal acción selectiva supone que determinadas especies de plantas cultivadas, y también 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 se conoce generalmente como tolerancia natural y ha sido definida por la HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) como la *habilidad/aptitud heredable de una especie vegetal a sobrevivir y reproducirse después de un tratamiento*, pudiendo considerarse como una característica a nivel de especie. Sin embargo, la variabilidad genética también se da intraespecíficamente. Debido a este hecho y como consecuencia de la presión selectiva impuesta por la aplicación continuada de herbicidas que caracteriza a los modernos sistemas de producción agrícola, es posible el desarrollo de biotipos de malas hierbas que dejan de ser

controlados por un determinado producto al que originalmente eran sensibles. Tal respuesta se conoce generalmente como resistencia, siendo una característica adquirida por una población (biotipo) de una especie que carecía de ella y ha sido definida por la HRAC como la *habilidad/aptitud heredable de una especie vegetal a sobrevivir y reproducirse después del tratamiento de un herbicida a dosis normalmente letales para la misma especie susceptible*.

En una planta, la resistencia puede ocurrir de una forma natural o puede ser inducida por técnicas como la ingeniería genética o selección de variantes resistentes obtenidas por cultivos de tejidos o mutagénesis. Esta definición, bastante completa en sí, presenta el problema de que se asume que la resistencia está asociada únicamente a factores de tipo fisiológico y/o morfológico. En este sentido, una definición expandida del concepto de resistencia a herbicidas podría contemplar un punto de vista más funcional, incluyendo cambios fenológicos tales como el letargo (Maxwell y Mortimer, 1994). A diferencia de las plantas tolerantes, las resistentes suelen sobrevivir no sólo a las dosis de aplicación agrícola del herbicida sino a otras bastante superiores (De Prado *et al.*, 1996).

El término resistencia suele ir adjetivado con diversos modificadores que hacen alusión a la posible pluralidad existente tanto en los mecanismos de resistencia que posee un individuo como en los herbicidas a los que éste es resistente. Surgen así los conceptos de resistencia cruzada y resistencia múltiple. Dependiendo de los autores consultados, estas definiciones se asociarán a mecanismos de resistencia (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). Por último, los cultivos resistentes a herbicidas, son cultivos que poseen genes que les confieren resistencia a un cierto herbicida al que habían sido previamente 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).

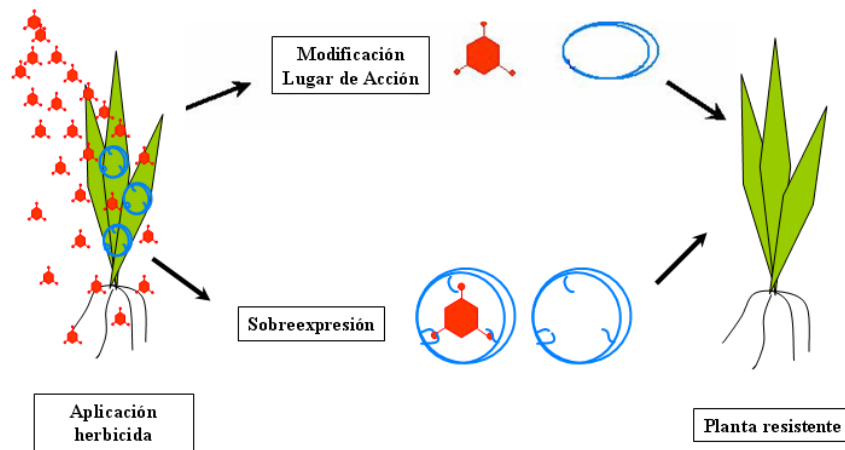
### **1.3.2. Mecanismos de resistencia a herbicidas**

El conocimiento de los procesos biológicos responsables de la resistencia a herbicidas en una determinada mala hierba es fundamental para el diseño de una estrategia de control (Fischer, 2008; Powles, 2009). Dependiendo del tipo de mecanismo de resistencia detectado, la mala hierba presentará un patrón específico en su tolerancia a herbicidas que podrá variar desde un alto grado de resistencia a determinados compuestos de una misma familia química, a una moderada resistencia a un amplio espectro de herbicidas. Así mismo el conocimiento de estos mecanismos nos permitirá prever la posible respuesta de la población resistente al conjunto de mecanismos químicos/mecánicos/culturales seleccionados para su control, la efectividad a corto y largo plazo de los mismos y la posible aparición de nuevos problemas. Actualmente hay más de 900 plaguicidas y casi 600 ingredientes activos en el mercado (Hall *et al.*, 2001). Millones de toneladas de plaguicidas se aplican anualmente, se ha estimado que un pequeño porcentaje de estos productos alcanzan el organismo diana depositando el resto en el suelo y en otros organismos, así como a la atmósfera y al agua (Pimental y Levitan, 1986).

La degradación abiótica es debida a una transformación química y física del plaguicida por procesos como la fotólisis, hidrólisis, oxidación y reducción. Además, los plaguicidas pueden no estar disponibles biológicamente debido a la compartimentalización que ocurre como resultado de una adsorción del plaguicida al suelo y a los coloides sin alterar la estructura original de la molécula plaguicida.

Sin embargo, las reacciones enzimáticas que son principalmente el resultado de procesos bióticos mediados por plantas y microorganismos es la ruta de detoxificación más importante. Existen al menos cinco mecanismos generales, no necesariamente

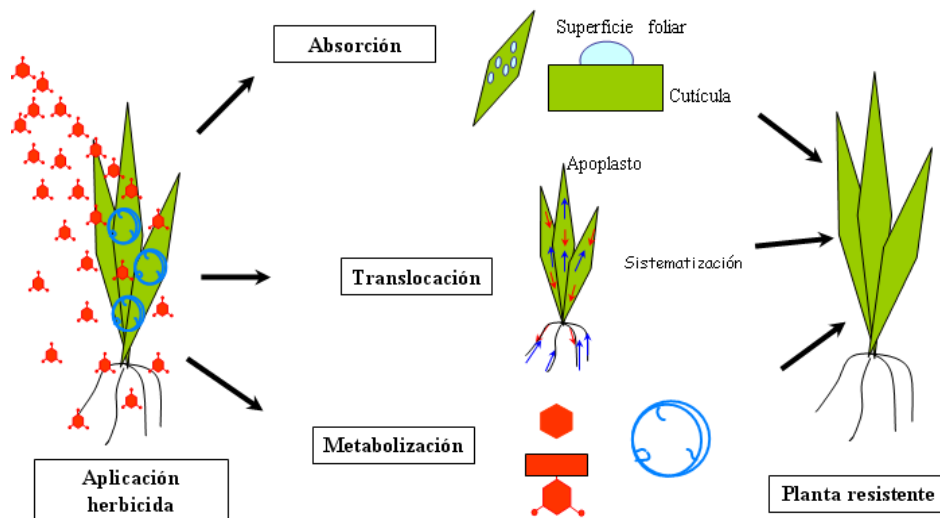
excluyentes que podrían justificar la resistencia a herbicidas (Sherman *et al.*, 1996). De todos los mecanismos detectados en malezas el/los cambio/s aminoacídico/s que conlleva un cambio estructural en el sitio de acción (proteína) y una pérdida de afinidad por el herbicida, es el mecanismo más determinante en malezas resistentes (Fig.1.5). La sobreexpresión de esta proteína no es un mecanismo bien conocido y de forma natural no ha sido detectado en malezas. Sin embargo si ha sido utilizado en OMG (Organismos Modificados Genéticamente), en cultivos resistentes a glifosato.



**Figura 1.5.** Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas dependiente del sitio de acción.

La figura 1.6 muestra el diferente comportamiento de un herbicida entre una planta sensible (S) y una resistente (R), pudiéndose observar que mientras en las malezas S el herbicida penetra y se transloca a la proteína de enlace, en la maleza R cambios fisiológicos (cambios en la cutícula y/o menor movimiento del herbicida vía xilema o floema) y/o una mayor actividad enzimática capaz de inactivar el herbicida hacen que la maleza sobreviva al herbicida.





**Figura 1.6.** Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas independiente del sitio de acción.

## Resistencia de sitio de acción

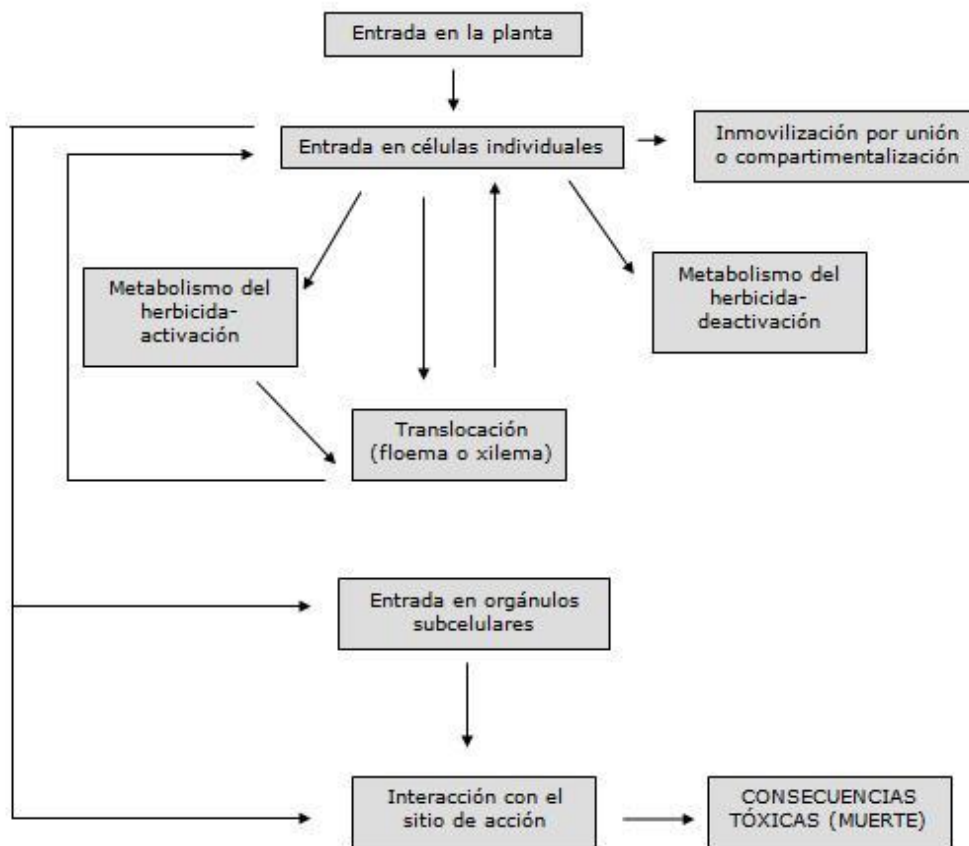
### *Pérdida de afinidad por el sitio de acción*

Los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su actuación sobre un sitio de acción primario, generalmente una proteína, de especial relevancia biológica (Figura 1.7). Este sitio primario suele ser específico y la acción del herbicida sobre él (efecto primario), suele conducir al desarrollo de efectos secundarios, de naturaleza mucho más general que normalmente acaban produciendo la muerte de la planta (Corbett et al., 1994). 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 e impidiendo así la continuidad del proceso vital mediado por dicho sitio (Gronwald, 1994, Délye et al., 2005, Whaley et al., 2007). Este tipo de mecanismo, caracterizado en la mayoría de los biotipos resistentes descritos hasta el momento, se caracteriza por conferir un alto grado de resistencia al herbicida empleado, pudiéndose extender ésta a otras moléculas pertenecientes a la misma familia química (Cruz-Hipólito et al., 2009).

## Resistencia fuera del sitio de acción

### *Metabolización a especies no tóxicas*

La degradación de los herbicidas a compuestos no fitotóxicos es la base de la selectividad que presentan muchas materias activas en cultivos tolerantes frente a las malas hierbas sensibles (Figura 1.7). En los procesos de detoxificación metabólica, entendido como aquellos procesos biológicos en los que las moléculas fitotóxicas 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, etc.



**Figura 1.7.** Esquema de secuencias de la entrada de un herbicida desde su absorción / penetración hasta la unión a la proteína de enlace y posterior muerte de la planta (Adaptado de Devine et al., 1993).

Los procesos de detoxificación metabólica de herbicidas en tejidos vegetales pueden dividirse en tres fases (Shimabukuro, 1985; Hatzios, 1991) (Tabla 2). 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 orgánulos celulares. La fase III implica la transformación de los metabolitos de la fase anterior a conjugados secundarios con nula fitotoxicidad (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 1.4.** Resumen de las tres fases del metabolismo de plaguicidas (Adaptado de Shimabukuro, 1985; De Prado *et al.*, 2004)

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

#### Fase I o conversión

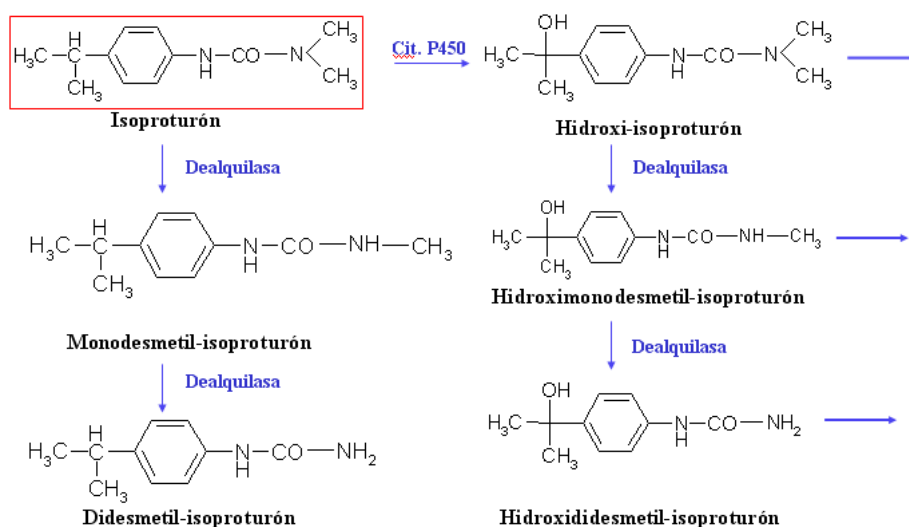
Si bien algunos herbicidas pueden ser conjugados directamente, muchos otros no poseen sustituyentes disponibles en sus moléculas (grupos amino, hidroxilo, sulfhidrilo, etc.) que pueden reaccionar para formar conjugados con constituyentes celulares. Dichos herbicidas deberán ser convertidos en metabolitos mediante algunas de las siguientes reacciones:

1.- 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 H<sub>2</sub>O. Hay muchas enzimas hidrolíticas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos particularmente aquellos que contienen grupos funcionales amida, carbamatos 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 revisadas en plantas y microorganismos (Inclendon y Hall, 1997; Hoagland y Zablotowicz, 2001). 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, las cuales rompen el enlace amida formando ácido propiónico y 3,4-dicloroanilina (Frear Y Still, 1968).

2.- 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).

3.- 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) (Figura 1.8). La regulación y expresión de P450 no se conocen bien en plantas principalmente porque en las células que no están expuestas a ningún tipo de 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.



**Figura 1.8.** Ruta metabólica de detoxificación de isoproturón en *Lolium rigidum*.

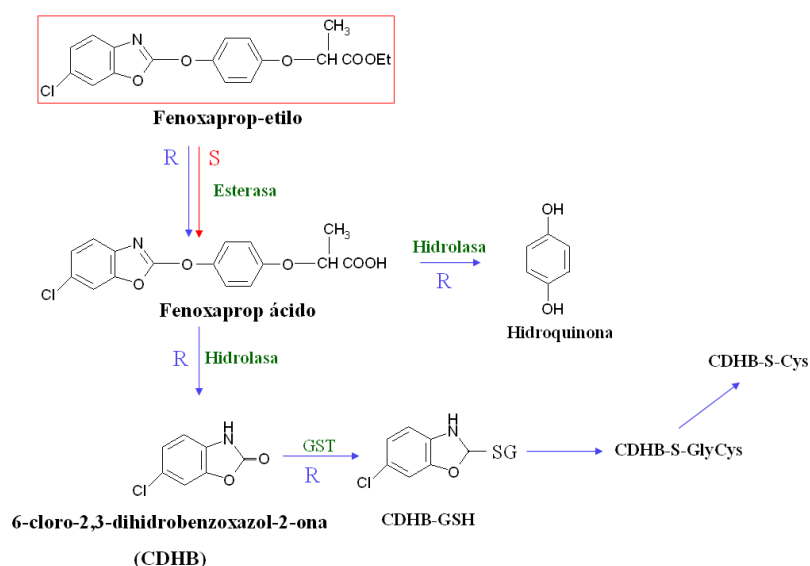
Además de las enzimas citocromo P-450 las plantas producen otras enzimas oxidativas (peroxidasas, polifenoloxidasas, lacasas y tirosinasas) las cuales catalizan la polimerización de varias anilinas y fenoles (Dec y BollaG, 2001). Por ejemplo, las peroxidasas que median el metabolismo de herbicidas que funcionan de manera similar a las P-450 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 lapathifolia* 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.

1.- 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).

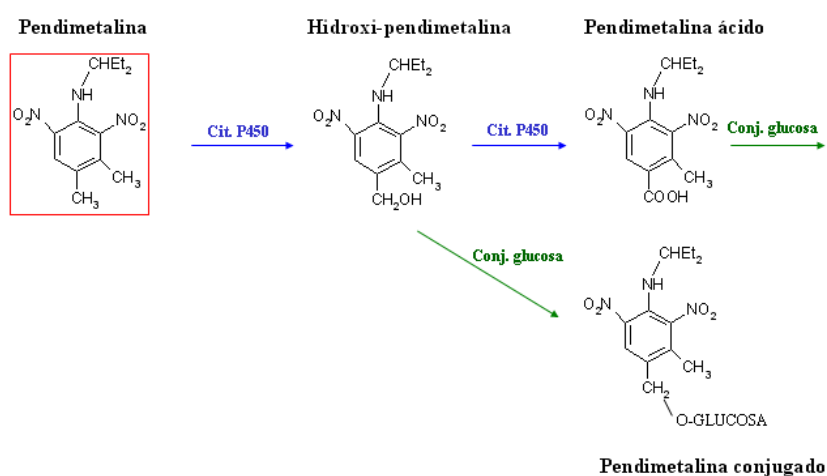
La conjugación con glutatión está catalizada por una familia de enzimas glutatión-S-transferasas más o menos específicas que se encuentran de manera constitutiva o inducible en muchos tejidos vegetales (Devine et al., 1993) (Figura 1.9).



**Figura 1.9.** Ruta metabólica de detoxificación de fenoxaprop-etilo en *Lolium rigidum*.

2.- Conjugación con aminoácidos: De forma general, la hidrólisis del glutatión en este tipo de conjugados suele producir 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 ha sido 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.

3.- Conjugación con azúcares: Los conjugados glicósidos más frecuentemente hallados en plantas son los  $\beta$ -D-glucopiranosidos, junto con los N-glicósidos, O-glicósidos y ésteres de glucosa (Figura 1.10). Este tipo de reacciones están catalizadas por glucosil-transferasas que utilizan UDP-glucosa como donante de glucosa (Mansager et al., 1983). De todas estas reacciones, la formación de O-glicósidos es la más común, la cual sigue normalmente a la introducción de grupos hidróxilo en la molécula herbicida por monooxigenación.



**Figura 1.10.** Ruta metabólica de detoxificación de pendimetalina en *Lolium rigidum* resistente a dinitroanilinas.

### 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 *et al.*, 1984) (Figura 1.11). Si bien 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). Como puede observarse en la figura el herbicida una vez que entra en la planta puede ser metabolizado (activando o desactivando el herbicida) y posteriormente pasar a la vacuola como material de

deshecho o bien directamente pasar a la vacuola donde queda secuestrado y lentamente degradado.

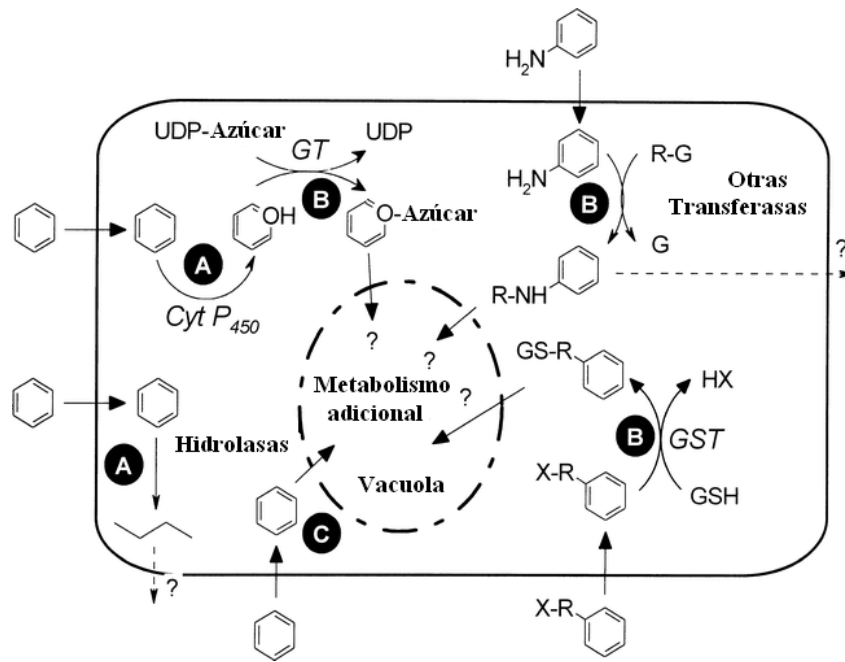
La resistencia a herbicidas por detoxificación es un proceso muy frecuente. Sin embargo, este mecanismo suele venir asociado a fenómenos de resistencia cruzada, lo que implica que un mismo individuo tiene la capacidad de metabolizar moléculas muy diferentes pertenecientes a diversas familias químicas.

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.

#### *Resistencia asociada a procesos de secuestación o compartimentación*

Los fenómenos de compartimentación entendidos como la secuestación del herbicida o sus metabolitos en un lugar específico de la célula, son mecanismos de resistencia/tolerancia poco conocidos debido a que las evidencias que los apoyan son en muchos casos circunstanciales (Coupland, 1991; Owen, 1991). Los escasos casos 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 (Fig. 7). Sin embargo, los procesos subyacentes a estos mecanismos de secuestación son todavía desconocidos.





**Figura 1.11.** Rutas metabólicas de detoxificación de herbicidas en malezas (Adaptado de De Prado y Franco, 2004).

*Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción*

Una condición necesaria para lograr la efectividad de un herbicida es que éste alcance su sitio de acción en una concentración suficiente como 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 orgánulos 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; Michitte et al., 2004; Ruiz-Santaella et al., 2006; Cruz-Hipólito et al., 2009b) (Figura 1.12). Aún 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.

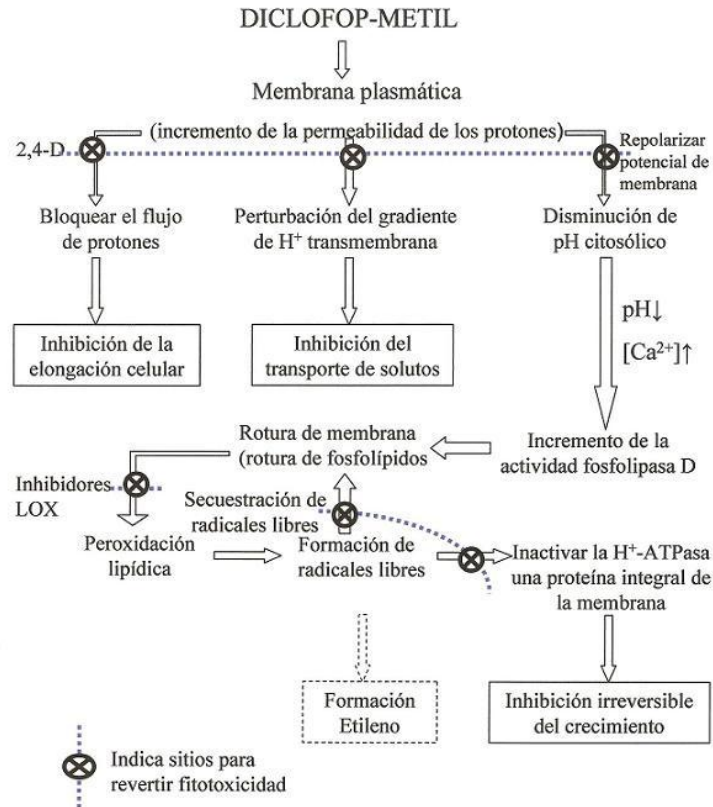


**Figura 1.12.** Penetración y translocación de <sup>14</sup>C-glifosato en plantas sensibles (izquierda) y tolerantes (derecha) a glifosato (Cruz-Hipólito et al., 2009b). Las zonas coloreadas indican el movimiento de <sup>14</sup>C-glifosato.

### *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 aestivium*, *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 (Shimabukuro y Hoffer, 1997) (Figura 1.13). Recientemente han sido 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).



**Figura 1.13.** Representación gráfica de los múltiples efectos ocurridos en gramíneas tratadas con diclofop-metil (Adaptado de Shimabukuro y Hoffer, 1997).

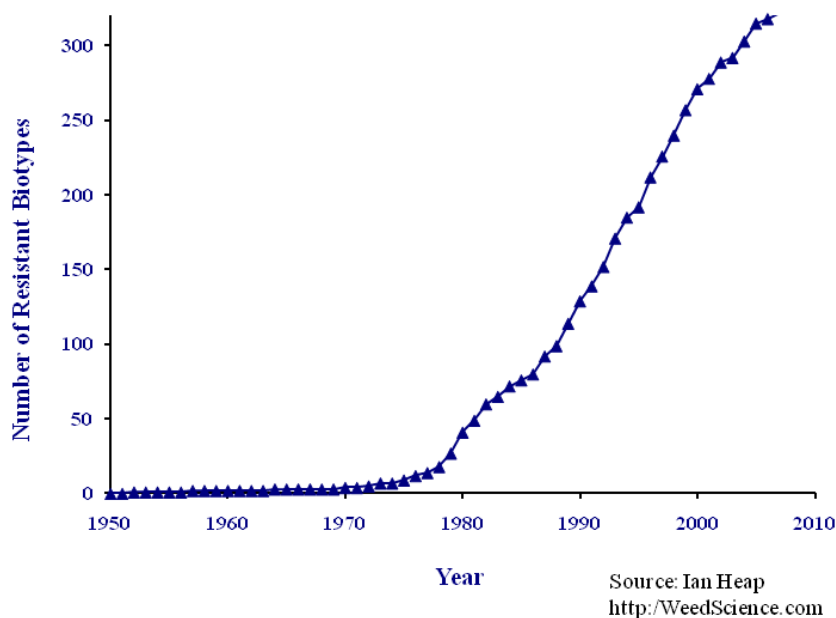
#### 1.4. BIOTIPOS RESISTENTES A HERBICIDAS A NIVEL MUNDIAL

La aparición de resistencia ha estado inevitablemente asociada a la introducción de los diferentes tipos de plaguicidas, siendo el caso más llamativo el de los insecticidas, conociéndose actualmente más de 400 especies, dentro de las que constituyen plagas agrícolas, que han desarrollado resistencia a uno o varios de estos productos (Graves, 1994). Una situación similar se da 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.

El primer caso de resistencia de malas hierbas a herbicidas fue dado a conocer por Ryan en 1970, cuando algunos biotipos de *Senecio vulgaris* que crecían en plantaciones de frutales, presentaron resistencia a herbicidas pertenecientes a la familia de las triazinas. Estos herbicidas se habían aplicado una o dos veces al año por un período de 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<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> para ser controladas.

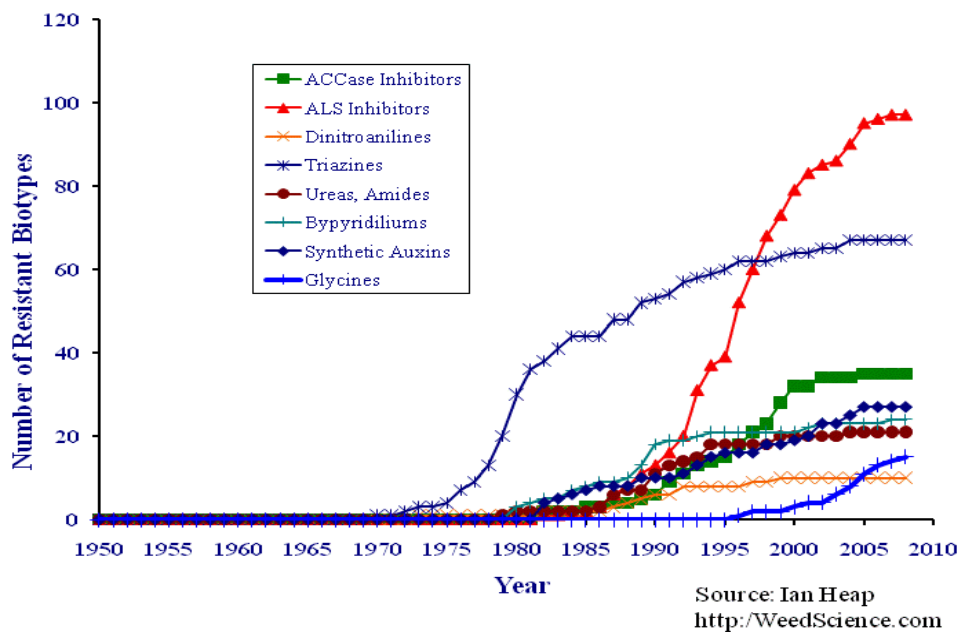
Desde la identificación de este primer biotipo resistente el incremento anual es considerable en cuanto al número de malas hierbas resistentes a herbicidas en el mundo, experimentado un crecimiento exponencial a partir de los años ochenta y esperando que se estabilice en el 2010 (Figura 14). Este aumento en especies y biotipos, amenaza a muchas regiones agrícolas del mundo, sobretodo en aquellas en donde existen casos de malas hierbas que presentan resistencia múltiple.



**Figura 1.14.** Incremento del número de malas hierbas resistentes a herbicidas hasta el año 2010.

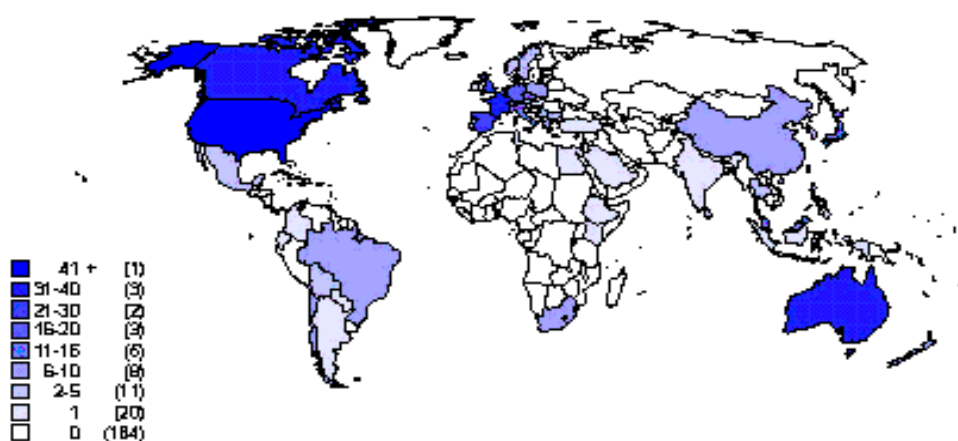
Un problema más serio es el rápido desarrollo de malas hierbas resistentes a herbicidas inhibidores de las enzimas acetolactato sintasa (ALS) y acetil coenzima A carboxilasa (ACCase). Estos herbicidas ejercen gran presión de selección sobre las malas hierbas, al ser productos selectivos. El clorsulfurón, primer herbicida inhibidor de la ALS, se comercializó en 1982, confirmándose el primer caso de resistencia en la especie *Lactuca serriola* en el año 1987 (Mallory-Smith *et al.*, 1990). Debido a las bajas dosis de empleo, los perfiles toxicológicos y ambientales favorables y su rentabilidad, muchas compañías han introducido al mercado herbicidas inhibidores de la ALS para controlar malas hierbas de hoja ancha, ciperáceas y gramíneas en la mayoría de los cultivos importantes. Los grupos químicos que inhiben la ALS son las sulfonilureas (p.e. bensulfurón-metil), las imidazolinonas (p.e. imazapir), las triazolopirimidinas (p.e. florasulam), los pirimidil-benzoatos (p.e. bispiribac-sodio) y las sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (p.e. flucarbazone-sodio).

Los primeros casos de resistencia se presentaron en Norte América, en condiciones de monocultivo. Actualmente 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 aumenta más rápidamente en la actualidad, ocupando más de un 30 % del total de biotipos resistentes a estos herbicidas (Heap, 2009) (Figura 1.6).



**Figura 1.15.** Número de biotipos resistentes a distintas familias de herbicidas desde que se encontró el primer caso de resistencia hasta el año 2010, distribuido según modo de acción.

En la última revisión (Heap, 2011) se encuentran 365 biotipos resistentes, en 200 especies (115 dicotiledóneas y 85 monocotiledóneas) en alrededor de 450.000 campos. La mayoría de estos biotipos fueron descubiertos en Europa y Norte América, pero el número de casos detectados en otras regiones del mundo es sorprendentemente alto (Figura 1.16).



**Figura 1.16.** Mapa mundial de la distribución del número de especies de malas hierbas resistentes a herbicidas en el mundo

## 1.5. REFERENCIAS

- Anderson, W. P. (1996) *Weed Science: Principles and Applications*. 3rd ed. St. Paul, MN: West. Pp. 3–5, 39–66.
- Baker, E.A.; Hayes, A. L. and 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. En: “Herbicides and Their Mechanisms of Action”, (eds. Cobbs AH y Kirkwood RC), Sheffield, Great Britain, Sheffield Academic, pp. 25-37.
- Bastida, F. y 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.
- Berner, D.A.; Ikie, F.O. and Green, L.M. (1997) ALS-inhibiting herbicide seed treatment control *Striga hermonthica* in ALS-modified corns (*Zea mays*). *Weed Technol.* 11:704-707.
- Caseley JC, Cussans GW y Atkin RK), Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, pp. 263-278.
- Chaleff, R. S.; Day, E. B. (1984). Herbicide resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science*, 223: 1148-1151.
- Coble, H.D. (1996) Weed management tools and their impact on the agro-ecosystem. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Weed Control Congress*: pp. 1143-1146.
- Conway, G. and Toenniessen, G. (1999) Feeding the world in the twenty-first century. *Nature*, 402: C55-8.
- Corbett, J.R.; Wright, R.; Bailie, A. C. (1994). The biochemical mode of action of

pesticides, (eds. Academic Press, London), 382 pp.

Coupland, D. (1991). The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. En: "Herbicide Resistance in Weeds and Crops", (eds.

Cousens, R. ; Mortimer, M. (eds.). 1995. Dynamics of weed populations, Cambridge University Press), Cambridge, England, 332 pp.

Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M. D.; Vidal, R. A.; De Prado, R. (2009a). Resistance mechanism to bensulfuron-methyl in biotypes of *Scirpus mucronatus* L. collected in Chilean rice fields. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:4273-4278.

Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M. D.; Heredia, A.; Ruiz-Santaella, J. P.; De Prado, R. (2009b). Nontarget mechanisms involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:4844-4848.

Dec, J.; Bollag, J. M. (2001). Use of enzymes in bioremediation. En: "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.

Délye, C.; Zhang, X. Q.; Chalopin, C.; Michel, S.; Matějček, A.; Powles, S.B. (2005). Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiology*, 137: 794-806.

De Prado, R.; Sánchez, M.; Jorrín, J.; Domínguez, C. (1992) Negative cross-resistance to bentazone and pyridate in atrazine-resistant *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus hybridus* biotypes. *Pesticide Science*, 35: 131-136.

De Prado, R.; Romera, E.; Menéndez, J. (1996). Chlortoluron resistance in a *Bromus tectorum* L. biotype is due to an enhanced detoxification processes. En: "Proceedings of the International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides" (eds. De



Prado, R.; Jorrín, J.; García-Torres L.; Marshall G), Universidad de Córdoba, España, pp. 62-64.

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. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63: 1-14.

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?. En: "Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference", pp. 545 - 550.

De Prado, R.; Franco, A. (2004). Cross resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Science*, 52:441-447.

De Prado, R.; Osuna, M. D.; Fischer, A. J. (2004). Resistance to ACCase inhibitor herbicides in green foxtail (*Setaria viridis*) biotype in Europe. *Weed Science*, 52: 506-512.

Devine, M. D.; Duke, S. O.; Fedtke, C. (1993). *Physiology of herbicide action*, (eds. Prentice Hall), Englewood Cliffs, 441 pp.

Fedtke, C. 1983. Leaf peroxisomes deaminate as-triazinone herbicides. *Naturwissenschaften*, 70: 199 - 200.

Fischer, A. J. (2008). Mecanismos de resistencia: Las bases para definir estrategias. Seminario Internacional "Viabilidad del Glifosato en Sistemas Productivos Sustentables". INIA. Colonia. Uruguay. 27-44.

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.

García, L. y Fernández-Quintanilla, C. (1991) Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas, 348 p., Mundi-Prensa, Madrid.

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. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, pp. 160-184.

Gressel, J.; Segel, L. A. (1990). Interrelating factors controlling the rate of appearance of resistance: the outlook for the future. En: "Herbicide Resistance in Plants", (eds. Lebaron, H. M.; Gressel, J.), John Wiley and Sons, New York: 325-347.

Gressel, J. (1991). Why get resistance? It can be prevented or delayed. En: "Herbicide Resistance in Weeds and Crops", (eds. Caseley, J. C.; Cussans, G. W.; Atkin, R. K.), Butterworth-Heinemann, Oxford, England, pp.1-26.

Gronwald, J. W. (1994). Herbicides inhibiting acetyl CoA carboxylase. Biochemical Society Transactions, 22: 153-161.

Hall, J. C.; Wickenden, J. S.; Kyf Y. (2001) Biochemical conjugation of pesticides in plants and microorganisms: an overview of similarities and divergences. En: "Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences", (eds. Hall JC, Hoagland RE y Zablotowicz RM), Washington, DC: American Chemical Society, pp. 89-118.

Hatzios, K. K. (1991). Biotransformations of herbicides in higher plants. En: "Environmental Chemistry of Herbicides", (eds. Grover R y Cessna AJ), Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 141-185.

Heap, I. (2009). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet.October, 2009. Available [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com).

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.

Hoagland, R. E.; Zablotowicz, R. M. (2001). The role of plant and microbial hydrolytic enzymes in pesticide metabolism. En: "Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences", (eds. Hall JC, Hoagland RE y Zablotowicz RM), ACS Symposium Series 664, Washington DC, American Chemical Society, pp. 58-88.

Holm, L.; Doll, J.; Holm, E.; Pancho, J. y Herberger, J. (1997) World weed: natural histories and distribution. John Wiley & Sons.

Holt, J. S.; Lebaron, H. M. (1990). Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology*, 4: 141-149.

Inclendon, B. J.; Hall, J. C. (1997). Enzymatic de-esterification of xenobiotics in plants. En: "Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants", (ed. Hatzios KK), NATO ASI Series, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 67-82.

Jäger, G. (1983). Herbicides. En: "Chemistry of Pesticides" (ed. Büchel KH), John Wiley and Sons, New York, pp. 322-392.

Jutsum, A. R.; Graham, J. C. (1995). Managing weed resistance: the role of the agrochemical industry. En "Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Weeds". pp. 557-566.

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.

Lamoureux, G. L. ; Frear, D. S. (1987). Current problems, trends and developments in pesticide metabolism in plants. En: "Pesticide Science and Biotechnology", (eds. Greenhalgh R y Roberts TR), Blackwell, Oxford, pp. 455- 462.

Lebaron, H. M.; Gressel, J. (eds.). (1982). Herbicide Resistance in Plants, John Wiley and Sons, New York: 325-347.

Mansager, E. R.; Swanson, H. R.; Tanaka, F. S . (1983). Metribuzin metabolism in tomato: isolation and identification of N-glucoside conjugates. Pesticide Biochemistry and Physiology, 19: 270-281.

Maxwell, B. D.; Mortimer, A.M. 1994. Selection for herbicide resistance. pp, 1-25 in S. B. Powles y J.A.M. Holtum, eds. Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry. Lewis Publishers. Boca Raton.

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.

Michitte, P.; Gauvrit, C.; Heredia, A.; De Prado, R. (2004). Resistance to glyphosate in *Lolium multiflorum*: involvement of epicuticular waxes?. En: "XII Colloque International Sur La Biologie Des Mauvaises Herbes", pp. 597- 602.

Morrison, I. N.; Friesen, L. F. (1996). Herbicide resistant weeds: mutation, selection and misconceptions. En: "Proceedings of the Second International Weed Control Congress", Copenhagen, Denmark, 2, pp. 377-386.

Owen, W. J. (1991). Herbicide metabolism as a basis for selectivity. En: "Target Sites for Herbicide Action", (ed. Kirkwood RC), Pleum Press, New York, pp. 285-314.

Pillmoor, J. B.; Gaunt, J. K.; Roberts, T. R. (1984) Examination of bound (non-extractable) residues of MCPA and flamprop in wheat straw. *Pesticide Science*, 15: 375-381.

Pimental, D.; Levitan, L. (1986). Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Biosciences*, 36: 86-91.

Pont, V.; Collet, G. F. (1980). Métabolisme du chloro-2-(p-chlorophényl)-3 propionate de méthyle et problème de sélectivité. *Phytochemistry*, 19: 1361- 1363.

Powles, S. B. 2009. Evolution in action: plants resistant to herbicides: AFPP-XIII<sup>th</sup> International Conference on Weed Biology. September 2009. Dijon. France.

Radosevich, S.; Holt, J. y Ghersa, C. (1997) *Weed Ecology. Implications for Management*, 589 p., John Wiley and Sons, New York.

Ruiz-Santaella, J. P.; Heredia, A.; De Prado, R. (2006). Basis of selectivity of cyhalofop-butyl in *Oryza Sativa* L. *Planta*, 223: 191-199.

Sherman, T. D.; Vaughn, K. C.; Duke, S. O. (1996). Mechanism of action and resistance to herbicides. En: "Herbicide Resistant Crops", (ed. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, pp. 14-28.

Shimabukuro, R. H. (1985). Detoxification of herbicides. En: "Weed Physiology", Vol. 2, (ed. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, pp. 215-240.

Shimabukuro, R. H.; Hoffer, B. L. (1997). Perturbation of the transmembrane proton gradient and resistance to AOPP herbicides. En "Weed and Crop Resistance to Herbicides" (eds. De Prado R, Jorrin J y García-Torres L), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.71-79.

Whaley, C. M.; Wilson, H. P.; Westwood, J. H. (2007). A new mutation in plant ALS

confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. *Weed Science*. 55: 83-90.

Wrubel, R. P.; Gressel, J.(1999). Are herbicide mixtures useful for delaying the rapid evolution of resistance? A case study. *Weed Technology*, 8: 635-648.

WSSA (2007) *Herbicide Handbook*. 9<sup>a</sup>. Edición.458 p.

Wyse, D. L.(1978) *Weed Science, Lecture notes*. 189 pp. Dept. of Agronomy and plant genetics. University of Minnesota.

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. y 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 2<sup>nd</sup> International Weed Control Conference*: 933-942.

## **CAPITULO II**

**RESISTENCIA A UREAS SUSTITUIDAS**

**EN**

**BIOTIPOS DE *Lolium rigidum***

## 1. INTRODUCCIÓN

El diclofop-métil, perteneciente a la familia de los herbicidas ariloxifenoxipropionato, sólo o en mezcla con clortolurón o isoproturón, ambos ureas sustituidas, se ha utilizado durante años en el noreste y sureste de España para controlar gramíneas. Desde principios de los 1990, el control de algunas poblaciones de *L. rigidum* se ha hecho progresivamente más difícil en campos de trigo de invierno en España. Ensayos en cámara de crecimiento han indicado que todos los biotipos son resistentes a dosis más altas de diclofopmétil, pero sólo algunos biotipos son resistentes a clortolurón o isoproturón a las dosis normales utilizadas por los agricultores en campos de trigo de invierno (De Prado et al., 1997).

Hay que considerar cuatro mecanismos de resistencia a herbicidas en plantas superiores (Gronwald, 1994). Sin embargo, sólo el metabolismo del herbicida (destoxificación) ha sido observado en plantas resistentes tratadas con ureas sustituidas (Ryan y Owen, 1982; Cabanne et al., 1987; Gonneau et al., 1988; De Prado et al., 1990; Burnet et al., 1993; Menéndez et al., 1994; Menéndez y De Prado, 1997). En dos casos se ha observado que la absorción y translocación confieren resistencia a las ureas sustituidas.

La resistencia a clortolurón en *Avena fatua* se debió a una menor tasa de absorción que en trigo y cebada, en los cuales las tasas de absorción fueron muy similares (Ryan et al., 1981). Un segundo caso, *Torilis arvensis*, fue más resistente a diurón que el susceptible *Lolium rigidum*. El [<sup>14</sup>C]-diurón penetró a través de las raíces y fue translocado por todas las hojas de *L. rigidum*, pero en *T. arvensis* se limitó a los tallos, petiolos foliares y venas foliares. Estas diferencias en el transporte y distribución han sido propuestas para explicar la tolerancia de *T. arvensis* a diurón (De Prado et al., 1990). El metabolismo incrementado de ureas sustituidas ha sido ampliamente estudiado en cereales así como en malas hierbas de este cultivo (Frear et al., 1972; Geissbuhler et al., 1975). Tanto la N-desalquilación como la alquil-oxidación seguidas de la conjugación como O-glicósidos han sido generalmente consideradas como las principales vías de degradación en plantas. Sin embargo, estudios recientes sobre la degradación de clortolurón en cereales han demostrado con claridad la susceptibilidad del grupo anillo-métil a ataques oxidativos, que son los productos predominantes entre los metabolitos extraíbles (Ryan y Owen, 1982; Cabanne et al., 1987; Cabanne et al.,



1985). Por contraste al trigo, donde el clortolurón fue destoxificado principalmente por la alquil-oxidación, la vía principal del metabolismo del herbicida era la N-desalquilación en *Verónica persica*, pero ambas vías estaban implicadas en *Bromus sterilis* y *Galium aparine* (Gonneau et al., 1988). En plantas tratadas con 1-aminobenzotriazol, un inhibidor de la enzima del Citocromo P450, la N-desalquilación del clortolurón fue apenas o en absoluto afectada, mientras que la alquil-oxidación se vió fuertemente inhibida. Este resultado sugería que la alquil-oxidación, pero no la N-desalquilación, está mediada por el Citocromo P450 (Cabanne et al., 1987; Gonneau et al., 1988; Canivenc et al., 1989).

Durante la década de 1980, resistencia a herbicidas inhibidores de PSII debida a un metabolismo incrementado apareció en gramíneas tratadas continuamente con el mismo herbicida (De Prado et al., 1997; Shaner, 1997; Rubin, 1997). Hasta la fecha, biotipos de siete especies de malas hierbas exhibiendo este tipo de resistencia han sido identificadas y parcialmente caracterizadas. Cinco entre ellas (*Alopecurus myosuroides*, *Lolium rigidum*, *Bromus tectorum*, *Phalaris minor*, y *Apera spica-venti*) son resistentes a clortolurón (Burnet et al., 1993; Menéndez et al., 1994; Kemp y Caseley, 1987; De Prado et al., 1996; Singh et al., 1996; Mayor y Maillard; 1996), mientras que los otros (*Echinochloa colona* and *Echinochloa crus-galli*) son resistentes a propanil (Fisher et al., 1993; Carey et al., 1995). Biotipos de *A. myosuroides* y *L. rigidum* resistentes a clortolurón están ampliamente distribuídos en Europa occidental y Australia, y se ha observado que metabolizan clortolurón (Burnet et al., 1993; Menéndez y De Prado, 1997; Kemp y Caseley, 1991). Dos poblaciones de *L. rigidum* resistentes a clortolurón fueron seleccionadas por atrazina y amitrol, y, en segundo lugar, por diurón y atrazina (Burnet et al., 1991). Ambos biotipos resistentes exhibieron una destoxificación incrementada, y algunos indicios indirectos sugirieron que el metabolismo estaba regulado por el Citocromo P450 (Burnet et al., 1993).

Tres biotipos de *L. rigidum* (R1, R2, y R3) resistentes a los herbicidas ariloxfenoxipropianato mediante diferentes mecanismos de resistencia (De Prado et al., 1997) han sido estudiados. Los objetivos de este trabajo fueron (i) cuantificar el nivel de resistencia de estos biotipos resistentes y susceptibles a diclofop a los herbicidas clortolurón e isoproturón; (ii) y determinar las bases de la resistencia a estos herbicidas evaluando la actividad de la reacción de Hill, la absorción, la translocación, y el

metabolismo de  $^{14}\text{C}$ -clortolurón los biotipos resistentes y el susceptible a ureas sustituidas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Productos químicos.

Se usaron productos comerciales de clortolurón (“Tolurex” 80 WP) e isoproturón (“Arelon” 50 WP). Los ensayos del efecto de los herbicidas clortolurón e isoproturón sobre la actividad fotosintética se hizo con herbicidas con grado analítico. Se empleó [ $^{14}\text{C}$ -clortolurón ( $89.5 \times 10^{-7}$  Bq  $\text{mmol}^{-1}$ )] radiactivo para los estudios de absorción, translocación y degradación metabólica.

### 2.2. Material vegetal.

Se recogieron semillas de biotipos anuales de ballico de campos de trigo en donde diclofop-métíl o diclofop -métíl + isoproturón habían fallado en el control de *L. rigidum* bajo prácticas normales. Las semillas se recolectaron durante el período desde 1992 a 1994 en tres diferentes campos de trigo de invierno en España. Dos biotipos (R1 y R2) procedían de campos que habían sido tratados previamente con diclofop-métíl durante al menos los últimos 10 años. Las semillas del tercer biotipo resistente (R3) fueron recogidas de campos de trigo de invierno tratados anualmente con una mezcla de diclofop-métíl + clortolurón o diclofop-métíl + isoproturón durante alrededor de 10 años. Las semillas de las plantas control del biotipo de *L. rigidum* (S) fueron recogidas de zonas marginales que nunca habían sido tratadas con herbicidas. Las semillas fueron germinadas en placas Petri que contenían papel de filtro humedecido con una solución de  $2 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$  bajo una iluminación continua de  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  y 80% humedad relativa durante 4 días. Las semillas pre-germinadas fueron transplantadas a razón de 10 semillas por maceta en una mezcla de 1:2 turba: tierra (arena) en macetas de plástico 20 x 15 cm. Las plantas se trasladaron a una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz de  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Las temperaturas diurnas y nocturnas fueron  $25$  y  $18^\circ\text{C}$ , respectivamente, y la humedad relativa fue constante a 80%. Las plantas fueron regadas según sus necesidades.

### **2.3. Condiciones de crecimiento.**

Macetas conteniendo tierra y 10 semillas pre-germinadas por maceta fueron tratadas pre-emergencia con clortolurón formulado (0.1 a 5 kg a.i.ha<sup>1</sup>) o isoproturón (0.1 a 4 kg a.i. ha<sup>1</sup>). Se aplicaron los herbicidas utilizando un pulverizador de laboratorio equipado con una boquilla de abanico plano TEE SET 8001 a 115 litros ha<sup>-1</sup> que corresponde a 250 kPa (De Prado et al., 1992). Las plantas control fueron pulverizadas con agua. Los experimentos fueron repetidos tres veces con 10 plantas por replicado, y las plantas fueron mantenidas durante 21 días en la cámara de crecimiento en las condiciones mencionadas anteriormente. Después de este tiempo, las plantas fueron cortadas y su crecimiento fue evaluado mediante la determinación del peso fresco de los brotes. Se calculó la dosis de herbicida necesaria para la reducción del 50% del peso fresco de los brotes (ED<sub>50</sub>) para cada herbicida según descrito previamente (Menéndez et al., 1994). En otro estudio paralelo, los mismos biotipos de *L. rigidum* fueron tratados con clortolurón o isoproturón a 2.0 y 1.0 kg a.i. ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Se determinó el peso fresco de los brotes después de 4, 8, 12, 16 y 20 días de tratamiento según se ha explicado anteriormente.

### **2.4. Aislamiento de cloroplastos y medidas de la reacción de Hill.**

Cloroplastos rotos fueron obtenidos a partir de hojas de 4 semanas de biotipos de *L. rigidum* como se ha descrito anteriormente por Ducruet y De Prado (1982). La reacción Hill (con ferricianuro como aceptor) se midió como una producción de O<sub>2</sub> con un electrodo de Clark. Las concentraciones de clortolurón e isoproturón necesarias para inhibir 50% del transporte electrónico fotosintético (I<sub>50</sub>) fueron evaluadas a partir de representaciones lineares de porcentajes de inhibición vs. el logaritmo de las concentraciones. Los experimentos se hicieron por triplicado.

### **2.5. Absorción y translocación de clortolurón.**

Plantas enteras de biotipos de *L. rigidum* teniendo tres hojas completamente expandidas fueron extraídas de las macetas y sus raíces fueron cuidadosamente lavadas. Plantas individuales fueron colocadas en recipientes de 25-ml llenos de solución nutritiva. Después de 2 días, las plantas enteras pesadas y aquellas con pesos similares fueron transferidas a pequeños tubos conteniendo 2 ml de una solución nutritiva con [<sup>14</sup>C]-

clortolurón a  $1650 \text{ Bq ml}^{-1}$  durante 12 hr. A continuación, las raíces de las plantas fueron bien lavadas para eliminar la radioactividad residual. Un grupo de plantas fue mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mientras que otros grupos fueron transferidos desde la solución con el herbicida a una solución nutritiva limpia de herbicida durante 24 y 48 horas. Se lavaron ambos grupos otra vez y se les secó con papel de filtro. Un grupo de plantas fue colocado sobre una película autoradiográfica y almacenado durante 2 semanas a  $4^{\circ}\text{C}$ . El otro grupo fue dividido en raíces y brotes, y las partes de las plantas fueron secadas, y posteriormente combustionadas en un oxidador de muestras vegetales (Tri-Carb, Modelo 307, Packard Instruments Co.), y su radioactividad (dpm) fue cuantificada (Beckman LS 6000 TA contador de centelleo, Beckman Instrument, Inc.) siguiendo el método descrito por (Menéndez et al., 1994). El experimento se repitió tres veces.

## **2.6. Metabolismo del clortolurón.**

Plantas recogidas según el método anterior fueron lavadas para eliminar cualquier radioactividad residual, secadas, y divididas en raíces y brotes. Los tejidos foliares fueron pesados, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-40^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior. Los metabolitos de clortolurón en brotes fueron analizados según descrito (De Prado et al., 1995; Swanson y Swanson, 1967). Los tejidos congelados fueron triturados en un mortero con 80% metanol, y el extracto se centrifugó (20,000g durante 10 mn a  $5^{\circ}\text{C}$ ).

Los pellets fueron lavados con metanol hasta extracción completa de  $^{14}\text{C}$  existente. Se determinó la radioactividad en los sobrenadantes mediante cuantificación en el contador de centelleo (dpm). Los extractos fueron evaporados hasta sequedad a  $40^{\circ}\text{C}$  bajo un chorro de  $\text{N}_2$  a 2 psi y redissueltos en 400  $\mu\text{l}$  de metanol al 95%. El clortolurón y sus metabolitos fueron identificados en alícuotas (100  $\mu\text{l}$ ) aplicadas sobre placas de TLC (250  $\mu\text{m}$  de silica gel, usando como eluyente cloroformo: etanol: ácido acético (90:10:10, v/v/vy). Los diferentes metabolitos de clortolurón fueron localizados empleando un escáner ( $^{14}\text{C}$ ) (Berthold LB 2821) e identificados mediante la comparación de sus valores Rf con los de compuestos de referencia. Los siguientes marcadores fueron facilitados por el Dr. F. Cabanne (INRA, Dijon, France): el metabolito N-monodesmetilado, el metabolito N-didesmetilado, y el metabolito hidroximetilfenil. Para las determinaciones cuantitativas, se rasparon las manchas

radioactivas, que fueron extraídas con metanol al 95%, y medidas en el contador de centelleo. Se repitió el experimento dos veces.

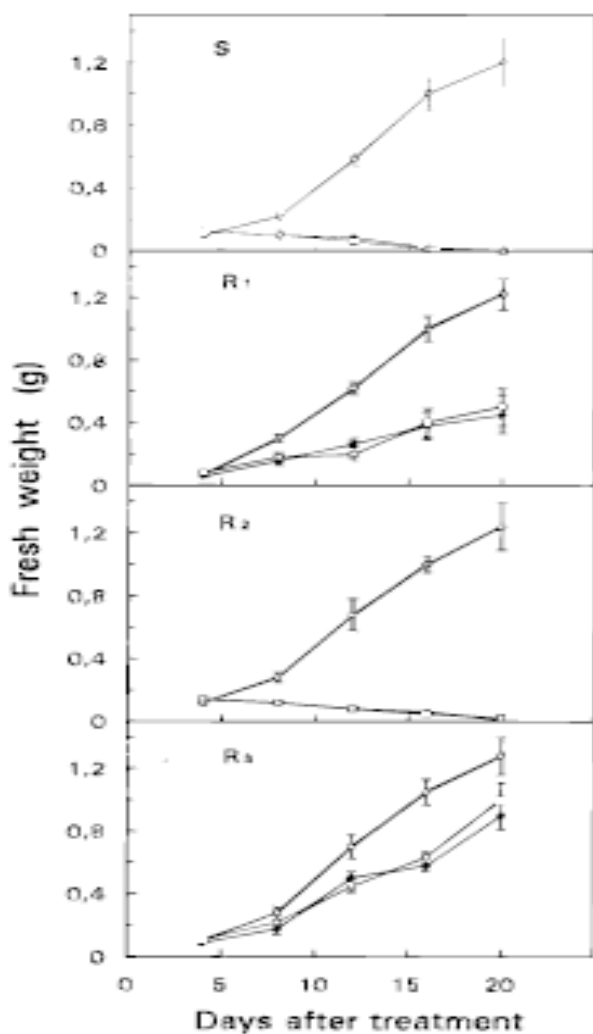
### **2.7. Efecto de ABT sobre el metabolismo.**

Plantas recogidas según se mencionó previamente en absorción y translocación fueron incubadas en una solución nutritiva con ABT a  $7 \mu\text{g litro}^{-1}$  durante 4 días. Posteriormente se utilizaron para los ensayos de metabolismo siguiendo el método descrito anteriormente. Se repitió el experimento tres veces.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Respuesta del crecimiento a los herbicidas.**

La respuesta del crecimiento a clortolurón e isoproturón mostró una marcada diferencia entre los biotipos de *L. rigidum* (Figura 2.1 y Tabla 2.1). Los pesos frescos demostraron que no había diferencias entre las plantas de control (Figura 2.1). Los tratamientos realizados a dosis de campo de clortolurón (2.0 kg a.i. ha<sup>-1</sup>) e isoproturón (1.0 kg a.i. ha<sup>-1</sup>) mostraron que sólo los biotipos R1 y R3 eran resistentes a estos herbicidas, mientras que los biotipos R2 y S fueron controlados a los 20 días después del tratamiento. El biotipo R1 fue 6.59 y 4.21 más resistentes a clortolurón e isoproturón que el biotipo S, mientras que el biotipo R3 era 9.26 y 5.53 más resistente a los herbicidas citados que el biotipo S. Los biotipos R2 y S eran susceptibles a ambas ureas sustituidas (Tabla 2.1).



**Figura 2.1.** Evolución del crecimiento de diferentes biotipos de *L. rigidum* tratados con clortolurón (2.0 Kg a.i. ha<sup>-1</sup>) e isoprotrurón (1.0 Kg a.i. ha<sup>-1</sup>), datos procesados a diferentes tiempos después de la aplicación. Plantas control (○). Plantas tratadas con clortolurón (□). Plantas tratadas con isoprotrurón (●).

**Tabla 2.1.** Valores de ED<sub>50</sub> de diferentes biotipos de *L. rigidum* tratados con clortolurón (C) e isoprotrurón (I).

Biotipo	ED <sub>50</sub> (kg a.i. ha <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		ED <sub>50</sub> ratio <sup>δ</sup>	
	C	I	C	I
S	0.41 ± 0.03	0.38 ± 0.06		
R <sub>1</sub>	2.70 ± 0.60	1.60 ± 0.55	6.59	4.21
R <sub>2</sub>	0.49 ± 0.08	0.34 ± 0.06	1.19	0.9
R <sub>3</sub>	3.80 ± 0.18	2.10 ± 0.12	9.26	5.53

Nota: Los datos son medias de los tres experimentos ±SE.

<sup>a</sup>ED<sub>50</sub>: concentración necesaria para la reducción del 50% del peso fresco.

<sup>δ</sup>ED<sub>50</sub> ratio: ED<sub>50</sub> (resistente) / ED<sub>50</sub> (susceptible)

### 3.2. Reacción de Hill.

Sobre tilacoides aislados se determinaron las concentraciones de clortolurón e isoproturón, necesarias para la inhibición de 50% de la reacción de Hill (Table 2.2). Los valores  $I_{50}$  de todos los biotipos fueron similares para ambos herbicidas. En todos los biotipos, los valores  $I_{50}$  fueron aproximadamente dos veces más altos para el isoproturón que para el clortolurón (Tabla 2. 2).

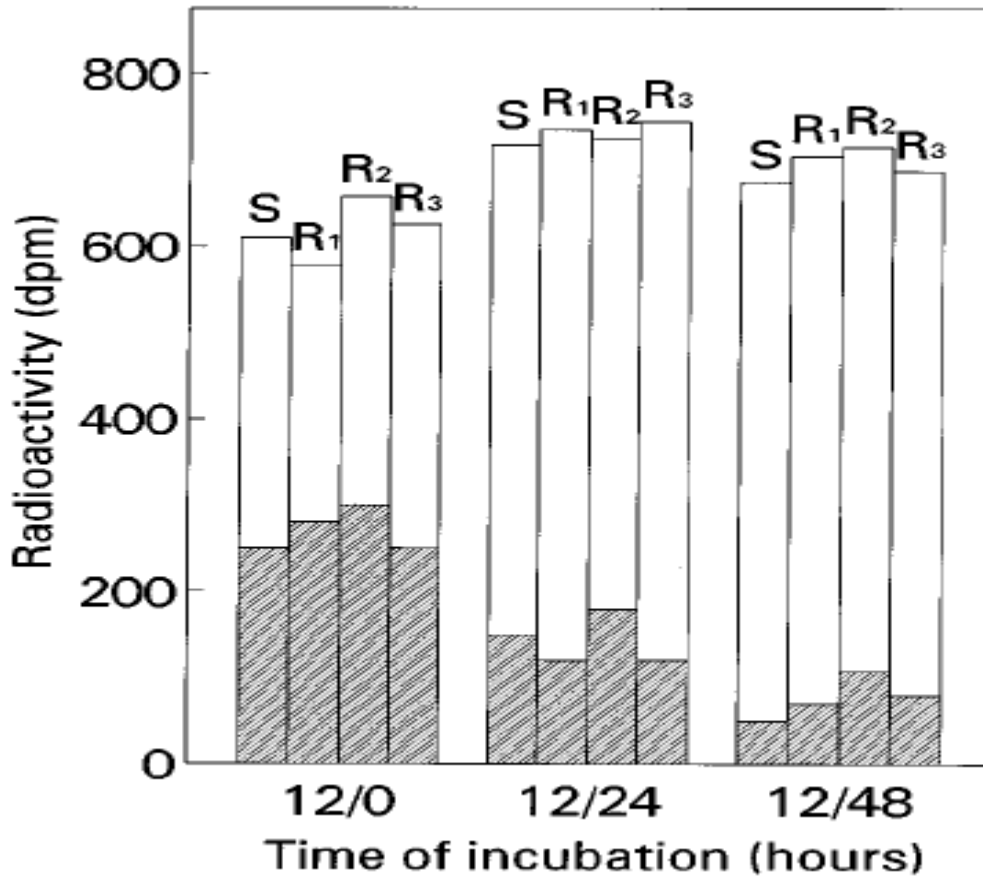
**Tabla 2. 2.** Valores de  $I_{50}$  de diferentes biotipos de *L. rigidum* tratados con clortolurón (C) e isoproturón (I).

Biotipo	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		$I_{50}$ ratio	
	C	I	C	I
S	0.22 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.04		
R <sub>1</sub>	0.26 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.04	1.18	1.11
R <sub>2</sub>	0.38 $\pm$ 0.04	0.68 $\pm$ 0.05	1.73	1.08
R <sub>3</sub>	0.32 $\pm$ 0.06	0.82 $\pm$ 0.09	1.45	1.3

Nota:  $I_{50}$  ratio =  $I_{50}$  (resistente) /  $I_{50}$  (susceptible). Los datos son medias de tres experimentos  $\pm$  SE.

### 3.3. Absorción y translocación de clortolurón.

La absorción de <sup>14</sup>C-clortolurón vía radicular y posterior translocación a los órganos foliares fueron similares para los biotipos resistentes y susceptibles de *L. rigidum* (Figura 2. 2). Estos datos fueron confirmados por autoradiografías (datos no mostrados). Estos resultados no sugieren diferencia alguna en la absorción y translocación en ninguno de los biotipos (S, R1, R2 y R3) y en ningún momento de su incubación en clortolurón, o incluso posteriormente en solución nutritiva limpia sin herbicida.

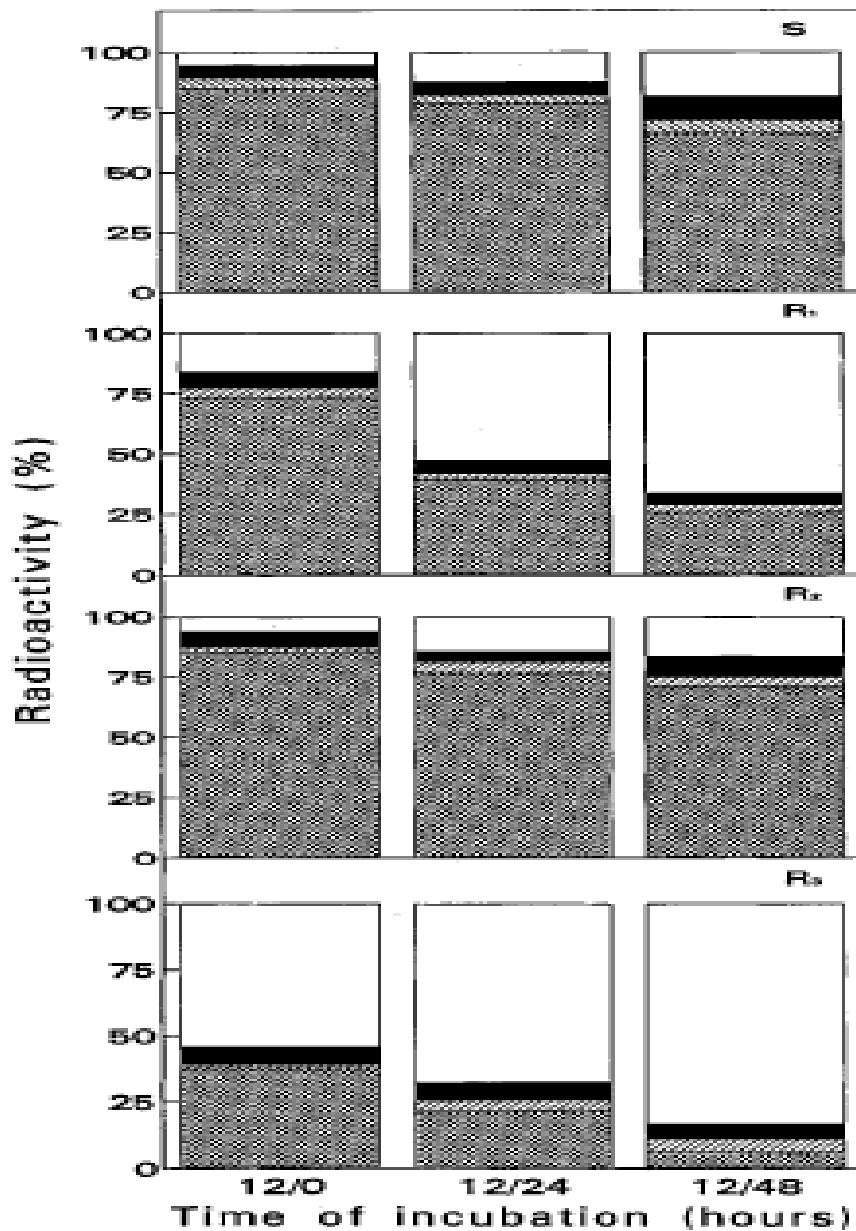


**Figura 2. 2.** Absorción y translocación de <sup>14</sup>C-clortolurón en diferentes biotipos de *L. rigidum*. <sup>14</sup>C- tallos (líneas blancas). <sup>14</sup>C-raíces (líneas oscuras).

### 3.4. Metabolismo de clortolurón.

La cromatografía de capa fina de la radioactividad extraíble procedente de todos los biotipos de *L. rigidum* mostró la conversión de clortolurón en tres metabolitos en todos los tiempos de la incubación (Figura 2. 3). El conjugado de clortolurón, un metabolito no fitotóxico, fue el principal producto que se formaba en los brotes después de 48 horas de incubación. Sin embargo, estos conjugados varían de biotipo a biotipo, y se encontraron los siguientes valores medios: biotipo S (17.97%); biotipo R1 (66.10%); R2 (16.32%); y R3 (83.21%). Pequeñas proporciones del metabolito N-monodesmetilado oscilaban entre 4.96 y 10.41%, y el metabolito hidroximetilfenil oscilaba entre 2.47 and 5.23%.





**Figura 2.3.** Distribución de  $^{14}\text{C}$ -clortolurón y sus metabolitos en biotipos de *L. rigidum* resistentes (R1 y R3) y sensibles (S y R2). La figura muestra los datos de un experimento. La duración de la incubación es expresada como horas de la planta en solución de herbicida / horas en solución nutritiva.  $^{14}\text{C}$ -clortolurón (barras punteadas).  $^{14}\text{C}$ -clortolurón conjugado (barras blancas). Metabolito  $^{14}\text{C}$ - monodesmetilado (barras negras). Metabolito  $^{14}\text{C}$ -hidroximetilfenil (barras de líneas).

### 3.5. Efecto de la aplicación de ABT en el metabolismo.

Los efectos de 1-aminobenzotriazol (ABT) en el metabolismo del clortolurón en los diferentes biotipos de *L. rigidum* tratados y no tratados con ABT aparecen en la Tabla 2. 3. El metabolismo de clortolurón en todos los biotipos fue inhibido por ABT. En hojas tratadas con ABT, la proporción de clortolurón conjugado disminuyó notablemente en los biotipos resistentes (R1 y R3). Sin embargo, en biotipos susceptibles (S y R2), los conjugados fueron menos claros debido a la ya baja tasa de formación de conjugados en estos biotipos. No se ha detectado el metabolito hidroximetilfenil en ninguno de los biotipos. Por contraste, se encontró un incremento en el metabolito N-monodesmetilado. Este metabolito fue mayor en los biotipos resistentes que en los biotipos susceptibles.

**Tabla 2.3.** Efecto de ABT (70  $\mu$ M) sobre el metabolismo de  $^{14}$ C-clortolurón en hojas de biotipos resistentes (R1 y R3) y sensibles (S y R2) de *L. rigidum*. Las plantas fueron incubadas en herbicida durante 24 hr y luego transferidas a solución nutritiva sin herbicida durante 48 hr.

		Radioactividad (%)			
	Metabolito <sup>a</sup>	CPU	M-CPU	H-CPU	C-CPU
- ABT	S	66.39 $\pm$ 5.38	15.21 $\pm$ 2.41	5.23 $\pm$ 1.88	17.97 $\pm$ 3.94
	R <sub>1</sub>	26.47 $\pm$ 2.17	4.96 $\pm$ 0.97	2.47 $\pm$ 0.79	66.01 $\pm$ 4.21
	R <sub>2</sub>	71.31 $\pm$ 6.32	8.46 $\pm$ 1.59	3.91 $\pm$ 1.03	16.32 $\pm$ 2.98
	R <sub>3</sub>	6.25 $\pm$ 1.21	5.33 $\pm$ 1.42	5.21 $\pm$ 0.74	83.21 $\pm$ 7.62
+ ABT	S	74.75 $\pm$ 5.94	15.61 $\pm$ 3.21	nd	9.64 $\pm$ 1.16
	R <sub>1</sub>	77.18 $\pm$ 4.21	9.89 $\pm$ 2.33	nd	12.93 $\pm$ 2.18
	R <sub>2</sub>	78.34 $\pm$ 5.67	10.61 $\pm$ 3.67	nd	11.05 $\pm$ 1.65
	R <sub>3</sub>	82.59 $\pm$ 4.91	15.95 $\pm$ 3.54	nd	11.46 $\pm$ 2.94

<sup>a</sup> CPU, M-CPU, H-CPU, and C-CPU clortolurón, metabolito N-monodesmetilado, metabolito hydroxymethylphenyl, y clortolurón conjugado. Los datos son medias de tres experimentos  $\pm$  SE no detectados

## 4. DISCUSIÓN

Estudios previos sobre estos biotipos de *L. rigidum* R1, R2 y R3, han mostrado distintos mecanismos de resistencia a diclofop-métil. Así, el mecanismo de resistencia en los biotipos R1 y R2 recogidos de un monocultivo de trigo de invierno tratado con diclofop-metil fue debido a su capacidad de resistir una disrupción celular catabólica

debida al estrés oxidativo, tal y como se reflejó en su menor susceptibilidad a la despolarización de la membrana. El biotipo R2 también poseía una forma tolerante de ACCasa. En el biotipo R3, que fue recogido de un monocultivo de trigo de invierno tratado con diclofop-metil + clortolurón o bien diclofop-metil + isoproturón, la resistencia a diclofop-metil era debida a la formación de un metabolito polar no fitotóxico vía aril hidroxilación, y también se notó su capacidad para recuperar el potencial de la membrana. Otros ensayos también sugirieron que el Citocromo P<sub>450</sub> podría estar implicado en este mecanismo de detoxificación.

Los resultados presentados confirman la resistencia a clortolurón, isoproturón y diclofop-metil en los biotipos R1 y R3 a nivel de planta entera. Por contraste, el biotipo R2 sólo exhibió resistencia a los herbicidas inhibidores de ACCase.

El mecanismo de resistencia sugerido en los biotipos R1 y R3 de *L. rigidum* a clortolurón e isoproturón podría ser debido al metabolismo de los herbicidas vía alquil-oxidación, mientras que los biotipos R2 y S (susceptible) carecen de esta aptitud. En los primeros biotipos, enzimas de Cit. P<sub>450</sub> podrían estar implicadas en esta reacción oxidativa. Una rápida inactivación metabólica de herbicidas sienta la base para una resistencia cruzada y múltiple a herbicidas en otras gramíneas (Menéndez et al., 1994; Menéndez y De Prado, 1997; Cotterman y Saari, 1992; Hall et al., 1994).

A nivel de planta entera, los biotipos R1 y R3 exhibieron resistencia a clortolurón y a isoproturón. El nivel de resistencia a estos herbicidas fue considerablemente mayor para el biotipo R3 comparado con los biotipos R1, pero esta diferencia también fue reflejada a nivel de formación de conjugados no fitotóxicos (Figs. 2.2 y 2.3). Los errores estándar fueron mayores para el biotipo R1 a lo largo del tratamiento de la planta que para el biotipo R3, lo que podría explicarse por el hecho de que la población R1 era menos homogénea que la población R3 (Figura 2.1 y Tabla 2.1).

La resistencia a clortolurón en los biotipos R1 y R3 no puede ser atribuída a absorción, translocación o diferencias en la unión a su sitio de acción (proteína DI) comparado con los biotipos susceptibles (S y R2) (Figura 2. 2 y Tabla 2. 2) Estos resultados están en total acuerdo con aquellos para *A. myosuroides* y *B. tectorum* resistentes a clortolurón (Menéndez et al., 1994; De Prado et al., 1996).

Una mayor detoxificación como mecanismo de resistencia a clortolurón ha sido descrita en varios cultivos y malas hierbas tales como trigo tolerante y biotipos de *A.*

*myosuroides* resistentes a clortolurón (Ryan y Owen, 1982; Cabanne et al., 1987; Menéndez y De Prado, 1997; Canivenc et al., 1989; Kemp y Caseley, 1987). En estos casos, la degradación del herbicida ha sido caracterizada como una vía metabólica de dos pasos mediada por un Cit. P<sub>450</sub> con N-monodesalquilación como el primer paso y anillo-alquil hidroxilación como reacciones posteriores (Ryan y Owen, 1982; Cabanne et al., 1987; Menéndez y De Prado, 1997; Canivenc et al., 1989). Esta segunda hidroxilación es un proceso clave en especies tolerantes/resistentes ya que los productos hidroxilados resultantes son sustratos para conjugaciones posteriores con azúcares. El clortolurón fue degradado a conjugados polares no fitotóxicos en todos los biotipos de *Lolium rigidum*, pero la degradación se hizo más rápida y mayor en los biotipos resistentes (R1 y R3) que en los biotipos susceptibles (S y R2) (Figura 2.3). Nuestros resultados muestran una alta capacidad para formar conjugados polares en ambas plantas R1 y R3, siendo este último el biotipo más eficaz para destoxificar el clortolurón. Estos hechos podría ser explicados por (A) una mayor capacidad de formar metabolitos de clortolurón conjugados mediante la actividad glucosil-transferase, o bien, como se afirmó anteriormente, (B) una alta capacidad para hidroxilar el clortolurón o metabolitos de clortolurón a especies no fitotóxicas óptimas para posteriores procesos de conjugación. Datos obtenidos de experimentos de ABT son consecuentes con esta segunda hipótesis. En calidad de inhibidor específico de la actividad hidroxalasa de clortolurón del Cit P<sub>450</sub> (Reichhart et al., 1982), esta sustancia química (ABT) inhibió el metabolismo del clortolurón en todos los biotipos mediante la reducción de la formación de metabolitos alquilhidroxilados, siendo las N-desmetilaciones menos susceptibles a ABT que las otras reacciones oxidativas. Esto no necesariamente implica que esta segunda actividad destoxificadora no está mediada por el Cit. P<sub>450</sub>, ya que algunas actividades de este sistema enzimático son más susceptibles a ABT que otras (Frear, 1995). A diferencia de los resultados obtenidos con otros biotipos resistentes de *L. rigidum*, que mostraron resistencia a clortolurón via N-desalquilación (De Prado et al., 1990; Burnet et al., 1991), nuestros datos sostienen la hipótesis de la hidroxilación 4-metilfenil como la principal vía de destoxificación en biotipos resistentes R1 y R3 de *L. rigidum*. Este mecanismo de resistencia podría ser la base para la resistencia a otros herbicidas dado que existe una buena correlación entre la capacidad de destoxificar clortolurón y el grado de resistencia a otras ureas sustituidas.

Por contraste, el biotipo R2 resistente a diclofop-métíl no exhibía estas características puesto que el Cit. P<sub>450</sub> no parece estar involucrado en su mecanismo de resistencia al herbicida.

## 5. REFERENCIAS

Burnet, M. W. M.; Hildebrand, O. B.; Holtum, J. A. M. and Powles, S. B. Amitrole, triazine, substituted urea and metribuzin resistance in a biotype of ryegrass (*Lolium rigidum*), *Weed Sci.* **39**, 317 (1991).

Burnet, M. W. M.; Loveys, B. R.; Holtum, J. A. M. and Powles, S. B. A mechanism of chlorotoluron resistance in *Lolium rigidum*, *Planta.* **190**, 182 (1993).

Cabanne, F.; Gaillardon, P. and Scalla, R. Phytotoxicity and metabolism of chlorotoluron in two wheat varieties, *Pestic. Biochem. Physiol.* **23**, 212 (1985).

Cabanne, F.; Huby, D.; Gaillardon, P.; Scalla, R. and Durst, F., Effects of the cytochrome P-450 inactivator 1 aminobenzotriazole on the metabolism of chlorotoluron and isoproturon in wheat, *Pestic. Biochem. Physiol.* **28**, 371 (1987).

Canivenc, M. C.; Cagnac, B.; Cabanne, F. and Scalla, R. Induced changes of chlorotoluron metabolism in wheat cell suspension cultures, *Plant Physiol. Biochem.* **27**, 193 (1989).

Carey, V. F.; Duke, S. O.; Hoagland, R. E. and Talbert, R. E. Resistance mechanism of propanil-resistant barnyardgrass. I. Absorption, translocation, and site of action studies, *Pestic. Biochem. Physiol.* **52**, 182 (1995).

Cotterman, J. C. and Saari, L. L. Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop-methyl-resistant ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype SR4/84, *Pestic. Biochem. Physiol.* **43**, 182 (1992).

De Prado, R.; Scalla, R. and Gaillardon, P, Differential toxicity of simazine and diuron to *Torilis arvensis* and *Lolium rigidum*, *Weed Res.* **30**, 213 (1990).

De Prado, R.; Sánchez, M.; Jorrin, J. and Domínguez, C. Negative cross-resistance to bentazone and pyridate in atrazine-resistant *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus hybridus* biotypes, *Pestic. Sci.* **35**, 131 (1992).

De Prado, R.; Romera, E. and Menéndez, J. Atrazine detoxification in *Panicum dichotomiflorum* and target site in *Poligonum lapathifolium*, *Pestic. Biochem. Physiol.* **52**, 1 (1995).

De Prado, R.; Romera, E. and Menéndez, J. Chlorotoluron resistance in a *Bromus tectorum* biotype is due to enhanced detoxification processes, in “International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides” (De Prado, R.; Jorrin, J.; Garcia-Torres, L. and Marshall, G. Eds.), pp. 62–64. Univ. Cordoba, Cordoba, 1996.

De Prado, R.; López-Martínez, N. and Giménez- Espinosa, R. Herbicide resistance in Europe: Agricultural, biochemical and physiological aspects, in “Weed and Crop Resistance to Herbicides” (De Prado, R.; Garcia- Torres, L. and Jorrin, J. Eds.), pp. 17–27, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1997.

Ducruet, J. M. and De Prado, R. Comparison of inhibitory activity of amide derivatives in triazine-resistant and -susceptible chloroplasts from *Chenopodium album* and *Brassica campestris*, *Pestic. Biochem. Physiol.* **18**, 253 (1982).

Fisher, A. J.; Granados, E. and Trujillo, D. Propanil resistance in populations of junglerice (*Echinochloa colona*) in Colombian rice fields, *Weed Sci.* **41**, 201 (1993).

Frear, D. S.; Swanson, H. R. and Tanaka, F. S. Herbicide metabolism in plants, in “Recent Advances in Phytochemistry” (V. C. Runeckles and R. C. Tso, Eds.), Vol.5 pp. 238–296, Academic Press, New York, 1972

Frear, S. Wheat microsomal cytochrome P450 monooxygenases: Characterization and importance in the metabolic detoxification and selectivity of wheat herbicides *Drug Metab. Drug Interact.* **12**, 329 (1995).

Geissbuhler, H.; Martín, H. and Voss, G. The substituted ureas, in “Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action” (P. C. Kearney and D. D. Kaufman, Eds.), Vol.1, pp. 209–291, Dekker, New York, 1975.

Gonneau, M.; Pasquette, B.; Cabanne, F. and Scalla, R. Metabolism of chlorotoluron in tolerant species: Possible role of cytochrome P-450 mono-oxygenases, *Pestic. Biochem. Physiol.* **28**, 19 (1988).

Gronwald, J.W. Resistance to photosystem II inhibiting herbicides, in “Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry” (Powles, S. B ;and Holtum, J. A. M. Eds.), pp. 27–60, Lewis Publishers, London, 1994.

Hall, L. M.; Holtum, J. A. M. and Powles, S. B. Mechanisms responsible for cross resistance and multiple resistance, in “Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry” (S. B. Powles and J. A. M. Holtum, Eds.), pp. 243–262, Lewis, London, 1994.

Kemp, M. S. and Caseley, J. C. Synergistic effects of 1-aminobenzotriazole on the phytotoxicity of chlorotoluron and isoproturon in a resistant population of black grass (*Alopecurus myosuroides*), *Br. Crop Prot. Conf.—Weeds*, 895 (1987).

Kemp M. S. and Caseley, J. C. Synergists to combat herbicide resistance, in “Herbicide Resistance in Weeds and Crops” (Caseley, J. C.; Cussans, G. W. and Atkin, R. K. Eds.), pp. 279–292. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1991.

Mayor, J. P. and Maillard, A. A new phenyl-urea resistant grass weed in Switzerland: *Apera spica -venti*, in “International Symposium on Weed and Crop Resistance to

Herbicides” (De Prado, R.; Jorrin, J.; Garcia-Torres, L. and Marshall, G. Eds.), pp. 26–29. Univ. Cordoba, Cordoba, 1996.

Menéndez, J.; Jorrin, J.; Romera, E. and De Prado, R, Resistance to chlorotoluron of a Slender foxtail (*Alopecurus myosuroides*) biotype, *Weed Sci.* **42**, 340 (1994).

Menéndez, J. and De Prado, R. Metabolism of chlorotoluron in resistant and susceptible *Alopecurus myosuroides* cell suspension cultures and whole plants, *Physiol. Plant.* **99**, 97 (1997).

Reichhart, D. ; Simón, A. ; Durst, F. ; Mathews, J. and Ortiz de Montellano, P. R. Autocatalytic inactivation of cinnamic acid 4-hydroxylase from *Helianthus tuberosus* by 1-aminobenzotriazole, *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 522 (1982).

Rubin, B. Herbicide resistance outside North America and Europe: Causes and significance, in “Weed and Crop Resistance to Herbicides” (De Prado, R.; Garcia-Torres, L. and Jorrin, J. Eds.), pp. 39–50, Kluwer Academic, Dordrecht, 1997.

Ryan, P. J.; Gross, D.; Owen, W. J. and Laanio, T. L. The metabolism of chlorotoluron, diuron, and CGA 43 057 in tolerant and susceptible plants, *Pestic. Biochem. Physiol.* **16**, 213 (1981).

Ryan; P. J and Owen, W. J. The mechanism of selectivity of chlorotoluron between cereals and grass weed. *Proc. Br. Crop Prot. Conf.—Weeds*, 317 (1982).

Shaner, D. L. Herbicide resistance in North America: History and circumstances of development and current situation, in “Weed and Crop Resistance to Herbicides” (De Prado, R.; Garcia-Torres, L. and Jorrin, J. Eds.), pp. 29–38, Kluwer Academic, Dordrecht, 1997.

Singh, S.; Kirwood, R. C. and Marshall, G. The effect of isoproturon applied *in vitro* and *in vivo* on photosynthesis of susceptible and resistant biotypes of *Phalaris minor*, in



“International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides” (De Prado, R.; Jorrin, J.; Garcia-Torres, L. and Marshall, G. Eds.), pp. 115–117. Univ. Cordoba, Cordoba, 1996.

Swanson, C. R. and Swanson, H. R. Metabolic fate of monuron and diuron in isolated leaf disc, *Weed Sci.* **15**, 137 (1967).

## **CAPITULO III**

### **RESISTENCIA A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ACCasa EN**

*Lolium rigidum*

## 1. INTRODUCCIÓN

*Lolium rigidum* Gaud (raigrás) es una de las principales malas hierbas que se encuentran en los cultivos herbáceos y perennes de Europa. Las primeras poblaciones de *L. rigidum* resistentes a diclofop-metil aparecen en 1990 en Inglaterra, y más tarde en 1992 aparecen en España los primeros biotipos con resistencia cruzada a herbicidas de las familias químicas de ACCasa, ALS, PSII y tubulina (De Prado *et al.* 1997). En España desde 1992, ha habido un aumento de la resistencia a los herbicidas inhibidores de la ACCasa, los ariloxifenoxipropionatos (AOPP) y la ciclohexanodionas (CHD), ya que cada vez se han utilizado más como graminicidas (Schmidt, 1997). Los AOPP y CHD se utilizan para el control de malas hierbas gramíneas en cultivos de hoja ancha y en cereales como el trigo (Gronwald, 1994; Devine *et al.* 1993). En general, su selectividad se basa en los efectos de estos herbicidas sobre la proteína diana, la enzima ACCasa (CE 6.4.1.2), que se encuentra tanto en el citosol como en los cloroplastos y cataliza el primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos (Konishi y Sasaki, 1994). La selectividad de los herbicidas AOPP y CHD se expresa a nivel de los plástidos donde se localiza la ACCasa (Gronwald, 1994; Konishi y Sasaki, 1994; Alban *et al.* 1994). Esta diferencia de susceptibilidad a nivel molecular se debe a la presencia de dos tipos diferentes de ACCasa en los plástidos de gramíneas y dicotiledóneas. Los plástidos de gramíneas contienen una ACCasa de tipo sensible, eucariota, multifuncional con una subunidad biotinilada de aproximadamente 36 kDa (Alban *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1995; Shorrosh *et al.*, 1995). En dicotiledóneas se encuentra la forma procariota de la enzima, una proteína con múltiples subunidades. Ambas malas hierbas, gramíneas y dicotiledóneas, contienen la ACCasa multifuncional citosólica (Alban *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1995; Shorrosh *et al.*, 1995; Egli *et al.*, 1993). Estas formas citosólicas presentan un nivel de tolerancia a los graminicidas que son significativamente mayores que las formas ACCasas plásticas de las malas hierbas gramíneas, pero inferior a aquellas formas plásticas presentes en las dicotiledóneas. La presencia de resistencia en biotipos de *Lolium* spp. pueden ser debidos a: (i) una mayor capacidad para metabolizar los herbicidas tales como; fenilureas (Preston y Powles., 1997; De Prado *et al.*, 1997), inhibidores de la acetolactato sintasa (Cotterman y Saari., 1992), e inhibidores de la ACCasa (Holtum *et al.*, 1991), estando en estos casos implicados 2

tipos de enzimas, el citocromo P450 (Moss et al., 2003) o a la glutatión S-transferasa (Moss et al., 2003)] y (ii) una isoforma alterada de la ACCasa que ha perdido afinidad por el herbicida (Zagnitko et al., 2001). Los objetivos específicos de este estudio fueron: (i) confirmar la resistencia a diclofop-metil (DM) en las poblaciones de *L. rigidum* encontradas en España, (ii) determinar el mecanismo de resistencia realizando ensayos con DM de penetración, metabolismo y actividad de ACCasa en poblaciones resistentes y susceptibles de *L. rigidum*, y (iii) examinar si ambas formas de ACCasa, cloroplástica y plastídica, se encontraban en *L. rigidum* y estudiar su respuesta frente al DM.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Reactivos.**

<sup>14</sup>C-DM fue proporcionado por Bayer CropScience (Alemania). Una formulación comercial de este herbicida (Iloxán; 36% w / v CE) utilizada para los ensayos de crecimiento fue suministrado por Bayer CropScience (España).

### **2.2. Material vegetal.**

Las semillas de *L. rigidum* fueron recolectadas en campos de trigo donde se había aplicado DM a la dosis recomendada por el fabricante, tanto solo como en combinación con clortolurón o isoproturón, y se había detectado escapes en el control de las malezas. Las semillas fueron recolectadas entre 1995 y 2000 en tres campos de trigo de invierno en España. El biotipo de *L. rigidum* resistente (R2) fue recogido de un campo de trigo de invierno que había sido tratado anualmente con una mezcla de clortolurón o isoproturón además de DM por más de 10 años. Los otros biotipos resistentes (R1 y R3) se recogieron de campos tratados anualmente con DM sólo, durante al menos 10 años. Semillas de un biotipo susceptible para ser utilizado como control se recogieron cerca de olivares que nunca habían sido tratados con herbicidas. Las semillas de los biotipos R y S fueron germinadas en placas Petri con un papel secante humedecido con agua destilada. La cubierta de placa de Petri se selló con parafilm, y las semillas fueron pregerminadas en una cámara de crecimiento a 23/18 °C (día / noche) en un fotoperiodo de 16 h. a 80 °C de humedad relativa.

Tres o cuatro semillas pregerminadas (para los ensayos de crecimiento y para los de absorción/ translocación, respectivamente) fueron plantadas por maceta (7 cm. de diámetro, 7 cm. de alto, macetas de plástico) en una mezcla turba/suelo (1/2, v/v). Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones que para la germinación.

### **2.3. Ensayos de crecimiento con DM.**

En el estadio de 2-3 hojas, los biotipos R y S de *L. rigidum* fueron tratados con una formulación comercial de DM en varias concentraciones (S: 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 kg. i.a. ha<sup>-1</sup>, R1, R2, y R3: 1, 2, 4, 6, y 12 Kg. i.a ha<sup>-1</sup>) con una máquina de tratamiento de laboratorio (de boquillas tipo abanico plano) a un volumen de 200 l ha<sup>-1</sup> a 200 kPa. Los tratamientos se repitieron tres veces, y el peso fresco se evaluó a los 21 días del tratamiento. La concentración de herbicida que causó una disminución del 50% de crecimiento con respecto al control (ED<sub>50</sub>) se determinó para cada biotipo (Osuna et al. 2003)

### **2.4. Penetración de <sup>14</sup>C-DM.**

El <sup>14</sup>C-DM se mezcló con la formulación comercial de DM para preparar una emulsión con una actividad específica de 37,9 Bq mg<sup>-1</sup> y una concentración de MS de 6,6 g L<sup>-1</sup> (que corresponde a 1,0 kg ha<sup>-1</sup> de DM a 150 L ha<sup>-1</sup>). Esta formulación del herbicida se aplicó a la cara adaxial de la segunda hoja de cada planta con cuatro gotas de 0,5 microlitros utilizando un microaplicador (Hamilton PB-600). Un total de 833.33 Bq se aplicaron en cada planta.

Las plantas se cosecharon en lotes de tres plantas a distintos intervalos de tiempo después de la aplicación del herbicida (0, 3, 6, 12, 24 y 48 h) y se separaron en hojas tratadas y del resto de plantas. Las raíces fueron descartadas, debido a que la translocación del herbicida de hoja a raíces se ha descrito como indetectable en el trigo (Brezeanu et al., 1975). El herbicida no absorbido fue retirado de la superficie de la hoja lavando el área tratada con 1,5 ml de acetona. El lavado de cada lote se agrupó y se analizó por espectrometría de centelleo líquido (LSS) (Beckman LS 6000 TA). El tejido se secó a 60 °C durante 48 h, y se quemó en un oxidador (Packard 307). El CO<sub>2</sub> que se produjo fue atrapado y cuantificado en 10 ml de Carbosob E/Permafluor + (7.3 V / V)

(Packard Instruments Co.). La radiactividad se cuantificó por LSS y se expresó como el porcentaje de la radioactividad recuperada, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ absorption} = \frac{^{14}\text{C in combusted tissue/}}{(^{14}\text{C in combusted tissue} + ^{14}\text{C in leaf washes})} \times 100$$

El experimento se repitió tres veces.

## **2.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

Se cortaron trozos pequeños de hojas frescas de *L. rigidum* con un bisturí y se fijaron en glutaraldehído al 2% (v/v) en 0,2 M de tampón fosfato, pH 7, durante la noche a 4°C. Basándonos en Casado y Heredia, 2001, las muestras fueron lavadas con un tampón de fosfato fresco y deshidratadas a través de una serie de soluciones de etanol a diferentes concentraciones [20, 40, 60, 80 y 100% (v/v)] y con intervalos de tiempo incrementando desde 15 min. a 1 hora y 30 min. Las piezas fueron colocadas en un soporte metálico con un adhesivo de doble cara y cubierto con una película delgada de 0.05 micras de oro. Un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-840 a 10-20 kV se utilizó para el análisis de las muestras.

## **2.6. Metabolismo de <sup>14</sup>C-DM.**

El metabolismo de <sup>14</sup>C-DM fue examinado en el tejido foliar de los biotipos R2, R3, y S en un estadio de 2 hojas, como fue realizado en los estudios de la penetración. El herbicida se aplicó a la superficie adaxial de la segunda hoja en 10 gotas de 0,5 l con un microaplicador. Se aplicó un total de 5.000 Bq en cada planta. Las plantas de R2, R3, y S se muestrearon 6, 12, 24 y 48 h después del tratamiento. Las hojas tratadas se lavaron siguiendo las indicaciones anteriores. Una alícuota de la solución de lavado de la hoja fue tomada para cuantificar la radiactividad, y la solución restante se almacenó a -20 ° C hasta su análisis. Las plantas tratadas fueron separadas en raíces y resto de la planta. La parte aérea de cada planta fueron pulverizadas en nitrógeno líquido con un mortero. El polvo se extrajo a 4 ° C con 4 ml de metanol al 80%, y el homogenizado se centrifugó a 20000G durante 20 minutos. El pellet se lavó con metanol al 80% hasta que ya no se extrajo ningún resto de <sup>14</sup>C. Los pellets fueron secados en un horno y quemados como se mencionó anteriormente. Los sobrenadantes se combinaron, se evaporaron a 40 ° C bajo una corriente de N<sub>2</sub> a 10 kPa, y se disolvieron en 500 L de metanol al 80%. El DM

y sus metabolitos en el sobrenadante fueron identificados por cromatografía en capa fina, en 250 micras placas de gel de sílice de 20 cm × 20 cm, 250 μm (Merck, gel de sílice 60) y como fase móvil una mezcla de tolueno/etanol/ácido acético (150/7/7, v/v/v). Las zonas radiactivas fueron detectadas con un escáner radiocromatógrafo (Berthold LB 2821) y su naturaleza química fue identificada mediante la comparación de sus valores Rf con los de los patrones (DM, 0,70; diclofop- ácido, 0,44; hidroxidiclofop, 0,34; conjugados polares, 0,00). Para las determinaciones cuantitativas, las manchas radiactivas se desprendieron, se extrajeron con metanol al 80%, y fueron cuantificadas por LSS. El experimento se repitió tres veces.

### **2.7. Efecto de ABT sobre el metabolismo de DM.**

Se ha demostrado que el ABT (1-aminobenzotriazol) inhibe el metabolismo de <sup>14</sup>C-DM en *L. rigidum* (Preston, C. et al. 1996). En este ensayo, las plantas con dos hojas completamente expandidas fueron retiradas de las macetas y las raíces se lavaron cuidadosamente. Las plantas individuales se colocaron en 50 mL de contenedores llenos con solución nutritiva los cuales contenían 7,5 mg L<sup>-1</sup> ABT. La solución nutritiva fue aireada con aire filtrado. Después de 8 días de incubación en ABT, las plantas fueron tratadas con DM como se describió previamente y se cosecharon 48 horas después de la aplicación de herbicidas.

El DM y sus metabolitos fueron extraídos, cromatografiados, e identificados como se describió anteriormente.

### **2.8. Ensayos de actividad ACCasa.**

La actividad enzimática se determinó mediante la medición de la incorporación de la ATP-dependiente de NaHO<sub>3</sub> en un producto ácido-estable. Anteriormente se demostró que el producto de la reacción es [<sup>14</sup>C]-malonil-CoA (Gronwald et al., 1992). Los ensayos se llevaron a cabo en viales de centelleo de 7ml los cuales contenían 0,1 M Tricina-KOH (pH 8.3), 0,5 M de glicerol, 0,05 M de KCl, 2 mM. EDTA, 0,5 mM. DTT, 1.5 mM. ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM de NaHO<sub>3</sub> (33 Ci mol<sup>-1</sup>), 90 μL de la enzima, y 5 mM de acetil-CoA en un volumen final de 0.2 mL. La temperatura del ensayo fue de 36°C. La reacción se detuvo después de 5 minutos con la adición de 30 μL de 4 N HCl. El medio de reacción acidificado se secó a 40°C bajo una corriente de

aire. La radiactividad en forma de ácido estable se determinó mediante la disolución de las muestras secadas en 0.5 ml de 50% (v/v) de etanol. La radioactividad se determinó por la LSS. Las concentraciones de diclofop ácido necesarias para reducir el 50% de la actividad enzimática (valores de  $I_{50}$ ) fueron determinadas para todos los biotipos de *L. rigidum*.

### **2.9. Western Blotting.**

Las fracciones de ACCasa crudas y purificadas fueron separadas uniformemente por electroforesis de sodio dodecil sulfato de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en 15.4% (w/v) Sistema PhastGels y PhastGels. Antes de la electroforesis, las muestras se hirvieron durante 5 min. Las distancias de las migraciones se determinaron mediante análisis de regresión comparando con las distancias de migración de proteínas de alto peso molecular con biotina (Bio Rad), además de ferritina caballo bazo (220 kDa) que se tomaron como controles. Las proteínas en PhastGels fueron trasladadas a Inmobilon-P por la acción capilar. Los bloques se incubaron durante 18 horas en TBST [80 mM Tris HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl, y 0,1% (v / v) Twen-20] a temperatura ambiente con agitación. Las proteínas biotiniladas se marcaron con fosfatasa alcalina avidina- (Evenson et al., 1997).

### **2.10. Determinación de la proteína.**

La proteína fue estimada por el análisis de Bradford usando albúmina sérica bovina como estándar (Bradford., 1976).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Ensayos de crecimiento con DM.**

La respuesta al crecimiento con DM fue diferente entre los biotipos de *L. rigidum*. El tratamiento realizado a la dosis de campo con DM (Iloxán 2,5 l ha<sup>-1</sup>) demostró que el biotipo S murió 15 días después del tratamiento. Los biotipos R1, R2 y R3 mostraron resistencia al DM, siendo este último el que mostró un mayor nivel de resistencia. Los biotipos R1, R2 y R3 fueron 7.20, 13.00 y 36.60, respectivamente, menos sensibles a DM que al biotipo S (Tabla 3.1). Estos resultados sugieren la



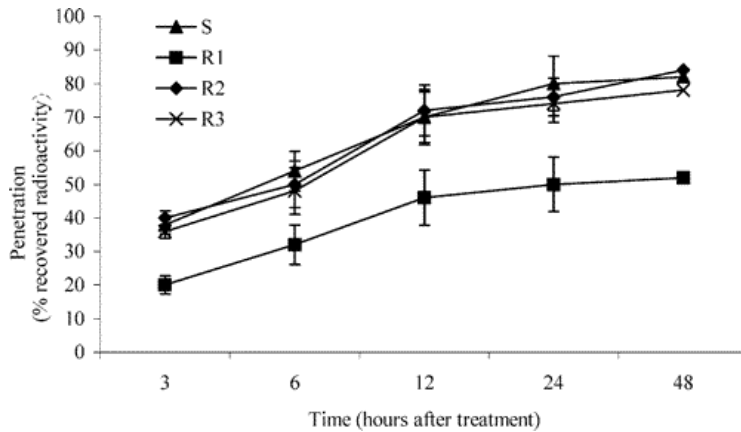
participación de los diferentes mecanismos de resistencia. Por lo tanto, una mutación en la ACCase dará un nivel de resistencia mayor que un cambio en el metabolismo del herbicida y esto también es superior a la resistencia provocada por la falta de penetración de los herbicidas.

**Tabla 3.1.** Efecto de la aplicación de DM sobre el crecimiento de los diferentes biotipos de *L. rigidum*.

Biotipo	ED <sub>50</sub> (Kg. a.i./ha)	ED <sub>50</sub> R/ED <sub>50</sub> S
S	0.25 ± 0.02	
R1	1.80 ± 0.06	7.20
R2	3.25 ± 0.3	13.00
R3	9.15 ± 0.7	36.60

### 3.2. Penetración de <sup>14</sup>C-DM.

No hubo diferencias significativas en la penetración de DM en los biotipos R2, R3 y S de *L. rigidum* (datos no mostrados), sin embargo, el biotipo R1 mostró un índice de penetración más bajo que los otros biotipos (Figura 3.1). Después de 24 h de la aplicación, aproximadamente el 75% de la radioactividad recuperada había penetrado en el tejido foliar de los biotipos R2, R3, y S de *L. rigidum*, mientras que sólo el 50% había penetrado en el biotipo R1. Después de 24 h, la penetración de los herbicidas fue inferior al 4% en todos los casos (Figura 3. 1). Esta es el primer reporte de la resistencia de en *L. rigidum* debido a falta de penetración, lo cual ya había sido reportado en otras gramíneas (Evenson et al., 1997; Devine et al., 1992, De Prado y Franco, 2004). Otros estudios realizados en el biotipo R1, tales como el metabolismo de DM y la actividad de ACCasa no revelaron ninguna diferencia entre éste y el biotipo susceptible (datos no mostrados).



**Figura 3. 1.** Penetración en diferentes biotipos de *L. rigidum*.

### 3.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

La superficie exterior de la cutícula de las hojas de los diferentes biotipos de *L. rigidum* fue estudiado por SEM. Se encontraron diferencias morfológicas significativas en el lado adaxial de las hojas.

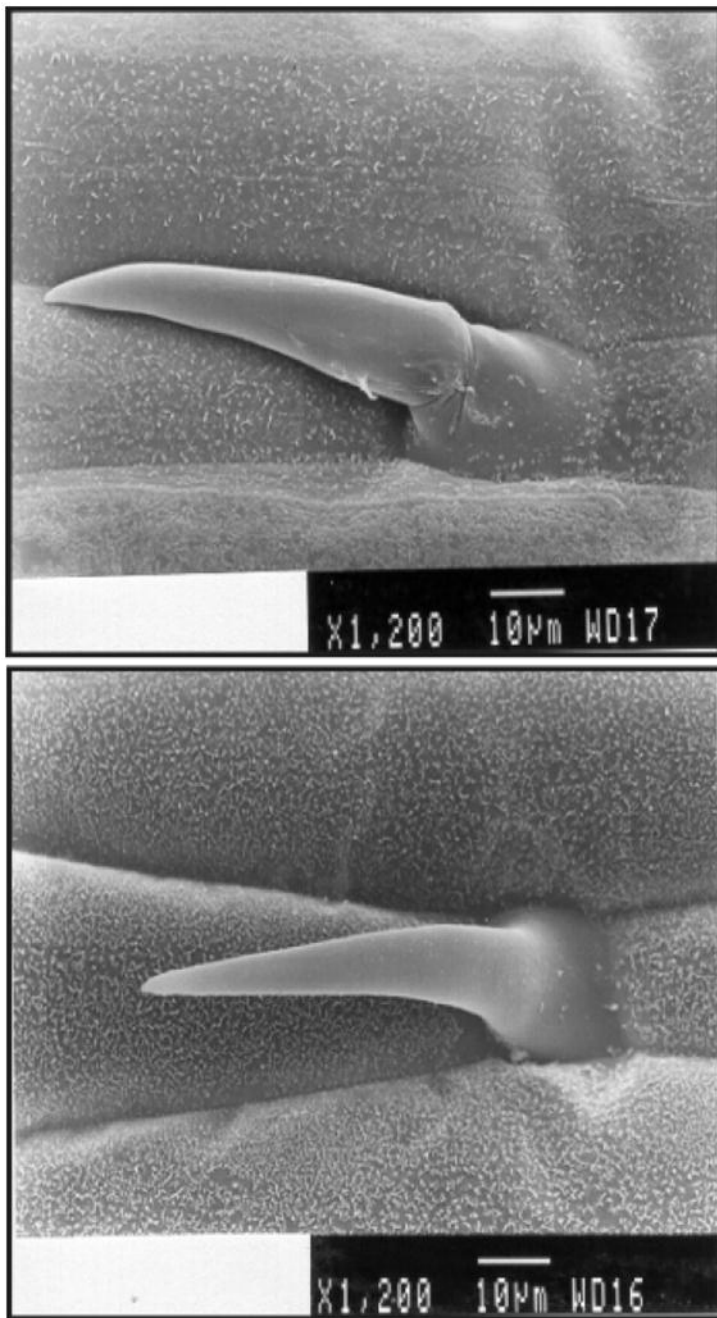
La Figura 2 muestra las micrografías electrónicas de barrido de la superficie externa de los biotipos S y R1. La cutícula aparece como una capa fina y continua, suave y con una notable cantidad de ceras en forma de plaquetas aisladas densamente distribuidas sobre la superficie externa de la cutícula.

Esta morfología y ultraestructura epicuticular de cera se ha observado en una amplia variedad de especies de plantas (Barthlott., 1998). La Figura 3.2 también muestra una diferencia significativa entre ambos biotipos: la cantidad de plaquetas de cera por unidad de área de superficie de la cutícula es mayor en el caso del biotipo R1.

Este hecho da a la cutícula de este biotipo una barrera molecular adicional e hidrofóbica a la difusión química.

Un análisis de cromatografía cualitativo, realizado mediante cromatografía en capa fina, de las ceras cuniculares aisladas de estos dos biotipos mostró una composición similar cualitativa que indica que los ésteres de cera fueron el principal componente de estas ceras (datos no presentados). Ésteres de cera de la planta, junto con alcanos cera, son los compuestos más hidrofóbicos que se encuentran en las ceras vegetales (Barthlott., 1998). Estos resultados permiten la hipótesis de que esta barrera de cera es responsable

de una menor penetración del herbicida en el biotipo R1 y una mayor sensibilidad a DM en el biotipo S



**Figura 3. 2.** Microscopía electrónica de la superficie adaxial de hojas de *L. rigidum* resistente (inferior) y sensible (superior) a DM.

### 3.4. Metabolismo de <sup>14</sup>C-DM.

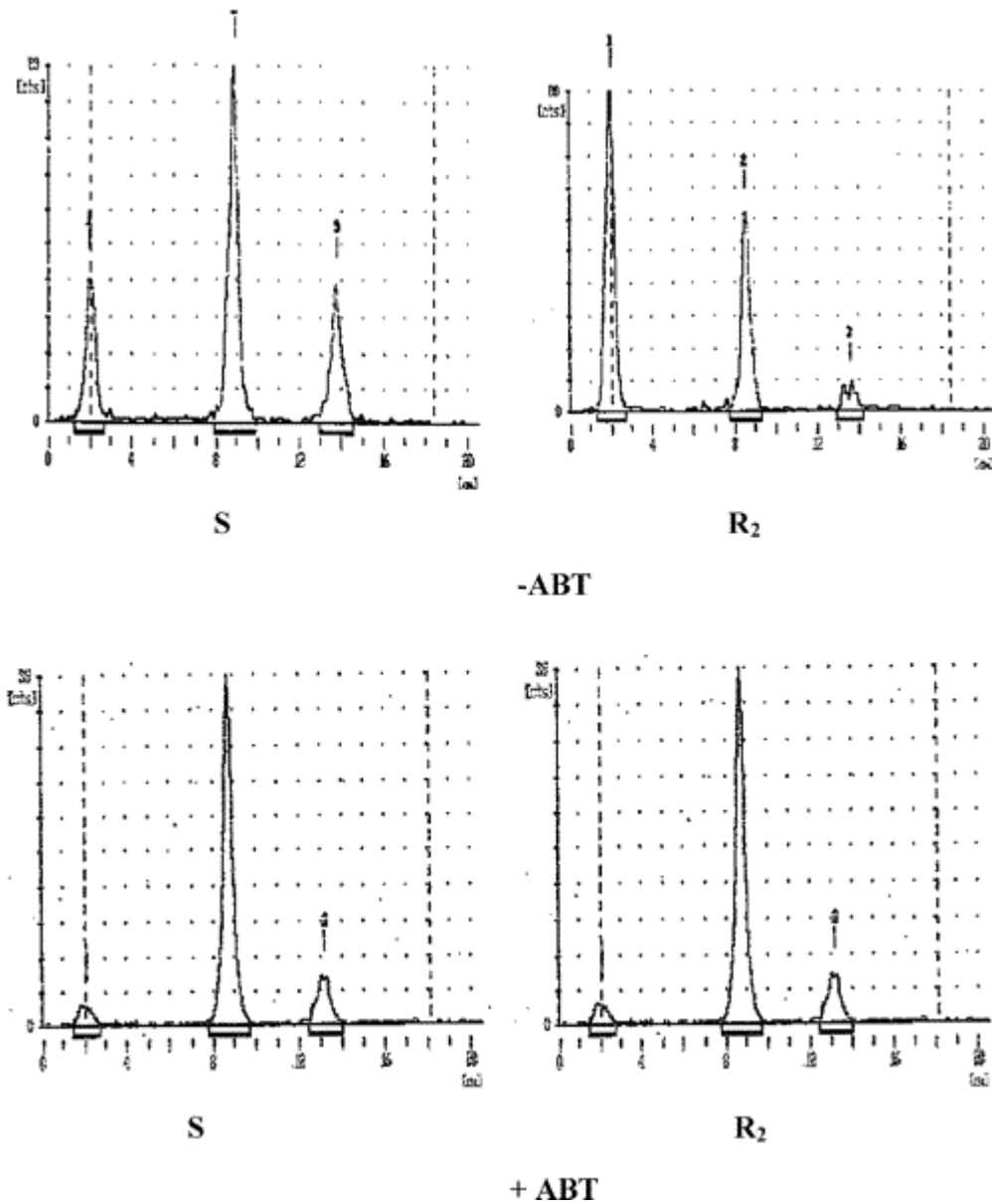
Cualitativamente, el patrón del metabolismo de DM fue similar en los biotipos de *L. rigidum* resistentes (R2 y R3) y susceptibles (S). DM se transforma en diclofop-ácido, y este compuesto es metabolizado a otros compuestos que son más polares que el diclofop-ácido. Estos compuestos son principalmente conjugados éster con azúcar del diclofop-ácido y del hidroxidiclofop. Todos estos metabolitos (DM, diclofop-ácido, y conjugados polares) se encontraron en todos los biotipos estudiados. Sin embargo, DM se metaboliza a un compuesto no tóxico significativamente más rápido en el R2 que en S y R3, los cuales cuantitativamente mostraron un patrón de metabolismo similar durante todo el tiempo del ensayo (datos no mostrados).

Los biotipos R2 y S hidrolizaron rápidamente el DM penetrado a la forma ácido a través de la actividad esterasa quedando menos del 11% de DM a las 48 h de tratamiento (Tabla 3. 2 y Figura 3. 3).

**Tabla 3. 2.** Metabolismo de <sup>14</sup>C-DM en biotipos de *L. rigidum* resistente (R2) y susceptible (S) 6, 12, 24 y 48 h después del tratamiento.

Metabolitos	% radioactividad extraída							
	6h		12h		24h		48h	
	R2	S	R2	S	R2	S	R2	S
DM	28,21(3,2) <sup>a</sup>	20,37(1,3)	20,47(1,3)	16,61(3,2)	15,92(1,1)	14,35(6,9)	10,92(1,1)	9,35(3,2)
Diclofop acd	64,48(2,1)	75,23(5,2)	60,00(3,2)	78,31(2,3)	36,92(3,3)	76,73(4,4)	20,32(3,2)	77,37(6,7)
Conjugado	10,31(0,1)	4,40(1,2)	19,53(0,4)	5,08(0,1)	47,38(2,4)	8,93(2,2)	68,76(4,1)	12,01(4,2)

<sup>a</sup> valores medios (± error Standard de las medias).



**Figura 3.3.** Distribución de  $^{14}\text{C}$ -DM y sus metabolitos en biotipos de *L. rigidum* preincubados (+ ABT) o no preincubados (-ABT) en  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 1. Datos de un experimento típico.

La concentración de diclofop-ácido fue 3,8 veces mayor en el biotipo S que en el biotipo R2 a las 48 h. Esto se correlaciona con la cinética de la forma-conjugada mostrada por los biotipos S y R2, donde después de 48 h de la aplicación de DM, la cantidad de conjugado formado fue 5 veces mayor en el biotipo R2 que en el biotipo S.

La preincubación en la solución de ABT inhibió significativamente el metabolismo de DM a conjugados polares en todos los biotipos ensayados (Figura 3. 3).

En los biotipos R2 y S, la cantidad de conjugados no tóxicos formados 48 horas después de la aplicación se redujo en más de una cuarta parte de la cantidad observada en las plantas no preincubadas. Como la cantidad de metabolitos polares disminuyó, una acumulación significativa de diclofop-ácido se observó en R2, lo que ya se había visto en otros experimentos utilizando inhibidores del Cit P<sub>450</sub> (Osuna et al., 2002).

Esta misma ruta también ha estado involucrada en la desintoxicación de DM en algunos biotipos de *L. rigidum* (Holtum et al., 1991) de Australia y *Alopecurus myosuroides* de España y el Reino Unido (Menéndez y De Prado., 1996; Hall et al., 1997). La detoxificación metabólica fue catalizada tanto en R2 como en S por monooxigenasas del Cit. P<sub>450</sub> ya que la inhibición de estas enzimas por ABT dió lugar a una fuerte reducción en la tasa de desintoxicación por hidroxilación de la inhibición de diclofop-metil (Figura 3. 3).

Por otro lado, nuestros datos sugieren que aril-O-glucósido fue el principal componente de la fracción conjugada, al verse la cantidad de los conjugados polares fuertemente afectada por la inhibición de la hidroxilación del diclofop. En la mayoría de las especies sensibles de gramíneas, el diclofop-ácido se conjuga para dar un conjugado de éster de glucosa (Menéndez y De Prado., 1996; Jacobson y Shimabukuro., 1984), que no es efectiva para desintoxicar el herbicida debido al carácter reversible de la formación de glicosil (Shimabukuro et al., 1987). En la mayoría de gramíneas resistentes, el anillo hidroxilado de diclofop se conjuga para dar un aril-O-glucósido de la naturaleza irreversible (De Prado y Franco., 2004).

### **3.5. Ensayos de ACCasa.**

Los valores de I<sub>50</sub> se calcularon para las diferentes fracciones en la purificación.

Después de la filtración gel S-400, el valor en ambos biotipos fue similar al del extracto crudo, cerca de 0.5 µM en el biotipo S y 15 y 16 µM en el biotipo R3. El factor de resistencia fue de 30. Las fracciones de ACCasa I y ACCasa II poseen diferencias significativas en su inhibición por DM. El valor de I<sub>50</sub> para la inhibición diclofop de la forma predominante (de ACCase I) fue de 37 veces mayor para el biotipo R3 que para el S.

La isoforma de menor importancia (ACCCase II) fue relativamente insensible a este herbicida en los dos biotipos con  $I_{50}$  de valores superiores a los observados para el de la ACCCase I (Tabla 3. 3).

**Tabla 3.3.** Efecto de diclofop ácido sobre diferentes fracciones de ACCCase obtenidas por filtración de Sephacryl S400 y cromatografía TMAE de intercambio aniónico de biotipos de *L.rigidum* resistentes (R3) y susceptibles (S) a diclofop-metil.

Fracciones	$I_{50}$ ( $\mu$ M)		Resistance factor [ $I_{50}(R)/I_{50}(S)$ ]
	S	R3	
crude extract	$0.43 \pm 0.06$	$15.0 \pm 0.82$	34.9
S400	$0.51 \pm 0.08$	$16.0 \pm 1.31$	31.4
ACCCase II	$110 \pm 7.26$	$110 \pm 10.03$	1.0
ACCCase I	$0.47 \pm 0.06$	$17.5 \pm 0.96$	37.2

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados de estos ensayos demuestran que *L. rigidum* contiene dos formas diferentes de la ACCasa que difieren en la tolerancia a diclofop. La resistencia a diclofop en el biotipo R3 se debe a la presencia de una forma resistente de ACCasa. En este trabajo se ha demostrado que las hojas de *L. rigidum* contienen dos actividades de ACCCase: una enzima plástido-localizada (ACCAase I) y una enzima menor (ACCAase II), que difiere en las propiedades de intercambio de aniones, el tamaño de la subunidad y la inhibición del herbicida.

Al igual que en otras gramíneas estudiadas, donde la ACCCase cloroplástica representa un 80-95% de la actividad ACCasa total (Egli et al., 1993; Evenson et al., 1997; Ashton et al., 1994; Herbert et al., 1996), esta isoforma fue predominante en ambos biotipos de *L. rigidum* (resistentes y susceptibles) (Egli et al., 1993; Evenson et al., 1997). Además, esta isoforma en el biotipo resistente fue tolerante a diclofop mientras que la isoforma en el biotipo sensible fue susceptible al herbicida. Este resultado coincide con el que previamente se había descrito en maíz (Egli et al., 1993) y *L. multiflorum* (Evenson et al., 1997). Sin embargo, la isoforma multifuncional de ACCCase II muestra una fracción más pequeña de la actividad total de ACCCase y muestra un alto nivel de resistencia de

diclofop en gramíneas. Por lo general, los valores de  $I_{50}$  de ACCase II para varios graminicidas son cerca de dos órdenes de magnitud mayor que los de tipo sensible de ACCase I (Evenson et al. 1997; De Prado et al. 2000).

La naturaleza simple monogénica del sitio de acción, y el alto grado de insensibilidad al herbicida conferida han sido atribuidos, por lo que ayuda a explicar por qué este tipo de resistencia puede aparecer con rapidez, en contraste con las bases más poligénicas que explican el metabolismo (Moss et al., 2003). Hasta el día de hoy, la resistencia de cuatro especies de gramíneas, *Avena fatua* (Christoffers y Messersmith., 1999), *Setaria viridis* (Zang y Devine., 2000), *L. rigidum* (Osuna et al., 2003), y *Alopecurus myosuroides* (Brown et al., 2002), han demostrado estar asociada con una mutación en el gen de ACCasa, resultando en una isoleucina a leucina de sustitución en el isoforma ACCase I. En nuestro caso, futuros estudios sobre la resistencia a graminicida necesitan centrarse en la clonación del gen de ACCase I e identificación de la secuencia que codifica la región de unión del graminicida en los biotipos R y S. Se desprende de los resultados presentados aquí y de estudios previos (Zagnitko et al., 2001) que la resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa en poblaciones de *L. rigidum* se debe a múltiples mecanismos.

Como se discutió en Tardif y Powles., 1994, los resultados del tratamiento con herbicidas de grandes poblaciones dieron lugar a la supervivencia de los individuos que expresan un mecanismo de resistencia que confiere la capacidad para resistir a los herbicidas a la dosis utilizada. En especies con polinización cruzada como *L. rigidum*, hay un flujo de genes entre los supervivientes, dando lugar a un intercambio de genes de resistencia diferentes y su acumulación en la siguiente generación.

Por lo tanto, dependiendo de la variación genética, el tamaño de una población sometida a la selección de los herbicidas y la capacidad y eficacia de la polinización cruzada, puede dar lugar a un enriquecimiento de una serie de mecanismos de resistencia. La probabilidad y la dinámica de intercambio de genes por el polen influirán en que los individuos de polinización cruzada tengan uno o varios mecanismos de resistencia. Por lo tanto, la clave para la lucha contra la resistencia de *L. rigidum* es la adopción de la prevención de la resistencia y estrategias de manejo en una etapa temprana y reducir la dependencia de los herbicidas, integrando el uso de herbicidas con métodos no químicos de control de malezas.



## 5. REFERENCIAS

Alban, C.; Baldet, P.; Axiotis, S.; Douce, R. Purification and characterization of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase from higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* **1993**, *102*, 957–965.

Alban, C.; Baldet, P.; Douce, R. Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Biochem. J.* **1994**, *300*, 557–565.

Ashton, A. R.; Jenkins, C. L. D.; Whitfeld, P. R. Molecular cloning of two different cDNAs for maize acetyl-CoA carboxylase. *Plant Mol. Biol.* **1994**, *24*, 35–49.

Barthlott, W.; Neinhuis, C.; Cutler, D.; Ditsch, F.; Meusel, I.; Theisen, I.; Wilhelmi, H. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot. J. Linn. Soc.* **1998**, *126*, 237–262.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

Brezeanu, A. G.; Davis, D. G.; Shimabukuro, R. H. Ultrastructural effects and translocation of methyl 2-[4-(2,4-dichloro-phenoxy)phenoxy]propanoate in wheat (*Triticum aestivum*) and wild oat (*Avena fatua*). *Can. J. Bot.* **1975**, *54*, 2038–2048.

Brown, A. C.; Moss, S. R.; Wison, Z. A.; Field, L. M. An isoleucine to leucine substitution in the ACCase of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) is associated

with resistance to the herbicide sethoxydim. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2002**, *72*, 160–168.

Casado, C. G.; Heredia, A. Ultrastructure of the cuticle during growth of the grape berry (*Vitis vinifera*). *Physiol. Plant.* **2001**, *111*, 220–224.

Christoffers, M. J.; Messersmith, C. G. Molecular analysis of acetyl-CoA carboxylase genes from herbicide-resistant and -susceptible wild oat. *Proc. North Weed Sci. Soc.* **1999**, *54*, 113–114.

Cotterman, J. C.; Saari, L. L. Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in a diclofop-methyl-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype SR4/84. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1992**, *43*, 182–192.

De Prado, R.; De Prado, J. L.; Menéndez, J. Resistance to substituted urea herbicides in *Lolium rigidum* biotypes. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1997**, *57*, 126–136.

De Prado, R.; Lopez-Martínez, N.; Jiménez-Espinosa, R. Herbicide-resistant weeds in Europe: Agricultural, physiological and biochemical aspects. In *Weed and Crop Resistance to Herbicides*; De Prado, R., Jorrin, J., Garcia-Torres, L., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, **1997**; pp 17–27.

De Prado, R.; González-Gutierrez, J.; Menéndez, J.; Gasquez, J.; Gronwald, J. W. Resistance to acetyl-CoA carboxylase inhibiting herbicides in *Lolium multiflorum*. *Weed Sci.* **2000**, *48*, 311–318.

De Prado, R.; Franco, A. R. Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: Biochemical and physiological aspects. *Weed Sci.* **2004**, *52*, 115–120.

De Prado, R.; Osuna, M. D. Resistance to ACCase inhibitor herbicides in *Setaria viridis* biotype is due at two mechanisms. *Weed Sci.* **2004**, *52*, 121–127.

Devine, M. D.; Maclsaac, S. A.; Romano, M. L.; Hall, J. L. Investigation of the mechanism of diclofop resistance in two biotypes of *Avena fatua*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1992**, *42*, 88–96.

Egli, M. A.; Gengenbach, B. G.; Gronwald, J. W.; Somers, D. A.; Wyse, D. L. Characterization of maize acetyl-CoA carboxylase. *Plant Physiol.* **1993**, *101*, 499–506.

Evenson, J. K.; Gronwald, J. W.; Wyse, D. L. Isoforms of acetyl-CoA carboxylase in *Lolium multiflorum*. *Plant Physiol. Biochem.* **1997**, *35*, 265–272.

Gronwald, J. W.; Eberlein, C. V.; Betts, K. J.; Baerg, R. J.; Ehlke, N. J.; Wyse, D. L. Mechanism of diclofop resistance in an Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Pestic. Biochem. Physiol.* **1992**, *44*, 126–139.

Hall, L. M.; Moss, S. R.; Powles, S. B. Mechanisms of resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in two resistant biotypes of *Alopecurus myosuroides* (blackgrass): Herbicide metabolism as a cross-resistance mechanism. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1997**, *57*, 87–98.

Herbert, D.; Price, L. J.; Alban, C.; DeHaye, L.; Job, D.; Cole, D. J.; Pallet, K. E.; Harwood, J. L. Kinetic studies of two isoforms of acetyl CoA carboxylase from maize leaves. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 997–1006.

Holtum, J. A. M.; Matthews, J. M.; Häusler, R. E.; Liljegren, D. R.; Powles, S. B. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). III. On the mechanism of resistance to diclofop-methyl. *Plant Physiol.* **1991**, *97*, 1026–1034.

Jacobson, A.; Shimabukuro, R. H. Metabolism of diclofop-methyl in root-treated wheat and oat seedling. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 742–746.

Menéndez, J.; De Prado, R. Diclofop-methyl cross-resistance in a chlortoluron-resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1996**, *56*, 123–133.

Menéndez, J.; De Prado, R. Characterisation of two acetyl-CoA carboxylase isoforms in diclofop-methyl-resistant and -susceptible biotypes of *Alopecurus myosuroides*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1999**, *65*, 82–89.

Moss, S. R.; Cocker, A. C.; Hall, L.; Field, L. M. Characterisation of target-site resistance to ACCase-inhibiting herbicides in the weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *Pest Manage. Sci.* **2003**, *59*, 190–201.

Osuna, M. D.; Vidotto, F.; Fischer, A. J.; Bayer, D. A.; De Prado, R.; Ferrero, A. Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2002**, *73*, 9–17.

Osuna, M. D.; Fischer, A. J.; De Prado, R. Herbicide resistance in *Aster squamatus* conferred by a less sensitive form of acetolactate synthase. *Pest Manage. Sci.* **2003**, *59*, 1210–1216.

Preston, C.; Powles, S. B. Light-dependent enhanced metabolism of chlorotoluron in a substituted urea herbicide-resistant biotype of *Lolium rigidum* Gaud. *Planta* **1997**, *201*, 202–208.

Sasaki, Y.; Konishi, T.; Nagano, Y. The compartmentation of acetyl-CoA carboxylase in plants. *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 445–449.

Shimabukuro, R. H.; Walsh, W. C.; Jacobson, A. Aryl-O-glucoside of diclofop: A detoxification product in wheat shoots and wild oat suspension culture. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 393–397.

Shorrosh, B. S.; Roesler, K. R.; Shintani, D.; van de Loo, F. J.; Ohlrogge, J. B. Structural analysis, plastid localization and expression of the biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA carboxylase from tobacco. *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 805–812.

Song, J.; Wurtele, E. S.; Nikolau, B. J. Molecular cloning and characterization of the cDNA coding for the biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase: Identification of the biotin carboxylase and biotin-carrier domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 5779–5783.

Tardif, F. J.; Powles, S. B. Herbicide multiple resistance in a *Lolium rigidum* biotype is endowed by multiple mechanisms: Isolation of a subset with resistant acetyl-CoA carboxylase. *Physiol. Plant.* **1994**, *91*.

Zagnitko, O.; Jelenska, J.; Tevzadze, G.; Haselkorn, R.; Gornicki, P. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 6617–6622.

Zhang, X.; Devine, M. D. A point mutation in the plastidic ACCase gene conferring resistance to sethoxydim in green foxtail (*Setaria viridis*). *Weed Sci. Soc. Am. Abstr.* **2000**, *40*, 81.

## **CAPITULO IV**

### **NIVELES DE TOLERANCIA DE *Avena sterilis*, *Eleusine indica*, *Lolium rigidum* Y *Paspalum distichum* A GLIFOSATO EN ESPAÑA**

## 1. INTRODUCCIÓN

Un cultivo de cobertura es cualquier cubierta vegetal viva que se siembra durante o después de un cultivo principal y, comúnmente eliminada antes de la siembra del siguiente cultivo. Las cubiertas vegetales vivas son cultivos plantados ya sea antes o con un cultivo principal y se mantienen como una cubierta viva a través de toda la estación del período vegetativo. Si la cobertura viva es una planta perenne, puede ser posible mantenerla año tras año sin la necesidad de resiembra (Hartwig, 1983; 1987). En España, la labranza mínima fue la principal técnica utilizada en el mantenimiento del suelo durante el año 2009, la cual representó el 44,1% de la superficie total (5.043.896 ha), la cubierta vegetal espontánea representó 955.909 hectáreas (19%), la labranza tradicional el 16,5%, y finalmente las cubiertas vegetales vivas con el 1% (51.529 ha) del área total. La mayor cobertura de vegetación espontánea y superficies de cubiertas vegetales vivas se encuentran en los cultivos de olivo, cítricos y viñedos. En las cubiertas vegetales vivas el suelo está protegido por el establecimiento de gramíneas como la cebada, el centeno, “bromus” o leguminosas (vezas, altramuces), en estos casos el crecimiento es controlado ya sea mecánica (siega), químicos (herbicidas) o mediante el pastoreo (ESYRCE, 2009). Las ventajas en el uso de esta técnica de mantenimiento del suelo son: prevenir o reducir el uso intensivo de herbicidas (Lal *et al.*, 1991; Buhler, *et al.*, 2001), la reducción de la erosión del suelo, reducción de la presión de las malas hierbas y el aumento en el contenido de la materia orgánica (Hartwig y Hoffman, 1975). Un buen sistema de cultivo tendría una cobertura viva para controlar la escorrentía y la erosión del suelo, los cuales producen aleloquímicos para controlar la germinación de semillas de malas hierbas y la posibilidad de suprimir el establecimiento de las mismas sin afectar el crecimiento y rendimiento del cultivo principal (Hartwig y Ammon, 2002).

El herbicida glifosato es uno de los más utilizados para el control de la vegetación en diversos sistemas de cultivo, es un herbicida de amplio espectro, no selectivo perteneciente al grupo químico de los inhibidores de la síntesis de aminoácidos (Franz, *et al.*, 1997), ha sido ampliamente utilizado para control de la vegetación en diferentes cultivos, en sistemas de siembra directa, y las situaciones no agrícolas (Baylis, 2000),



hoy, es el herbicida más comercializado en el mundo (Duke y Powles, 2008). Actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (EPSPS) sintasa (CE 2.5.1.19).

La EPSP sintasa cataliza la conversión de shiquimato-3-fosfato y fosfoenolpiruvato (PEP) para producir EPSP y fosfato inorgánico en la vía de shiquimato (Geiger y Fuchs, 2002). La inhibición de esta enzima impide la biosíntesis de aminoácidos esenciales aromáticos como la fenilalanina, tirosina y triptófano, así como también otros compuestos secundarios importantes, tales como auxinas y aleloquímicos (Harring et al., 1998).

Las aplicaciones de glifosato en grandes áreas infestadas con malezas han causado la selección de biotipos resistentes después de 10 años de aplicación continua (Owen, 2001, Thill y Lemerle 2001). Hoy en día, todo el mundo hay 355 biotipos resistentes a los herbicidas distribuidos en 197 especies (115 dicotiledóneas y monocotiledóneas 82). Veinte especies de malas hierbas han desarrollado resistencia al glifosato en todo el mundo, en España se han producido cinco especies, *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis*, *Conyza sumatrensis*, *Lolium multiflorum* y *Lolium rigidum* (Heap, 2011). Sin embargo, otras especies dicotiledóneas o monocotiledóneas presentan una alta dificultad de control por el herbicida de forma natural (Cruz-Hipólito et al., 2009). Tolerancia natural y Resistencia a herbicidas en plantas han sido definidas por la “Herbicide Resistant Plants Committee y aprobada por la WSSA in 1988 (WSSA Terminology Committee, 1988). Tolerancia natural “es definida como la capacidad inherente de una especie para sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con herbicidas a dosis de campo. Esto implica que no hubo manipulación genética o de selección para alcanzar la tolerancia a herbicidas, es naturalmente una planta tolerante”. Resistencia a los herbicidas "es la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse después de la exposición a dosis de herbicidas normalmente letales para el biotipo salvaje. En una planta, la resistencia puede ser natural o inducida por técnicas como la ingeniería genética o la selección de variantes resistentes producidas por cultivo de tejidos o mutagénesis. La tolerancia natural/resistencia a glifosato ha sido atribuida a los siguientes factores: 1.a la presencia de una reducción de la retención foliar de los herbicidas entre diferentes especies (González-Torralba et al, 2010; .Menéndez et al, 2011). 2.a la presencia de una disminución de la concentración de glifosato en los tejidos vegetales (Feng et al, 2004;.Michitte et al, 2007.) 3.a la

mutación de la secuencia de ADN que codifica la enzima EPSPS (Powles y Yu, 2010; Nandula, 2010), 4.a la secuestración de glifosato en compartimentos celulares, tales como la vacuola (Ge et al, 2010); 5.a la sobreexpresión de la EPSPS a través de la amplificación génica (Gaines et al, 2010.), y 6.a la vía metabólica de glifosato capaz de degradarlo a productos no tóxicos. El propósito general de este estudio fue determinar la eficacia del glifosato en cuatro malas hierbas que tienen dificultad en su control a las dosis recomendadas de glifosato en el campo. Los objetivos específicos fueron los siguientes: 1. Caracterizar los niveles de tolerancia de cuatro especies de gramíneas (*Avena sterilis*, *Eleusine indica*, *Lolium rigidum* y *Paspalum distichum*) recogidos en campos tratados (T) con glifosato y compararlas con las mismas especies sin tratamiento (NT) con el mismo herbicida; 2. Determinar las características físicas (retención de glifosato sobre la superficie de las hojas, cara adaxial) y fisiológicas (acumulación de ácido shikímico, penetración y translocación de  $^{14}\text{C}$ -glifosato) que puedan explicar los diferentes niveles de tolerancia de estas cuatro malas hierbas a glifosato; y 3. Examinar herbicidas alternativos en el campo, capaz de controlar una población de *Lolium rigidum* altamente resistente a glifosato.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Productos químicos.

$^{14}\text{C}$ -glifosato (actividad específica de  $273,8 \text{ MBq nmol}^{-1}$  y 95% de pureza isotópica) fue suministrado por Sigma Aldrich (Francia). Todos los ensayos *in vivo* e *in vitro* con glifosato fueron realizados con una formulación comercial de Round up Energy 45% W/V SL. Los ensayos de laboratorio se realizaron con reactivos de grado analítico ( $\geq 90\%$ ). Los ensayos de campo se realizaron con formulaciones comerciales de los siguientes herbicidas: Glifosato (Round up Energy 45% W/V SL); Flazasulfurón (Terafit 25% W/V); Cletodim (Centurión Plus 12% W/V EC); Quizalafop-p-etil (Master D 5% W/V SL); Diurón (Karmex DF 80% WG); Iodosulfurón + Diflufenicán (Hussar Pro 10%+75%+Biopower).

## 2.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Las semillas de las cuatro gramíneas fueron recolectadas en el verano de 2009 en campos de cultivos donde glifosato (3-5 L ha<sup>-1</sup> de Round up 36%) había sido anualmente aplicado al menos durante los últimos cinco años (T). Las poblaciones de *A. sterilis* y *L. rigidum* fueron recolectadas de diferentes campos de olivar en las provincias de Málaga y Jaén, respectivamente.

Las semillas de *E. indica* y *P. distichum* fueron recolectadas de diferentes campos de cítricos en las provincias de Huelva y Castellón, respectivamente. Las cuatro especies nunca tratadas (NT) fueron obtenidas de campos cercanos que nunca habían recibido aplicación de glifosato. Las semillas de todas las poblaciones ensayadas fueron germinadas en placas Petri con papel filtro humedecido con agua destilada, y colocadas en cámaras de crecimiento a una temperatura de 28/18 °C (día/noche), con un fotoperiodo de 16 h (850 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 80% de humedad relativa. Posteriormente, las plántulas de cada especie T y NT fueron transplantadas a macetas (3 plantas por maceta) conteniendo arena/turba (1:2 v/v) y colocadas en la cámara de crecimiento bajo las condiciones anteriormente descritas.

## 2.3. Ensayos dosis-respuesta.

Para los ensayos de dosis-respuesta, se hicieron aplicaciones del herbicida glifosato en plantas en el estadio 2-3 hojas, en la máquina de tratamientos del laboratorio equipada con boquillas de abanico plano (Tee Jet 80.02 EVS) a una presión de 200 kPa, y una altura regulada de 50 cm. Las dosis aplicadas fueron de 0; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500; 550; 600 g de ia ha<sup>-1</sup>, con un volumen de caldo de 200 L ha<sup>-1</sup>. Se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento (3 plantas cada una).

Las plantas tratadas se mantuvieron en cámara de crecimiento con las condiciones anteriormente descritas. A los 21 días después de la aplicación, las plantas de las cuatro especies se cortaron a ras de suelo registrándose el peso fresco, el cual se transformó a porcentaje con respecto al control no tratado (Rosario et al., 2011). Los datos se ajustaron a un modelo de regresión no-lineal utilizando para ello un ajuste por medio de una curva sigmoideal (4 parámetros).

$$Y = c + \{(d-c)/[1 + (x/g)^b]\},$$

Donde  $Y$  representa el peso fresco expresado como porcentaje del control no tratado,  $c$  y  $d$  los coeficientes que corresponden a las asíntotas superior (máximo crecimiento) e inferior (mínimo crecimiento),  $b$  es la pendiente de Hill,  $g$  es la dosis de herbicida ( $ED_{50}$ ) en el punto de inflexión medio entre la asíntota superior y la inferior y  $x$  (variable independiente) es la dosis de herbicida. La estimación de la dosis media efectiva ( $ED_{50}$ ) del herbicida se hizo mediante análisis de regresión no lineal, utilizando el programa SigmaPlot versión 10.0 para Windows.

#### **2.4. Ensayo de Retención foliar.**

Se realizaron aplicaciones del herbicida glifosato sobre 12 plantas de cada especie en el estadio de 2-3 hojas. Se utilizó la máquina de tratamiento anteriormente descrita; la dosis aplicada fue de 300 g de i.a.  $ha^{-1}$  + 100 mg  $L^{-1}$  de fluoresceína, a una presión de 200 kPa y una altura regulada de 50 cm con un volumen de caldo de 200  $L ha^{-1}$ . Después de que la solución herbicida se había secado, las plantas de las cuatro especies fueron cortadas cuidadosamente a ras de suelo y enjuagadas en NaOH 5 mM durante 30 s, las plantas fueron colocadas en estufa a 80 °C por 72 h, obteniendo así el peso seco por planta. La solución obtenida tras el lavado de las plantas se colocó individualmente en viales para medir la cantidad de fluoresceína presente por muestra. Para su análisis se utilizó un espectrofluorímetro a 490/510 nm. Una vez obtenidos ambas variables se calculó la cantidad de herbicida retenido por g. de peso seco de cada planta.

#### **2.5. Acumulación de ácido shiquímico.**

Plantas de las cuatro especies de gramíneas fueron tratadas a una dosis de 300 g de ia  $ha^{-1}$  con la máquina de tratamientos anteriormente descrita (ensayo de dosis respuesta). 50 mg de plantas tratadas y no tratadas fueron cortadas y congeladas inmediatamente en  $N_2$  líquido a 12, 24, 48, 72 y 96 después del tratamiento, se siguió la metodología descrita por Pérez-Jones *et al.*, 2005. La acumulación del ácido shiquímico fue determinada ópticamente mediante un espectrofotómetro Beckman DU-640 a una longitud de onda de 380 nm, los resultados fueron expresados como  $\mu g$  de ácido shiquímico por g. de peso fresco. Este experimento se desarrolló con 5 plantas tratadas y 5 plantas no tratadas por especie, con tres repeticiones.

## **2.6. Absorción y traslocación de $^{14}\text{C}$ -glifosato.**

Al compuesto radioactivo  $^{14}\text{C}$ -glifosato de actividad específica  $3.7 \text{ kBq } \mu\text{L}^{-1}$  se le adiciono herbicida comercial (para que la mezcla contenga los mojantes y aditivos necesarios para su absorción). De esta manera se simulaban las condiciones de campo (un volumen de caldo de  $200\text{L ha}^{-1}$  y una dosis de glifosato de  $300 \text{ g ia ha}^{-1}$ ). Esta mezcla se aplico sobre el haz de la segunda hoja (plantas de 3 hojas) de cada una de las especies de gramíneas estudiadas.

Se depositó 4 microgotas de  $0.5\mu\text{L}$  en cada una de las hojas ( $2.5 \text{ kBq/planta}$ ), usando un microaplicador (Hamilton PB 6000 Dispenser, Hamilton Co., Reno, NV). Ensayos previos con las diferentes especies de gramíneas, demostraron que la mayor penetración foliar se obtuvo después de 96 horas de la aplicación (HDA). Las plantas enteras de cada especie fueron extraídas cuidadosamente del suelo y sus raíces fueron cuidadosamente lavadas con agua destilada hasta no quedar resto de suelo. Las plantas fueron divididas en hojas tratadas, resto de planta (tallo, 1ª hoja y hoja meristemática y tallo) y raíz. Las hojas tratadas de cada planta fueron cuidadosamente lavadas con 3ml de metanol al 80% (v/v) para eliminar de la superficie foliar el herbicida no penetrado.

## **2.7. Visualización de $^{14}\text{C}$ -glifosato.**

Para una determinación cualitativa de la absorción y translocación de  $^{14}\text{C}$ -glifosato se hicieron estudios autoradiográficos sobre dos biotipos de *L. rigidum* resistentes (T) y sensibles (NT) a glifosato. Las plantas de *L. rigidum* fueron tratadas siguiendo el protocolo del ensayo anterior de absorción y translocación. Las plantas se lavaron, se secaron a temperatura ambiente con papel absorbente y se expusieron a películas autorradiográficas de fósforo (Perkin-Elmer, SR 12.5 x 25.2 cm), durante 14 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las placas se revelaron en un Cyclone (Perkin-Elmer, Storage Phosphor Screen. El experimento fue repetido tres veces para cada planta/biotipo.

## **2.8. Ensayos de campo**

Se realizaron durante las campañas 2007-2008 y 2008-2009, con el fin de determinar la respuesta de *Lolium* a la aplicación de glifosato y a herbicidas alternativos. Se analizaron un total de 8 tratamientos y un control sin tratar (Tabla 1). El diseño

experimental fue de bloques completos al azar con tres repeticiones, con miniparcelas de 10 m<sup>2</sup>. Los tratamientos se aplicaron con una mochila Pulvexper equipada con boquillas 11002E, calibrado para entregar 250 L ha<sup>-1</sup> a 276 kPa. Las evaluaciones visuales del control de *Lolium* se realizaron 45 DAT. La evaluación visual se valoró utilizando la escala ALAM de 0 a 100. Donde 0 corresponde no control total y 100 al control total. La biomasa aérea se cosechó 75 DAT en un área de 0.25 m<sup>2</sup>, las plantas se colocaron en una estufa durante 5 días a 50 °C, para ser llevadas a peso seco constante, posteriormente se registró el peso, y se convirtieron a porcentaje de control con respecto al control no tratado. Los datos fueron analizados con el paquete estadístico Statistix v 8.0, por análisis de la varianza y pruebas de separación de medias Tukey a una confiabilidad del 95%, los tratamientos empleados se muestran en la Tabla 4. 1.

**Tabla 1:** Tratamientos con herbicidas y su correspondiente abreviatura.

Control (Sin tratar)	Control
Glifosato 1125 g i. a. ha <sup>-1</sup>	G1125
Glifosato 2250 g i. a. ha <sup>-1</sup>	G2250
Glifosato 1125 g i. a. ha <sup>-1</sup> + Orosorb 0,8%	G1125+O
Glifosato 1125 g i. a. ha <sup>-1</sup> + Flazasulfurón 50 g i. a. ha <sup>-1</sup>	G125+F
Glifosato 1125 g i. a. ha <sup>-1</sup> + Cletodim 120 g i. a. ha <sup>-1</sup>	G1125+C
Glifosato 1125 g i. a. ha <sup>-1</sup> + Quizalofop 50 g i. a. ha <sup>-1</sup>	G1125+Q
Glifosato 1125 g i. a. ha <sup>-1</sup> + diurón 3200 g i. a. ha <sup>-1</sup>	G1125+D
Glifosato 1125 g i. a. ha <sup>-1</sup> + [IMS+ DFF]* 1 L. ha <sup>-1</sup>	G1125+H

\* IMS= Iodosulfurón-metil-sodio 1% [EC] P/V; DFF=Di flufenicán 15% [EC] P/V

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Ensayos dosis-respuesta.

En la Tabla 4. 2 se pueden observar los parámetros del modelo estadístico usado para la obtención de los valores ED<sub>50</sub> (dosis de glifosato requerida para la reducción del 50% del peso fresco de cada especie de gramínea) La diferencia existente (ED<sub>50</sub>) entre el

biotipo T y NT en *Lolium rigidum* al tratamiento del herbicida es de 5.9 veces mayor en el biotipo T (resistente) que en el biotipo NT (sensible).

**Tabla 4. 2.** Parámetros del modelo estadístico usado para la obtención de los valores ED<sub>50</sub>, (dosis de glifosato requerida para la reducción del 50% del peso fresco) de cada especie de gramínea.

Especies		<i>c</i>	<i>D</i>	<i>b</i>	ED <sub>50</sub> (g a. i. ha <sup>-1</sup> )	<i>Pseudo</i> <i>r</i> <sup>2</sup>	<i>P</i>	F. R.
<i>A. sterilis</i>	T	0,16	98,36	6,01	297.1	0,99	<0,0001	1.0
	NT	1,03	100,00	6,24	283.7	0,98	<0,0001	
<i>E. indica</i>	T	1,58	98,19	7,16	90.1	0,93	<0,0001	1.1
	NT	0,16	99,33	8,01	81.6	0,96	<0,0001	
<i>L. rigidum</i>	T	0,37	100,00	2,38	458.6	0,99	<0,0001	5.9
	NT	0,81	99,03	2,05	78.4	0,97	<0,0001	
<i>P. distichum</i>	T	1,23	99,73	4,19	86.9	0,94	<0,0001	1.0
	NT	2,39	97,29	3,27	87.1	0,99	<0,0001	

T: Plantas tratadas; NT: Plantas no tratadas (sin historial de aplicaciones con el herbicida glifosato).

Los factores de resistencia (ED<sub>50</sub>T/ED<sub>50</sub>NT) de las otras tres especies de gramíneas son próximos a la unidad, lo cual indica un nivel de sensibilidad en ambas poblaciones T y NT similares. Sin embargo, ambas poblaciones T y NT de *A. sterilis* mostraron una ED<sub>50</sub> alto (283,7 a 297,1), los cuales comparados con el ED<sub>50</sub> encontrado para *L. rigidum* NT (ED<sub>50</sub> de 71,4) mostraron ser 4 veces más tolerantes. Este resultado implica que estamos en tres situaciones diferentes: *L. rigidum* (T) presenta resistencia a glifosato; *A. sterilis* (T y NT) presenta tolerancia natural a glifosato; mientras que *E. indica* (T y NT) y *P. distichum* (T y NT) muestran una alta sensibilidad al herbicida.

### 3.2. Ensayos de retención foliar.

Los resultados de retención foliar de glifosato son significativamente diferentes entre las especies de gramíneas ensayadas (Tabla 4. 3). El orden de retención de glifosato es: *P.distichum* > *E. indica* > *L. rigidum* >> *A. sterilis*. Sin embargo, no hay diferencia significativa entre poblaciones T y NT de una misma especie. Los resultados obtenidos,

pueden en parte explicar la diferente tolerancia entre las especies, de forma que a menor retención mayor es la tolerancia entre las especies de *P. distichum* y *E. indica*, *A. sterilis*. Aunque los biotipos de *L. rigidum* (T y NT) tienen un valor similar de retención y el biotipo NT ( $ED_{50}$  de  $71,4 \text{ g ia ha}^{-1}$ ) tiene una susceptibilidad que sigue la regla de las otras gramíneas estudiadas, no así el biotipo T que tiene un alto valor de  $ED_{50}$  que solo puede ser explicado por un mecanismo fisiológico y/o bioquímico (Tabla 4. 2 y 4. 3).

**Tabla 4.3.** Retención foliar del herbicida glifosato sobre las diferentes especies estudiadas.

Especies	$\mu\text{L de solución retenida g}^{-1}$	
	peso seco	
	T	NT
<i>A. sterilis</i>	$0.7 \pm 0,1 \text{ c}$	$0.7 \pm 0,2 \text{ c}$
<i>E. indica</i>	$2.4 \pm 0,2 \text{ abc}$	$2.5 \pm 0,4 \text{ abc}$
<i>L. rigidum</i>	$1.6 \pm 0,7 \text{ bc}$	$1.6 \pm 0,6 \text{ bc}$
<i>P. distichum</i>	$3.8 \pm 1,0 \text{ ab}$	$4.1 \pm 1,8 \text{ a}$

<sup>a</sup> Medias dentro de una misma columna seguida por la misma letra no son significativamente diferente ( $\alpha= 0.05$ ). Valores medios  $\pm$  error estándar. T: Plantas tratadas; NT: Plantas no tratadas (sin historial de aplicaciones con el herbicida glifosato).

### 3.3. Acumulación de ácido shiquímico.

La acumulación de shiquimato en extracto de plantas es aceptada como un parámetro que refleja la inhibición de la EPSPS debido a la aplicación de glifosato. Mientras mayor es la acumulación mayor es el efecto tóxico del glifosato sobre las plantas. Como podemos observar en la Tabla 4. 4, *P. distichum* presenta la mayor acumulación de shiquimato en ambas poblaciones T y NT tras 96 horas de aplicación del herbicida. La acumulación de shiquimato en *E. indica* es similar en ambas poblaciones pero menor en un 81,41% a las plantas de *P. distichum*. Los dos casos restantes de *A. sterilis* y *L. rigidum* muestran diferencias significativas con respecto a los dos anteriores. Mientras la acumulación de shiquimato en plantas T y NT de *A. sterilis* tras la aplicación de glifosato fue aproximadamente el 50% de *P. distichum*, en el caso de *L. rigidum* observamos dos valores muy diferentes. Las plantas del biotipo de *L. rigidum*



recolectadas de campo NT con glifosato acumularon una cantidad de ácido shiquímico con un valor intermedio entre los obtenidos para *E. indica* y *A. sterilis*, mientras que el biotipo T de *L. rigidum* apenas aumenta un 22% después de 96 horas de aplicación del herbicida.

Los resultados permiten ordenar estas especies según su tolerancia a glifosato: *L. rigidum* T >> *A. sterilis* T y NT >> *L. rigidum* NT  $\geq$  *E. indica* T y NT > *P. distichum* T y NT. Los resultados obtenidos apoyan la primera conclusión que obtuvimos en retención de glifosato por plantas de las especies estudiadas.

**Tabla 4.4.** Acumulación de ácido shiquímico ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso fresco) en plantas tratadas (T) y no tratadas (NT) después de la aplicación de glifosato a una dosis de 200 g de ia ha<sup>-1</sup>.

Especies	Accession <sup>b</sup>	Tiempo después de tratamiento <sup>a</sup> (h)				
		12	24	48	72	96
<i>A. sterilis</i>	T	980±42.42A	1100±28.28C	2300±565.68BC	4600±395.97B	5300±415.77C
	NT	960±113.13A	1070±84.85C	2180±254.55BC	4900±579.82B	5600±152.73C
<i>E. indica</i>	T	1500±282.84A	3100±410.12B	5600±848.52A	8200±212.13A	9200±158.39B
	NT	1380±70.71A	3250±141.42AB	6080±274.35A	8600±424.26A	9250±664.68B
<i>L. rigidum</i>	T	900±169.70A	950±155.56C	1030±183.84C	1050±98.99C	1100±438.40D
	NT	950±257.38A	1500±240.41C	3100±268.70B	5200±407.29B	6800±226.27C
<i>P. distichum</i>	T	1400±311.12A	3800±197.98AB	6200±294.15A	9300±551.54A	11200±721.24A
	NT	1480±593.96A	4100±296.98A	6300±127.27A	9250±367.69A	11480±57.98A

<sup>a</sup> Medias dentro de una misma columna seguida por la misma letra no son significativamente diferente ( $\alpha=0.05$ ). Valores medios  $\pm$  error estándar. T: Plantas tratadas; NT: Plantas no tratadas (sin historial de aplicaciones con el herbicida glifosato). <sup>b</sup> Valores de ácido shiquímico antes del tratamiento con glifosato. Dichos valores fueron similares entre especies y entre las poblaciones T y NT. Valor medio  $900 \pm 82,4$ .

### 3.4. Ensayos de absorción y translocación.

Diferencias significativas en la absorción foliar de <sup>14</sup>C-glifosato fueron encontradas después de 96 horas de aplicación del herbicida entre las cuatro especies de gramíneas estudiadas (Tabla 4. 5). El orden de absorción fue el siguiente: *P. distichum* T y NT > *E. indica* T y NT y *L. rigidum* NT > *A. sterilis* T y NT > *L. rigidum* T. Estos resultados, junto con aquellos encontrados en los ensayos anteriores de dosis-respuesta, retención foliar de glifosato y acumulación de shiquimato podrían explicar la diferente susceptibilidad / tolerancia entre las cuatro especies y entre los dos diferentes biotipos

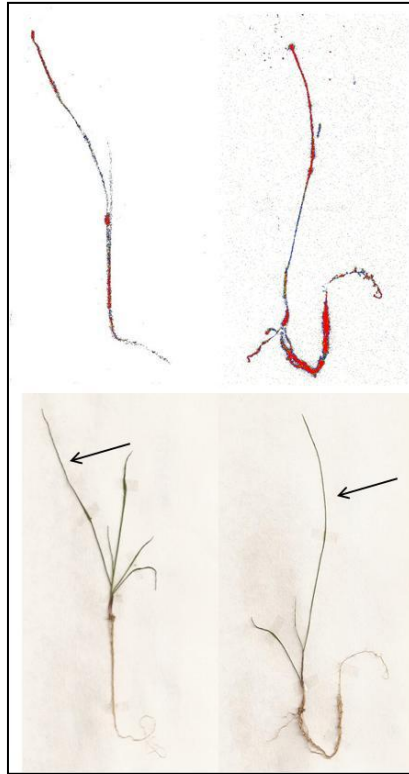
de *L. rigidum*. Además, podemos observar que existe una clara diferencia entre especies en la cantidad de  $^{14}\text{C}$ - glifosato translocado de la hoja tratada hacia el resto vegetal de la planta y de la raíz (Tabla 4. 5). La mayor translocación de glifosato se obtuvo de la hoja tratada a la raíz de *P. distichum* T y NT, luego le sigue el caso de *A. sterilis* T y NT, y débilmente en el caso de *E. indica* donde la población NT movió el doble de glifosato de la hoja a la raíz que en la población T.

Con respecto a la especie de *L. rigidum* la translocación del glifosato hacia la raíz podría estar también involucrada en la alta resistencia del biotipo T con respecto al NT (Tabla 4. 2 y 4. 4). Diferencias en translocación de  $^{14}\text{C}$ -glifosato fueron también visualizadas por autoradiografías (Figura 4. 1). En general, 96 horas después de aplicación del herbicida, la translocación de glifosato desde la hoja tratada fue más rápida y con mayor cantidad en el biotipo NT que en el biotipo T. Esta diferencia visual estaba en buen acuerdo con las diferencias encontradas en los ensayos cuantitativos de absorción y translocación y los encontrados en los de acumulación de shiquimato (Tabla 4. 4 y 4. 5).

**Tabla 4. 5.** Absorción y translocación de  $^{14}\text{C}$ -glifosato en las cuatro especies de gramíneas estudiadas después de 96 h de la aplicación de glifosato.

Especies	Accesión	% Absorción <sup>a</sup>	translocación (% absorbido) <sup>a</sup>		
			Hoja tratada	Resto de planta	Raíz
<i>A. sterilis</i>	T	70.36 ±1.41BC	68.6 ±0.2B	18.6 ±2.3BC	12.8 ±2.5BC
	NT	74.76 ±2.10BC	65.7 ±1.4B	20.7 ±1.2ABC	13.6 ±0.8B
<i>E. indica</i>	T	84.64 ±3.16AB	86.3 ±1.1A	10.9 ±0.9C	2.8 ±1.8C
	NT	86.2 ±7.13AB	83.4 ±1.7A	12.4 ±2.2C	4.2 ±0.7BC
<i>L. rigidum</i>	T	60.2 ± 4.6C	71.8 ±2.8B	20.4 ±1.6ABC	7.8 ±2.0BC
	NT	85.8 ± 6.2AB	39 ±1.0C	34.2 ±0.3A	26.8 ±3.8A
<i>P. distichum</i>	T	92.8 ±2.96A	38 ±2.6C	30.2 ± 6.1AB	31.8 ± 2.2A
	NT	93.12 ±4.34A	37.8 ±1.3C	34.6 ± 8.4A	27.6 ± 4.6A

<sup>a</sup> Medias dentro de una misma columna seguida por la misma letra no son significativamente diferente ( $\alpha= 0.05$ ). Valores medios ± error estándar. T: Plantas tratadas; NT: Plantas no tratadas (sin historial de aplicaciones con el herbicida glifosato).



**Figura 4. 1.** Visualización de  $^{14}\text{C}$ -glifosato en dos biotipos de *L. rigidum* T (izquierda) y NT (derecha) después de 96 horas de tratamiento. Las flechas muestran el lugar del tratamiento.

### 3.5. Ensayos de campo.

En la Tabla 6 se puede observar la baja eficacia de glifosato a dosis de  $1125 \text{ g ha}^{-1}$ , en el cual, tras 45 días después del tratamiento (DDT) no alcanza el 50%. La adición del coadyuvante (orosorb) y el incremento de la dosis ( $2240 \text{ g ha}^{-1}$ ) mejoran la eficacia ligeramente; sin embargo se considera un control insatisfactorio al ser de 52% y 65% visualmente y presentando una biomasa similar ( $119$  y  $114 \text{ g m}^{-2}$ ). La mezcla de glifosato y flazasulfurón mostraron una eficacia alta. Generalmente el flazasulfurón es un herbicida de actuación lenta, presentando una eficacia del 84% a los 45 DDT y presenta la menor cantidad de materia seca al final del ensayo (1.85 g). Como era de esperar los graminicidas (cletodim y quizalofop) resultaron ser los más eficaces desde los 15 DDT, con respecto a los otros tratamientos (datos no mostrados), aumentando el control con respecto al tiempo, la eficacia se estabiliza y mantiene después de un mes de la aplicación. Ambos graminicidas, presentaron un control muy aceptable de 95% a los

45 DDT. La biomasa registrada al final del ensayo fue de 12 g en la mezcla con cletodim y 21 g con quizalofop.

En la Tabla 6 se puede observar que la adición de diurón no mejora en el control de *Lolium*, siendo similar a la eficacia presentada por el glifosato aplicado sólo. La eficacia proporcionada por la mezcla de glifosato y Hussar es igual al flazasulfurón (84.4%), sin embargo en la evaluación cuantitativa, la mezcla con flazasulfurón ubican a esta mezcla como la sulfonilurea más eficaz.

**Tabla 4.6.** Evaluación del glifosato y sus mezclas en *Lolium rigidum* (visual y cuantitativa) durante las campañas 2007 y 2008.

Tratamiento	Evaluación visual (45 DDT)	Peso seco (m <sup>2</sup> )	% reducción (peso seco)
Control	0.0±0.0	429.45±19.3	0
G1125	40.7±5.0	206.88 ± 9.4	41.82
G2250	65.5±7.6	114.33 ± 8.0	73.37
G1125+O	52.7±3.6	119.66 ± 4.9	72.13
G125+F	84.4±9.1	1.85± 2.2	99.56
G1125+C	100±0.0	12.31± 2.1	97.13
G1125+Q	95.0±4.3	21.08± 2.7	95.09
G1125+D	46.6±5.0	247.03±19.6	42.47
G1125+H	84.4±8.6	44.1±5.7	89.73

#### 4. DISCUSIÓN

De acuerdo a nuestros resultados, *A. sterilis* y *L. rigidum* tienen tolerancia natural y resistencia a glifosato a dosis que normalmente son utilizadas por los agricultores en los cultivos de cubiertas vegetales, respectivamente. La adopción de estrategias de manejo integrado para prevenir o reducir los efectos de glifosato en la selección de malas hierbas resistentes o tolerantes es fundamental para mantener los sistemas de agricultura sostenible (Johnson et al., 2009). Sin embargo, la aplicación de estas estrategias

requiere un buen conocimiento de bioquímica, genética, fisiología y ecología de las malezas resistentes o tolerantes a los herbicidas (Vila-Aiub et al, 2007). *A. sterilis* tiene una alta tolerancia a glifosato, debido principalmente a una menor retención foliar de glifosato y posterior penetración de  $^{14}\text{C}$ -glifosato en ambas poblaciones T y NT (Tabla 4. 3 a 4. 5).

Esta diferencia entre las especies podría ser explicada por diferencias en la retención foliar, ángulo de contacto, la cobertura de la hoja, la penetración foliar y translocación de glifosato (Cruz-Hipólito et al, 2009; González Torralba et al, 2010; Domínguez et al, 2010; Menéndez et al, 2011). En conjunto, los resultados anteriores indican que la resistencia a glifosato en el biotipo de *L. rigidum* T se debe en parte a la reducida absorción y translocación de  $^{14}\text{C}$ -glifosato en comparación con el biotipo NT. Los brotes y las raíces son las zonas meristemáticas sensibles a la acumulación de glifosato y a la acción de este. Por lo tanto, limitando la capacidad de translocación de glifosato hacia los tejidos en desarrollo podría conferir resistencia en las malas hierbas al herbicida (Preston y Wakelin, 2008; Yu et al, 2009; Shaner, 2009; Gandula, 2010). El papel de los posibles cambios en el metabolismo de glifosato y del gen EPSPS como mecanismos potenciales de la resistencia a glifosato merece la pena seguir en esta línea de investigación. La gestión y prevención de la resistencia, sin duda, requiere de un sistema diversificado de control de malas hierbas, en las que no solo las opciones químicas y las tácticas de uso de herbicidas (mezclas y secuencias) se intercambien, pero también, se de una oportunidad a la aplicación periódica de las prácticas de control agronómico (rotaciones, labranza, etc). Tenemos que admitir que será una tarea difícil para que el productor renuncie a la comodidad de la siembra de producción con la utilización flexible y segura de un solo herbicida, el glifosato. En ensayos de campo con herbicidas alternativos, para el control de *Lolium* resistente a glifosato, (Nandula, *et al.* 2007) obtuvieron un control satisfactorio cuando aplicaron Diclofop a  $1.12 \text{ kg ha}^{-1}$ . Los mismos autores cuando aplicaron una sulfonilurea (mesosulfurón) obtuvieron un excelente control de plántulas (96%). Las poblaciones estudiadas fueron susceptibles a cletodim, nicosulfurón + rimsulfurón, proporcionando un control de 88%, independientemente del tipo de herbicida. (Roman *et al.*, 2004), obtuvieron resultados que demuestran la sensibilidad de biotipos resistentes a glifosato cuando aplicaron herbicidas con distinto mecanismo de acción (glufosinato, haloxyfop, diclofop y

paraquat). En campos en los que ya hay malas hierbas con resistencia a glifosato el uso de mezclas de glifosato con un inhibidor de la ALS o de la de ACCasa implica que estos herbicidas podrían seleccionar resistencia.

La probabilidad de que esto ocurra es muy fuerte, si una cierta mezcla se utiliza recurrentemente, ya que estos dos grupos de inhibidores son considerados como los herbicidas con un alto riesgo de desarrollo de resistencia (Yu et al., 2009).

## 5. REFERENCIAS

Baylis, A. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects *Pest Manag. Sci.* 56, 299– 308

Buhler, D. D.; Kohler, A.; Foster, M. S. 2001. Corn, soybean, and weed responses to spring-seeded smother plants *J. Sustain. Agric.* 18, 63– 79.

Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M. D.; Heredia, A.; Ruiz-Santaella, J. P.; De Prado, R. 2009. Nontarget mechanism involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *J. Agric. Food Chem.* 57:4844–4848.

Domínguez, E.; Heredia-Guerrero, J. A.; Heredia, A. 2010. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytologist*.

Duke, S. O.; Powles, S. B. 2008. Glyphosate: a once in a century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 64:319–325.

Feng, P.C.C.; Tran, M.; Chiu, T.; Sammons, R.D.; Heck, G.R.; Cajacob, C.A. 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): Retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science.* 52: 498-505.

Franz, J.E., M.K. Mao and J.A. Sikorski. 1997. Glyphosate: A Unique Global Herbicide. American Chemical Society. Chap. 4 pp. 65-97.

Gaines, T.A.; Zhang W.; Wang, D.; Bukun, B.; Chisholm, S.T.; Shaner, D.L.; Nissen, S.J.; Patzoldt, W.L.; Tranel, P.J. *et al.* 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107: 1029-1034.

Ge, X.; d'Avignon, D.A.; Ackerman, J.J.; Sammons R.D. 2010. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science*. 66: 345-348.

Geiger, D. R.; Fuchs, M. A. 2002. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). Pages 59–85 in P. Böger, K. Wakabayashi, and K. Hirai, eds. *Herbicide Classes in Development*. Berlin: Springer-Verlag.

González-Torralba, F.; Cruz-Hipólito, H.; Bastida, F.; Mülleder, N.; Smeda, R.J.; De Prado, R. 2010. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *J. Agric. Food Chem*. 58:4361–4366.

Harring, T., J. C. Streibig, and S. Husted. 1998. Accumulation of shikimic acid: a technique for screening glyphosate efficacy. *J. Agric. Food Chem*. 46:4406–4412.

Hartwig, N. L. and L. D. Hoffman. 1975. Suppression of perennial legume and grass cover crops for no-tillage corn. *Proc. Northeast. Weed Sci. Soc.* 29:82–88.

Hartwig, N. L. 1983. Crownvetch—a perennial legume “living mulch” for no-tillage crop production. *Proc. Northeast. Weed Sci. Soc.* 37: 28–38.

Hartwig, N. L. 1987. Cropping practices using crownvetch in conservation tillage. Pages 109–110 in J. F. Power, ed. *The Role of Legumes in Conservation Tillage Systems*. Proceedings of a National Conference, University of Georgia; April 27–29, 1987; Athens, GA. Soil Conservation Society of America.

Hartwig, N. L.; Ammon, H.U. 2002. Cover crops and living mulches *Weed Sci.* 50, 688– 699.

Heap, I. 2011. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.com>. Accessed January 29, 2011.

Johnson, W. G.; Davis, V. M.; Kruger, G. R.; Weller, S. C. 2009. Influence of glyphosate-resistant cropping systems on weed species shifts and glyphosate-resistant weed populations. *European Journal of Agronomy.* 31, 162-172.

Lal, R.; Regnier, E.; Eckert, D. J.; Edwards, W. M.; Hamm, R. 1991. Expectations of cover crops for sustainable agriculture. In *Cover Crops for Clean Water*, 1<sup>st</sup> ed.; Hargrove, W. L.; Ankeny, I. A., Eds.; Soil and Water Conservation Society: Columbus, OH, pp 1– 11.

Menéndez , J.; Camacho, D.; Fernández-Cerejido, M. C.; Bastida, F. 2011. Effect of tan-mixed blended green adjuvants on glyphosate efficacy in four winter crop weed species. *Weed Research.* .

Michitte, P. ; Espinoza, N.; Ruiz-Santaella, J. P.; Gauvrit, C.; De Prado, R. 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science.* 435-440.

Nandula, V. K.; Poston, D. H.; Eubank, T. W.; Koger, C. H.; Reddy, K. N. (2007). Differential response to glyphosate in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations from Mississippi. *Weed Technology* 21, 477-482.

Nandula, V. K. 2010. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds.* John Wiley & Sons, Inc. Pp.321.



Owen, M. D. K. 2001. World maize/soybean and herbicide resistance. Pages 101-163 in S. B. Powles, and D. L. Shaner, eds. Herbicide resistance and world grains. Boca Raton: CRC Press.

Pérez-Jones, A.; Park, K. W.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C.; Shaner, D. (2005). Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Science*. 53, 775–779.

Powles, S.B., Yu, Q. 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 317-347.

Preston, C.; Wakelin, A.M. 2008. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. *Pest Management Science*. 64: 372-376.

Roman, E.S.; Vargas, L.; Rizzardi, M.A. and Mattei, R.W. (2004). Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. *Planta daninha*. 22, 301-306.

Rosario, J. M.; Cruz-Hipólito, H.; Smeda, R.J.; De Prado, R. 2011. White mustard (*Sinapis alba*) resistance to ALS-inhibiting herbicides and alternative herbicides for control in Spain. *European Journal of Agronomy*. 35: 57-62.

Shaner, D. L. 2009. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Science*. 57: 118–123.

Thill, D. C. and D. Lemerle . 2001. World wheat and herbicide resistance. *In* S. B. Powles and D. L. Shaner, eds. Herbicide Resistance and World Grains. New York: CRC. Pp. 165–194.

Vila-Aiub, M. M.; Vidal, R.A.; Balbi, M. C.; Gundel, P. E. ; Trucco, F.; Ghersa, C.M. 2007. Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Management Science*. 64, 366-371.

WSSA Terminology Committee. 1998. Herbicide resistance and herbicide tolerance defined. *Weed Technology*.12, 789.

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-resistant *Lolium rigidum*. *Planta*. 230: 713-723.

## **CAPITULO V**

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo de investigación han permitido obtener las siguientes conclusiones:

En España se han detectado poblaciones resistentes a herbicidas: En el norte y sur de España en cultivos de cereales de invierno se han caracterizado diferentes poblaciones de *Lolium rigidum* resistentes a clortolurón e isoproturón; en el Norte de España en siembra directa de trigo de invierno se han caracterizado poblaciones de *L. rigidum* resistentes a graminicidas principalmente al herbicida diclofop-metil; en el sur de España en el cultivo del olivar se han detectado y caracterizado poblaciones de *L. multiflorum* y *L. rigidum* resistentes a glifosato.

El mecanismo de resistencia involucrado en la alta resistencia de *L. rigidum* a clortolurón es debido a la detoxificación a formas no tóxicas del herbicida. La monooxigenasa Cit. P<sub>450</sub> es necesaria metabolizar el herbicida.

Tres mecanismos de resistencia han sido encontrados en tres poblaciones resistentes de *L. rigidum*: La menor resistencia es debida a una menor penetración foliar del herbicida; la resistencia media es debida a la metabolización del herbicida a formas conjugadas no toxicas; la alta tolerancia es debida a una mutación puntual de la ACCasa I localizada en el citosol.

El mecanismo de resistencia involucrado en la resistencia de *L. rigidum* a glifosato es debida a la menor translocación del herbicida a través de ambos xilema y floema hasta zonas meristemáticas de tallo y raíz.

Ensayos de campo realizados sobre una población resistente, muestran que glifosato a 1.250 g ai ha<sup>-1</sup> no controlaba *L. rigidum* (reducción de 51,8%). Sin embargo, glyphosate + flazasulfurón (99.6% reducción), glyphosate + clethodim (97.1% reducción) y glyphosate + quizalafop-p-ethyl (95.1% reducción) resultó en un alto control de *L. rigidum*.

## **CAPITULO VI**

### **PUBLICACIONES Y *CURRICULUM VITAE***

## ***CURRICULUM VITAE***

Apellidos: DE PRADO RUIZ-SANTAELLA Nombre: JOSE LUIS

DNI: 30806685 W Fecha de nacimiento: 19/11/1972 Sexo:

VARON

Correo Electrónico: [joseluisdeprado@deprado.eu](mailto:joseluisdeprado@deprado.eu)

---

### **Situación profesional actual**

Organismo/empresa: De Prado, S.A.

Dirección postal:

Teléfono :

Fax:

Categoría profesional: Gerente Fecha de inicio: 01/05/2010

Situación administrativa

Plantilla  Contratado  Interino  Becario

Otras situaciones especificar:

Dedicación A tiempo completo

A tiempo parcial

### **Otros trabajos desempeñados**

Organismo/empresa: Agroservicios Medioambientales, S.L.

Dirección postal:

Teléfono:

Fax:

Categoría profesional: Director Técnico Periodo: 01/08/2002 hasta 31/12/2004

Situación administrativa

Plantilla  Contratado  Interino  Becario

Otras situaciones especificar:

Dedicación A tiempo completo

A tiempo parcial

Organismo/empresa: As. Esp. Agricultura de Conservación  
Dirección postal:

Teléfono:

Fax:

Categoría profesional: Director Técnico Periodo: 10/01/1999 hasta 01/07/2002

Situación administrativa

Plantilla  Contratado  Interino  Becario

Otras situaciones especificar:

Dedicación A tiempo completo

A tiempo parcial

Organismo: UNIV. CORDOBA

Facultad, Escuela o Instituto: E.T.S.I.A.M.

Depto./Secc./Unidad estr.: Departamento de Química Agrícola y Edafología

Dirección postal: Campus Rabanales, edif. C-3, 3ª planta

Teléfono: 957218600

Fax: 957218600

Categoría profesional: ninguna Periodo: 01/09/1997 hasta 31/07/2000

Situación administrativa

Plantilla  Contratado  Interino  Becario

Otras situaciones especificar:

Dedicación A tiempo completo

A tiempo parcial

---

### Formación Académica

Titulación Superior	Centro	Fecha
Ingeniero Agrónomo	E.T.S.I.A.M.	1996

DEA o SUFICIENCIA INVESTIGADORA	Centro	Fecha
	E.T.S.I.A.M.	2001

**Idiomas (R = regular, B = bien, C = correctamente)**

Idioma	Habla	Lee	Escribe
INGLES	C	C	C
FRANCES	B	C	R
PORTUGUES	R	R	R

---

**Publicaciones o Documentos Científico-Técnicos**

---

( CLAVE: L = libro completo, CL = capítulo de libro, A = artículo, R = "review", E = editor, S = Documento Científico-Técnico restringido. )

---

Autores (p.o. de firma): De Prado, R., **De Prado, J.L.**, Menéndez, J.

Título: RESISTANCE TO SUBSTITUTED UREA HERBICIDES IN *Lolium rigidum* BIOTYPES

Ref.  revista: Pesticide Biochemistry and Physiology  Libro:

Clave: A Volumen: Número: 57 Páginas, inicial: 126 total: 10

Fecha: 1997

---

Autores (p.o. de firma): **De Prado, J.L.**, Osuna, M.D., Shimabukuro, R.H., De Prado, R.

Título: BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL RESISTANCE MECHANISMS TO DICLOFOP-METHYL IN *Lolium rigidum*

Ref.  revista: Faculty of Agricultural & Applied Biological Sciences  Libro:

Clave: A Volumen: Número: 63 Páginas, inicial: 681 total: 9

Fecha: 1998

---

Autores (p.o. de firma): **De Prado, J.L.**, De Prado, R. and Shimabukuro, R.H.

Título: THE EFFECT OF DICLOFOP-METHYL ON MEMBRANE POTENTIAL AND ETHYLENE INDUCTION IN RESISTANT AND SUSCEPTIBLE BIOTYPES OF GRASSES

Ref.  revista: Pesticide Biochemistry and Physiology  Libro:

Clave: A Volumen: Número: 63 Páginas, inicial: 1 total: 14

Fecha: 1999

---



Autores (p.o. de firma): De Prado, R., **De Prado, J.L.**, Osuna, M.D., Taberner, A., Heredia, A.

Título: IS DICLOFOP-METHYL RESISTANCE IN *Lolium rigidum* ASSOCIATED WITH A LACK OF PENETRATION?

Ref.  revista: Brighton Crop Protection Conference  Libro:

Clave: A Volumen: Número: 8A Páginas, inicial: 545 total: 5

Fecha: 2001

---

Autores (p.o. de firma): **De Prado, J.L.**, Osuna, M.D., De Prado, R.

Título: CROSS RESISTANCE TO ACCase HERBICIDE IN *Lolium rigidum*

Ref.  revista: Agricultural and Applied Biological Sciences  Libro:

Clave: A Volumen: Número: 69 Páginas, inicial: 97 total: 5

Fecha: 2004

---

Autores (p.o. de firma): **De Prado, J.L.**, Osuna, M.D., Heredia, A., De Prado, R.

Título: *Lolium rigidum* A POOL OF RESISTANCE MECHANISMS TO ACCase INHIBITOR HERBICIDES

Ref.  revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry  Libro:

Clave: A Volumen: Número: 53 Páginas, inicial: 2185 total: 6

Fecha: 2005

---

COMUNICACIONES Y PONENCIAS:

AUTORES: Menéndez, J., Taberner, A., **De Prado, J.L.** and De Prado, R.

TÍTULO: "Chlorotoluron-resistant biotypes of resistance mechanism *Lolium rigidum* Gaudín"

LUGAR Y FECHA: Córdoba (España), 1995.

CONGRESO: International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides

AUTORES: **De Prado, J.L.**, Shimabukuro, R.H. and De Prado, R.

TÍTULO: "Biochemical and physiological resistance mechanisms to diclofop-methyl in *Lolium rigidum*"

LUGAR Y FECHA: Ghent (Bélgica), 1998.

CONGRESO: International Symposium on Crop Protection (ISCP)

AUTORES: Osuna, M.D., **De Prado, J.L.** and De Prado, R.

TÍTULO: "ACCCase isoforms in *Lolium rigidum* resistant to diclofop-methyl"

LUGAR Y FECHA: Ghent (Bélgica), 2000.

CONGRESO: 52<sup>nd</sup> ISCP

AUTORES: Osuna, M.D., **De Prado, J.L.** and De Prado, R.

TÍTULO: "Resistencia a Herbicidas inhibidores de la ALS en España"

LUGAR Y FECHA: Córdoba (España), 2001.

CONGRESO: II Simposium Internacional sobre Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI

AUTORES: **De Prado, J.L.**, Osuna, M.D. and De Prado, R.

TÍTULO: "Cross resistance to ACCCase herbicide in *Lolium rigidum*"

LUGAR Y FECHA: Ghent (Bélgica), 2004.

CONGRESO: 56<sup>th</sup> ISCP

## **2. PUBLICACIONES**