

RESISTENCIA A GLIFOSATO: ASPECTOS BIOLÓGICOS Y AGRONÓMICOS

González-Torralva, Fidel¹;
Pérez-López, Macrina¹;
De Prado, Rafael¹

RESUMEN

La introducción de las auxinas sintéticas fue una revolución en la agricultura mundial para controlar las malas hierbas dicotiledóneas en cereales. A partir de ese momento las compañías de agroquímicos invirtieron cuantiosas sumas en producir nuevos herbicidas para controlar diferentes especies de malas hierbas en distintos cultivos. Sin embargo, una de las desventajas del uso de estos productos es la evolución de malas hierbas resistentes a herbicidas. Actualmente existen 396 biotipos resistentes a herbicidas pertenecientes a 210 especies, de las cuales, 123 son dicotiledóneas y 87 monocotiledóneas distribuidas en más de 670.000 campos infestados (Heap, 2013). 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. Dependiendo del tipo de mecanismo de resistencia desarrollado, 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. La resistencia a herbicidas puede ser debida a dos mecanismos básicos, aquellos referidos al sitio de acción, bien por pérdida de afinidad entre la proteína de enlace y el herbicida o bien por una sobreexpresión de esa proteína. El segundo grupo de mecanismos básicos pertenecen a aquellos donde no está involucrado el sitio de acción, también llamados mecanismos por exclusión del herbicida, principalmente debido a un incremento de la detoxificación metabólica del herbicida en productos no tóxicos, una falta de absorción/penetración del herbicida y posterior pérdida de transporte vía xilema/floema del herbicida a la proteína de enlace. En el presente trabajo se realiza una revisión de los mecanismos involucrados en la resistencia de las plantas a glifosato (aspectos biológicos), así como el control alternativo de las malezas resistentes a glifosato más importantes en la Península Ibérica (aspectos agronómicos).

Palabras clave: *Conyza* spp., control químico, EPSPS, *Lolium* spp., mecanismo de

ABSTRACT

Glyphosate Resistant: Biological and Agronomic Aspects

The introduction of synthetic auxins revolutionized world agriculture in the control of dicotyledonous weeds in cereals. From that time on, agrichemical companies invested large sums of money in producing new herbicides to control different weed species in different crops. However, one of the disadvantages of the use of these products has been the evolution of weeds resistant to herbicides. Currently, there are 396 herbicide-resistant biotypes belonging to 210 species, 123 of which are dicotyledonous and 87 monocotyledonous spread in over 670,000 fields (Heap, 2013). Knowledge of the biological processes responsible for herbicide resistance in a certain weed is fundamental for designing a control strategy. Depending on the type of resistance mechanism developed, the weed will present a specific pattern in its tolerance to herbicides, which could vary from a high degree of resistance to certain compounds of one same chemical family to a moderate resistance to a wide spectrum of herbicides. Resistance to herbicides can be due to two basic mechanisms. The first are those referring to the site of action (target site), either due to a loss of affinity between the linking protein and the herbicide or from an over expression of that protein. The second group of basic mechanisms belong to those in which the target site is not involved, also called herbicide exclusion mechanisms, mainly due to an increase in the metabolic detoxification of the herbicide in non toxic

¹Departamento de Química Agrícola y Edafología, Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

products, a lack of absorption/penetration of the herbicide and a subsequent loss of transport via the xylem/phloem of the herbicide at the linking protein. In this work, a review has been made of the mechanisms involved in the resistance of plants to glyphosate (biological aspects), as well as an alternative control of the most important glyphosate-resistant weeds in the Iberian Peninsula (agronomic aspects).

Key words: Chemical control, *Conyza* spp., EPSPS, *Lolium* spp., Resistance mechanism.

INTRODUCCIÓN

El herbicida glifosato (ácido N-fosfona metil glicina), es un herbicida no selectivo, de absorción foliar, se mueve en el floema hacia los puntos meristemáticos. Otra de las características principales que hacen a este uno de los principales herbicidas en el mundo es su baja o casi nula actividad en el suelo (para fines prácticos se considera que no la tiene), además de su baja toxicidad para mamíferos (Nandula *et al.*, 2007; Duke y Powles, 2008).

El mecanismo de acción de este herbicida consiste en la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos, principalmente fenilalanina, tirosina y triptófano los cuales son compuestos que intervienen en la formación de proteínas. Específicamente, el glifosato ejerce su acción inhibiendo la enzima 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) la cual está integrada dentro de la ruta del ácido shiquímico (Figura 1). Esta enzima cataliza la reacción entre shiquimato 3 fosfato (S3P) y fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato y

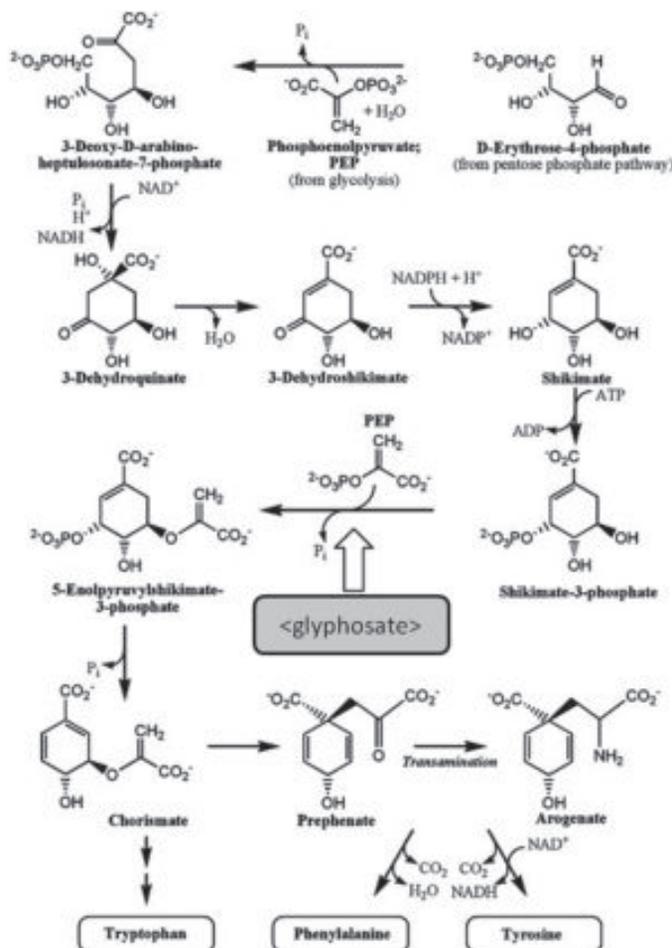


Figura 1. Ruta del ácido shiquímico en plantas mostrando el sitio de acción del herbicida glifosato (Petersen *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Malas hierbas resistentes al herbicida glifosato a nivel mundial

Dicotiledóneas	Países afectados	Año reportado
1. <i>Amaranthus palmeri</i>	USA*	2005
2. <i>Amaranthus spinosus</i>	USA	2012
3. <i>Amaranthus tuberculatus</i> (syn. <i>rudis</i>)	USA*	2005
4. <i>Ambrosia artemisiifolia</i>	USA*	2004
5. <i>Ambrosia trifida</i>	USA*, Canadá	2004
6. <i>Conyza bonariensis</i>	Sudáfrica, España, Brasil, Israel, Colombia, USA*, Australia, Grecia, Portugal,	2003
7. <i>Conyza canadensis</i>	USA*, Brasil, China, España, República Checa, Canadá*, Polonia, Italia, Grecia	2000
8. <i>Conyza sumatrensis</i>	España, Brasil*, Grecia	2009
9. <i>Kochia scoparia</i>	USA, Canadá*	2007
10. <i>Parthenium hysterophorus</i>	Colombia	2004
11. <i>Plantago lanceolata</i>	Sudáfrica	2003
Monocotiledóneas	Países afectados	Año reportado
1. <i>Bromus diandrus</i>	Australia	2011
2. <i>Chloris truncata</i>	Australia	2010
3. <i>Cynodon hirsutus</i>	Argentina	2008
4. <i>Digitaria insularis</i>	Paraguay, Brasil	2005
5. <i>Echinochloa colona</i>	Australia, USA, Argentina	2007
6. <i>Eleusine indica</i>	Malasia*, Colombia, China, USA, Argentina	1997
7. <i>Leptochloa virgata</i>	México	2010
8. <i>Lolium multiflorum</i>	Chile*, Brasil*, USA*, España, Argentina*	2001
9. <i>Lolium perenne</i>	Argentina	2008
10. <i>Lolium rigidum</i>	Australia*, USA, Sudáfrica, Francia, España, Israel*, Italia	1996
11. <i>Poa annua</i>	USA	2010
12. <i>Sorghum halepense</i>	Argentina, USA	2005
13. <i>Urochloa panicoides</i>	Australia	2008

* Existen biotipos en el país con resistencia múltiple.

fósforo inorgánico (Pi) (Steinrücken y Amrhein, 1980; Geiger y Fucks, 2002; Jaworski, 1972).

El glifosato se utiliza para el control no selectivo de malas hierbas anuales y perennes de hoja ancha y monocotiledóneas. Des-

afortunadamente, el uso extensivo de esta molécula dentro de una gran variedad de sistemas de cultivos ha provocado la aparición de 24 especies (11 dicotiledóneas y 13 monocotiledóneas) resistentes a nivel mundial (Cuadro 1) (Heap, 2013).

La resistencia de una planta a un herbicida se define: 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 la resistencia encontramos la resistencia cruzada, la resistencia múltiple y la resistencia cruzada negativa. La resistencia cruzada se define como *aquella por la que un individuo es resistente a dos o más herbicidas debido a un sólo mecanismo de resistencia*. La resistencia múltiple se refiere a que *algún individuo puede tener más de un mecanismo de resistencia ya sea a uno o más herbicidas*; finalmente, la resistencia cruzada negativa se interpreta como *aquella especie resistente a cierta molécula que experimenta un aumento en la sensibilidad a otras moléculas con diferente modo de acción* (De Prado *et al.*, 1992).

ASPECTOS BIOLÓGICOS

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 desarrollado, 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. Asimismo 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 por-

centaje de estos productos alcanzan el organismo diana depositando el resto en el suelo, 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 malas hierbas el/los cambio/s aminoácido/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 malas hierbas resistentes (Figura 2). La sobreexpresión de esta proteína no es un mecanismo bien conocido y de forma natural solo ha sido detectado y/o estudiado en el caso de *Amaranthus palmeri* (Gaines *et al.*, 2010). Sin embargo, ha sido utilizado ampliamente en OMG (Organismos Modificados Genéticamente), resistentes a herbicidas.

La Figura 3 muestra el comportamiento diferente de un herbicida entre una planta sensible (S) y una resistente (R), pudiéndose observar que mientras en las malas hierbas S el herbicida penetra y se transloca a la proteína de enlace, en la mala hierba R se producen 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 y poder sobrevivir.

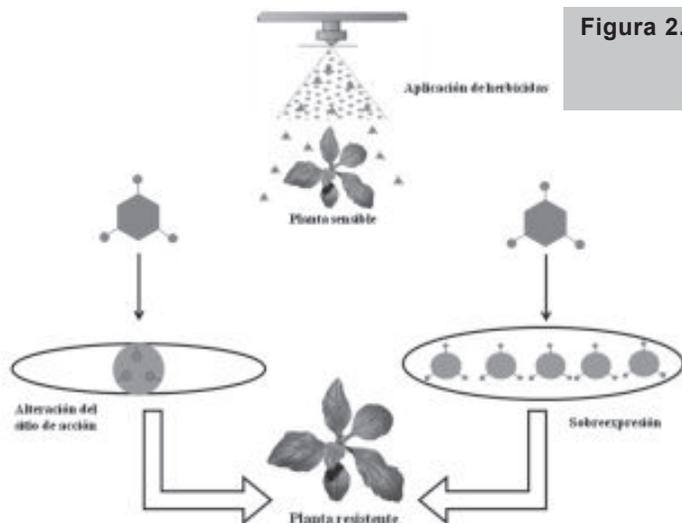
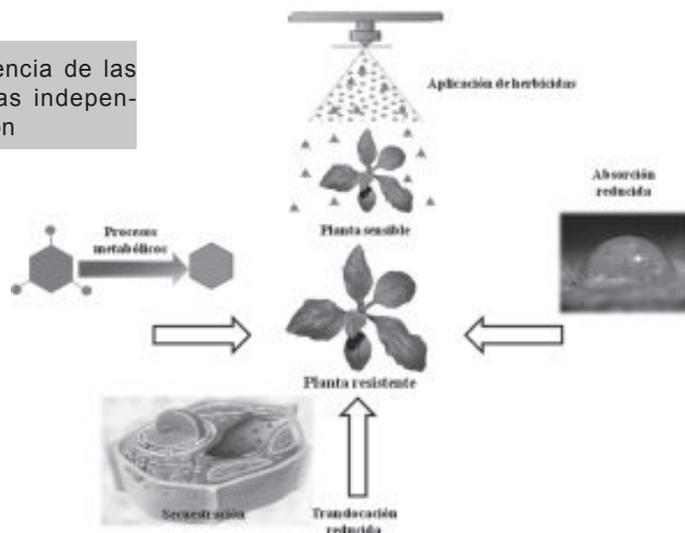


Figura 2. Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas dependiente del sitio de acción

Figura 3. Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas independiente del sitio de acción



Resistencia debida a sitio de acción

Mutación en el gen EPSPS

La resistencia de sitio activo a glifosato resulta de mutaciones puntuales en el gen *EPSPS*. El primer caso de resistencia de sitio activo a glifosato por modificación en el sitio de acción fue descrita en biotipos de *Eleusine indica* de Malasia, en los cuales mutaciones en el gen *EPSPS* causaron la sustitución de los aminoácidos Prolina por Serina en la posición 106 (Pro-106 Ser) (Baerson *et al.*, 2002), otros investigadores han encontrado en otras gramíneas la mis-

ma sustitución en la posición 182 (Carvalho *et al.*, 2012; González-Torralva *et al.*, 2012). También se han descrito sustituciones por treonina y alanina en dicha posición en biotipos resistentes de *E. indica* y *Lolium* spp. (Ng *et al.*, 2003; Wakelin y Preston, 2006; Pérez-Jones *et al.*, 2007; Jasieniuk *et al.*, 2008). Se ha descrito que las diferentes sustituciones de aminoácidos confieren diferentes niveles de resistencia, lo cual puede ser debido a que las diferentes mutaciones producen diferencias en la conformación de la proteína. De todas formas, los niveles de resistencia debidos al sitio de acción suelen ser menores que aquellos encontrados debidos a mecanismos no relacionados con

dicho sitio. En todos los casos estudiados, la resistencia conferida por la mutación en Pro106 de la *EPSPS* se hereda como un gene nuclear con dominancia incompleta. Los niveles moderados de resistencia son suficientes para permitir la supervivencia de las plantas a las dosis de campo y, por lo tanto, para que estos biotipos resistentes sean pasibles de selección por uso repetido de glifosato.

Amplificación del gen *EPSPS*

La resistencia de sitio activo también puede involucrar elevados niveles de expresión o de actividad de la enzima sobre la cual se ejerce el efecto del herbicida, como fue recientemente descrito en un biotipo de *Amaranthus palmeri* resistente a glifosato (Gaines *et al.*, 2010). El número de copias del gen *EPSPS* en la población susceptible estuvo en el rango entre 1 a 1.3, mientras que en el resistente estuvo entre 5 y 160, estando altamente correlacionado con la expresión de la enzima. La sobreexpresión de la enzima que representa el sitio activo del herbicida puede deberse a efectos postranscripcionales, reguladores de expresión, o bien ser el resultado de duplicaciones y/o amplificaciones génicas. El control genético de esta sobreexpresión no está claro en el caso de glifosato, pero la participación de herencia poligénica es una posibilidad, especialmente en aquellos casos en que se observa considerable variabilidad intraespecífica en los niveles de esta enzima (Gressel, 2002).

Resistencia fuera del sitio de acción

Uno de los aspectos clave en la eficacia del glifosato es su capacidad de transportarse en la planta. El transporte es principalmente vía floema, pero también existe cierto derrame del herbicida hacia el apoplasta con el subsiguiente arrastre por la corriente transpiratoria hacia las hojas. La elevación de la concentración del herbicida en las hojas resultante de esta acumulación en tejidos transpiratorios promueve nuevamente su absorción al simplasma desde donde es nuevamente reexportado por el floema. Así, el herbicida posee propiedades de ambimovilidad y es capaz de circular por la planta

(Dewey y Appleby, 1983). Finalmente el herbicida se acumula en regiones «depósito» donde los carbohidratos provenientes de la fotosíntesis están siendo activamente utilizados en el crecimiento celular o están siendo depositados como reservas. Por otra parte, el glifosato no es casi degradado por la mayoría de las plantas, lo cual es la razón de que sea un herbicida no selectivo (Duke y Powles, 2008). Esto permite que el herbicida tenga el tiempo suficiente para ser exhaustivamente transportado dentro de la planta sin perder su toxicidad y logre acumularse gradualmente a concentraciones tóxicas en puntos de crecimiento o áreas de depósito distantes del punto de absorción inicial. Por esta razón el glifosato tiene mucha utilidad como herbicida para el control de malezas perennes. Estos aspectos también explican que la resistencia metabólica no haya aparecido aún como mecanismo de resistencia en malezas resistentes al glifosato, si bien es cierto que existen plantas con cierta capacidad de metabolizar a este herbicida. Dada la importancia del transporte para la efectividad del glifosato, es concebible pues que alteraciones en su transporte puedan causar resistencia.

Entre todos los mecanismos de resistencia a glifosato identificados hasta ahora, los más importantes son la absorción y translocación del herbicida. En el primer caso de resistencia a glifosato reportado, *Lolium rigidum* procedente de Australia (Powles *et al.*, 1998; Pratley *et al.*, 1999), los estudios mostraron que la resistencia no fue debida a una *EPSPS* insensible, ni a diferencias en metabolismo (Lorraine-Colwill *et al.*, 2003). Se observó una acumulación de glifosato en el extremo de la hoja en la planta resistente y una acumulación en los meristemas de las plantas susceptibles. Este mismo patrón de resistencia ha sido encontrado en otros cuatro biotipos diferentes de *L. rigidum* procedentes de Australia (Wakelin *et al.*, 2004). En cruces realizados entre dos biotipos resistentes (cambio en la secuencia de aminoácidos: Pro-106-Thr y translocación reducida del herbicida), la población F1 mostró un factor de resistencia superior comparado con los parentales, lo cual demuestra que los diferentes mecanismos de resisten-

cia a glifosato pueden ser aditivos (Lorraine-Colwill *et al.*, 2003; Wakelin y Preston, 2006; Preston *et al.*, 2009). El que exista una población con diferentes mecanismos de resistencia, incrementa el problema de resistencia, y hará más difícil el manejo de malas hierbas en ciertos cultivos. (Yu *et al.*, 2007; Preston *et al.*, 2009).

La reducción de absorción y translocación de glifosato ha sido también encontrada en *Lolium multiflorum* en Chile (Pérez y Kogan, 2003). De hecho, los biotipos resistentes de esta especie muestran una reducción en la absorción de herbicida y una concentración más alta de herbicida en la punta de las hojas (Michitte *et al.*, 2007). También se ha encontrado una reducción de la absorción y translocación del herbicida en *Lolium multiflorum* de USA (Nandula *et al.*, 2008). La acumulación de glifosato en hojas tratadas ha sido también identificada en biotipos resistentes de *Conyza canadensis* (USA) y *Conyza bonariensis* en España y Brasil (Feng *et al.*, 2004; Koger y Reddy, 2005; Dinelli *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2008). Las últimas investigaciones han

mostrado que la secuestración en la vacuola es el mecanismo de resistencia en *C. canadensis* (Ge *et al.*, 2010), lo anterior sugiere que aquellos biotipos resistentes a glifosato en los cuales se ha descrito reducida translocación, el herbicida es secuestrado en la vacuola.

El metabolismo de glifosato en plantas modificadas genéticamente (OMG) y en malas hierbas es un tema con resultados controvertidos y muchas veces discutibles (Duke, 2011). La Figura 4 resume las vías más importantes en la degradación de glifosato en organismos vivos. La principal ruta de degradación de glifosato es debido a la acción de la glifosato oxidoreductasa que hidroliza el herbicida a AMPA y glioxilato (Nandula, 2010; Duke, 2011). Además, la actividad C-P liasa puede degradar glifosato a sarcosina y fosfato inorgánico. La sarcosina a su vez puede producir formaldehído, glicina y CO₂, reacción que está catalizada por una sarcosina oxidasa (Liu *et al.*, 1991). Los estudios realizados por técnicas de electroforesis capilar sobre extractos de *Amaranthus retroflexus* (S) y *Mucuna pruriens* (R) tratadas con

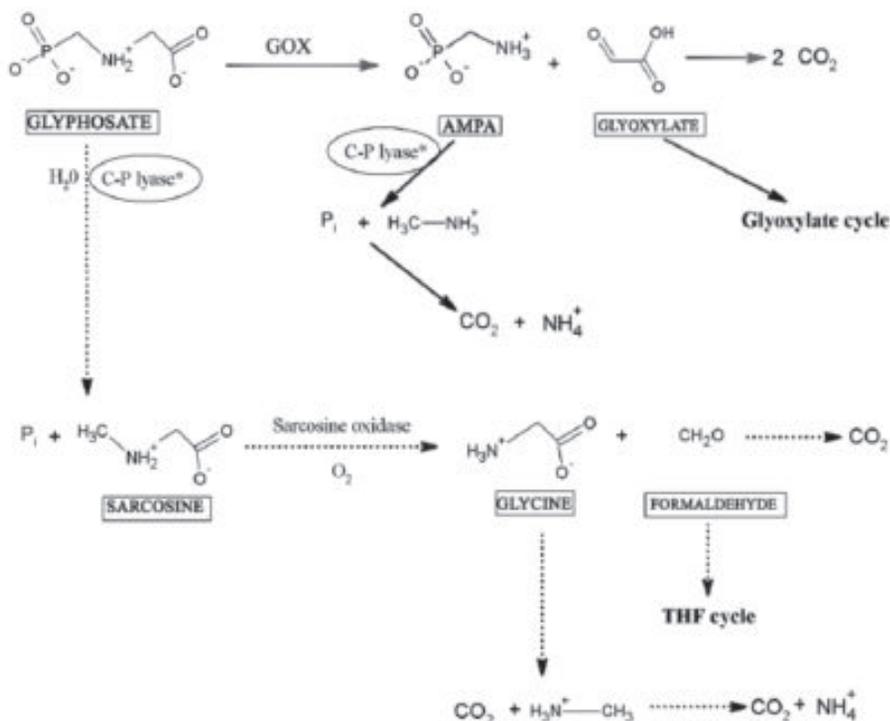


Figura 4. Vías más importantes en la degradación del herbicida glifosato en organismos vivos

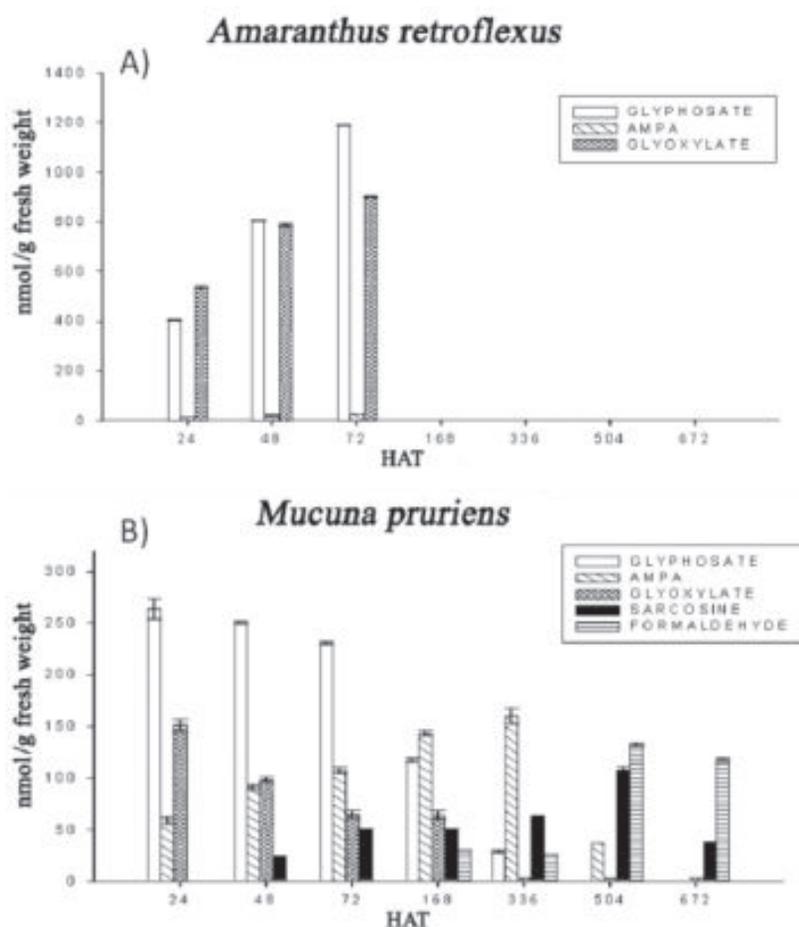


Figura 5. Degradación del herbicida glifosato en *A. retroflexus* y *Mucuna pruriens*

glifosato muestran que la especie R puede metabolizar más rápido y eficaz el herbicida que la especie S. (Rojano-Delgado *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que 168 h después de la aplicación de glifosato a 500 g ae ha⁻¹ la especie tolerante metaboliza el herbicida a nuevos productos: AMPA, glioxilato, sarcosina y formaldehído. Los resultados indican claramente que *M. pruriens* puede metabolizar glifosato a productos no tóxicos y que las dos vías de degradación representadas en la Figura 5 pueden coexistir (Rojano-Delgado *et al.*, 2012).

ASPECTOS AGRONÓMICOS

Alternativas para el control químico de *Lolium* spp. resistentes a glifosato

Lolium spp. se consideran una de las malezas más importantes en diferentes sistemas de cultivo de todo el mundo. En la Península Ibérica, *L. rigidum*, *L. multiflorum* y *L. perenne* se encuentran afectando plantaciones de cítricos, frutales y olivos. La forma común de controlar estas especies es

con el uso de herbicidas totales como el glifosato. En los últimos años, algunas afirmaciones acerca de una baja eficacia en el control se han registrado en sistemas de cultivo de no labranza como los olivares del sur de España y centro de Portugal y en huertos de cítricos en Castellón (centro-este de España), así como en las viñas del Duero

(Portugal). Con el objetivo de determinar alternativas para el control químico de estas especies, los herbicidas se aplicaron en diferentes etapas de crecimiento de *Lolium* spp. (Cuadro 2). Para evaluar la eficacia del tratamiento, la evaluación visual se llevó a cabo a los 30 y 60 días después del momento de aplicación B. La eficacia se evaluó a partir

Cuadro 2. Diferentes tratamientos aplicados en *Lolium* spp. resistentes a glifosato, y la evaluación visual a 30 DDT-B y 30 DDT-C

	Tratamiento	Dosis	Momento de aplicación	% Control ^a	% Control ^b
1	-Control		A	0.0	0.0
2	-Glifosato	720 g ia	B	38.3	20.6
3	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B	83.3	48.4
4	Oxifluorfen	960 g ia	A	78.3	85.3
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
5	-Amitrol	1440 g ia	B	97.3	50.4
	-Tiocianato de Amonio	1260 g ia	B		
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
6	-Cicloxdim	250 g ia	B	97.3	100.0
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
7	-Fluazifop-p-butil	250 g ia	B	78.3	75.8
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
8	-Flazasulfuron	50 g ia	B	58.3	94.4
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
9	-Pendimetalina	1980 g ia	A	69.7	56.7
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
10	-Flumioxazin	600 g ia	A	61.7	78.4
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
11	-Cletodim	100 g ia	B	88.3	100.0
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
12	-Iodosulfuron-metil	50 g ia	B	91.7	96.4
	-Surfactante	1000 g ia	B		
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
13	-Quizalofop-etil	125 g ia	B	75.0	94.4
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
14	-Fluometuron	990 g ia	A	94.3a	96.3
	-Terbutilazina	990 g ia	A		
	-Glifosato - sal de potasio	1800 g ia	B		
15	-Pendimetalina	1980 g ia	A	93.3	98.4
	-Diquat	800 g ia	B		

^aEvaluación correspondiente a 30 DDT-B. ^bEvaluación correspondiente a 30DDT-C.

Donde: A = preemergencia de una hoja, B = postemergencia temprana (principio de macollaje o ahijamiento).

de 0 a 100%, donde 0 corresponde a un control nulo y 100% para un control total. El Cuadro 2 muestra los diferentes tratamientos aplicados y los resultados obtenidos en *Lolium* spp. resistente a glifosato en momentos de aplicación diferentes (A y B).

Las evaluaciones visuales mostraron que los mejores tratamientos a 30 DDT-B fueron 5, 6, 11, 12, 14 y 15, pero, no hubo diferencias significativas de acuerdo a la comparación de medias con el resto de los tratamientos excepto para el tratamiento 1. El tratamiento 2 mostró una eficacia baja a una dosis baja, pero, cuando la dosis se incrementa, la eficacia aumenta hasta 83,3% (tratamiento 3). Cicloxidim, Cletodim e Iodosulfuron-metil proporcionó una buena eficacia en el control. Como puede verse, los tratamientos 14 y 15 tenían una gran eficacia cuando se aplicaron en el tiempo A. Después de 60 DT la eficacia se mantiene y aumenta en la mayoría de los casos, sin embargo también hay casos donde la eficacia disminuye bien por nuevas germinaciones de primavera o bien por rebrotes de las plantas como es el caso de Amitrol y Pendimetalina, por otra parte glifosato disminuye aun más su eficacia. Los resultados muestran que hay todavía diferentes herbicidas eficaces para controlar *Lolium* spp. resistentes a glifosato. Estos se pueden aplicar en momentos de preemergencia o postemergencia temprana.

La utilización de los herbicidas antigra-míneos (FOPs y DIMs) y la mayoría de los herbicidas ALS (sulfonilureas) tienen que realizarse con mucho cuidado al ejercer estos una alta presión de selección de resistencia sobre *Lolium* spp., como ha sido bien demostrado últimamente (Powles y Yu, 2010). La rotación de estos herbicidas en mezcla con glifosato es necesaria y debe ser programada para varios años de cultivo.

Alternativas para el control químico de *Conyza* spp. resistentes a glifosato

Se ha reportado que *Conyza* spp. son malezas importantes en más de 40 cultivos en 70 países. Tres especies están muy extendidas en todo el territorio de la Península

Ibérica correspondientes a *C. canadensis*, *C. bonariensis* y *C. sumatrensis*. En los últimos 5 años, se han registrado algunas afirmaciones acerca de una baja eficacia de control en los sistemas de cultivo de no labranza como los olivares y huertos de cítricos y algunos biotipos de las tres especies mencionadas han sido reportados como resistentes a glifosato en el sur de España. El objetivo de este estudio es definir la mejor estrategia de control químico en biotipos resistentes a glifosato. Para ello diferentes herbicidas fueron aplicados en diferentes etapas de crecimiento en un campo de naranjos situado en Palma del Río (Córdoba). En un campo de 6 años de edad y una extensión de 8 hectáreas, con árboles de la variedad Navel Power espaciados a 6 m entre hileras y 4 m en la fila. Desde el establecimiento de la plantación el manejo de malezas incluyó la aplicación de glifosato (1080 g ia ha⁻¹) + MCPA (900 g ia ha⁻¹) en marzo y octubre, y glifosato (1080 g ia ha⁻¹) + diflufenican (150 g ia ha⁻¹) en mayo y diciembre. El experimento se llevó a cabo utilizando un diseño completamente al azar con tres repeticiones. El Cuadro 3 muestra los diferentes tratamientos, dosis, momento de aplicación, y el % de control a 30 y 60 DDT-B. Los tratamientos de preemergencia (A) y post-emergencia (B) y (C) se aplicaron con un pulverizador de mochila equipado con 6 boquillas de abanico plano y calibrado para aportar 400 y 200 L ha⁻¹ en preemergencia y postemergencia, respectivamente. Para determinar la eficacia del control de malezas en cada tratamiento, se realizaron evaluaciones visuales a 30 y 60 días después de la aplicación B. La escala usada para evaluar la eficacia del tratamiento es de 0 a 100% de control respecto a un control sin tratar.

Los resultados del Cuadro 3 muestran que la adición de MCPA a glifosato en los tratamientos 15 y 16, ofrece la mejor eficacia de control en 30 DAT-B respecto a los otros tratamientos. Los tratamientos 2 y 14 mostraron el valor más bajo de eficacia en el control de *Conyza* spp. con 43,3 y 71,7%, respectivamente, y fueron significativamente diferentes al resto de los tratamientos. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que el uso de la dosis máxima de

Cuadro 3. Diferentes tratamientos aplicados en *Conyza* spp. resistentes a glifosato, y la evaluación visual a 30 DDT y 60 DDT-B

	Tratamiento	Dosis		Momento de aplicación	% Control ^a	% Control ^b
1	-Control			A	0.0	0.0
2	-Glifosato - sal de potasio	720	g ia	B	43.3	30.6
3	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B	91.7	71.2
4	-Isoxaben	1000	g ia	A	87.7	70.5
	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B		
5	-Pendimetalina	1980	g ia	A	85.7	64.3
	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B		
6	-Flumioxazin	600	g ia	A	93.3	82.6
	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B		
7	-Oxifluorfen	960	g ia	A	91.0	74.8
	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B		
8	-Amitrol	1440	g ia	B	96.7	94.8
	-Tiocianato de amonio	1260	g ia	B		
	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B		
9	-Flazasulfuron	50	g ia	B	89.0	96.2
	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B		
10	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B	91.7	99.4
	-Glufosinato de amonio	750	g ia	C		
11	-Pendimetalina	1980	g ia	A	96.3	96.4
	-Diquat	800	g ia	B		
12	-Fluometuron	990	g ia	A	94.7	90.2
	-Terbutilazina	990	g ia	A		
	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B		
13	-Diflufenican	320	g ia	A	91.0	84.2
	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B		
14	-Iodosulfuron-metil	50	g ia	B	71.7	96.4
	-Surfactante	1000	g ia	B		
	-Glifosato - sal de potasio	720	g ia	B		
15	-MCPA	1080	g ia	B	98.0	96.6
	-Glifosato	1080	g ia	B		
16	-MCPA	1080	g ia	B	99.3	100.0
	-Glifosato	1080	g ia	B		
	-MCPA	1080	g ia	C		
	-Glifosato	1080	g ia	C		
17	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B	84.3	98.2
	-Fluroxipir	300	g ia	C		
18	-Glifosato - sal de potasio	2160	g ia	B	88.3	94.4
	-Clopiralid	128	g ia	C		

^aEvaluación correspondiente a 30 DDT-B. ^bEvaluación correspondiente a 30DDT-C.

Donde: A = preemergencia de una hoja, B = postemergencia temprana (principio de macollaje o ahijamiento).

glifosato a 2160 g ia ha⁻¹ aplicado en postemergencia temprana tiene buenos valores de eficacia (91%) en estas *Conyza* spp. resistentes a glifosato, pero el control se ha mejorado a un costo razonable con la adición de herbicidas post emergentes tales como MCPA o Amitrol. Después de 60 DT el herbicida que ampliaron su eficacia solo fueron Iodosulfuron y Flazasulfuron, que como sabemos estos inhibidores de la ALS son lentos en su acción fitotóxica. En general los herbicidas de preemergencia perdieron eficacia debido principalmente a la disminución de su poder residual posiblemente por la metabolización microbiana a formas no tóxicas de estos herbicidas, la adición de glifosato a dosis altas no mejoró la eficacia de estas mezclas. La segunda aplicación de herbicidas de postemergencia (auxinas y glutamina) 30 días después del tratamiento B mejoraron el control de *Conyza* spp. resistente a glifosato. Todos ellos obtuvieron una eficacia superior al 94,4%.

A: etapa de preemergencia hasta dos hojas; B: etapa de Roseta (9-10 hojas); C: etapa de atornillamiento (<25 cm).

AGRADECIMIENTOS

El Grupo de «Acción de los Pesticidas sobre el Medio Ambiente agradece a la Empresa Monsanto Europa la ayuda financiera y técnica durante estos últimos años.

BIBLIOGRAFÍA

- BAERSON, S.R.; RODRIGUEZ, D.; TRAN, M.; FENG, Y.; BIEST, N.A.; DILL, G.M.** 2002. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol.*, v. 129, p. 1265–1275.
- CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; CRUZ-HIPÓLITO, H.E.; ROJANO-DELGADO, A.M.; DE PRADO, R.; GIL-HUMANES, J.; BARRO, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D.** 2012. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 60, p. 615-622.
- 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 Sci.*, v. 35, p. 131-136.
- DEWEY, S.A.; APPLEBY, A.P.** 1983. A Comparison between glyphosate and assimilate translocation patterns in tall morning glory (*Ipomoea purpurea*). *Weed Sci.*, v. 31, p. 308-314.
- DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; CATIZONE, P.; URBANO, J.M.; BARNES, J.** 2008. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. *Weed Res.*, v. 48, p. 257–265.
- DUKE, S.O.** 2011. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 59, p. 5835–5841.
- DUKE, S.O.; POWLES, S.B.** 2008. Glyphosate: a once in a century herbicide. *Pest Manag. Sci.*, v. 64, p. 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 Sci.*, v. 52, p. 498–505.
- FERREIRA, E.A.; GALON, L.; ASPIAZÚ, I.; SILVA, A.A.; CONCENCO, G.; SILVA, A.F.; OLIVEIRA, J.A.; VARGAS, L.** 2008. Glyphosate translocation in Hairy Fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes. *Planta Daninha*, v. 26, p. 637-643.
- FISCHER, A.J.** 2008. Mecanismos de resistencia: Las bases para definir estrategias. *Seminario Internacional «Viabilidad del Glifosato en Sistemas Productivos Sustentables»*. INIA. Colonia. Uruguay, p. 27-44.
- GAINES, T.A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; WEBSTER, T.M.; VENCILL, W.K.; SAMMONS, R.D.; JIANG, J.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P.** 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 107, p. 1029–1034.

- GE, X.; D'AVIGNON, D.A.; ACKERMAN, J.J.H.; SAMMONS, R.D.** 2010. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Manag. Sci.*, v. 66, p. 345–348, 2010.
- GEIGER, D.R.; FUCHS, M.A.** 2002. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). In *Herbicide Classes in Development*. Böger, P.; Wakabayashi, K.; Hirai, K., Eds.; Berlin, Springer-Verlag., p. 59–85, 2002.
- GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; GIL-HUMANES, J.; BARRO, F.; BRANTS, I.; DE PRADO, R.** 2012. Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 58, p. 16–22.
- GRESSEL, J.** 2002. *Molecular Biology of Weed Control*. Taylor y Francis, London, UK, p. 504.
- HALL, J.C.; WICKENDEN, J.S.; KYF, Y.** 2001. Biochemical conjugation of pesticides in plants and microorganisms: an overview of similarities and divergences. In *Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences*. Hall, J.C.; Hoagland, R.E.; Zablotowicz, R.M., Eds.; Washington, DC: American Chemical Society. p. 89–118.
- HEAP, I.** 2013. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [www. weedscience.org](http://www.weedscience.org). [accessed: January 12, 2013].
- JASIENIUK, M.; AHMAD, R.; SHERWOOD, A.M.; FIRESTONE, J.L.; PEREZ-JONES, A.; LANINI, W.T; MALLORY-SMITH, C.; STEDNICK, Z.** 2008. Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: Distribution, Response to Glyphosate, and Molecular Evidence for an Altered Target Enzyme. *Weed Sci.*, v. 56, p. 496–502.
- JAWORSKI, E.G.** 1972. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.*, v.20, p. 1195–1198.
- KOGER, C.H.; REDDY, K.N.** 2005. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci.*, v. 53, p. 84–89.
- LIU, C.M.; McLEAN, P.A.; SOOKDEO, C.C.; CANNON, F.C.** 1991. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 57, p. 1799–1804.
- LORRAINE-COLWILL, D.F.; POWLES, S.B.; HAWKES, T.R.; HOLLINSHEAD, P.H.; WARNER, S.A.J.; PRESTON, C.** 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 74, p. 62–72.
- MICHTTE, P.; DE PRADO, R.; ESPINOZA, N.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; GAUVRIT, C.** 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Sci.*, v. 55, p. 435–440.
- NANDULA, V.K.; REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O.; POSTON, D.H.** 2007. Glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 3540–3545.
- NANDULA, V.K.; REDDY, K.N.; POSTON, D.H.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O.** 2008. Glyphosate tolerance mechanism in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. *Weed Sci.*, v. 56, p. 344–349.
- NANDULA, V.K.** 2010. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds*. John Wiley y Sons, Inc. 321 p.
- NG, C.H.; WICKNESWARI, R.; SALMIJAH, S.; TENG, Y.T.; ISMAIL, B.S.** 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Res.*, v. 43, p. 108–115.
- PÉREZ, A.; KOGAN, M.** 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Res.*, v. 43, p. 12–19.
- PEREZ-JONES, A.; PARK, K.W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A.** 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta*, v. 226, p. 395–404.
- PETERSEN, I.L.; ANDERSEN, K.E.; SØRENSEN, J.C.; SØRENSEN, H.** 2006. Determination of shikimate in crude plant extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A.*, v. 1130, p. 253–258.

- PIMENTAL, D.; LEVITAN, L.** 1986. Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Biosciences*, v.36, p. 86-91.
- POWLES, S.B.; LORRAINE-COLWILL, D.F.; DELLOW, J.J.; PRESTON, C.** 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Sci.*, v. 46, p. 604-607.
- POWLES, S.B.** 2009. Evolution in action: plants resistant to herbicides: AFPP-XIIIth International Conference on Weed Biology. September 2009. Dijon. France.
- POWLES, S.B.; YU Q.** 2010. Evolution en action: plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 61, p. 317-347.
- PRATLEY, J.; URWIN, N.; STANTON, R.; BAINES, P.; BROSTER, J.; CULLIS, K.; SCHAFER, D.; BOHN, J.; KRUEGER, R.** 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. I. Bioevaluation. *Weed Sci.*, v. 47, p. 405-411.
- PRESTON, C.; WAKELIN, A.M.; DOLMAN, F.C.; BOSTAMAM, Y.; BOUTSALIS, P.A.** 2009. Decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: Mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. *Weed Sci.*, v. 57, p. 435-441.
- ROJANO-DELGADO, A.M.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; DE PRADO, R.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; FRANCO, A.** 2012. Limited uptake and translocation of glyphosate by effect of enhanced metabolic degradation increasing its tolerance by *Mucuna pruriens* var. *utilis* plants. *Phytochem.*, v. 73, p. 34-41.
- SHERMAN, T.D.; VAUGHN, K.C.; DUKE, S.O.** 1996. Mechanism of action and resistance to herbicides. In *Herbicide Resistant Crops*. Duke, S.O. ed, CRC Press, Boca Raton, p. 14-28.
- STEINRÜCKEN, H.C.; AMRHEIN, N.** The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 94, 1207-1212, 1980.
- WAKELIN, A.M.; LORRAINE-COLWILL, D.F.; PRESTON, C.** 2004. Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Res.*, v. 44, p. 453-459.
- WAKELIN, A.M.; PRESTON, C.A.** 2006. Target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. *Weed Res.*, v. 46, p. 432-440.
- YU, Q.; CAIRNS, A.; POWLES, S.** 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta.*, v. 225, p. 499-513.