

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

PRIMER REPORTE DE RESISTENCIA A GLIFOSATO EN
POBLACIONES DE *LOLIUM MULTIFLORUM* Lam EN URUGUAY Y
SUCEPTIBILIDAD DE ESTAS A HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ACCASA

por

Eduardo FÉLIX ALFONSO
Santiago URIOSTE CAORSI

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2016

Tesis aprobada por:

Director: _____

Dr. Ing. Agr. Milton Alejandro García Latasa

Dra. Ing. Agr. Grisel Fernández

Dra. Ing. Agr. Juana Villalba

Fecha: 25 de setiembre de 2016

Autores:

Eduardo Félix Alfonso

Santiago Urioste Caorsi

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarnos e iluminarnos durante todo el camino.

A nuestra familia que no ha brindado un apoyo incondicional para nosotros durante la carrera.

A todos nuestros amigos que compartieron la carrera con nosotros.

Al Ing. Agr. PhD. Alejandro García por su apoyo académico y su dedicación.

Al personal de INIA La estanzuela por el apoyo que recibimos.

A Ing. Agr. PhD. Grisel Fernández y a la Ing. Agr. PhD. Juana Villalba por acompañarnos en la defensa de nuestro trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1. SIEMBRA DIRECTA Y CULTIVOS TRANSGÉNICOS.	2
2.2. HERBICIDAS	4
2.2.1. <u>Glifosato</u>	4
2.2.1.1. Absorción, transporte y degradación dentro de las plantas.	6
2.2.2. <u>Herbicidas Inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa (ACCase)</u>	6
2.2.2.1. Modo y sitio de acción.	7
2.2.2.2. Absorción, transporte y degradación dentro de las plantas.	7
2.3. RESISTENCIA DE MALEZAS A HERBICIDAS	8
2.3.1. <u>Resistencia de sitio activo</u>	9
2.3.2. <u>Resistencia fuera de sitio de acción</u>	10
2.3.3. <u>Situación mundial de la resistencia a herbicidas</u>	11
2.4. <u>LOLIUM MULTIFLORUM</u> (RAIGRÁS ANUAL)	12
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	14
3.1. EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DE SUCEPTIBILIDAD DE <i>L.</i> <u><i>MULTIFLORUM</i></u> A GLIFOSATO	15
3.2. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DE SUCEPTIBILIDAD DE <u><i>L.MULTIFLORUM</i></u> A DIFERENTES INHIBIDORES DE LA ACCASA.	16
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	17
3.3.1. <u>Experimento 1</u>	17
3.3.2. <u>Experimento 2</u>	18
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	20
4.1. EXPERIMENTO 1	20

4.2. EXPERIMENTO 2.....	27
5. <u>CONCLUSIONES</u>	33
6. <u>RESUMEN</u>	34
7. <u>SUMMARY</u>	36
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	37

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Importaciones de glifosato en Kgs de ingrediente activo y Kgs de producto formulado en Uruguay y su relación durante los años 2002 y 2015.....	3
2. Dosis de glifosato aplicadas a las poblaciones de <i>L. multiflorum</i> supuestamente resistentes (R1, R2 y R3) y a la población (S) en el experimento 1.....	15
3. Dosis de haloxifop-metil utilizadas en las 4 poblaciones evaluadas en el experimento anterior (R1, R2, R3 y S).....	17
4. Dosis de clethodim utilizadas en las 4 poblaciones evaluadas en el experimento anterior (R1, R2, r3 y S).....	17
5. Parámetros estimados por el modelo usado para calcular las dosis de glifosato necesarias para reducir el peso seco al 50% en plantas de poblaciones supuestamente r y una población s de <i>L. multiflorum</i>	22
6. Valores de dosis estimadas por el modelo para controlar el 50% de las plantas de 3 poblaciones supuestamente R y una población S de <i>L. multiflorum</i>	24
7. Valores de dosis de haloxifop-metil- metil necesaria para disminuir el crecimiento en un 50% (GR_{50}), y los respectivos intervalos de confianza al 95% para 4 poblaciones de <i>L. multiflorum</i>	29
8. Valores de dosis de clethodim necesaria para disminuir el crecimiento en un 50% (GR_{50}), y los respectivos intervalos de confianza al 95% para 4 poblaciones de <i>L. multiflorum</i>	31
Figura No.	
1. Evolución del área sembrada de cultivos de invierno y verano en Uruguay para el periodo 1996 - 2015.	2
2. La ruta del ácido shiquimico y el sitio de inhibición de glifosato productos de la ruta (flechas con línea continua) e inhibición por feedback regulador (flecha con línea punteada).	5
4. Sitios de colecta de las diferentes poblaciones de <i>L. multiflorum</i>	14

5. Curvas de dosis-respuesta a glifosato sobre el peso seco aéreo de 3 poblaciones de <i>L. multiflorum</i> supuestamente resistentes a este herbicida (R1, R2 y R3) y una población susceptible (S). Los símbolos y las barras representan las medias de los tratamientos \pm el error estándar de la media (n = 6), respectivamente. Las líneas representan el crecimiento predicho de acuerdo a la ecuación [1].	21
6. Curva de dosis respuesta a diferentes dosis de glifosato, medida como proporción de plantas vivas en relación al total de plantas evaluadas de <i>L. multiflorum</i> . Los símbolos representan las medias de los tratamientos (n = 6). Las líneas representan la disminución del crecimiento predicho de acuerdo a la ecuación [2].	23
7. Respuesta a las diferentes dosis de glifosato de las poblaciones S y R de <i>L. multiflorum</i> utilizadas en los experimentos.	26
8. Rebrote de los tratamientos con dosis de 4320 y 8640 g e.a ha ⁻¹	27
9. Curva de dosis respuesta de 4 poblaciones de <i>L. multiflorum</i> a diferentes dosis de haloxifop-metil. Los puntos representan los promedios de cada tratamiento \pm el error estándar (n=4). Las líneas representan el crecimiento como ps predicho por la ecuación [3].	28
10. Curva de dosis respuesta de 4 poblaciones de <i>L. multiflorum</i> a diferentes dosis de clethodim. Los símbolos representan los promedios de cada tratamiento y las barras \pm el error estándar (n=4).las líneas representan el crecimiento en ps predicho por el modelo [3].	30

1. INTRODUCCIÓN

Desde los comienzos del año 2000 el Uruguay ha experimentado un proceso de intensificación y expansión creciente de su agricultura (Ernst y Siri-Prieto, 2011). Este proceso ha implicado una adopción masiva de tecnologías como ser la práctica de siembra directa y la utilización de cultivos genéticamente modificados, especialmente aquellos resistentes al herbicida glifosato (Ríos et al., 2008). El área estimada de cultivos agrícolas en nuestro país fue de casi 1.6 millones de hectáreas en el 2015 según MGAP. DIEA de los cuales el 90% se realizó en esquemas de agricultura sin laboreo (Ernst y Siri-Prieto, 2011). De esta superficie, según la Cámara Uruguaya de Semillas (CUS) aproximadamente el 82% se siembra con cultivos RR (maíz y soja). Ambas tecnologías han favorecido el uso intenso y casi exclusivo de glifosato para el control de malezas tanto durante la preparación de la cama de siembra como durante el ciclo del cultivo, en el caso de los cultivos resistentes a glifosato (RR). Esta práctica ha acentuado los procesos de modificación de las comunidades florísticas determinando el aumento en la frecuencia de especies tolerantes (Ríos, 2011) y/o biotipos resistentes a este herbicida.

La evolución de biotipos de malezas resistentes a herbicidas y en especial a glifosato es un problema generalizado que en muchos casos llega a limitar seriamente la producción agrícola, especialmente en sistemas con alta dependencia de esta herramienta de control químico. En Uruguay, el glifosato es por amplio margen el herbicida más usado, alcanzando muchas veces más de cinco aplicaciones por hectárea y por año (Fernández et al., 2013).

En los últimos años han aumentado las observaciones de campo que sugieren que existen en el Uruguay poblaciones de especies maleza que han evolucionado para resistir aplicaciones del herbicida glifosato. Particularmente preocupante es el caso de la especie *Lolium multiflorum* Lam (raigrás) ya que la frecuencia de los reportes de fallas de control con glifosato en esta especie han aumentado notoriamente en los últimos 3 años. Sin embargo no se cuenta con información experimental que permita confirmar estas sospechas, cuantificar y entender el problema y/o diseñar estrategias para mitigarlo.

Los objetivos de este trabajo fueron: i) confirmar la resistencia a glifosato y determinar los niveles de resistencia en tres poblaciones de *L. multiflorum* supuestamente resistentes a glifosato en relación a una población susceptible de referencia; y ii) evaluar la susceptibilidad de estas mismas poblaciones a los herbicidas haloxifop-metil y clethodim.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. SIEMBRA DIRECTA Y CULTIVOS TRANSGÉNICOS

En los últimos 15 años el Uruguay sufrió cambios en el sistema de producción agropecuaria, pasando de una agricultura que estaba dominada por el cultivo de trigo en el invierno, a una donde actualmente la soja es ampliamente el cultivo más sembrado (MGAP. DIEA, 2015, Figura No. 1). Al mismo tiempo la agricultura pasó de un sistema de labranza convencional, en el cual se rotaban los cultivos con pasturas al final del siglo XX, a sistemas con laboreos conservacionistas en la mayoría de los suelos agrícolas.

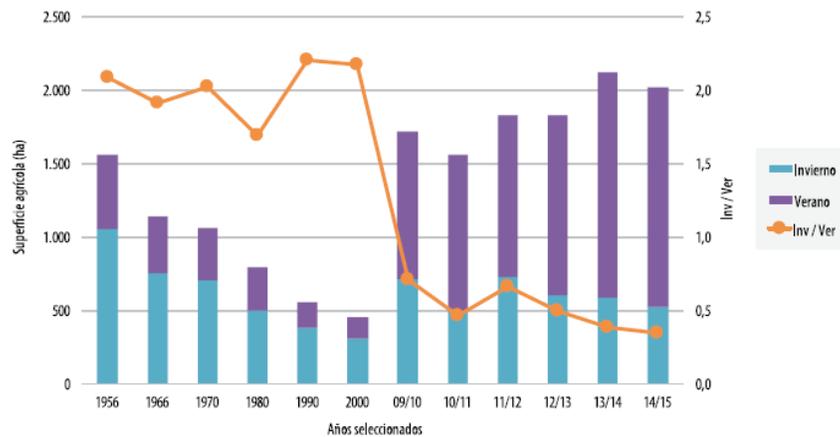


Figura No. 1. Evolución del área sembrada de cultivos de invierno y verano en Uruguay para el periodo 1996 - 2015. Fuente: MGAP. DIEA (2015)

La eliminación del laboreo es un factor de suma importancia en la agricultura, ya que minimiza los problemas de erosión y degradación de los suelos. Estos procesos son serias limitantes para la intensificación en el uso de la tierra y en la viabilidad de rotaciones agrícolas puras en suelos marginales por su riesgo de erosión (Dabalá, 2009).

La siembra directa (SD) es una tecnología que implica realizar agricultura sobre el rastrojo del cultivo anterior procurando que el suelo no quede descubierto. En Uruguay, la SD comenzó su expansión a inicio de la década del 90 y se encuentra actualmente ampliamente difundida, principalmente, en el litoral agrícola del país (Ríos et al., 2007). La adopción

masiva de la SD puede ser explicada fundamentalmente por las siguientes razones: i) la caída de la patente de propiedad intelectual del glifosato que poseía MONSANTO en el año 1991 lo que permitió su utilización a un costo menor debido a la rápida aparición de formulaciones de herbicidas a base de este ingrediente activo por parte de otras compañías, sumado a su excelente performance como herbicida total, ii) la reducción de costos asociada al menor uso de combustibles fósiles y menor tiempo de laboreos, iii) mejora en la eficiencia del uso del tiempo, a través de la reducción en el tiempo de espera para entrar en la chacra luego de la ocurrencia de precipitaciones y del mayor tiempo libre de los productores para destinar a otras actividades de gestión, y iv) disminución de la erosión del suelo y la quema de combustible fósiles.

Este cambio en la tecnología de siembra fue en gran parte posible gracias a la utilización de glifosato. Asimismo, en el año 1996 se aprobó el evento soja 40-3-2 (RR) el cual tiene la característica de conferir resistencia a glifosato. De ahí en adelante se comienzan a sembrar cultivos con el evento transgénico RR, permitiendo utilizar el glifosato no solo en la preparación de la cama de siembra sino también en post-emergencia del cultivo. Ambas tecnologías contribuyeron para que aumentara drásticamente el uso de glifosato en el país (Cuadro No. 1).

En la actualidad el glifosato ocupa aproximadamente un 60% del total de herbicidas que se importan, según MGAP. DGSSAA (2015), demostrando así la gran importancia que tiene esta herramienta química en los sistemas de producción del Uruguay.

Cuadro No. 1. Importaciones de glifosato en miles de Kgs de ingrediente activo y Kgs de producto formulado en Uruguay y su relación durante los años 2002 y 2015

	Importaciones de glifosato		
	Año		Relación 2015/2002
	2002	2015	
Kg de i. a.	1,493.9	8,699.3	5.82
Kg de producto formulado	3,293.6	12,602.3	3.83

Fuente: elaborado en base a dato de MGAP. DIEA (2015)

Como se puede observar en el cuadro anterior, el uso de glifosato aumento de manera importante entre los años 2002 y 2015, convirtiéndose en casi la única herramienta para el control de malezas tanto en los barbecho como en la etapa del cultivo (en los cultivos transgénicos RR).

La utilización de cultivos genéticamente modificados resistentes a glifosato, ha favorecido el incremento del uso de este herbicida, aumentando la presión de selección sobre las poblaciones de especies maleza (Ríos, 2011).

2.2.HERBICIDAS

2.2.1.Glifosato

John E. Franz, de la Compañía Monsanto, fue el primero en sintetizar y probar al glifosato como herbicida, cuyo uso fue patentado a partir de 1970 (Duke y Powles, 2008). Este herbicida llegó al mercado en el año 1974 como sal isopropilamina (Duke y Powles, 2008), pero hoy en día existen en el Uruguay otras 3 formulaciones, la sal dimetilamina, sal potásica, y sal de amonio.

El glifosato es un herbicida incluido en el Grupo G según la clasificación del Comité de Acción contra la Resistencia a Herbicidas (HRAC, según sus siglas en inglés). Mientras que la Sociedad Americana de Malezas (WSSA, por sus siglas en inglés) clasifica a esta familia química dentro del grupo 9 (Forouzesh et al., 2015). En especies susceptibles, inhibe competitivamente a la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Es un herbicida no selectivo, sistémico, post-emergente, que carece de residualidad en el suelo. Esta última característica se debe principalmente a la fuerte adsorción a las partículas orgánicas e inorgánicas del suelo (Duke y Powles, 2008).

El glifosato inhibe la enzima EPSPS la cual forma parte de la ruta del ácido shiquímico. La inhibición de esta enzima impide que se sintetice el ácido corísmico, precursor común en la síntesis de los aminoácidos aromáticos felinalanina, tirosina y triptófano, compuestos que intervienen en la formación de proteína para las plantas.

Steinrucken y Amrhein, citados por Duke y Powles (2008), observaron altos niveles de ácido shiquímico que se acumulaban rápidamente en tejidos de las plantas tratadas con glifosato. Este trabajo fue clave para entender que la EPSPS era el sitio de acción del glifosato. La enzima EPSPS cataliza la reacción entre shiquimato-3-fosfato (S3P) y fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 5-enolpirulvil-shiquimato-3-fosfato (EPSP) y fósforo inorgánico (Pi). El glifosato es un análogo del estado de transición de PEP y actúa como inhibidor

competitivo de la EPSPS con respecto al PEP y como un inhibidor no competitivo con respecto a S3P (Duke y Powles, 2008). El sustrato S3P forma un complejo con EPSPS al cual glifosato se acopla con mayor afinidad que el PEP (Figura No. 2).

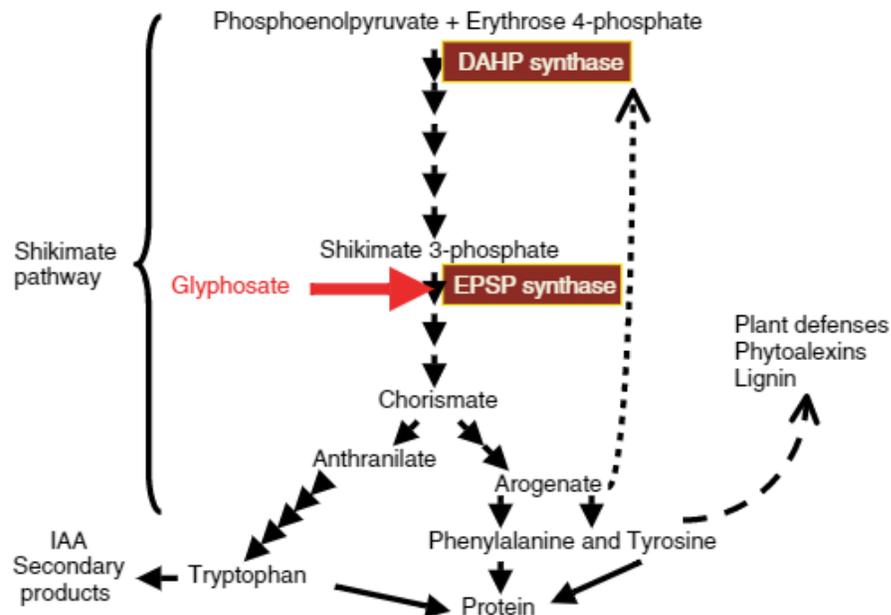


Figura No. 2. La ruta del ácido shiquímico y el sitio de inhibición de glifosato. Productos de la ruta (flechas con línea continua) e inhibición por feedback regulador (flecha con línea punteada). Fuente: adaptado de Duke y Powles (2008)

El fenómeno de adsorción del glifosato a las partículas del suelo es rápido y ocurre principalmente a través de la fracción fosfórica del compuesto, que compite por sitios de adsorción específicos con el Pi (Piccolo et al., 1994). Prata et al., citados por Bozzo De Brum (2010), concluyeron que esta competencia se produce solamente cuando los niveles de fósforo son muy elevados en el suelo, lo que no es común en suelos agrícolas de nuestro país. También existe una fuerte adsorción con óxidos de Fe y Al, y con las arcillas (Hance, 1976). La adsorción por parte del suelo puede variar según el tipo y cantidad de arcilla, siendo la montmorillonita y la illita las que presentan mayor fuerza de adsorción en relación a la caolinita (Glass, 1987). Esta fuerte y rápida adsorción a las partículas del suelo determina su nula residualidad como herbicida y bajo riesgo de contaminación de aguas subterráneas.

La degradación del glifosato en el suelo ocurre principalmente por acción microbiana, ya que los microorganismos utilizan al glifosato como fuente de energía y fósforo (Dicke y Quinn, 1995) generando ácido amino metilfosfónico (AMPA) (Rueppel et al., 1977) y glioxilato (Nandula 2010, Duke 2011) existiendo también otros compuestos de menor importancia.

El glifosato es uno de los herbicidas con menor toxicidad aguda para mamíferos (Franz et al. 1997, Duke et al. 2003, Cerderia y Duke 2006). Thompson et al. (2014), concluyen que no se encontraron efectos adversos en las abejas adultas ni tampoco en el desarrollo de la abeja reina en colonias que fueron tratadas con glifosato al igual que Ferguson (1987), quien no encontró efectos en colonia de abejas alimentadas hasta con 5 mg/Kg de glifosato. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por su sigla en inglés) reclasificó al glifosato como clase 2a (producto probablemente cancerígeno), lo cual ha promovido nuevamente una discusión mundial acerca de su inocuidad.

2.2.1.1. Absorción, transporte y degradación dentro de las plantas

El glifosato es un herbicida foliar, sistémico que luego de ser absorbido por las hojas se transloca hacia el tallo y las raíces. Ingresa a la planta por difusión atravesando la cutícula de las hojas y posteriormente a las células a través, fundamentalmente, de transportadores. Una vez dentro del sistema vascular de la planta el glifosato, según Fisher (2008), se transporta principalmente por floema, aunque existe una porción que también es arrastrada hacia la corriente transpiratoria (xilema) y luego a las hojas. El aumento en la concentración del herbicida en las hojas debido a esta acumulación en los tejidos transpiratorios, promueve nuevamente el pasaje hacia el simplasma. Esta característica del herbicida hace que sea ambimóvil y pueda circular por toda la planta (Dewey y Appleby, 1983).

En cuanto a la degradación del glifosato dentro de la planta, Duke y Powles (2008) afirman que el glifosato no es casi degradado por la mayoría de las especies vegetales, una de las razones por las cuales se lo considera un herbicida no selectivo. En al menos algunas especies, el glifosato se degradaría lentamente, produciendo ácido aminofosfónico (AMPA) y glioxilato por medio de la glifosato oxidorreductasa (GOX) (Duke et al. 2003, Nandula et al. 2007).

2.2.2. Herbicidas Inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa (ACCase)

Los herbicidas que inhiben la enzima acetil coenzima A carboxilasa (ACCase) se utilizan para el control de especies gramíneas. Su selectividad frente a las dicotiledóneas es fisiología debido a que cierta proporción de la

enzima ACCasa de este tipo de plantas es insensible a la acción de esta molécula. Sin embargo, estos herbicidas pueden ser utilizados selectivamente para el control de gramíneas en algunos cultivos de cereales en post emergencia. En algunos casos esta selectividad se logra o mejora a través del uso de “protectores” o “safeners”.

Dentro de este grupo de herbicidas existen tres sub grupos: los ariloxi – fenoxi – propionatos (APP), más conocidos como FOPs, las ciclo – hexana – dionas (CHD) denominados comúnmente DIMs (Clavijo, 2010) y los DENs (feniloxopirazolinil formatos). Dentro de este último sub grupo se encuentra el pinoxaden, herbicida ampliamente usado en Uruguay para el control selectivo de gramíneas en trigo y cebada. La dosis recomendada de etiqueta de estos productos para la especie *L. multiflorum*, está dentro del rango de 0.35 a 0.5 L ha⁻¹ en el caso del haloxifop-metil (Verdict[®]-M, Dow AgroSciences[™], 2015) y entre 0.35 y 0.45 L ha⁻¹ en el caso del clethodim (ClethoMax[®], Shandong Cynda Chemical CO. LTD, 2015) Para antes del macollaje se recomienda el rango inferior y luego de iniciado el mismo el rango superior de dosis.

2.2.2.1. Modo y sitio de acción

Los herbicidas que integran el Grupo A según la clasificación de HRAC, tienen como modo de acción la inhibición de la síntesis de ácidos grasos dentro de la planta. El sitio de acción de estos herbicidas es la enzima ACCasa cloroplástica (Gronwald, 1991), enzima clave en la producción de lípidos (Devine, 1997). Esta enzima cataliza la acetil CoA, introduciendo CO₂ con gasto de ATP, derivando en la producción de malonil CoA, compuesto muy importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Gronwald, 1991). Los APP y las CHD, son grupos de herbicidas químicamente diferentes pero presentan el mismo sitio de acción.

2.2.2.2. Absorción, transporte y degradación dentro de las plantas

Este tipo de herbicidas son clasificados como foliares, post-emergente, con poca o nula actividad en el suelo. Los APP, son en general herbicidas lipofílicos y no poseen una alta movilidad simplástica, mientras que las CHD son muy móviles por el floema, existiendo algunas moléculas dentro de este subgrupo muy inestables, expuestas a una fotólisis rápida (Clavijo, 2010). Luego de absorbido el herbicida se transloca a las regiones meristematicas (meristemas apicales, raíces, meristemas intercalares), donde existe una alta demanda de Malonil CoA que estimula la nueva biosíntesis de lípidos, ejerciendo allí su acción herbicida (Brezeanu et al. 1976, Lichtenthaler y Meier 1984, Gronwald 1991).

En cuanto al metabolismo de este herbicida por parte de las gramíneas, existen algunas especies capaces de metabolizar este herbicida. Un ejemplo de esto es el trigo, que posee la capacidad de metabolizar el herbicidas del grupo de los APP como por ejemplo el diclofop (Donald, 1980).

2.3.RESISTENCIA DE MALEZAS A HERBICIDAS

En los sistemas sin laboreo (i.e. en esquemas de siembra directa, SD), la preparación del suelo se realiza mediante el uso de herbicidas totales, con los que se busca eliminar las malezas, y a través de su descomposición, se prepara la cementera. El laboreo deja de ser un factor de presión de selección en las comunidades de malezas y los herbicidas pasan a ser el principal factor de selección. Cuando se comienzan a usar esquemas de SD, durante los primeros años, germinan las semillas que quedaron en los primeros centímetros de suelo después del último laboreo. A medida que este banco de semillas se va agotando, las reinfestaciones comienzan a estar dominadas por especies que se adaptan a las nuevas condiciones. En este tipo de sistemas hay especies que tienen la capacidad de germinar e implantarse sobre la superficie del suelo (o muy próxima a ella), bajo el rastrojo y que por su ciclo y/o fisiología son más tolerantes a los herbicidas usados en la/s aplicaciones en pre siembra de los cultivos agrícolas o forrajeros (Fischer, 2008). La implementación de esta práctica comúnmente ha derivado en la utilización frecuente y sin rotación de un herbicida, el glifosato.

La resistencia es la capacidad heredable que tienen ciertos biotipos dentro de una especie o dentro de una población para sobrevivir y reproducirse después de recibir una dosis de herbicida que es comúnmente letal para los biotipos “salvajes” de su especie (Fischer, 2008). Generalmente la resistencia involucra un proceso evolutivo que aumenta, en una población de malezas, la frecuencia de uno o más alelos de uno o varios genes que le confieren a la planta la capacidad de sobrevivir a la aplicación de un herbicida. Resulta de la selección que ejercemos dentro de una especie vegetal cuando matamos a los individuos susceptibles y se multiplican los resistentes (mutantes) que sobreviven. Es decir, los biotipos resistentes se seleccionan porque el usuario impone una presión de selección mediante el uso repetido de herbicidas con: i) el mismo mecanismo de acción, ii) la misma ruta de degradación metabólica o, iii) algún proceso común involucrado en la acumulación del herbicida en el sitio activo o su acción fitotóxica. Al continuar usando de forma repetida herbicidas que comparten una o más de estas características, continuamos avanzando en el proceso de selección de resistencia (Fischer, 2008).

Existen varios mecanismos que han sido asociados a la resistencia evolutiva de malezas a herbicidas (Fischer, 2008) Identificar estos mecanismos

es importante para el desarrollo de estrategias que minimicen la selección y dispersión de biotipos de malezas resistentes (Hall et al., 2001). Tradicionalmente, los mecanismos de resistencia se han agrupado en: mecanismos de resistencia de **sitio activo** y mecanismos de resistencia **fuera del sitio activo**.

2.3.1. Resistencia de sitio activo

El sitio activo o sitio de acción de un herbicida se refiere al proceso específico que es bloqueado en la planta por el herbicida, y que resulta en la interferencia del crecimiento de la misma. Generalmente implica el bloqueo o disrupción de una enzima que cumple un rol clave en algún proceso metabólico de la planta, y cuyo bloqueo resulta letal (Fisher, 2008).

La resistencia de sitio activo puede ocurrir por una mutación génica espontánea que confiere un cambio en un aminoácido de la enzima objetivo de un determinado herbicida. Estos cambios de aminoácidos en la enzima objetivo del herbicida provocan cambios en su conformación estructural, haciendo que esta sea insensible o reduzca su sensibilidad al herbicida. Consecuentemente, al verse afectada la capacidad del herbicida de acoplarse a una región específica en la enzima para ejercer su acción inhibitoria, las plantas que poseen esta mutación logran sobrevivir. Es necesario considerar que la mutación que genera la resistencia no debería afectar significativamente la funcionalidad natural de la enzima (De Prado et al., 2009)

La tasa natural de mutaciones y la cantidad de mutaciones diferentes que pueden afectar una enzima objetivo, y por ende la performance de ciertos grupos de herbicidas es variable. Esto determina que ciertos grupos de herbicidas sean más vulnerables que otros a seleccionar individuos resistentes, ya que las probabilidades de encontrar mutantes resistentes son diferentes para diferentes grupos de herbicidas incluso aunque las poblaciones de malezas nunca hayan sido sometidas a la selección por herbicidas (Tranel y Wright 2002, Whaley et al. 2007). Un ejemplo es la resistencia de *Raphanus raphanistrum* a ALS generada por una mutación en la posición 197 de esta enzima (donde naturalmente se encontraría una prolina) (Yu et al., 2003). Otro ejemplo es la resistencia en *Bromus tectorum* a triazinas debido a la sustitución de una serina por una glicina en la posición 264 del gen *psbA* en la proteína D1 (Park et al. 2004a, Park et al. 2004b, Park y Malliory-Smith 2005). También se ha confirmado el caso de resistencia a inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa, en poblaciones de *Amaranthus tuberculatus*, por la pérdida completa de un aminoácido (delección) que provoca el cambio en la conformación del sitio en donde se acopla el herbicida Lactofen (Patzoldt et al. 2006, Hao et al. 2009).

También puede ocurrir una sobreexpresión de la enzima objetivo, esto hace que por más que el herbicida actué en el sitio de acción, la sobreexpresión neutraliza o reduce el daño causado por el herbicida (Powles y Yu, 2010). La sobreexpresión del gen que codifica para la enzima objetivo, genera que haya más cantidad de enzima que en los biotipos silvestres y aun cuando el herbicida se acopla normalmente a la enzima, la mayor producción de esta, hace que la dosis recomendada de herbicida no sea suficiente para inhibir el proceso metabólico en el cual participa la enzima objetivo. Un ejemplo de este tipo de mecanismo de resistencia fue reportado por Gaines et al. (2010) quienes demostraron que la resistencia a glifosato en biotipos de *Amaranthus palmeri* en Georgia (EE.UU.) era conferida por la sobreexpresión del gen *EPSPS*.

La resistencia de sitio activo implica generalmente resistencia a un modo de acción específico. Sin embargo, dentro de un modo de acción se agrupan varios herbicidas, por lo cual, probablemente también haya resistencia a otros herbicidas (aunque estos difieran químicamente) dentro del mismo modo de acción. Este fenómeno se denomina resistencia cruzada. Distintas mutaciones pueden dar distintos patrones de resistencia cruzada (Fischer, 2008). En este caso se pueden citar biotipos de *Echinochloa colona* resistentes a herbicidas FOPs como el fenoxaprop que también son resistentes a las DIMs como ser el setoxidim, ambos inhibidores de la ACCasa. También se han reportado biotipos de *Cyperus difformis* resistentes a sulfonilurea e imidazolinonas, ambos inhibidores de la ALS (Fischer y Valverde, 2010).

2.3.2. Resistencia fuera de sitio de acción

Existen diversos mecanismos que confieren resistencia a herbicidas sin involucrar al sitio activo (Yuan et al., 2007). Los mecanismos fuera del sitio de acción incluyen: reducción de la penetración del herbicida, reducción en la translocación del herbicida o mecanismos metabólicos de degradación del herbicida dentro de la planta (Délye et al., 2013). La resistencia metabólica o enzimática consiste en la capacidad de los biotipos resistentes de degradar los herbicidas hacia formas no tóxicas para las plantas, a diferencia de los biotipos susceptibles de la misma especie. En la resistencia metabólica se reduce la concentración del herbicida que llega al sitio de acción, afecta a herbicidas con diferente modo de acción y es casi impredecible su respuesta (Fischer, 2008). Estos mecanismos son diversos, pero los principales involucran dos grandes grupos de isoenzimas, las citocromo P450 (P450) y las glutatión-s-transferasas (GSTs). Las P450 y GSTs son enzimas que están en abundancia en las plantas y además interfieren en diversos procesos metabólicos. Hatzios y Burgos (2004) mencionan que estas enzimas cumplen un rol importante en la defensa de las plantas frente a estreses causados por agentes bióticos y abióticos. Las P450 catalizan reacciones de oxidación mientras que las isoenzimas GSTs catalizan la

formación de conjugados entre moléculas de herbicidas, o sus metabolitos de oxidación con el tripéptido glutatión (u homoglutatión en las leguminosas).

2.3.3. Situación mundial de la resistencia a herbicidas

Luego de la década de los 90, se agudizo la dependencia de los herbicidas para el control de malezas en los países en desarrollo, que anteriormente se realizaba en gran parte a través del control mecánico. Desde entonces han aumentado en forma creciente los reportes de biotipos de malezas resistentes a herbicidas de diferentes familias (Valverde y Heap, 2009).

La probabilidad de seleccionar individuos resistentes varía en función del grupo químico del herbicida. En la actualidad, se han confirmado 417 casos de resistencia a diferentes herbicidas entre los cuales predomina la resistencia a los inhibidores de ALS (159 reportes). En referencia al glifosato, el primer caso se confirmó en Australia en el año 1996 en una población de *Lolium rigidum* (Figura No. 3).

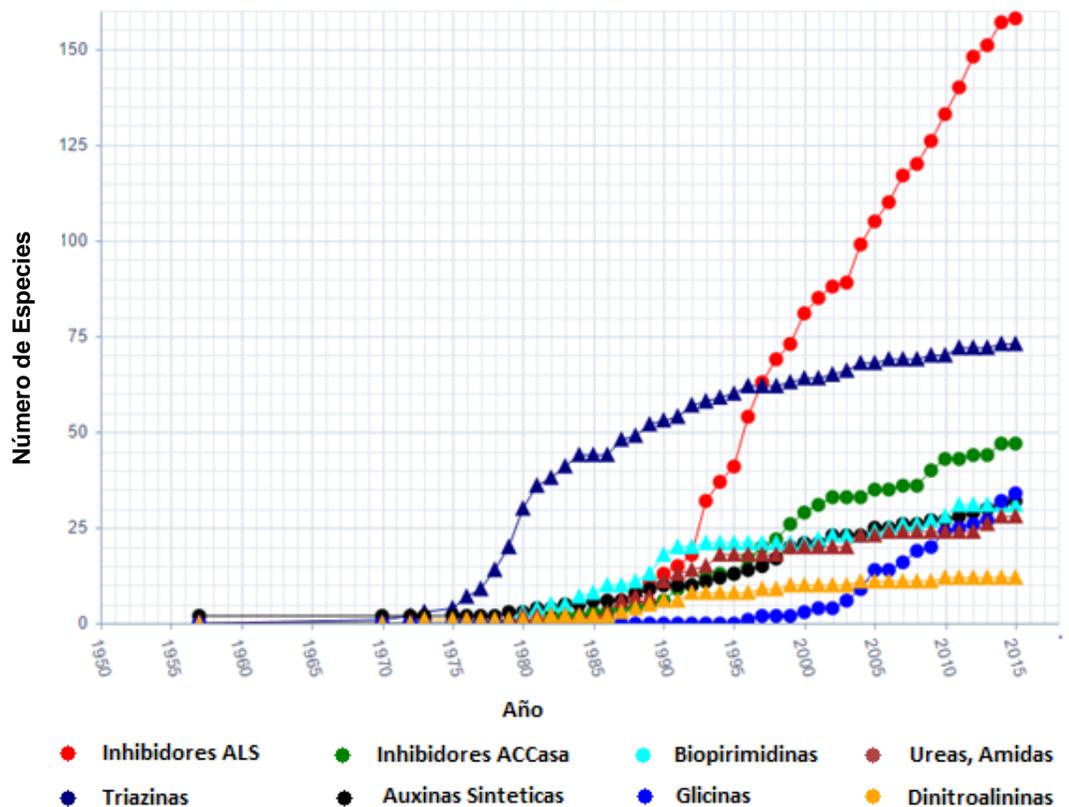


Figura No. 3. Evolución cronológica de la aparición de resistencia genética en diferentes especies de malezas a distintos grupos químicos de herbicidas. Fuente: Heap (2016)

En nuestra región, aparecen Brasil y Argentina en los puestos 8 y 23 respectivamente en el Ranking de los países con mayores casos registrados de resistencia. En Brasil se registraron 31 casos mientras que en Argentina son 11.

El primer caso de *L. Multiflorum* resistente a glifosato en Sudamérica se reportó en Chile en el año 2001 (Pérez-Jones y Kogan, 2001), luego Rizzardi et al., en Brasil y Diez de Ulzurrun et al., en Argentina, citados por Heap (2016) confirmaron el primer caso de resistencia. Actualmente en todo el mundo existen 22 reportes de casos de resistencia a glifosato en dicha especie (Heap, 2016).

2.4. *LOLIUM MULTIFLORUM* (RAIGRÁS ANUAL)

L. multiflorum fue descubierta por el francés J.B.A.P.M Lamarck en 1778 (Missouri Botanical Garden, 2016). Es una especie alógama de la familia de las gramíneas, proveniente del Centro y Sur de Europa, Noroeste de África y Suroeste de Asia. Hoy en día se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo en ambientes templados no muy fríos. Las plantas de esta especie pueden alcanzar 1.3 m de altura; poseen tallo cespitoso; vainas foliares con aurículas conspicuas hacia el ápice, lígulas de 1 a 4 mm de largo, lamina de hasta 22 cm de largo y 0.8 cm de ancho opacas y ásperas en el haz y lisas en el envés (Marzocca, 1976).

En Uruguay, *L. multiflorum* se usa principalmente como verdeo de invierno, solo o en mezcla con avena para diversificar el momento de producción de materia seca. Sin embargo, por su gran capacidad de competencia frente a otras gramíneas, su agresividad y alta producción de semilla se lo considera también una de las principales maleza de los cultivos de invierno.

Debido a que *L. multiflorum* es una especie alógama, sus individuos son predominantemente heterocigotos y sus poblaciones heterogéneas. En esta heterogeneidad se encuentra la base genética para adaptarse a las medidas de manejo propuestas y consecuentemente prosperar como una maleza muy exitosa. De esta forma, han evolucionado y se han propagado individuos con habilidad competitiva y adaptados a las medidas de manejo comúnmente usadas. El incorrecto manejo de herbicidas, principalmente la falta de rotación de los mismos es uno de los factores que ha seleccionado intensamente biotipos adaptados que logran sobrevivir las aplicaciones de ciertos herbicidas. La evolución de ciertas poblaciones naturalizadas, determinada por las medidas

de manejo propuestas, sumado probablemente al uso de semilla no certificada (que pudo haber contribuido a la dispersión de ciertos biotipos difíciles de controlar), hacen de esta especie una de las principales malezas de los sistemas agrícolas de nuestro país.

Las dificultades para controlar *L. multiflorum* previo a la siembra de los cultivos estivales generan mayores costos relacionados a la necesidad de aumentar las dosis y combinar herbicidas con distintos mecanismos de acción, así como también mayores costos relacionados a una inadecuada preparación del barbecho (i.e. prolongación del consumo de agua y nutrientes por parte de las plantas que sobreviven). Por lo tanto es importante generar información que nos permita diagnosticar el estado de situación de algunas poblaciones de *L. multiflorum* cuyo control con herbicidas se ha vuelto difícil. Y a partir de este diagnóstico avanzar en estudios que generen información que permita diseñar estrategias para mitigar los procesos de evolución de resistencia a herbicidas y por ende los perjuicios económicos que esta conlleva.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos, para los cuales se utilizaron 4 poblaciones de *L. multiflorum*. Tres de ellas fueron colectadas en campos de productores en el litoral oeste del Uruguay en situaciones donde muchas plantas sobrevivieron después de la aplicación de glifosato (R1, R2 y R3). Las semillas utilizadas para los experimentos corresponden a la progenie de plantas reproducidas en invernáculo en el 2014 que resistieron la aplicación de $2L\ ha^{-1}$ de glifosato. Las poblaciones R1 y R2 fueron colectadas cerca de la localidad de Puntas de Valdez, mientras que la población R3 fue colectada en la localidad de Colonia Valdense (Figura No. 4).

Como testigo susceptible (S) se utilizó una población de *L. multiflorum* LE 284 que fue provista por la unidad de semillas de INIA La Estanzuela. Los experimentos fueron realizados en esta estación experimental en condiciones controladas de invernadero.

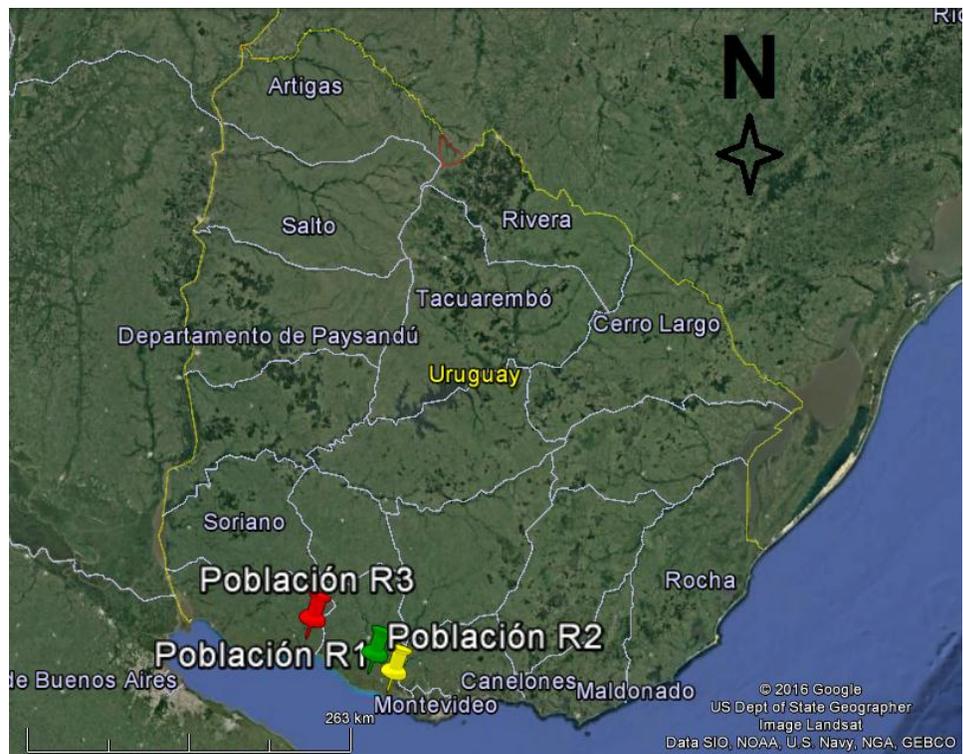


Figura No. 4. Sitios de colecta de las diferentes poblaciones de *L. multiflorum*

3.1. EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DE SUCEPTIBILIDAD DE *L. MULTIFLORUM* A GLIFOSATO

En cada maceta (1.6 L de volumen) conteniendo una mezcla de tierra, sustrato de madera y vermiculita (2:1:1 respectivamente) se sembraron ocho semillas. Luego de la emergencia se procedió a ralear las plantas para que en cada maceta se desarrollaran 4 plantas. Las macetas se mantuvieron en invernáculo a una temperatura promedio de 19/17 °C día/noche, y con agua a capacidad de campo. La fertilización nitrogenada se manejó para que este nutriente no fuera limitante.

Cuando las plantas de cada población alcanzaron en promedio 15 cm de altura (2-3 macollos promedio) se aplicaron los tratamientos herbicidas (Cuadro No. 1). Para la población R2 el estado de desarrollo descrito se alcanzó el 9/4/15, mientras que el resto de las poblaciones (R1, R3 y S) alcanzaron ese mismo estado de desarrollo el 15/4/15.

Cuadro No. 2. Dosis de glifosato aplicadas a las poblaciones de *L. multiflorum* supuestamente resistentes (R1, R2 y R3) y a la población (S) en el experimento 1.

Dosis de glifosato		
Relativa a la recomendación de etiqueta	g e.a. ha ⁻¹	Producto formulado L.ha ⁻¹
0x	0	0
1/8x	135	0.25
1/4x	270	0.5
1/2x	540	1
3/4x	810	1.5
1x	1080	2
1.5x	1620	3
2x	2160	4
4x	4320	8
8x	8640	16

A la población S no se le aplicó la dosis 8x y 1,5x mientras que a las poblaciones R1; R2; R3 no se les aplicaron la dosis 1/8x ni 3/4x, esto se debe a que se creyó conveniente que la población susceptible a glifosato reciba una dosis inferior más a la dosis de etiqueta y las poblaciones resistentes reciban una dosis superior más a la dosis de etiqueta para realizar el modelo de dosis respuesta.

La aplicación del glifosato (Round up Full II[®], 0.54 kg e.a L⁻¹ Monsanto Company, Argentina) se realizó en un ambiente cerrado con condiciones ambientales óptimas. Ambas aplicaciones se realizaron a la misma hora del día y coincidentemente con las mismas condiciones ambientales (60% HR, 22°C, y viento de 2km/hora). La aplicación se realizó con una pulverizadora manual de CO₂ de presión constante con un varal de 4 picos Teejet AI 110 02 (Teejet, Spraying System, Co.), aplicándose un volumen de caldo de 110 L ha⁻¹.

Treinta días después de la aplicación para cada población se cosecharon las plantas. Al momento de la cosecha se le adjudicó un valor de fitotoxicidad a cada planta utilizando una escala de 1 a 5 (donde 1 es planta muerta y 5 es planta viva). Esta escala se utilizó para calcular la proporción de plantas vivas en función del total. Posteriormente se cortó la parte aérea a nivel de suelo y se determinó el peso fresco de las plantas en cada maceta. Luego fueron llevadas a estufa y se mantuvieron a 60° C hasta que el peso de dos medidas consecutivas fuera constante y se registró el peso seco.

3.2. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DE SUCEPTIBILIDAD DE *L. MULTIFLORUM* A DIFERENTES INHIBIDORES DE LA ACCASA

Luego de realizado el trabajo de confirmación de resistencia a glifosato, se trabajó sobre las mismas poblaciones pero en este caso se las trató con graminicidas inhibidores de la ACCasa (haloxifop-metil y clethodim), para determinar si estas mismas poblaciones pueden ser controladas con herbicidas de este grupo. En el caso de haloxifop-metil, se utilizó el rango superior de dosis de etiqueta (i.e. dosis recomendada de campo) como 1x, 0.5 L ha⁻¹ (Verdict[®]-M, 0.108 Kg. i.a L, Dow AgroSciences[™], 2015). El mismo criterio fue utilizado para clethodim en el cual la dosis 1x fue de 0,45 L ha⁻¹ (ClethoMax[®], 0.240 Kg. i.a.L, Shandong Cynda Chemical CO. LTD).

El protocolo utilizado para este experimento fue en líneas generales similar al utilizado en el experimento anterior en términos de manejo de las plantas (fertilización y riego) y de aplicación de los tratamientos (especificaciones de la pulverización). En cuanto a las condiciones ambientales la temperatura día/noche fue 17/9°C en promedio. La aplicación se realizó con condiciones óptimas de aplicación (Temp 6°, HR 85% y viento 3 km/hora)

Cuando las plantas de cada población alcanzaron en promedio 15 cm (3 hojas verdaderas hasta macollaje según etiqueta), se aplicaron los tratamientos herbicidas. El peso fresco y el peso seco se calcularon de la misma forma que en el experimento 1.

Cuadro No. 3. Dosis de haloxifop-metil utilizadas en las 4 poblaciones evaluadas en el experimento anterior (R1, R2, R3 y S)

Dosis de haloxifop-metil		
Relativa a la recomendación de etiqueta	g.i.a.ha-1	Producto formulado l.ha ⁻¹
0X	0	0
1/8X	6.75	0.0625
1/4X	13.5	0.125
1/2X	27	0.25
1X	54	0.5
2X	108	1

Cuadro No. 4. Dosis de clethodim utilizadas en las 4 poblaciones evaluadas en el experimento anterior (R1, R2, R3 y S)

Dosis de clethodim		
Relativa a la recomendación de etiqueta	g.i.a.ha-1	Producto formulado l.ha ⁻¹
0X	0	0
1/8X	13.5	0.05625
1/4X	27	0.1125
1/2X	54	0.225
1X	108	0.45
2X	216	0.9

El experimento fue replicado dos veces para cada graminicida con 4 repeticiones por tratamiento.

3.3.ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.3.1. Experimento 1

Para glifosato el experimento se repitió 2 veces con 3 repeticiones por tratamiento (8 tratamientos). No hubo interacción entre las repeticiones de

cada experimento, por lo tanto los datos de ambas replicaciones del experimento fueron analizados conjuntamente.

Los datos recabados fueron analizados estadísticamente con el programa R (del programa R Development Core Team, versión 3.2.4 del año 2015), utilizando el paquete “drc” para el análisis de regresión de las curvas de dosis-respuesta para cada población. Se ajustaron con un modelo de regresión logística no lineal “Cedergreen-Ritz-Streibig” (CRS5.a) (Ritz y Streibig, 2005). Este modelo permitió estimar el valor de dosis de glifosato con la cual se disminuye un 50% el crecimiento (GR_{50}) para cada población y comparar dichos parámetros entre poblaciones. Dicho modelo fue seleccionado luego del análisis visual de ajuste de los datos y de una prueba no significativa de falta de ajuste ($p = 0.0744$). La notación del modelo utilizado es la siguiente:

$$Y = c + \frac{d - c + f \exp(-1/x)}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))} \quad [1]$$

Donde Y es el peso seco promedio por maceta, c es el límite inferior, d es el límite superior, x es la dosis de glifosato, b y e son dos parámetros que no tienen interpretación directa y f describe el tamaño del efecto de hormesis que para los datos presentados fue casi despreciable. También se calculó el valor de la dosis que provoca el 50% de la mortalidad de las plantas (DL_{50}) utilizando un modelo log logístico de dos parámetros (LL.2) en donde Y es la proporción de plantas vivas en relación al total y x es la dosis de glifosato, esta ecuación se ajusta a los datos y se fija el nivel inferior en 0 y el superior en 1 (Ritz y Streibig, 2005) [2]. El modelo utilizado es descripto a continuación:

$$Y = \frac{1}{[1 + (\frac{x}{LD_{50}})^b]} \quad [2]$$

Los niveles de resistencia expresados en cada población fueron comparados a través del cálculo de índices de resistencia (IR). Para el cálculo de los IR, los valores de GR_{50} y DL_{50} de las poblaciones R fueron divididos por los valores de GR_{50} y DL_{50} de la población S.

3.3.2. Experimento 2

Para haloxifop-metil y clethodim se realizaron 2 experimentos de 6 tratamientos con 4 repeticiones cada uno. El análisis de los datos fue realizado utilizando el programa Sigma Plot ® (versión 11.0, de Systat Software 2015). Los datos para este experimento ajustaron a una ecuación exponencial decreciente. La notación del modelo utilizado es la siguiente:

$$Y = a \exp(-b * x) \quad [3]$$

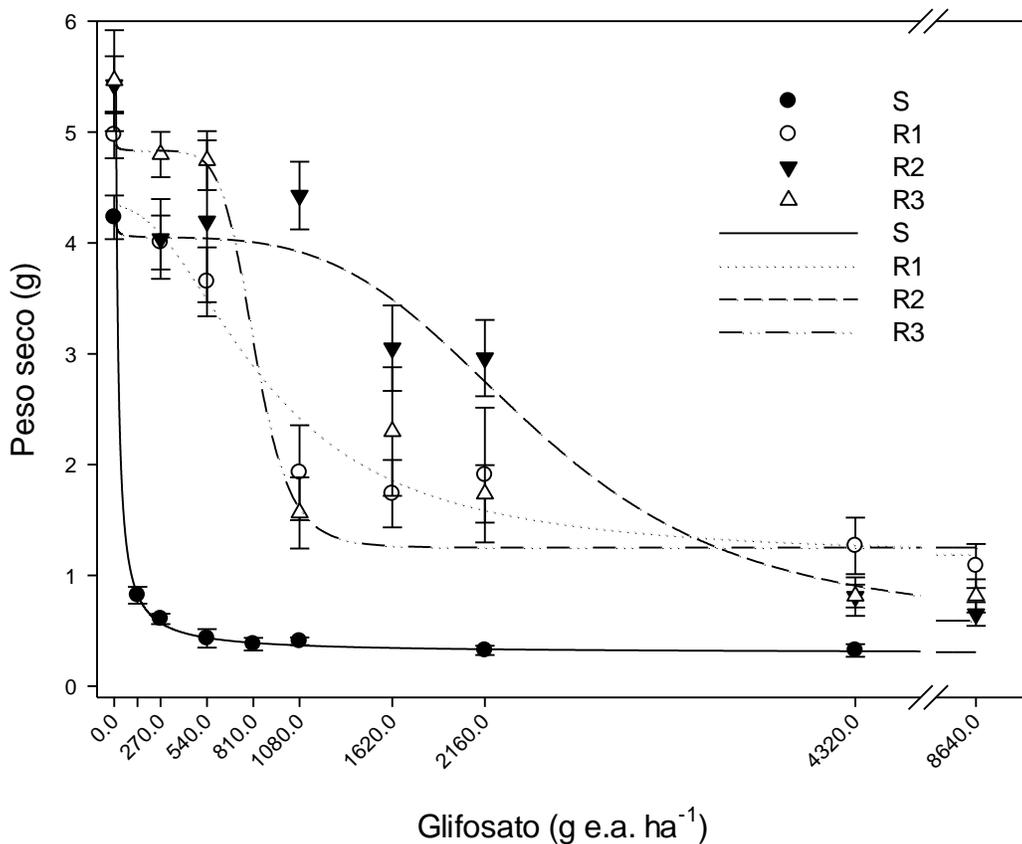
Donde Y es el peso seco promedio por maceta, a es el peso del tratamiento sin herbicida, b la tasa de disminución del peso y x es la dosis de graminicida. Para cada población se construyó una función con su correspondiente intervalo de confianza ($\alpha = 0.05$), y estos intervalos de confianza se utilizaron para determinar diferencias entre poblaciones en su respuesta a las dosis crecientes de los graminicidas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXPERIMENTO 1

Los experimentos de dosis respuesta realizados en invernadero confirmaron la resistencia, de las tres poblaciones colectadas (R1, R2, R3) en el litoral sur oeste del Uruguay, al herbicida glifosato. Las poblaciones supuestamente resistentes necesitaron claramente una mayor dosis de glifosato para ser controladas en comparación al testigo susceptible (S).

La dosis necesaria de glifosato para disminuir el crecimiento de las poblaciones R1, R2 y R3 en un 50% (GR_{50}) fue de 721.4, 1992.9 y 781.8 g e.a. ha^{-1} respectivamente. Sin embargo para la población S el valor estimado de GR_{50} fue de 32.9 g e.a. ha^{-1} . La dosis de 0.13 kg ha^{-1} , equivalente a 1/8 de las dosis de etiqueta recomendada para el control de *L. multiflorum* en Uruguay (1.08 Kg ha^{-1}), redujo un 82% el crecimiento de las plantas S, en comparación al testigo sin aplicación, mientras que no se afectó el crecimiento de las poblaciones resistentes. Al aplicarse la dosis de etiqueta, se redujo en un 91.4% el peso seco (PS) de las plantas de la población susceptible, mientras que la reducción de PS de las plantas en las poblaciones resistentes fue de 55.6% ,18.9% Y 71.3% para R1, R2 y R3 respectivamente (Figura No. 5).



Los símbolos y las barras representan las medias de los tratamientos \pm el error estándar de la media ($n = 6$), respectivamente. Las líneas representan el crecimiento predicho de acuerdo a la ecuación [1].

Figura No. 5. Curvas de dosis-respuesta a glifosato para el peso seco aéreo de 3 poblaciones de *L. multiflorum* supuestamente resistentes a este herbicida (R1, R2 y R3) y una población susceptible (S).

El análisis de los experimentos de dosis-respuesta indicó que las diferencias en la respuesta a glifosato entre las poblaciones resistentes (R) y la S no solo se manifestaban en el crecimiento de las plantas sino también en la sobrevivencia de las mismas. La dosis necesaria para matar el 50% de las plantas (DL_{50}) en la población S fue $149.3 \text{ g e.a. ha}^{-1}$, mientras que para las poblaciones R1, R2 y R3 se requirieron 3061.6 , 4312.2 y $3099.4 \text{ g e.a. ha}^{-1}$, respectivamente. La población S fue controlada en más de un 95% con dosis de 270 e.a ha^{-1} , esta misma dosis no logró llegar a un 80% de mortalidad en las poblaciones R.

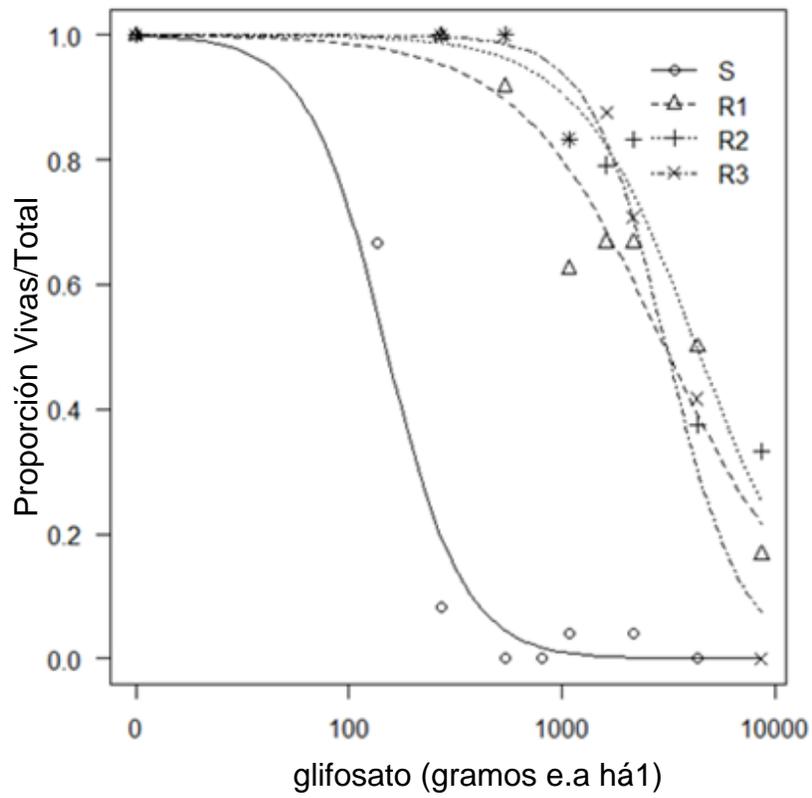
Los niveles de resistencia entre poblaciones se determinaron a través de la comparación de sus índices de resistencia (IR). Los IR calculados en base a las GR₅₀ indican que se necesita 22, 61 y 24 veces más glifosato para inhibir el crecimiento a la mitad de las poblaciones R1, R2 y R3, respectivamente, en comparación con la población S. Del mismo modo, los niveles de IR calculados en base a las DL₅₀ indican que las poblaciones R1, R2 y R3 son 20, 29 y 21 veces más resistentes en comparación a la población S.

Cuadro No. 5. Parámetros estimados por el modelo usado para calcular las dosis de glifosato necesarias para reducir el peso seco al 50% en plantas de poblaciones supuestamente R y una población S de *L. multiflorum*.

Población	Parámetro	Estimado	IC 95%	IR
		g e.a ha		
Susceptible	C	0.3		
	D	4.2		
	GR50	32.9	18.8 - 84.5	
R1	C	1.2		
	D	5.0		
	GR50	721.4	449.9 - 992.9	22
R2	C	0.6		
	D	5.5		
	GR50	1992.9	1571.2 - 413.2	61
R3	C	1.2		
	D	5.4		
	GR50	781.8	520.9 - 1042.7	24

Abreviaciones: c, es el límite inferior; d, es el límite superior; GR₅₀, es la dosis necesaria para disminuir el crecimiento un 50% y está calculado en peso seco de biomasa; IC 95%, es el intervalo con 95% de confianza; IR, es el índice de resistencia.

Por otra parte cuando se comparan entre si los valores de GR₅₀ de las poblaciones R, los datos indican que la población R2 tiene un mayor nivel de resistencia en comparación a R1 y R3 (2,8 y 2.5 veces más resistente respectivamente), mientras que entre las poblaciones R1 y R3 el índice de resistencia es 1.08 lo que indica que el nivel de resistencia entre estas poblaciones es muy similar.



Los símbolos representan las medias de los tratamientos (n = 6). Las líneas representan la disminución del crecimiento predicho de acuerdo a la ecuación [2].

Figura No. 6. Curva de dosis respuesta a diferentes dosis de glifosato, medida como proporción de plantas Vivas en relación al Total de plantas evaluadas de *L. multiflorum*.

Cuadro No. 6. Valores de dosis estimadas por el modelo para controlar el 50% de las plantas de 3 poblaciones supuestamente R y una población S de *L. multiflorum*.

SUPERVIVENCIA				
Población	Parámetros	Estimado	IC 95%	IR
		Gramos e.a ha		
Susceptible	DL ₅₀	149.3	105.8 , 192.7	
R1	DL ₅₀	3061.6	2083.5 , 4039.6	20
R2	DL ₅₀	4312.2	3013.7 , 5610.7	29
R3	DL ₅₀	3099.4	2476.7 , 3722.1	21

Abreviaciones: DL₅₀, es la dosis necesaria para controlar un 50% de la población; IC 95%, es el intervalo con 95% de confianza; IR, es el índice de resistencia.

Los resultados obtenidos, confirman la hipótesis sobre la existencia de poblaciones de *L. multiflorum* resistentes a glifosato, siendo este el primer caso reportado para Uruguay. El primer caso de resistencia a glifosato fue reportado por Pratley et al. (1996) en poblaciones de *L. perenne* en Australia. Por otra parte también existen reportes en la región, como por ejemplo, los publicados por Pérez-Jones y Kogan (2001), quienes reportan la aparición de *L. multiflorum* resistente en Chile, siendo este caso el primero en América de Sur. Luego, Diez De Ulzurrun et al., citados por Heap (2016) reportaron el primer caso de resistencia a glifosato de esta especie en Argentina.

Por otra parte el nivel de resistencia medido como IR, superó ampliamente los reportados por Diez De Ulzurrun y Leadan (2012) quienes informan niveles entre 3-5, mientras que Pérez-Jones y Kee-Woong (2007) muestran valores de IR 5 veces mayor al testigo S. Sin embargo, al igual que los encontrados en este trabajo, existen reportes con IR mayores, como es el caso reportado por Yu et al. (2007), quienes encontraron valores de resistencia 14 veces más altos en la población catalogada como R en relación a la S.

Los valores de IR medido como supervivencia de R1 (20) y R3 (21) son muy similares a los valores de IR medido en función del peso seco. Sin embargo, en el caso de la población R2, los valores de IR difieren claramente según el cálculo se haya realizado sobre la mortalidad o la acumulación de biomasa. Esta diferencia pudo deberse a que luego de la aplicación, las poblaciones R1 y R3 tuvieron una mayor disminución del crecimiento (i.e.

fueron más susceptibles al herbicida) en comparación con R2, lo que determinó que la tasa de crecimiento de las plantas en la población R2 fuera menos afectada. Esta diferencia en sensibilidad al herbicida podría estar indicando diferencias en los mecanismos de resistencia expresados en las distintas poblaciones.

Este experimento confirmó los altos niveles de selección por resistencia a glifosato que han sufrido algunas poblaciones de *L. multiflorum* en nuestro país. Incluso podríamos especular que los datos presentados son conservadores ya que, observaciones realizadas posteriormente a la toma de datos indicaría mayores niveles de sobrevivencia. Luego de cosechadas las plantas, los tratamientos que recibieron 4 y 8 veces las dosis de etiqueta, fueron dejados en invernáculo, y algunas de las plantas que visualmente parecían muertas (completamente necróticas) rebrotaron. Este comportamiento ha sido denominado por algunos autores como “resistencia fenix” (Gressel, 2009, Figura No. 8).



Figura No. 7. Respuesta a las diferentes dosis de glifosato de las poblaciones S y R de *L. multiflorum* utilizadas en los experimentos



Figura No. 8. Rebrote de los tratamientos con dosis de 4320 y 8640 g e.a ha⁻¹

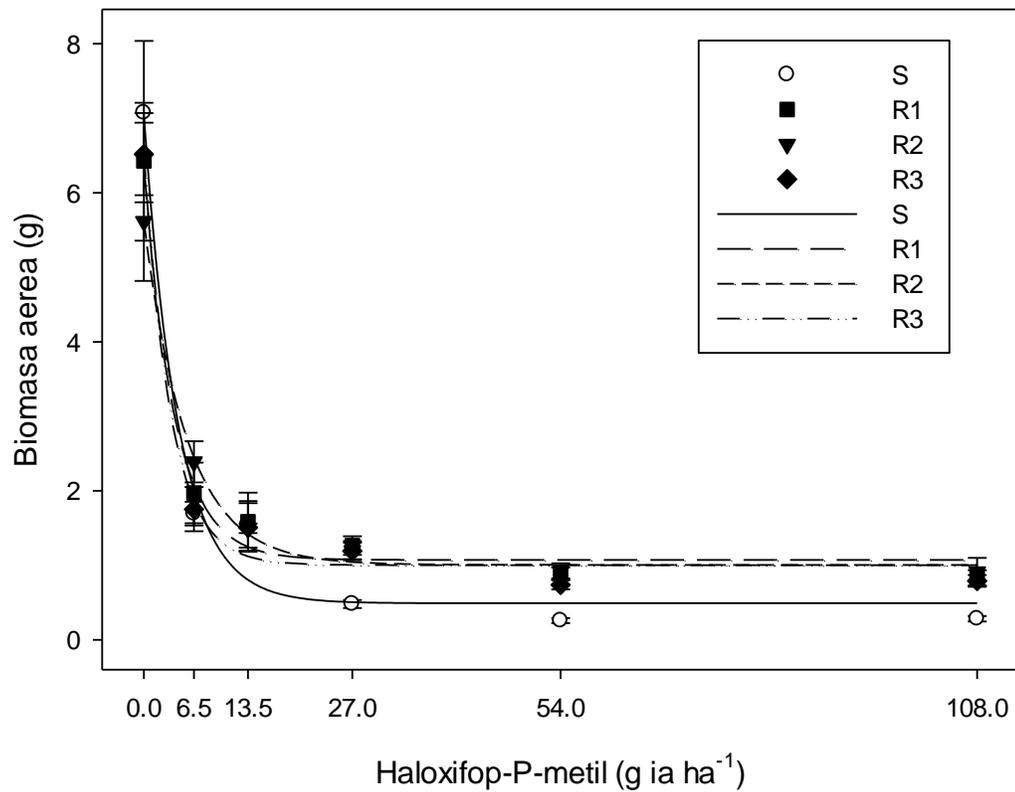
4.2. EXPERIMENTO 2

El experimento 2 consistió en un ensayo de dosis respuesta a diferentes dosis de haloxifop-metil y clethodim para determinar si hubiera una respuesta diferente de las poblaciones R y S a estos graminicidas lo cual, de confirmarse, podría significar que la eficacia de estas herramientas podría estar comprometida.

Los resultados obtenidos fueron muy consistentes, y en general confirmaron que las poblaciones de *L. multiflorum* testeadas aún son susceptibles a estos graminicidas.

La dosis de haloxifop-metil de 27 g i.a. ha⁻¹, equivalente ½ de la dosis recomendada de etiqueta para el control de *L. multiflorum* (54 g i.a ha⁻¹), produjo una importante reducción de crecimiento en todas las poblaciones. A esta dosis el crecimiento se redujo en 88%, 78%, 88% y 82% para las poblaciones S, R1, R2 y R3, respectivamente, en comparación al tratamiento sin aplicación de herbicida (Figura No.9).

La dosis necesaria para disminuir el crecimiento un 50% (GR₅₀) fue similar para todas las poblaciones. Sin embargo se detectó una leve menor susceptibilidad a este herbicida de la población R2 con respecto a S (Cuadro No. 7).



Los puntos representan los promedios de cada tratamiento +/- el error estándar (n=4). Las líneas representan el crecimiento como PS predicho por la ecuación [3].

Figura No. 9. Curva de dosis respuesta de 4 poblaciones de *L. multiflorum* a diferentes dosis de haloxifop-metil.

Cuadro No. 7. Valores de dosis de haloxifop-metil- metil necesaria para disminuir el crecimiento en un 50% (GR₅₀), y los respectivos intervalos de confianza al 95% para 4 poblaciones de *L. multiflorum*.

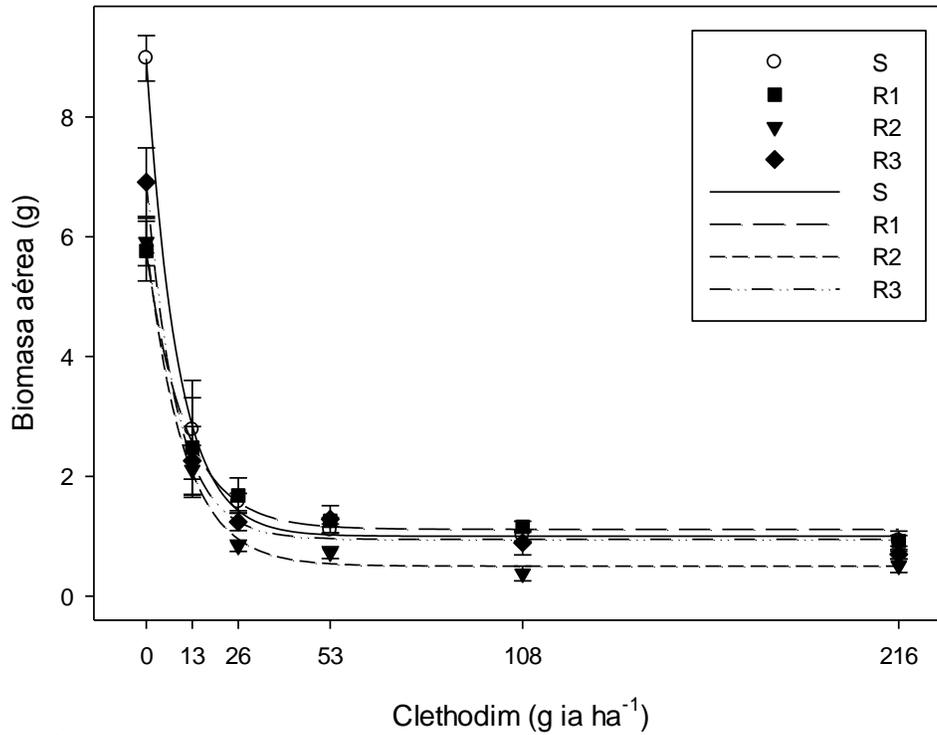
Población	GR50	IC95%
		g i.a. ha ⁻¹
S	3.194	2.566 – 4.015
R1	2.88	2.06 – 3.94
R2	4.015	3.243 – 4.88
R3	2.615	1.673 – 3.822

Abreviaciones: donde GR₅₀ es la dosis necesaria para disminuir el crecimiento en un 50% e IC 95% son los valores del intervalo con 95% de confianza.

La dosis de campo utilizada en este experimento, logró disminuir el crecimiento de las poblaciones S, R1, R2 y R3 en 96.3%, 86%, 84% y 89% respectivamente. Cuando se evalúan los resultados obtenidos utilizando dos veces la dosis recomendado, los porcentajes de mortalidad fueron similares, próximos al 90% en comparación a los testigos sin aplicación.

Similarmente a los resultados obtenidos para haloxifop-metil, el ensayo de dosis-respuesta utilizando clethodim indicó que no existen diferencias en susceptibilidad entre estas poblaciones para este herbicida.

Todas las poblaciones redujeron drásticamente su crecimiento a dosis tan bajas como 54 g i.a. há⁻¹, lo que equivale a la mitad de la dosis recomendada de etiqueta (108 g i.a. ha⁻¹). A esta dosis las poblaciones S, R1, R2 y R3 redujeron su crecimiento en 88%, 79%, 88% y 81%, respectivamente, en comparación con el tratamiento sin aplicación.



Los símbolos representan los promedios de cada tratamiento y las barras +/- el error estándar (n=4). Las líneas representan el crecimiento en PS predicho por el modelo [3].

Figura No. 10. Curva de dosis respuesta de 4 poblaciones de *L. multiflorum* a diferentes dosis de clethodim.

Cuadro No. 8. Valores de dosis de clethodim necesaria para disminuir el crecimiento en un 50% (ED_{50}), y los respectivos intervalos de confianza al 95% para 4 poblaciones de *L. multiflorum*.

Población	GR ₅₀	IC 95%
	gramos i.a há ⁻¹	
S	6.31	4.765 – 8.25
R1	8.25	5.263 - 12.78
R2	7.354	5.811 – 9.296
R3	6.458	4.516 – 9.196

Abreviaciones: donde GR50 es la dosis necesaria para disminuir el crecimiento en un 50% e IC 95% son los valores del intervalo con 95% de confianza.

Los valores de GR₅₀ para este experimento fueron aproximadamente iguales, aunque se puede decir que existe una leve menor susceptibilidad de la población R1 con respecto a la población S.

Al igual que en el experimento anterior, los datos indican que, cuando se utiliza la dosis de etiqueta (0.108 kg e.a ha⁻¹), la reducción en crecimiento medido como PS equivale a 89%, 80%, 94% y 87% para las poblaciones S, R1, R2 y R3 respectivamente.

Como indican los resultados, existe una alta susceptibilidad de estas poblaciones a tratamientos con inhibidores de la ACCasa, ya que, aún en dosis bajas se logró una disminución importante en el crecimiento en ambos experimentos. Estas herramientas deben ser utilizadas con responsabilidad debido a que, según Espinoza y Rodríguez (2013) la probabilidad de estos biotipos de generar resistencia a estos herbicidas es 1 en 100.000, esto se debe a que es muy específico el sitio de acción y pocas mutaciones pueden cambiar la respuesta a estos herbicidas.

Los resultados de ambos experimentos (haloxifop-metil y clethodim), indican que las poblaciones que, en este caso se comportaron como resistentes a glifosato, aun son susceptibles a estos graminicidas. Por lo tanto, estos herbicidas aún son una opción viable para controlar estas poblaciones resistentes a glifosato. Sin embargo, de no tomarse medidas para preservar la vida útil de los graminicidas, seguramente dejen de ser una opción como ya ha pasado en la región. Espinoza en Chile y Dirceu et al., en Brasil, citados por Heap (2016), reportan poblaciones de *L. multiflorum* con resistencia múltiple a glifosato e inhibidores de ACCasa.

Por otra parte, para evitar este tipo de problemas, pueden utilizarse estrategias como, la inclusión de principios activos conformando mezclas que aumente el espectro de control (Vigna et al., 2008), el control mecánico de malezas o el uso de la estrategia "doble golpe" (Fernández et al., 2013). Por otra parte, Vigna et al. (2008), dicen que existe un buen control de *L. multiflorum* cuando se utiliza los herbicidas haloxifop-metil o clethodim en mezcla con 500 gr e.a. ha⁻¹ de glifosato.

5. CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo realizado confirman la existencia de poblaciones resistentes a glifosato en el litoral sur oeste del Uruguay, siendo estos casos los primeros confirmados experimentalmente en nuestro país. También cabe destacar que dentro de las poblaciones evaluadas existieron diferentes niveles de resistencia, por lo que los datos sugieren que podrían estar interviniendo diferentes mecanismos de resistencia a glifosato. Si bien no se investigaron los mecanismos de resistencia, determinarlos, podría ser el próximo paso en futuros trabajos, para intentar asociar diferentes niveles de resistencia a diferentes mecanismos.

En ambos experimentos con graminicidas, las poblaciones R tuvieron la misma susceptibilidad a los herbicidas clethodim y haloxifop-metil que la población S, lo cual indica que estas herramientas herbicidas aún son efectivas para el control. Sin embargo, hay que destacar que el hecho de que ya hayan sido seleccionadas por resistencia a glifosato nos urge a tomar medidas para evitar que se seleccione también la resistencia a otros mecanismos de acción (resistencia múltiple).

El glifosato es la herramienta de control químico más utilizada en el país, por lo que la aparición de poblaciones resistentes es alarmante y nos obliga a todos a la planificación estratégica de las aplicaciones y a poner en práctica un verdadero manejo integrado de malezas. Existen diferentes alternativas que deberían combinarse para lograr un adecuado manejo de malezas. Algunas de estas alternativas incluyen: la rotación de modos de acción, el control mecánico, evitar la subdosificación (i.e. aplicaciones en etapas fisiológicas avanzadas, deriva, utilización de coadyuvantes, considerar problemas de calidad agua, etc.), manejos culturales y de maquinaria, entre otros. De esta manera estaríamos contribuyendo a un uso más racional de los herbicidas en general.

Si bien aún queda mucho para investigar acerca de estas poblaciones, estos resultados deberían ser importantes para sensibilizar y concientizar a los actores de los sistemas agropecuarios en cuanto al impacto potencial que tendría en la producción el perder estas herramientas.

Estudiar los mecanismos de resistencia u otras características que nos permitan comprender como es el proceso de evolución y dispersión de la resistencia, serían insumos importantes para elaborar estrategias que mitiguen los problemas de malezas resistentes.

6. RESUMEN

El raigrás anual (*Lolium multiflorum*) es una especie alógama, espontánea y es una maleza muy frecuente en barbechos de cultivos invernales, el cual últimamente se ha vuelto un problema debido al aumento de biotipos sobrevivientes luego de la aplicación de la dosis recomendada. Este aumento puede deberse: a) al aumento en la intensidad agrícola que ha sufrido el Uruguay en los últimos 15 años, acompañado del alto porcentaje de cultivos RR (Roundup Ready) que se siembran, y por ende un aumento en la frecuencia de aplicación de glifosato, b) por el uso en momentos inapropiados (tempranos o tardíos), c) la calidad de la aplicación y d) la aplicación de subdosis. El glifosato es un herbicida post emergente de amplio espectro que ingresa a la planta por medio del follaje, lo cual nos indica que la dosis aplicada y el momento de aplicación, son factores muy importantes en la determinación de la efectividad del tratamiento. Este trabajo intenta cuantificar el grado de resistencia a la aplicación de 8 diferentes dosis de glifosato (6 repeticiones por tratamiento). Se utilizaron tres poblaciones de *L. multiflorum* espontaneas colectadas en el litoral oeste del Uruguay y como testigo la variedad comercial LE 284. Las plantas fueron sembradas en macetas, bajo condiciones controladas de invernáculo, y la aplicación se realizó cuando las plantas se encontraban entre 1 y 2 macollos. La forma de cuantificar dicha resistencia es mediante el PS y supervivencia medido a los 30 días pos-aplicación. Cuando estas poblaciones fueron aplicadas con la dosis de etiqueta, la población S redujo un 91.4% su crecimiento medido en PS mientras que la reducción de PS de las plantas en las poblaciones resistentes fue de 55.6% ,18.9% y 71.3% para R1, R2 y R3 respectivamente. El valor de GR_{50} para la población S fue de 149.3 g e.a ha⁻¹ y para las poblaciones R1, R2 y R3 resulto 3061.6, 4312.2 y 3099.4 g e.a ha⁻¹ respectivamente, arrojando un valor de IR de 21, 61 y 24 en relación a la población S. Por otra parte y siguiendo el mismo protocolo que el experimento anterior se cuantifico la respuesta de estas poblaciones a 6 diferentes dosis de clethodim y haloxifop-metil (4 repeticiones por tratamiento). La aplicación de 27 g i.a.ha-1 equivalente a la mitad de la dosis de etiqueta de haloxifop-metil (54 g i.a. ha-1) redujo un 88%, 78%, 88% y 82% el crecimiento para las poblaciones S, R1, R2 y R3 respectivamente, mientras que 54 g i.a. ha-1 equivalente a ½ de la dosis de etiqueta de clethodim (108 g i.a. ha-1) logró reducciones en las poblaciones S, R1, R2 y R3 de en 88%, 79%, 88% y 81% respectivamente. Estos resultados confirman el primer caso de resistencia de una especie al herbicida glifosato en el Uruguay, sin embargo indican que estas poblaciones son susceptibles a los gramínicidas utilizados, lo que nos obliga a cuidar estas herramientas de control químico utilizándola de forma responsable y estratégica.

Palabras clave: Resistencia; Glifosato; Raigrás; Inhibidor de Accasa;
Dosis respuesta.

7. SUMMARY

The annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) is a cross pollinated, spontaneous species and is a common weed in winter fallow crops, which lately has become a problem due to increased biotypes survivors after application of the recommended dose. This increase may be due to: a) increase in agricultural intensity that has suffered Uruguay in the last 15 years, accompanied by the high percentage of RR crops (Roundup Ready) that are sown, and therefore an increase in the frequency of application glyphosate, b) for use at inappropriate times (early or late), c) the quality of the application and d) the application of sub-doses. Glyphosate is a post emergent broad-spectrum herbicide that enters the plant through the foliage, which indicates that the dose applied and the time of application, they are very important in determining the effectiveness of treatment factors. This paper attempts to quantify the degree of resistance to the implementation of 8 different doses of glyphosate (6 replicates per treatment). It used three populations of *L. multiflorum* collected on the west coast of Uruguay and witness the commercial variety LE 284. The plants were grown in pots under controlled greenhouse conditions, and the application was made when the plants were between 1 and 2 tillers. How to quantify this resistance is measured by PS and 30 days post-application survival. When these populations were applied dose label, the population S decreased by 91.4% its measured in DW growth while reducing DW plant in resistant populations was 55.6%, 18.9% and 71.3% for R1, R2 and R3 respectively. The value of GR50 for the population S was 149.3 g ae ha⁻¹ and R1, R2 and R3 populations resulted 3061.6, 4312.2 and 3099.4 g e.a ha⁻¹ respectively, yielding a value of IR 21, 61 and 24 regarding the population S. Moreover and following the same protocol as the previous experiment the response of these populations to 6 different doses of clethodim and haloxyfop (4 replicates per treatment) were quantified. Applying 27g iaha⁻¹ equivalent to half the haloxyfop dose field (54 g a.i ha⁻¹) decreased by 88%, 78%, 88% and 82% growth for populations S, R1, R2 and R3 respectively, while 54 g a.i ha⁻¹ equivalent to ½ clethodim dose filed (108 g a.i. ha⁻¹) achieved reductions in S, R1, R2 and R3 populations in 88%, 79%, 88% and 81% respectively. These results confirm the first case of resistance to the herbicide glyphosate kind in Uruguay, however they indicate that these populations are susceptible to graminicides used, forcing us to take care of these chemical control tools using it responsibly and strategically.

Keywords: Resistance; Glyphosate; Ryegrass; Accasa inhibitors; Dose response.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bozzo de Brum, M. 2010. Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo. Tesis Maestría en Ciencias Ambientales. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 109 p.
2. Brezeanu, A. G.; Davies, D. G.; Shimabukuro, R.H. 1976. Ultrastructural effects and translocation of methyl-2-(4-(2,4-dichlorophenoxy) phenoxy propanoate in wheat (*Triticum aestivum*) and wild oat (*Avena fatua*). *Can. J. Bot.* 54:2038-2048.
3. Cerderia, A. ; Duke, S. 2006. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops; a review. *J. Environ. Qual.* 35:1633–1658.
4. Clavijo, J. 2010. Acción de los herbicidas en un arrozal; modo y mecanismo. Producción eco eficiente de arroz en América Latina. *In: Deggiovani, B. V.; Martinez, C. V.; Motta, F. eds. Producción eco eficiente de arroz en América Latina. Cali, Colombia, CIAT/FLAR/ UNICORDOBA. pp. 431 – 446.*
5. Dabála, F. 2009. Guía siembra directa. Montevideo, Uruguay, AUSID/MGAP. 43 p.
6. De Prado, J. L.; Cruz-Hipólito, H.; De Prado, R. 2009. Mecanismos de resistencia de malezas a los herbicidas. Córdoba, España, Universidad de Córdoba. 19 p.
7. Delye, C.; Jasieniuk, M.; Le Corre, V. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *TIG.* 29:649-658.
8. Devine, M. D. 1997. Mechanisms of resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors; a review. *Pest. Manag. Sci.* 51(3): 259-264.
9. Dewey, S. A.; Appleby, A. P. 1983. A Comparison between glyphosate and assimilate translocation patterns in tall morningglory (*Ipomoea purpurea*). *Weed Sci.* 31:308-314.

10. Dike, R. E ; Quinn, J. P. 1995. Glyphosate degrading isolates from environmental samples occurrence and pathways of degradation. *Appl. Microb. and Biotec.* 3:545-550.
11. Diez de Ulzurrun, P.; Leadan, M. I. 2012. Sensitivity analysis of *Lolium multiflorum* biotypes to glyphosate, ACCase and ALS-Inhibiting Herbicides. *Planta Daninha.* 30(3): 667-673.
12. Donald, W. W.; Shimnabukuro. R. H. 1980. Selectivity of diclofop-methyl between wheat and wild oat; growth and herbicide metabolism. *Physiol. Plant.* 49:459-464.
13. Duke, S.; Baerson, S.; Rimando, A. M. 2003. Herbicides; glyphosate. (en línea). *In:* Plimmer, J. R.; Ragsdale, N. N.; Gammon, D. eds. *Encyclopedia of agrochemicals.* New York, Wiley. s.p. Consultado 14 jun. 2016. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/>
14. _____. ; Powles, S. 2008. Glyphosate; a once-in-a-century herbicide. *Pest. Manag. Sci.* 64: 319-325.
15. _____. 2011. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and – susceptible crops and weeds. *J. Agric. Food. Chem.* 59: 5835–5841.
16. Ernst, O.; Siri-Prieto, G. 2011. La agricultura en Uruguay; su trayectoria y consecuencias. *In:* Simposio Nacional de Agricultura (2º., 2011, Paysandú, Uruguay). No se llega, si no se sabe a dónde ir. El abordaje necesario para que el proceso de expansión agrícola madure en Uruguay. Montevideo, Hemisferio sur. pp. 149 – 163.
17. Espinoza, N.; Rodríguez, C. 2013 Evolución de la resistencia de ballica (*Lolium multiflorum*) a glifosato y estrategias para su control en el sur de Chile. *In:* Seminario Internacional Viabilidad del Glifosato en Sistemas Productivos Sustentables (2º., 2013, Colonia). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 119-130 (Serie Técnica no. 204).
18. Ferguson, F. 1987. Long term effects of systemic pesticides on honey bees. *ABK Journ.* 89:49-54.
19. Fernández, G.; Villalba, J.; Scaglia, L. 2013. El manejo de herbicidas y la problemática actual de malezas. *In:* Simposio Nacional de Agricultura (3º., 2013, Paysandú, Uruguay). No se llega, si no se sabe a dónde ir. Pensar en las causas y no sólo medir las consecuencias. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 125-133.

20. Fisher, A. J. 2008. Mecanismos de resistencia; las bases para definir estrategias. In: Seminario Internacional Viabilidad del Glifosato en Sistemas Productivos Sustentables (1º, 2008, Colonia). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 27–41 (Actividades de Difusión no. 554).
21. _____.; Valverde, B. V. 2010. Resistencia a herbicidas en malezas asociadas con arroz. In: Deggiovani, B. V.; Martinez, C. V.; Motta, F. eds. Producción eco eficiente de arroz en América Latina. Cali, Colombia, CIAT/FLAR/UNICORDOBA. pp. 447-487.
22. Forouzesh, A.; Zand, E.; Soufizadeh, S.; Foroushani, S. 2015. Classification of herbicides according to chemical family for weed resistance management strategies – an update. *Weed Res.* 55: 334-358.
23. Franz, J. E.; Mao, M.; Sikorski, J. 1997. Glyphosate; a unique and global herbicide. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 654-668.
24. Gaines, T. A.; Zhang, W.; Wang, D.; Bukun, B.; Chisholm, S. T.; Shaner, D. L.; Nissen, S. J.; Patzoldt, W. L.; Tranel, P. J.; Stanley Culpepper, A.; Grey, T. L.; Webster, T. M.; Vencill, W. K.; Sammons, R. D.; Jiang, J.; Preston, C.; Leach, J. C.; Westra, P. 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(3): 1029-1034.
25. Glass, R. 1987. Adsorption of glyphosate by soils and clay mineral *JAFCA*. 35: 497-500.
26. Gressel, J. 2009. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest. Manag. Sci.* 65: 1164-1173.
28. Gronwald, J. W. 1991. Lipid biosynthesis inhibitors. *Weed Sci.* 39: 435-449.
29. Hance, R. 1976. Adsorption of glyphosate by soils. *Pest. Sci.* 7: 363-366.
30. Hall, J. C.; Wickenden, J. S.; Kyf, Y. 2001. Biochemical conjugation of pesticides in plants and microorganisms; an overview of similarities and divergences. In: Hall, J. C.; Hoagland, R. E.; Zablotowic, R. M. eds. Pesticide biotransformation in plants and microorganism; similarities and divergences. Washington, D. C., ACS. pp. 89-118.

31. Hao, G. F.; Zhu, X. L.; Ji, F. Q. 2009. Understanding the mechanism of drug resistance due to a codon deletion in Protoporphyrinogen oxidase through computational modeling. *J. Phys. Chem. B.* 113: 4865-4875.
32. Hatzios, K. K.; Burgos, N. 2004 Metabolism-based herbicide resistance; regulation by safeners. *Weed Sci.* 52: 454–467.
33. Heap, I. 2016. Resistance weed by species. (en línea). s.l., International Survey of Herbicide Resistant Weeds. s.p. Consultado 22 may. 2016. Disponible en <http://www.weedscience.org/>
34. Lichtenthaler, H. K.; Meier, D. 1984. Inhibition by sethoxydim of chloroplast biogenesis, development and replication in barley seedlings. *Z. Naturforsch.* 39c:115-122.
35. Marzocca, A. 1976. Manual de malezas. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 564 p.
36. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, UY). 2015. Anuario estadístico agropecuario 2015. Montevideo. 215 p.
37. MBG (Missouri Botanical Garden). 2016. Flore Française. (en línea). St. Louis, MO. s.p. Consultado 26 jun. 2016. Disponible en <http://www.tropicos.org/NamePublicationDetail.aspx?nameid=25509742>
38. Nandula, V. K.; Reddy, K.; Rimando, A.; Duke, S.; 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.* 55:3540–3545.
39. _____, 2010. Glyphosate resistance in crops and weeds; history, development and management. Missisipi, USA, Wiley y Sons. 344 p.
40. Park, K.; Fandrich, L.; Malliory-Smith, C. A. 2004a. Absorption translocation, and metabolism of Propoxycarbazone-Sodium in ALS-inhibitor resistant *Bromus tectorum* biotipes. *Pest. Biochem. Physiol.* 79: 18-24.

41. _____.; _____.; _____. 2004b. Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotipes. *Weed Res.* 44: 71-77.
42. _____.; Malliory-Smith, C. A. 2005. Multiple herbicide resistance in downey brome (*Bromus tectorum*) and its impact on fitness. *Weed Sci.* 53: 780-786.
43. Patzoldt, W. L.; Hager, A. G.; McCormick, J. S.; Tranel, P. J. 2006. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 12329-12334.
44. Pérez – Jones, A.; Kogan, M. 2001. Resistencia de malezas a herbicidas. *Agron. Forest. UC.* 13: 3-9.
45. _____.; Kee-Woong, P. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta.* 226: 395-404.
46. Piccolo, A.; Celano, G.; Arienzo, M.; Mirabella, A. 1994. Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils. *J. Environ. Sci. Health.* 6:1105-1115.
47. Powles, S.; Yu, Q., 2010. Evolution in action; plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:317–347.
48. Pratley, I.; Baines, P.; Eberbach, P.; Incerti, M.; Broster, I. 1996. Glyphosate resistance in annual ryegrass. *In:* Annual Conference Grasslands Society of New South Wales (11th., 1996, Victoria). Proceedings. Wagga Wagga ,AU, The Grasslands Society of NSW. s.p.
49. Ríos, A.; Fernández, G.; Collares, F. 2007. Comunidades de malezas asociadas a los sistemas de siembra directa en Uruguay. *In:* Seminario de Cierre del PROYECTO INIA SA04 (2007, Las Brujas, Canelones). Uso de la biodiversidad para la evaluación del impacto de la intensificación agrícola y el diseño de agroecosistemas sustentables. Montevideo, INIA. p. 106 (Actividades de Difusión no. 674).

50. _____.; García, A.; Caulin, P.; Mailhos, V.; San Román, G. 2008. Comunidades florísticas asociadas a los sistemas de siembra directa en Uruguay. In: Seminario Internacional Viabilidad del Glifosato en Sistemas Productivos Sustentables (1º, 2008, Colonia). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 96 – 112 (Actividades de Difusión no. 554)
51. _____. 2011 El riesgo de resistencia a glifosato en Uruguay. In: Jornada de Divulgación (2011, Durazno, UY). Aportes a la zafra de cultivos de invierno. Montevideo, INIA. pp. 13-22 (Actividades de Difusión no. 646).
52. Ritz, C.; Streibig, J. C. 2005. Bioassay analysis using R. (en línea). J Stat. Soft. 12(5): p.irr. Consultado 18 may. 2016. Disponible en <https://www.jstatsoft.org/article/view/v012i05>
53. Rueppel, M. L.; Brightwell, B. B.; Schaefer, J.; Marvel, J. T. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. J. Agric. Food. Chem. 25 (3): 517–52.
54. Steinrucken, H.; Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimate acid-3-phosphate synthase. Biochim. Biophys. Res. Commun. 94:1207–1212.
55. Thompson, H. M.; Levine, S. L.; Doering, J.; Norman, S.; Manson, P.; Sutton, P.; Von Mérey, G. V. 2014. Evaluating exposure and potential effects on honey bee brood (*Apis mellifera*) develop ment using glyphosate as an example. Inter. Environ. Assess. Manag. 10(3): 463-470.
56. Tranel, P. J.; Wright, T. R. 2002. Resistance of weeds to als-inhibiting herbicides; what have we learned? Weed Sci. 50: 700-712.
57. Valverde, B. E.; Heap, I. M. 2009. El estado actual de las resistencias en el mundo. In: Seminario Internacional Diagnóstico y Manejo de la Resistencia a Herbicidas (1º., 2009, Temuco, Chile). Trabajos presentados. Temuco, Chile, INIA. pp. 1 – 27 (Serie Actas INIA no. 44).
58. Vigna, M. R.; López, R. L.; Gigón, R.; Mendoza, J. 2008. Estudios de curvas dosis respuesta de poblaciones de *Lolium multiflorum* a glifosato en el

SO de Buenos Aires, Argentina. In: Congresso Latinoamericano de Malezas (18°. 2008 Ouro Preto). A ciência das plantas daninhas na sustentabilidade dos sistema agrícolas. Ouro Preto, MG, EMBRAPA Milho e Sorgo. pp. 50-53.

59. Whaley, C. M.; Wilson, H. P.; Westwood, J. H. 2007. A new mutation in plant als confers resistance to five classes of als-inhibiting herbicide. *Weed Sci.* 55: 83-90.
60. Yu, Q.; Powles, S. B.; Hasem, A.; Walsh, M. J.; Zhang, X. Q. 2003. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Sci.* 51: 831 – 838.
61. _____; Cairns, A.; Powles, S. 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta.* 225(2): 499 – 513.
62. Yuan, J. S.; Tranel, P. T.; Stewart, C. N. 2007. Non-target-site herbicide resistance; a family business. *Plant. Sci.* 12: 7-13.