



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Caracterización de la resistencia a herbicidas en poblaciones de *Lolium multiflorum* Lam. del Uruguay

Sofía Marques Hill

Maestría en Ciencias Agrarias

Abril 2021

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. PhD. Claudia Marchesi, Ing. Agr. PhD. Martín Vila-Aiub y Ing. Agr. PhD. Juana Villalba y, el 23 de abril de 2021.
Autora: Sofía Marques Hill. Directora: Ing. Agr. PhD. Grisel Fernández. Co-director: Ing. Agr. PhD. Alejandro García.

Dedico este trabajo a mi hermana Agus que siempre me invita a ser mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a INIA por darme la oportunidad para formarme y conocer la profesión del investigador desde adentro y especialmente a mi tutor Alejandro García por ayudarme a desarrollar la investigación con una consistente visión macro del problema y con tranquilidad.

Me gustaría agradecer también a todo el equipo de malezas de INIA La Estanzuela que me ayudó con el trabajo de invernáculo, desde llenar alrededor de 2000 macetas hasta ir un domingo a regar, ¡Gracias!

Finalmente, agradecer a mi familia que siempre están y a mi pareja que me acompaña en este camino de dedicación a la ciencia y al campo que acaba de comenzar.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. RESISTENCIA A HERBICIDAS.....	1
1.1.1. <u>Mecanismos de resistencia a herbicidas</u>	2
1.1.2. <u>Factores que afectan la evolución de poblaciones resistentes</u>	
<u>a herbicidas</u>	3
1.1.2.1. Factores genéticos	3
1.1.2.2. Factores bio-ecológicos de la especie	4
1.1.2.3. Factores agronómicos	5
1.2. CARACTERÍSTICAS DEL RAIGRÁS MALEZA	6
1.2.1. <u>Características morfo-fisiológicas</u>	7
1.2.2. <u>Importancia a nivel productivo</u>	8
1.2.3. <u>Características de los grupos de herbicidas más utilizados</u>	
<u>para el control de <i>Lolium</i> spp.</u>.....	9
1.2.3.1. Inhibidores de la EPSPS	9
1.2.3.2. Inhibidores de la ACCasa	10
1.2.3.3. Inhibidores de la ALS	11
1.3. RAIGRÁS RESISTENTE A HERBICIDAS EN EL MUNDO	11
1.3.1. <u>Evolución y situación actual</u>	11
1.3.2. <u>Relevamientos de malezas resistentes a herbicidas</u>	14
1.4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	16
1.4.1. Objetivos	16

1.4.2. Hipótesis	17
2. <u>FIRST SURVEY OF HERBICIDE RESISTANT POPULATIONS OF</u>	
<u>LOLIUM MULTIFLORUM LAM. OF URUGUAY</u>	18
2.1. RESUMEN	18
2.2. SUMMARY	19
2.3. INTRODUCTION	20
2.4. MATERIALS AND METHODS	23
2.4.1. <u>Plant Materials</u>	23
2.4.2. <u>Herbicide Resistance Screening</u>	24
2.4.3. <u>Statistical Analysis</u>	26
2.5. RESULTS AND DISCUSSION	26
2.5.1. <u>Mortality and growth reduction</u>	26
2.5.2. <u>Frequency of herbicide resistant LOLMU within</u>	
<u>tested populations</u>	31
2.5.3. <u>Multiple resistance patrons and correlation between resistance</u>	
<u>to tested herbicides</u>	34
2.6. CITED LITERATURE	38
2.7 SUPPLEMENTARY MATERIAL	42
3. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES</u>	46
4. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	49

RESUMEN

La resistencia a herbicidas es actualmente uno de los problemas más importantes de los sistemas agrícolas llegando a comprometer su sostenibilidad ambiental y económica. En Uruguay, en los últimos años, han incrementado los reportes de resistencia a herbicidas en poblaciones de LOLMU (*Lolium multiflorum*), pero se desconoce la magnitud del problema a nivel país. Con el objetivo de caracterizar la resistencia a herbicidas en poblaciones naturalizadas de esta maleza, se realizó un relevamiento dirigido donde se colectaron 66 poblaciones de LOLMU que habían sobrevivido a la aplicación de alguno de los herbicidas recomendados para el control de esta especie. Además, se relevó la historia de herbicidas y rotación de cada chacra. Las muestras obtenidas fueron sembradas en macetas en condiciones de invernáculo, junto con una población susceptible conocida. Los herbicidas testeados fueron glifosato, clethodim, pinoxaden y una formulación de iodosulfuron y mesosulfuron (IodoMeso). Cuando las plantas se encontraban entre tres hojas y un macollo, se aplicaron dos dosis: la indicada en la etiqueta de cada producto según el estado de las plantas (1x) y la mitad de esta (1/2x). Se evaluó la mortalidad y biomasa aérea de cada maceta a los 28 días post aplicación (DPA). Las poblaciones se categorizaron como resistentes si su mortalidad 28 DPA a la dosis 1x era menor a 80%. Los resultados indican un proceso de selección de resistencia más avanzado para el glifosato con respecto a los demás herbicidas. El 80% de las poblaciones testeadas mostraron ser resistentes a glifosato, el 24% a clethodim, el 36% a pinoxaden y 49% a IodoMeso. El 52% de las poblaciones resistieron a más de un principio activo, siendo el 16% resistente a los cuatro herbicidas testeados. Se encontró una alta correlación entre los niveles de resistencia de clethodim y pinoxaden ($R^2 = 0,83$), lo que sugiere la ocurrencia de resistencia cruzada. Estos resultados constituyen el primer diagnóstico formal de la situación actual de resistencia a herbicidas en LOLMU en el Uruguay y ponen de manifiesto la urgencia en el diseño de nuevas estrategias para el manejo de malezas resistentes.

Palabras clave: resistencia múltiple, detección de resistencia, relevamiento.

Herbicide resistance characterization in *Lolium multiflorum* Lam. populations of Uruguay

SUMMARY

Herbicide resistance is currently one of the most important problems in agricultural systems, compromising their environmental and economic sustainability. In Uruguay, reports of herbicide resistant populations of LOLMU (*Lolium multiflorum*) have increased in recent years, but the magnitude of the problem at the national level is still unknown. To characterize the resistance to herbicides in naturalized populations of LOLMU, a targeted survey was carried out. Sixty-six populations that had survived herbicide applications recommended to control this species were collected. Additionally, information of herbicide history and crop rotation of each field was requested to farmers. The samples obtained were grown in pots under greenhouse conditions with a known susceptible population. The herbicides tested were glyphosate, clethodim, pinoxaden and a formulation of iodosulfuron and mesosulfuron (IodoMeso). The recommended label rate (1x) of each herbicide and half of this (1/2x) were sprayed to plants at the 3-leaves to 1-tiller stage. Mortality and shoot biomass in each pot were evaluated 28 days after treatment (DAT). Populations were categorized as resistant if their 28 DAT mortality at 1x dose was less than 80%. The results indicate a more advanced process of resistance selection for glyphosate compared to the other tested herbicides. Eighty percent of the populations tested were resistant to glyphosate, 24% to clethodim, 36% to pinoxaden and 49% to IodoMeso. Fifty-two percent of the populations resisted to more than one herbicide, being 16% resistant to all tested herbicides. Furthermore, a high correlation between clethodim and pinoxaden resistance levels ($R^2 = 0.83$) was observed, which suggests the occurrence of cross-resistance. These results constitute the first formal diagnosis of the current situation of herbicide resistant LOLMU in Uruguay and highlight the urgency in designing new strategies for resistance management.

Keywords: multiple resistance, resistance screening, survey.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. RESISTENCIA A HERBICIDAS

Las malezas resistentes a herbicidas son uno de los problemas más importantes en los sistemas agrícolas actuales, al punto de amenazar su sostenibilidad económica y ambiental.

La resistencia a herbicidas puede definirse como la habilidad heredable de una planta a sobrevivir y reproducirse luego de ser expuesta a cierta dosis de un herbicida con la cual normalmente moriría (WSSA, 1998). Estos biotipos existen naturalmente en baja frecuencia en las poblaciones de malezas. Sin embargo, el uso repetido del mismo principio activo ejerce una presión de selección que genera poblaciones con alta frecuencia de biotipos resistentes (Vila-Aiub y Fischer, 2014). Según la WSSA (2011), la resistencia a herbicidas de un biotipo puede clasificarse en i) simple, si sobrevive a un único principio activo; ii) múltiple, si sobrevive a dos o más principios activos de diferentes sitios de acción (SOA); o iii) cruzada, si sobrevive a más de un principio activo, por un mismo mecanismo de resistencia.

La resistencia múltiple es una gran amenaza para la sostenibilidad del uso de herbicidas ya que, individuos o poblaciones de malezas pueden acumular resistencia a varios herbicidas de diferente SOA y reducir más o menos gradualmente las alternativas químicas para el control de estos biotipos. Este tipo de resistencia suele ser el resultado de aplicaciones secuenciales de herbicidas con diferente SOA (Backie y Tardif, 2012). Según Heap (2021), el caso de resistencia a mayor cantidad de herbicidas de diferente SOA reportado es en Australia, en una población de *Lolium rigidum* resistente a herbicidas con siete SOAs diferentes. Por otro lado, en especies de polinización cruzada, este tipo de resistencia también puede darse por recombinación entre individuos con resistencia simple, pudiendo aumentar la frecuencia de resistencia múltiple rápidamente.

1.1.1. Mecanismos de resistencia a herbicidas

Se conoce como mecanismos de resistencia a los procesos mediante los cuales una planta consigue disminuir o anular la actividad fitotóxica del herbicida. La efectividad del herbicida depende de los procesos de absorción, transporte y unión a la proteína objetivo (i.e. sitio de acción del herbicida), por lo que cualquier modificación en estos procesos puede generar resistencia al herbicida (Rigon et al., 2020; Taberner et al., 2007).

Existen dos tipos de mecanismos de resistencia, aquellos que están basados en una alteración del sitio de acción del herbicida y aquellos en los que la alteración no implica cambios en el sitio de acción (Gaines et al., 2020; Yanniccari, 2014; Délye et al., 2013).

Las alteraciones de sitio de acción pueden implicar la sustitución de algún aminoácido de la enzima objetivo que genera cambios en su estructura e impide la correcta adhesión de la molécula del herbicida (Délye et al., 2013). Otras alteraciones dentro de este tipo de mecanismo pueden generar la sobreproducción de la enzima objetivo que deriva en mayores concentraciones de la misma, determinando que la dosis normal de herbicida ya no sea suficiente para inhibirla (Gaines et al., 2020). Esta sobreproducción de la enzima objetivo puede estar explicada por una amplificación del gen que codifica la enzima, es decir que haya mayor número de copias en el ADN en comparación con las susceptibles y/o por una sobreexpresión del gen mediante alteración de sus promotores o factores de expresión (Yanniccari, 2014).

Por otro lado, los mecanismos de resistencia ajenos al sitio de acción implican una reducción de la concentración de la molécula fitotóxica que llega al sitio de acción en comparación con los biotipos susceptibles (Vila-Aiub y Fischer, 2014). Esto puede deberse a cambios en la absorción, translocación, compartimentalización y/o detoxificación del herbicida dentro de la planta (Rigon et al., 2020; Powles y Yu, 2010). Generalmente estos mecanismos están explicados por múltiples genes menores que

mediante recombinación se acumulan y pueden expresar resistencia a un herbicida (Gressel, 2009). A su vez, estos mecanismos de resistencia amenazan la utilidad de los herbicidas ya que pueden conferir resistencia a múltiples herbicidas de diferentes modos de acción (Rigon et al., 2020).

1.1.2. Factores que afectan la evolución de poblaciones resistentes a herbicidas

La evolución de poblaciones resistentes a herbicidas depende de varios factores biológicos y de manejo. Es importante puntualizar que no solo los herbicidas generan estos procesos evolutivos, sino que cualquier disturbio que se realice frecuentemente e implique selección por determinadas características en la población, generará una población resistente a ese disturbio (Hanson et al., 2014; Yannicari, 2014).

1.1.2.1 Factores genéticos

Los factores genéticos más importantes en determinar la velocidad en que se generan poblaciones resistentes a herbicidas son la frecuencia y número de alelos que confieren resistencia preexistentes en la población, la dominancia que estos tengan y los cambios en el “fitness” o adaptabilidad de los biotipos resistentes en comparación con los susceptibles (Busi et al., 2019; Vila-Aiub y Fischer, 2014; Powles y Yu, 2010; Jasieniuk et al., 1996).

Si la herencia es dominante, los individuos heterocigotos serán resistentes también y por ende serán más frecuentes los biotipos resistentes (Hanson et al., 2014). Además, si las mutaciones se encuentran en el núcleo celular, la resistencia podrá ser transmitida en los granos de polen, produciendo mayor descendencia resistente que si se encontraran en plastos maternos. El número de genes que confieren la resistencia también es importante, ya que si se trata de resistencias monogénicas las dosis bajas suelen mantener genes susceptibles que contribuyen a diluir la selección de los resistentes. Por otro lado, en resistencias poligénicas las subdosis pueden

generar biotipos altamente resistentes mediante recombinación y adición de genes que individualmente confieren bajos niveles de resistencia (Busi et al., 2013; Neve y Powles, 2005)

Los cambios en el “fitness” de la planta generados por un cambio genético también afectan la evolución de poblaciones resistentes. Si los genes que confieren resistencia tienen asociado un fitness negativo, los biotipos resistentes se encontrarán en desventaja frente a los susceptibles en los períodos donde no se utiliza el herbicida (Vila-Aiub et al., 2009; Bergelson y Purrington, 1996) y por lo tanto puede significar un avance de la resistencia más lento.

1.1.2.2. Factores bio-ecológicos de la especie

Los factores bio-ecológicos que favorecen la evolución de biotipos resistentes son la polinización cruzada, los ciclos de vida cortos, las altas tasas de producción de semillas y la baja dormición de éstas (Jasieniuk et al., 1996). Las especies alógamas generan un flujo de genes mayor por lo que la difusión de alelos resistentes será más rápida que en especies autóгамas (Délye et al., 2013). Por otro lado, las especies con alta dormición tendrán semillas susceptibles en el banco de semilla por más tiempo, provocando que la frecuencia de biotipos resistentes no aumente abruptamente (Jasieniuk et al., 1996).

La forma de dispersión de la especie y el tipo de polinización determinan en gran medida la velocidad de expansión de biotipos resistentes. Por ejemplo, en *Lolium rigidum* se ha constatado polinización a 100 m de la planta de origen en un 0,1% de individuos, lo que genera una frecuencia más alta que la probabilidad de mutación espontánea generalmente asumida de 10^{-6} (Loureiro et al., 2017). Por otro lado, especies que tienen alta prolificidad y que sus semillas se dispersan por viento como *Conyza* spp., pueden expandirse rápidamente, disminuyendo la importancia de otros factores (Shields et al., 2006).

1.1.2.3. Factores agronómicos

Los factores agronómicos son los más controlables ya que son los asociados al manejo productivo. Los más importantes son: el herbicida, las dosis y frecuencias utilizadas y el grado de integración de otras prácticas de control como las culturales y/o mecánicas (Beckie, 2006). Las prácticas agrícolas de los últimos años han seleccionado especies y biotipos muy adaptados a los sistemas agrícolas actuales. La adopción de cultivos resistentes a herbicidas y la tecnología de siembra directa han tenido una gran influencia en la aparición de poblaciones resistentes a herbicidas, ya que se basan en la utilización de éstos para la preparación del suelo y el control de malezas (Yannicari, 2014).

La presión de selección de los herbicidas es lo más determinante en la velocidad evolutiva de la resistencia (Beckie, 2006; Jasieniuk et al., 1996). Los herbicidas con un sitio de acción específico, gran efectividad de control y alta residualidad generan una presión de selección mayor y por lo tanto generarán poblaciones resistentes con menor número de aplicaciones. El riesgo de resistencia de sitio de acción varía según el grupo de herbicidas. Los inhibidores de la acetil coenzima-A carboxilasa (ACCase) y la acetolactato sintasa (ALS) tienen un sitio de acción que genéticamente tiene más probabilidad de presentar mutaciones que confieren resistencia, pudiendo seleccionar poblaciones resistentes en menos de 10 aplicaciones (Beckie, 2006; Gressel, 2002).

Por otro lado, las dosis utilizadas pueden condicionar el tipo de mecanismo de resistencia que es seleccionado. Generalmente con altas dosis sobrevivirán pocas plantas con mecanismos de resistencia de sitio de acción. Mientras que con subdosis, intencionales o no, se suele seleccionar plantas con genes menores que confieren bajos niveles de resistencia y que, mediante recombinación y efecto aditivo, pueden llegar a resistir dosis altas (Yu y Powles, 2014).

Por último, cuanto más diversas sean las prácticas de control, la presión de selección será menor y por ende la evolución hacia poblaciones resistentes a herbicidas será más lenta (Norsworthy et al., 2012). La rotación con pasturas y distintos cultivos hacen que el sistema sea más diverso y que la evolución de la resistencia a herbicidas se enlentezca. En este sentido, Boutsalis et al. (2012) reportó mayor frecuencia de resistencia múltiple en *Lolium rigidum* en zonas de mayor intensidad agrícola. Sin embargo, las decisiones realizadas por el productor están determinadas por múltiples factores socio-económicos, por lo que generalmente se seleccionan otras alternativas de control antes de un ajuste en la rotación y/o sistema de producción (Beckie, 2006). Algunos ejemplos que condicionan las elecciones de los productores podrían ser las grandes áreas que maneja cada técnico, los contratos de arrendamiento donde no se conoce la historia de herbicidas, la determinación de beneficios únicamente a corto plazo, así como la conveniencia del uso de herbicidas frente a otros mecanismos de control en términos de rentabilidad y eficacia inmediata.

1.2. CARACTERÍSTICAS DEL RAIGRÁS MALEZA

Para comprender qué efecto tiene el manejo empleado sobre las poblaciones de malezas es importante conocer las características fisiológicas y ecológicas de la/s especie/s de interés.

El raigrás es una maleza que comprende varias especies, y la presencia o abundancia de cada una depende de la región o país. En este trabajo el término “raigrás” hace referencia a todas las especies del género (*Lolium* spp.) y el término “LOLMU” se utiliza específicamente para referirse a la especie *Lolium multiflorum*, siendo esta la más abundante en el Uruguay.

1.2.1. Características morfo-fisiológicas

El género *Lolium* está formado por ocho especies originarias de Europa, Asia occidental y del norte de África, pero tres de estas tienen valor agronómico: *LOLMU*, *Lolium perenne* y *Lolium rigidum*. Estas tres especies son alógamas, anemófilas y diploides, aunque se han generado cultivares tetraploides de algunas de estas especies (Vargas et al., 2018; Inda-Aramendía, 2005).

En estado vegetativo presentan láminas de envés brillante y la base de los macollos color violácea. En estado reproductivo, presenta una inflorescencia constituida por espigas dísticas con dos series opuestas de espiguillas multifloras provistas de una sola gluma, excepto la espiguilla terminal que posee las dos glumas (Gigón et al., 2017). Según Inda-Aramendía (2005), la distinción morfológica y biológica de las especies alógamas del género no es sencilla, ya que se dan hibridaciones en la naturaleza. Sin embargo, puntualiza ciertas diferencias como son la presencia de aristas, cantidad de flores por espiguilla y largo de espiga. Las plantas de *Lolium perenne* suelen tener espigas algo más cortas ($28,0 \pm 7,8$ cm vs. $37,8 \pm 8,0$ cm) y menor cantidad de flores por espiguilla ($12,9 \pm 2,2$ vs. $14,0 \pm 3,1$) que *Lolium multiflorum*. Además, las espiguillas de esta última especie se diferencian por presentar aristas.

En cuanto a la fenología, la tasa de crecimiento de las plántulas es inicialmente baja hasta el macollaje, el cual comienza al alcanzar la cuarta hoja. Presenta requerimientos de día largo para el desarrollo de la inflorescencia y posterior encañazón, y la floración ocurre en primavera prologándose entre octubre y noviembre (Yanniccari, 2014). Presentan fecundación cruzada, por lo que el grado de heterocigosis es elevada, resultando en una gran variabilidad dentro de las poblaciones (Vargas et al., 2018). Finalmente, las cariopses maduran y comienzan a dispersarse a fines de la primavera.

La perpetuación de este género depende fundamentalmente de las semillas ya que la reproducción vegetativa es nula o escasa. La dispersión de las semillas es básicamente a través del hombre ya que por su peso no se dispersan a grandes distancias desde la planta madre (Lodovichi, 2018). La producción de semillas por planta puede llegar hasta 12.000, siendo muy dependiente de las condiciones ambientales (Yannicari et al., 2016). La semillas presentan dormición que se rompe por las altas temperaturas del verano (Gigón et al., 2017; Lodovichi et al., 2017) y suelen tener una persistencia en el suelo de hasta dos años (Jensen, 2010).

1.2.2. Importancia a nivel productivo

El LOLMU es la maleza gramínea invernal más importante en los sistemas agrícolas del Uruguay, con mayor importancia en cereales de invierno donde una vez que está implantado el cultivo son pocas las herramientas que quedan para su control. Los efectos competitivos de LOLMU sobre el trigo son variables según las características morfo-fisiológicas y la densidad de la maleza (Acciaresi et al., 2001). Según Acciaresi y Picapietra (2018), la merma en rendimiento puede llegar a 30% si se superan densidades de 100pl/m². En cultivos de verano también puede generar dificultades en la implantación (Gigón et al., 2017), principalmente por presentar un estado de desarrollo avanzado donde el herbicida no actúa correctamente.

A estos escenarios se suma que comienzan a observarse poblaciones de LOLMU resistentes a los herbicidas más utilizados. La resistencia a herbicidas tiene un costo productivo importante ya que se deben utilizar otros principios activos u otras prácticas de control generalmente más costosas (Norsworthy et al., 2012). Además, las plantas no controladas que llegan a cosecha pueden perjudicar el rendimiento y la calidad del grano, ya sea por pureza y/o por mayor humedad a la cosecha (Vargas et al., 2016a). Esto cobra más importancia aún si se tiene en cuenta que el LOLMU es una especie alógama muy adaptada en todo el territorio del Uruguay, por lo que la

dispersión y recombinación de genes de resistencia puede suceder relativamente rápido si no se tienen en cuenta las prácticas que favorecen su expansión.

1.2.3. Características de los grupos de herbicidas más utilizados para el control de raigrás

1.2.3.1. Inhibidores de la EPSPS

Este grupo actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) evitando la biosíntesis de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano requeridos para la síntesis de proteínas. Más específicamente, esta enzima cataliza la reacción entre shikimato-3-fosfato (S3P) y fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato (EPSP) y fósforo inorgánico (Kogan y Pérez, 2003).

El glifosato es el único herbicida perteneciente a este grupo y se caracteriza por ser un herbicida post emergente, no residual, no selectivo y sistémico, por lo que requiere que la planta este metabólicamente activa para una buena translocación. Generalmente es absorbido por el follaje mediante difusión por la cutícula y se transloca por floema a tejidos metabólicamente activos como los meristemas (Sprankle et al., 1975).

Los síntomas provocados por este herbicida aparecen lentamente (entre 10 y 20 días), comenzando por una detención del crecimiento, seguido de clorosis en hojas, necrosis y muerte. La demora en la acción del herbicida se debe al gran tamaño del pool de aminoácidos aromáticos que existe en las plantas, requiriéndose tiempo para que se agoten y lo perciba la planta (Kogan y Pérez, 2003). Por otro lado, Duke et al. (2003) afirma que un efecto más dramático que la reducción del pool de aminoácidos aromáticos es el incremento del ácido shikímico y en menor medida de los ácidos benzoicos derivados del shikimato. Estos ácidos se relacionan a una menor fijación de carbono y por lo tanto una reducción de la fotosíntesis. Es el herbicida más usado

en Uruguay por su amplio espectro y eficacia de control. Se utiliza principalmente en barbecho y en cultivos resistentes a este herbicida.

1.2.3.2. Inhibidores de la ACCasa

Este grupo de herbicidas actúa inhibiendo la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) que se encarga de catalizar la carboxilación de acetil-CoA para formar malonil-CoA (Powles y Yu, 2010), la cual es intermediario de la síntesis de lípidos. De esta manera, la inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos fundamentales para la formación de membranas y por ende para el crecimiento de la planta es el principal mecanismo que lleva a la muerte de las plantas (Takano et al., 2021).

Los herbicidas inhibidores de ACCasa son selectivos, teniendo efecto únicamente en gramíneas que tienen la enzima ACCasa plastídica homomérica. Las dicotiledóneas tienen la ACCasa plastídica multimérica que es insensible a estos herbicidas (Yu et al., 2010). Son post emergentes de acción sistémica, comúnmente absorbidos vía foliar, siendo transportados vía floema a las zonas meristemáticas y tejidos jóvenes en expansión (Kogan y Pérez, 2003).

Los síntomas de estos herbicidas se comienzan a observar entre 7 y 15 días luego de la aplicación, aunque las plantas detienen su crecimiento pocos días después de la misma. Si bien las plantas pueden verse sanas por varios días, las hojas en expansión se desprenden fácilmente y presentan tejido necrótico en la base debido al efecto fitotóxico generado en los meristemas (Diez de Ulzurrun, 2013; Kogan y Pérez, 2003). Tres familias químicas forman este grupo de herbicidas: los aryloxi-fenoxi-propionatos, comúnmente denominados “fops”; las cyclohexanodionas, comúnmente llamados “dime” y los fenilpirazoles, comúnmente llamados “dime”. Por su selectividad generalmente son utilizados en cultivos de hoja ancha, aunque algunos principios activos pueden ser utilizados en cultivos de trigo y cebada debido que estos metabolizan más rápido el herbicida o porque el herbicida se aplica junto a protectores de cultivo (Diez de Ulzurrun, 2013). En Uruguay se usan principalmente

el haloxyfop, el clethodim y el pinoxaden. Los dos primeros son utilizados principalmente en cultivos de hoja ancha y barbechos con presencia de gramíneas resistentes a glifosato. El pinoxaden es utilizado en cultivos de trigo y cebada para el control de raigrás y avena.

1.2.3.3. Inhibidores de la ALS

Este grupo de herbicidas actúa inhibiendo la enzima cloroplástica acetolactato sintasa (ALS) que se encarga de catalizar la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada como valina, leucina e isoleucina (Duggleby y Pang, 2000). Esto hace que se reduzca la producción de proteínas y la división celular (Powles y Yu, 2010).

Los síntomas se visualizan de 7 a 14 días y se caracterizan por presentar acortamiento de entrenudos, clorosis internerval, terminando con necrosis y abscisión de hojas (Arregui y Puricelli, 2014).

Las familias químicas incluidas en este grupo son las sulfonilureas, imidazolinonas, triazolinonas, sulfonamidas, triazolpirimidinas y los primidilbenzoatos (HRAC, 2020). Las familias más utilizadas para el control de raigrás son las sulfonilureas, imidazolinonas y triazolpirimidinas, siendo aplicados algunos de ellos junto a un protector de cultivo. Más específicamente el iodosulfuron con mesosulfuron, el flucarbazone y el pyroxulam son los principios activos más utilizados para el control de LOLMU en cultivos de trigo o cebada ya implantados.

1.3. RESISTENCIA DE RAIGRÁS A HERBICIDAS EN EL MUNDO

1.3.1. Evolución y situación actual

Según Heap (2021), existen 128 casos registrados de raigrás (*Lolium* spp.) resistentes a herbicidas a nivel mundial. La mayoría de ellos son reportes de resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa (Grupo A según clasificación HRAC), seguido por inhibidores de la EPSPS y la ALS (Grupos G y B respectivamente) (Figura 1). Si bien la

resistencia al grupo G se registró por primera vez 22 años después de que se comenzara a utilizar el glifosato, el reporte de casos escalo rápidamente, alcanzando a los inhibidores de ALS. De todos los casos reportados en el relevamiento de Heap (2021), aproximadamente un 33% son de tipo múltiple con un máximo de resistencia a siete modos de acción diferentes.

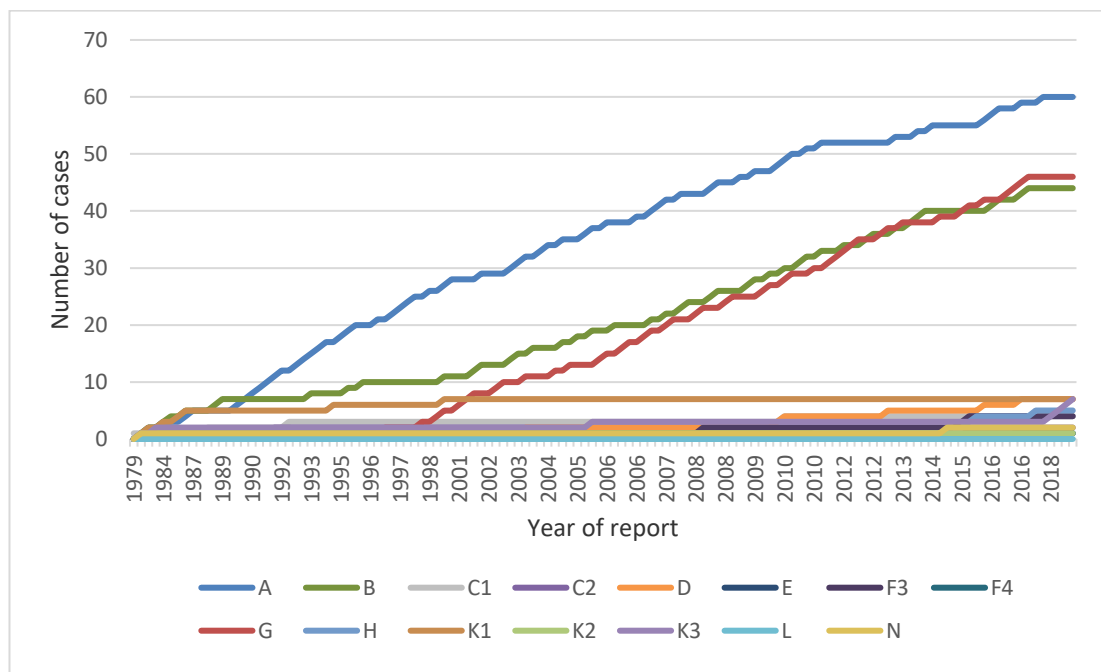


Figura 1. Evolución de casos registrados de *Lolium* spp. resistentes a herbicidas según modo de acción a nivel mundial (clasificación HRAC)(Adaptado de Heap, 2021). A = inhibidores de ACCasa; B = inhibidores de ALS; C1 y C2 = inhibidores del fotosistema II; D = desvío de electrones en fotosistema I; E = inhibidores de PPO; F4 = inhibidores de DOXPS; G = inhibidores de EPSPS; H = Inhibidores la glutamina sintetasa; K1 = inhibidores del ensamblado de microtúbulos; K2 = Inhibidores de la organización de microtúbulos; K3 = inhibidores de biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga; L = inhibidores de la síntesis de celulosa; N = inhibidores de lípidos.

En el cono sur de Latinoamérica, pese a no estar documentado en el relevamiento internacional, la resistencia a herbicidas en raigrás se ha expandido a grandes áreas. En Brasil, en la región de Río Grande do Sul, los primeros biotipos resistentes a

glifosato fueron reportados en el año 2003, por lo que comenzaron a controlarlo con inhibidores de ACCasa y ALS. Esto derivó en la evolución de poblaciones resistentes a estos herbicidas en los años 2010 y 2011 respectivamente. En el 2016 se estimó el área afectada con raigrás resistente a glifosato, inhibidores de ACCasa e inhibidores de ALS, llegando a 4.000.000, 1.000 y 1.200 hectáreas respectivamente (Vargas et al., 2016a). De manera similar, en Argentina las primeras poblaciones de raigrás resistentes a glifosato se identificaron en el 2006 y las primeras poblaciones con resistencia múltiple a inhibidores de EPSPS, ALS y ACCasa en el 2009 (Vigna et al., 2013). Hoy en día en Argentina se estiman más de 5 millones de hectáreas afectadas por *Lolium* spp. resistente a glifosato entre las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba (Aapresid, 2020).

En Uruguay hace varios años que es constatada la sobrevivencia de plantas de LOLMU a los productos más utilizados para su control. Sin embargo, son pocos los trabajos que confirman casos de resistencia mediante curvas de dosis respuesta y/o que caracterizan la frecuencia y distribución de las poblaciones resistentes a herbicidas. Della Valle y Ferrari (2011), determinaron variaciones en la sensibilidad de LOLMU al glifosato en función de los diferentes sitios geográficos estudiados, así como también por el estado fenológico y cantidad de materia seca de cada sitio. El primer reporte de LOLMU resistente a herbicidas fue realizado por Félix y Urioste (2016), encontrando cuatro poblaciones resistentes a glifosato con una DL_{50} promedio 35 veces mayor que la población susceptible. En este mismo trabajo también se probaron los herbicidas inhibidores de ACCasa haloxyfop y clethodim, sin encontrar resistencia a estos herbicidas en las poblaciones caracterizadas. Más recientemente se han confirmado poblaciones de raigrás resistentes a iodosulfuron y a haloxyfop (García et al., com. pers.).

La distribución de poblaciones de LOLMU resistentes a herbicidas aún es desconocida en Uruguay, pero al estar muy asociada a la frecuencia e historia de uso de herbicidas, probablemente se encuentren concentradas en las zonas agrícolas del país. En

Uruguay el área agrícola se concentra en el litoral oeste. Según la DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias, 2020a; 2020b), en la zafra 2019-2020 fueron sembradas 495 mil ha de cultivos de invierno y 1,07 millones de hectáreas de cultivos de verano. El trigo y la cebada suman el 81% del área de invierno, mientras que la soja ocupa un 85% del área de verano. Los departamentos que concentran la mayor área de estos cultivos son Soriano, Colonia, Río Negro y Paysandú (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de área sembrada por los principales cultivos agrícolas de Uruguay por departamento. Adaptado de DIEA (2020a, 2020b).

Departamento	Soja	Trigo	Cebada
	----- Superficie (%)* -----		
Soriano	26,8	22,1	30,9
Río Negro	15,9	11,9	13,1
Colonia	14,9	23,7	29,7
Paysandú	9,1	13,3	11,2
Flores	8,3	6,5	8,9
San José	5,6	12,1	3,2
Otros	19,4	10,4	3

*Área total de cultivos de invierno: 496 miles de ha.

Área total de cultivos de verano: 1.075 miles de ha.

1.3.2. Relevamientos de malezas resistentes a herbicidas

El relevamiento de especies resistentes a herbicidas se ha tornado una práctica ampliamente utilizada por muchos países con alta producción agrícola como herramienta de caracterización y monitoreo del problema. Si bien la forma más detallada de caracterizar la resistencia a herbicidas de un biotipo se realiza por experimentos de dosis respuesta, este método es poco práctico y costoso cuando la cantidad de poblaciones a testear es elevada y lo que se busca es determinar la frecuencia de las plantas o poblaciones resistentes. Es en estos casos se realiza un “screening” de resistencia que consta de la prueba de pocas dosis de herbicida en muchas poblaciones, siendo una de estas una dosis conocida como discriminante entre biotipos susceptibles y resistentes (Beckie et al., 2000). Además, estos estudios

realizados periódicamente permiten analizar la evolución de la resistencia a herbicidas mediante la comparación de resultados de relevamientos de distintos años (Loureiro et al., 2017; Malone et al., 2014; Owen et al., 2014).

El relevamiento puede hacerse en base a muestreos de chacras al azar (Loureiro et al., 2017; Boutsalis et al., 2012), al azar con previa determinación según otras características geográficas y/o agroclimáticas (Davis et al., 2008; Owen et al., 2007) o en base a muestreos dirigidos; en el cual se visitan chacras con cierta sospecha de presentar poblaciones de malezas resistentes (Vargas, et al., 2016b; Rauch et al., 2010). La decisión de cuál muestreo a realizar varía según los objetivos del relevamiento (Burgos et al., 2013; Beckie et al., 2000). En muestreos dirigidos no es posible determinar la frecuencia de poblaciones resistentes encontradas en una región o país, ya que el muestreo es sesgado hacia la detección de estas poblaciones. Sin embargo, este tipo de muestreos permiten confirmar la presencia de poblaciones resistentes y profundizar en su caracterización (Burgos et al., 2013). Además, brindan mejor información respecto al tipo y niveles de resistencia en una región y por lo tanto son útiles para diseñar rápidamente estrategias de mitigación de los problemas de resistencia.

De forma general, las variables medidas en respuesta a la aplicación de un herbicida pueden ser la sobrevivencia de plantas, proporción de plantas dañadas y/o reducción de crecimiento en comparación con plantas no tratadas. Los valores de sobrevivencia, daño o acumulación de biomasa que se utilizan para clasificar las poblaciones en diferentes grupos según el nivel de resistencia suelen variar entre trabajos (Singh et al., 2020; Loureiro et al., 2017; Owen et al., 2014; Beckie et al., 2000). Además, la clasificación de las poblaciones en diferentes niveles de resistencia puede variar entre las variables medidas (e.g. plantas que disminuyen drásticamente la acumulación de biomasa durante el periodo de evaluación, pero no mueren), pero suele ser consistente para la misma variable. En trabajos donde se categoriza la resistencia según la sobrevivencia de plantas, generalmente se define como

resistente aquellas poblaciones que tengan una sobrevivencia de plantas mayor a 20% a la dosis de campo. La definición de este porcentaje se basa en la proporción de plantas que sobreviven luego de una aplicación, que coincide aproximadamente con la percepción del productor de que hubo una falla de control y comienza a buscar otras alternativas (Owen et al., 2014). Para la variable reducción de crecimiento Moss et al. (1999) presentan una categorización en la que se toma como poblaciones con alta resistencia a aquellas que la reducción del crecimiento varía entre 0 y 80% y susceptibles cuando la variación del crecimiento es mayor al 90%.

1.4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1.4.1. Objetivos

Este trabajo, tuvo como objetivo realizar el primer relevamiento de poblaciones de *Lolium multiflorum* resistentes a herbicidas en el Uruguay con el fin de caracterizar la resistencia a los herbicidas post emergentes más usados. A su vez, será la base de germoplasma para estudios posteriores que aporten al mejor entendimiento de la resistencia a herbicidas en esta especie y sistemas de producción. Enmarcados en este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un muestreo de poblaciones de *L. multiflorum* que sobrevivieron a la aplicación de alguno de los herbicidas recomendados para la especie.
2. Confirmar y caracterizar el nivel de resistencia a glifosato (inhibidor EPSPS), clethodim (inhibidor ACCasa), pinoxaden (inhibidor ACCasa) y una formulación con mezcla de iodosulfuron y mesosulfuron (inhibidores ALS) en poblaciones de *L. multiflorum* colectadas de todo el país.
3. Georreferenciar los patrones de resistencia en las poblaciones colectadas.

1.4.2. Hipótesis

Debido a la historia de uso en el Uruguay de los herbicidas testeados en este trabajo, es esperable que la resistencia a glifosato sea la más frecuentemente encontrada en las poblaciones recolectadas.

A su vez, debido a la ausencia de reportes formales de resistencia múltiple en *Lolium multiflorum* en el país, se presume que aún no hay poblaciones con este tipo de resistencia.

2. FIRST SURVEY OF HERBICIDE RESISTANT POPULATIONS OF *LOLIUM MULTIFLORUM* LAM. OF URUGUAY¹

2.1. RESUMEN

La resistencia a herbicidas es actualmente uno de los problemas más importantes de los sistemas agrícolas, amenazando su sostenibilidad económica y ambiental. En Uruguay, en los últimos años, han incrementado los reportes de fallas de control de poblaciones de LOLMU (*Lolium multiflorum* Lam.) con los herbicidas recomendados para esta maleza. Sin embargo, se carece de una evaluación y caracterización metódica de la resistencia de esta maleza a los herbicidas. Se muestrearon 66 chacras para caracterizar la resistencia del LOLMU a los herbicidas postemergentes más utilizados. Las semillas recolectadas fueron sembradas y crecidas en macetas bajo condiciones de invernáculo junto con una población susceptible conocida. Cuando las plantas tenían entre tres hojas y un macollo, se aplicaron las dosis recomendadas de etiqueta (1x) y la mitad de estas (1/2x) de glifosato, clethodim, pinoxaden y una formulación de iodosulfuron-mesosulfuron (IodoMeso). Las poblaciones se clasificaron como resistentes si la mortalidad 28 días después del tratamiento (DAT) era del 80% o menos con dosis 1x. Los resultados mostraron que el 80% de las poblaciones eran resistentes al glifosato, seguidos de la resistencia a IodoMeso con 49% y pinoxaden y cletodim con 36 y 24% respectivamente. A su vez, 52% de las poblaciones probadas mostraron ser resistentes a más de un herbicida, con una importante frecuencia de poblaciones resistentes a glifosato e IodoMeso (17%) y a todos los herbicidas testeados (16%). Además, la correlación entre el nivel de resistencia a pares de herbicidas resultó ser alta para pinoxaden y clethodim ($R^2 = 0,84$). La distribución geográfica sugiere que la resistencia múltiple a herbicidas se concentra donde la agricultura ha sido históricamente localizada. Estos resultados indican que el LOLMU resistente a herbicidas está presente en las regiones agrícolas de Uruguay y que ya existe un número significativo de casos de resistencia múltiple

¹ Artículo a ser publicado en Weed Science

que se espera que aumente rápidamente si no se modifican sustancialmente los manejos comúnmente utilizados. Este relevamiento constituye el punto de partida para posteriores estudios de resistencia a herbicidas, siendo un insumo clave para mejorar las estrategias de manejo del LOLMU resistente a herbicidas.

Palabras clave: resistencia múltiple, detección de resistencia, relevamiento.

2.2. SUMMARY

Herbicide resistance is currently one of the most important problems in agricultural systems, threatening their economic and environmental sustainability. In Uruguay, in recent years, there have been increasing reports of failures to control LOLMU (*Lolium multiflorum* Lam.) populations with recommended herbicides for this weed. However, methodical evaluation and characterization of herbicide resistance is lacking. Sixty-six fields were sampled to characterize LOLMU resistance to most commonly used postemergence herbicides. Plants from collected seeds were grown in pots under greenhouse conditions along with a known susceptible population. When plants reached three-leaves to one-tiller stage, they were sprayed with the recommended (1x) and half the recommended (1/2x) label dose of glyphosate, clethodim, pinoxaden and an iodosulfuron-mesosulfuron formulation (IodoMeso). Populations were classified as resistant if 28 days after treatment (DAT) mortality was 80% or less at 1x doses. Results showed that 80% of the populations were resistant to glyphosate, followed by resistance to IodoMeso with 49% and pinoxaden and clethodim with 36 and 24% respectively. Moreover, fifty-two percent of the tested populations were shown to be resistant to more than one herbicide, with an important frequency of populations resistant to glyphosate and IodoMeso (17%) and to all tested herbicides (16%). In addition, correlation of resistance levels between herbicide pairs was found to be high for pinoxaden and clethodim ($R^2 = 0.84$). Geographic distribution suggests that multiple resistance is concentrated where

agriculture has been historically localized. Overall, these results indicate that herbicide resistant LOLMU is present in agricultural regions of Uruguay and a significant number of multiple resistance cases already exist and are expected to increase rapidly provided management practices are not adjusted quickly and substantially. This survey represents the starting point for further herbicide resistance studies a key input to improve herbicide resistant LOLMU management strategies.

Keywords: multiple resistance, resistance screening, survey.

2.3. INTRODUCTION

Herbicide resistant weeds are currently a major threat to food production systems, compromising their economic and environmental sustainability. Herbicide resistance is defined by the Weed Science Society of America (WSSA 1998) as “the inherited ability of a plant to survive and reproduce following exposure to a dose of herbicide normally lethal to the wild type”. These rare biotypes are present at low frequencies in natural ecosystems, but herbicide resistant weed populations are the outcome of an evolutionary process in response to the selection pressure imposed by herbicides (Délye et al. 2013).

Herbicide resistance can be categorized into i) simple, if a plant survives only to one herbicide; ii) multiple, if it survives to more than one herbicide with different site of action (SOA) and iii) cross resistance, if it survives more than one herbicide due to the same resistance mechanism. Multiple resistance is usually the result of sequential applications with herbicides of different site of action (SOA), leading to the accumulation of various resistance alleles at the individual and/or population level (Beckie and Tardif 2012).

The evolution of herbicide resistance is affected by many factors, including the initial frequency of resistance gene mutations, associated fitness costs, allelic interactions (i.e. genetic dominance), herbicide site of action, dose and frequency of use, and weed reproductive biology (self-pollinated vs outcrossing), fecundity and pollen and/or seed dispersion (Powles and Yu 2010). However, the selective pressure imposed by herbicides is suggested as the main factor affecting the risk of resistance evolution (Beckie, 2006; Norsworthy et al., 2012). The importance of rotating and mixing herbicides with different site of action, implementing diverse crop rotations and including non-chemical weed control methods is well recognized in order to reduce herbicide selection pressure (Busi et al., 2019). Nevertheless, farmers' decisions are also influenced by multiple social and economic factors, and thus practices to mitigate herbicide resistance evolution are often not implemented until the problem has escalated in their fields.

Lolium multiflorum is native to Europe, North Africa and Occidental Asia and it was introduced to many productive systems around the world as an alternative for forage production. In Uruguay, LOLMU has adapted to almost all the territory and it is the most important winter grass weed. Its germination concentrates at the beginning of the fall with the first rains of the season, but smaller flows can still germinate until august. *Lolium* spp. plants can produce up to 12,000 seeds per plant depending on environmental conditions, remaining viable for 2 years approximately in the soil seedbank with very good resowing rates (Gigón et al. 2017). It is an anemophilous crosspollinated species, being highly heterozygous and therefore populations can have high standing genetic variability (Vargas et al. 2018).

To date, 128 reports of herbicide resistant (HR) *Lolium* spp. populations are listed in the international survey of HR weeds (Heap, 2021). Most cases involve herbicide resistance to ACCase (Acetyl-Coa Carboxylase, ALS (Acetolactate synthase) and EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) enzymes.

A population of *L. rigidum* Gaudin has been reported to evolve resistance to seven different sites of action herbicides (Heap, 2021), being described by Yu and Powles (2014) as one of the most dramatic examples of herbicide resistance evolution and multiple resistance. In the southern portion of South America, large areas have been affected with HR *Lolium* spp. In Rio Grande do Sul (Brazil), around 4 million ha are affected with glyphosate resistant populations, and 1,200 and 1000 ha with *Lolium* spp. resistant to ALS and ACCase inhibitors, respectively (Vargas et al., 2016). In Argentina more than 2 million hectares are affected with glyphosate resistant *Lolium* spp. and there are several reports of multiple resistant biotypes to these three MOAs (Aapresid, 2020).

Surveys are important tools that have been used around the world to characterize and monitor the evolution of herbicide resistance in certain weed species (Loureiro et al. 2017, Owen et al. 2014, 2007, Rauch et al. 2010). Furthermore, surveys are needed to better understand resistance evolution in order to design integrated management strategies for controlling resistant populations and reduce the risk of resistance evolution (Takano et al., 2021).

In Uruguay, reports of putative HR LOLMU have increased during the past few years. Glyphosate resistant LOLMU biotypes were documented by Félix and Urioste (2016), and resistance to haloxyfop and iodosulfuron was confirmed in LOLMU populations screened at the National Agricultural Research Institute of Uruguay (MA García, personal communication). However, a formal and methodical characterization of the problem is still lacking. The resistance patterns to herbicides with different MOAs and the geographical distribution of resistant populations remain unknown which makes control recommendations to be inefficient in many cases. Higher herbicide doses than necessary or repeated applications are more and more common implying greater economic costs, and higher risk of generating negative environmental impacts and resistance evolution.

The objective of this research was to geo-reference the distribution and to characterize the spectrum of herbicide resistance to some of the most used post emergent herbicides in naturalized populations of LOLMU from Uruguay.,. It aims to be the starting point for subsequent characterizations of resistance mechanisms and resistance spread and evolution in order to improve the efficiency of weed control strategies.

2.4. MATERIALS AND METHODS

2.4.1. Plant Materials

During the months of November and December 2019 mature seeds from putative herbicide resistant LOLMU plants were collected from 79 fields where farmers and agriculture technicians had observed control failures using the recommended herbicides and doses for the species. In each field, sampling was made depending on LOLMU plants distribution. For a uniform distribution, approximately one hectare was walked making an inverted “V” patron starting 10 m in from the edge of the crop. Every mature spike crossed by was collected and kept on a paper bag. If the distribution was uneven, every patch was sampled collecting randomly 5 to 10 spikes per patch. In some cases where the crop was already harvested, the sampling was made walking the edges of the crop and collecting spikes randomly. All the samples had spikes from at least 20 LOLMU plants and were labeled and georeferenced. Once in the laboratory, seeds were manually threshed and kept dry at room temperature for two months. Because of differences in seed quality, mainly due to different dormancy levels at the time of the collection, seed samples were reduced to 66.

A questionnaire form was sent to each farmer/technician via e-mail in order to collect information about herbicide history, crop rotation and the implementation of other control methods from each surveyed field (Supplementary material S1). The form was answered by 51 of the 66 farmers involved in this survey.

2.4.2. Herbicide Resistance Screening

One week before sowing, all seed samples were kept in a refrigerated camera in order to homogenize their germination. On February 2020, approximately 60 seeds of each population were sown in 2L pots filled up with a 5:1 mixture of soil and vermiculite by volume, respectively. Foundation seed of the traditionally most planted *L. multiflorum* cultivar was used as the known susceptible population, which was sown twice (S and S2) with one week of difference in order to synchronize growth with the slowest growing populations. Pots were randomly placed inside a greenhouse that had an average temperature of 23.8 ± 6.5 °C and relative humidity of 72.6 ± 17.2 % during the experimental period. Two weeks after germination pots were thinned to get 15 plants per pot at the time of herbicide application.

At the three-leaf stage, plants were sprayed with glyphosate (Roundup Full II, 540 g ea L⁻¹, Monsanto Argentina), clethodim (Clethomax, 240 g ia L⁻¹, Ningbo Sunjoy Co., and Shandong Cynda Chemical Co.) and pinoxaden (Axial, 50 g ia L⁻¹, Syngenta Crop Protection) at the label dose (1x) and half of the label dose (1/2x) (Table 1). The application of herbicides was conducted in a cabinet sprayer equipped with XR8010 nozzles and regulated to deliver 150 L ha⁻¹ at 250 Kpa pressure. Plant mortality and fresh weight were assessed 28 days after treatment (DAT). Growth reduction was calculated by comparing weight of aerial biomass of treated plants with that of non-treated plants.

Table 1. Herbicides and doses sprayed on sixty-six (66) *Lolium multiflorum* populations with plants exhibiting a growing stage between three-leaf to one-tiller .

Herbicide	Dose	
	1/2x	1x
	----- g ha ⁻¹ -----	
Glyphosate	540 ¹	1080 ¹
Clethodim	48	96
Pinoxaden²	15	30
Iodosulfuron/Mesosulfuron²	5.5/0.86	11/1.72

¹ g ea ha⁻¹

² 64 populations tested with these herbicides

The same procedure was followed on August 2020 to evaluate resistance to a iodosulfuron plus mesosulfuron commercial formulation (Hussar Plus, 50 g ia L⁻¹ iodosulfuron and 7.8 g ia L⁻¹ mesosulfuron, Bayer AG) commonly used on winter cereal crops in Uruguay to control LOLMU. Mean temperature of 16.8 ± 7.38 °C and relative humidity of 65.6 ± 15.4 % were recorded in the greenhouse during this experimentof. Two populations could not be tested for resistance to all herbicides because of seed quantity, and thus 64 populations were tested for resistance to pinoxaden and iodosulfuron-mesosulfuron.

Populations were classified according to plant mortality levels at 1x dose and 28 DAT: highly resistant (RR) if plant mortality was lower than 40%, resistant (R) if mortality was between 41 and 80%, and as susceptible (S) if mortality was above 80%. In order to complement these results, resistance score for each population, previously used by Neve and Powles (2005), was calculated multiplying the mean relative biomass with the mean plant survival in each pot. This score integrates both measurements and gives a more integral resistance characterization for each population. Determination coefficient (R²) was calculated between resistance scores for different herbicides, in order to detect plausible associations with herbicide use history, weed management and cross resistance patterns. Further analysis at 1/2x doses was made

for populations categorized as S at the 1x doses to determine whether developing resistance (DR) was occurring..

2.4.3. Statistical Analysis

The experimental design was completely randomized with factorial arrangement, where the herbicide doses and populations were the main factors. Data were analyzed using linear generalized model (glm) and linear model using least squares (gls) for plant mortality and relative biomass, respectively. ANOVA with a 95% of confidence was performed to determine the effect of each main factor and possible interactions. All the statistical analysis was made using R software (R Core Team, 2020).

2.5. RESULTS AND DISCUSSION

2.5.1. Plant mortality and growth reduction

In our work, because of the evaluation time frame (28 days) after spraying, plant mortality in response to herbicide treatment more clearly distinguished between herbicide resistant and susceptible populations than biomass data. Therefore, categorization of resistant populations was made based on the former parameter. Boutsalis et al. (2012), Owen et al. (2007, 2014) and Zangeneh et al. (2018) also employed this variable to categorize *L. rigidum* resistant populations, defining a resistant population showing equal to or higher than 20% plant survival. This threshold is empirically chosen as it fairly reflects when farmers usually detect the herbicide resistance problem in the fields and change to other alternatives of weed control, usually another herbicide. Because the known susceptible S2 population was not completely controlled with IodoMeso and the other herbicides, populations were categorized as resistant to IodoMeso if their mortality was lower than 80% and significantly different to mortality of the S2 population based on the 95% CI.

ANOVA showed all the factors to be significant ($p < 0.05$) in both gls and glm models for glyphosate, clethodim and pinoxaden. For iodosulfuron-mesosulfuron formulation (IodoMeso), ANOVA showed a significant interaction between population and dose ($p < 0.05$). Assessment of plant mortality using herbicides recommended label rates (1x) indicate that the selection process of herbicide resistance is more evolved for glyphosate and IodoMeso than for clethodim and pinoxaden herbicides (Figure 1). Only three (4%) and four (6%) populations were completely controlled with glyphosate and IodoMeso, respectively. On the other hand, 35 (53%) and 14 (21%) of the tested populations were completely controlled with clethodim and pinoxaden, respectively.

Plant growth reduction showed a similar response (Supplementary material S2). Correlation between plant mortality and growth reduction was high, being the Pearson's correlation coefficient of 0.80, 0.94, 0.92 and 0.84 for glyphosate, clethodim, pinoxaden and IodoMeso, respectively. This high correlation suggests that both variables are comparable for measuring the effect of these herbicides on LOLMU populations. However, in most resistance test protocols, growth reduction can be a less accurate measure than mortality to determining resistance. For example, pots where mortality is high, but the few plants that survive have greater biomass because of the less competition within the pot, can mask the difference with pots that have lower mortality and less biomass accumulation of individual survivors.

Colonia and Soriano (Departments of Uruguay) have been shown to concentrate 46% and 61% of the wheat and barley cultivated area, respectively. These two Departments together with Rio Negro also concentrate nearly 60% of the soybean cultivated area in the country (DIEA, 2020). In this survey, geographic distribution of sampled populations considering mortality at 1x doses showed that glyphosate resistance is highly distributed in all the sampled regions (Figure 2). However, populations with mortality lower than 40% (high resistance) for clethodim, pinoxaden and IodoMeso treatments were considerably less frequent in Departments with less

agriculture intensification. As expected, this result suggests that herbicide resistant LOLMU populations are more frequent in areas with more history and intensification of agriculture, and where generally herbicide reliance is higher. Coincidentally, Boutsalis et al. (2012), showed that cropping areas with greater crop production intensity are more likely to have resistance to multiple herbicides.

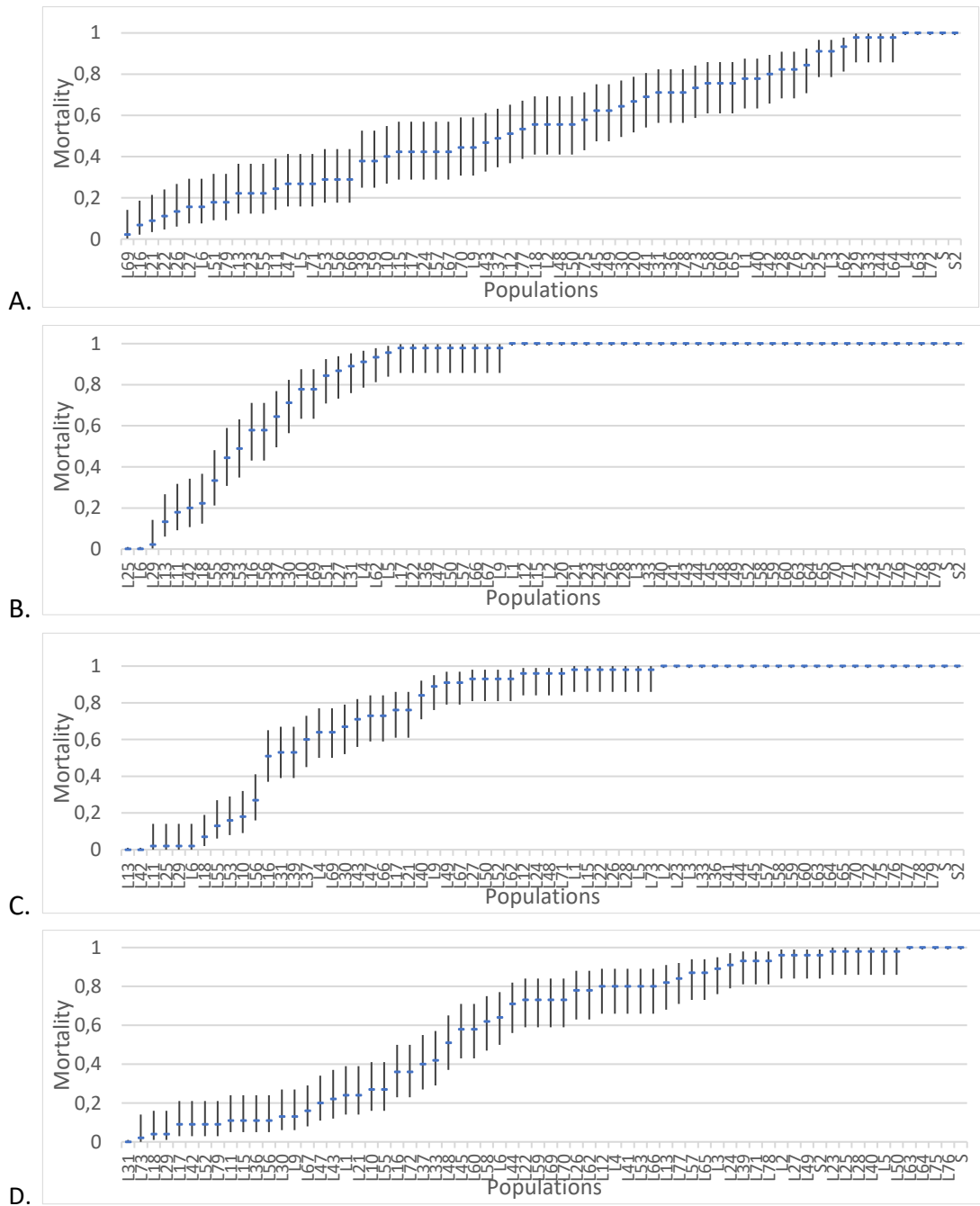


Figure 1. Mean plant mortality evaluated 28 days after treatment of *Lolium multiflorum* populations treated with label doses (1x) of glyphosate (A), clethodim (B), pinoxaden (C) and a iodosulfuron/mesosulfuron formulation (D). Error bars indicate range from lower to upper 95% confidence limit (n = 3).

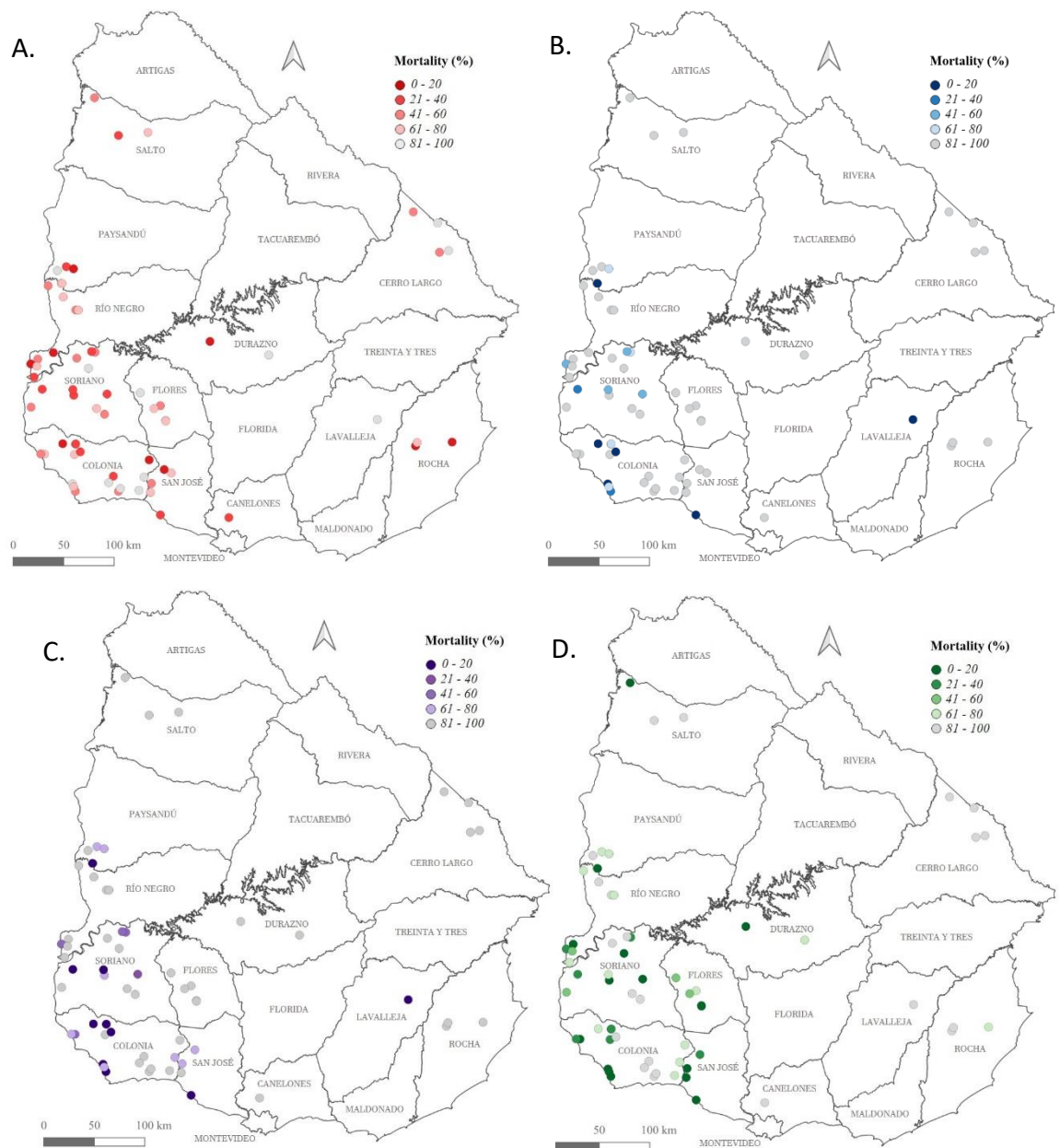


Figure 2. Geographic distribution of sampled populations of *Lolium multiflorum* according to plant mortality 28 days after treatment at label doses (1x) of glyphosate (A), clethodim (B), pinoxaden (C) and iodosulfuron/mesosulfuron mixture (D).

2.5.2. Frequency of herbicide resistant LOLMU within tested populations

As expected, because of the design of the plant sampling where growers and agronomists were asked to inform control failures, most sampled populations were resistant to one or more of the tested herbicides. Only six out of 66 samples were susceptible to all the herbicides. However, this fact also suggests that some of the control failures that are indicated as resistance cases may be related to bad quality herbicide applications and/or applications on oversized weeds.

Resistance to glyphosate was determined in 80% of the populations, being the most frequent resistance observed in comparison with the other tested herbicides (Figure 3). The second herbicide to which LOLMU populations showed high resistance was IodoMeso, with 49% of screened populations. Selection of resistance in these populations can be explained by the use history of these herbicides in Uruguay. Because of its wide spectrum and high efficacy, glyphosate is the most used herbicide in Uruguay and around the world. Additionally, the agricultural systems of Uruguay highly rely on glyphosate for weed control, mainly due to the prevailing sowing method (direct drilling) (Ernst and Siri-Prieto, 2011) and the high adoption of glyphosate resistant crops (Ríos et al., 2008). This high reliance on glyphosate is reflected on the information that farmers and technicians provided from the surveyed fields in this study. In most of these fields, glyphosate had been applied for 5 or more years and with a frequency of 3 or more times per year (Supplementary material S3).

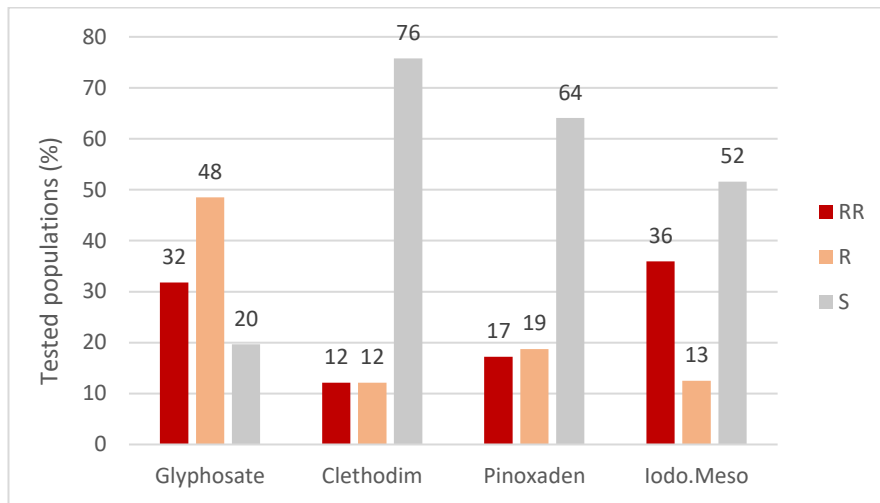


Figure 3. Frequencies of populations classified as highly resistant (RR), resistant (R) and susceptible (S) to glyphosate, clethodim, pinoxaden and iodosulfuron/mesosulfuron herbicides.

Wheat and barley have been historically the most important winter crops in Uruguay (MGAP-DIEA, 2020) and selective post emergence herbicides like IodoMeso and pinoxaden are widely used in these crops to control late seed germination and emergence fluxes of LOLMU and wild oat, among other grasses. IodoMeso is a mixture of two ALS inhibitors while pinoxaden is an ACCase inhibitor generally formulated together with the crop safener cloquintocet-methyl. Additionally, pyroxsulam, flucarbazone and clodinafop-propargil, complete the list of herbicides registered in Uruguay for selective LOLMU control in post emergence of the wheat crop. All these herbicides belong to either the ALS or ACCase inhibitors group which makes evident the traditionally lack of diversity on herbicide's MOAs for LOLMU control in winter crops in the country.

Furthermore, fifty-four percent of the samples were collected from fields growing winter cereal crops at the time of collection (data not shown), where IodoMeso and pinoxaden are regularly used. This may contribute to explain why IodoMeso and pinoxaden resistant populations were more frequent than clethodim resistant ones (Figure 3). These results are consistent with the well-known concept that higher

frequencies and history of use of the same herbicide increases the selection pressure and the risk of herbicide resistance evolution in weeds (Powles and Yu, 2010; Beckie, 2006).

Some populations categorized as susceptible 28 DAT with 1x doses showed to have significantly lower mortality than the known susceptible population at 1/2x doses (Table 2). This result suggests that these populations are in the process of developing or evolving resistance to these herbicides and that the low level of clethodim resistance is being selected in 22% of the sampled populations. This process can result due to the selection of phenotypes at low herbicide doses, in which minor genes that confer low levels of resistance are selected but at high application rates plants do not survive (Busi et al., 2013). Sub-doses are not usually intentional, as many factors can reduce the herbicide concentration that arrives to the plant and site of action, such as weather conditions or the size and growth stages of weeds at the time of spraying. The importance of recurrent sub-doses selection lies in the ability of cross-pollinated species to combine minor resistant genes by recombination leading to high levels resistance in few generations (Yu and Powles, 2014). Once these low resistance conferring genes begin to stack in individual plants by cross pollination, resistance within the population becomes evident and it is favored if the selection pressure continues.

Table 2. Number of populations categorized as susceptible at the recommended label dose (1x) for each herbicide but that exhibited significantly lower mortality than the known susceptible population at 28 DAT at half the recommended label dose (1/2x).

<i>Herbicide</i>	<i>N of populations and percentage of tested populations</i>
Glyphosate	7 (10.6 %)
Clethodim	15 (22.7 %)
Pinoxaden	1 (1.6 %)
IodoMeso ¹	5 (7.8 %)

¹ Iodosulfuron/Mesosulfuron mixture

2.5.3. Multiple resistance patrons and correlation between resistance to tested herbicides

Multiple herbicide resistance has been widely reported in *Lolium* spp. populations around the world (Anthimidou et al., 2020; Singh et al., 2020; Zangeneh et al., 2018; Vargas et al., 2016; Salas et al., 2013). The fact that LOLMU is an allogamous cross-pollinated species makes multiple resistance likely to evolve, as resistant alleles can add up by recombination (Délye et al., 2013; Neve and Powles, 2005). In this survey, approximately half (52%) of the screened populations were classified as resistant to two or more herbicides and 39% were resistant only to one of the tested herbicides (Figure 4). From the populations resistant to a single herbicide, the majority were resistant only to glyphosate (20 of 31, data not shown). The most frequent multiple herbicide resistant pattern corresponded to populations exhibiting resistance to both glyphosate and IodoMeso (11 out of 33), followed by populations that survived to the application of the four herbicides tested (10 out of 33) (Figure 5). This shows an important and challenging occurrence of multiple herbicide resistance to the most commonly used herbicides in winter crops during post emergence applications for LOLMU control. The negative impact of the evolution of multiple resistant populations to different modes of action herbicides lies in the difficulty of chemical weed management strategies with fewer alternatives which in general are not as efficient or more expensive (Norsworthy et al., 2012).

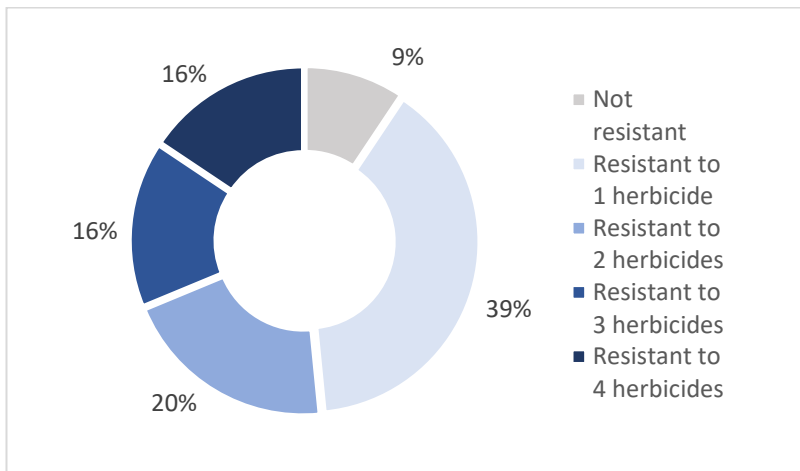
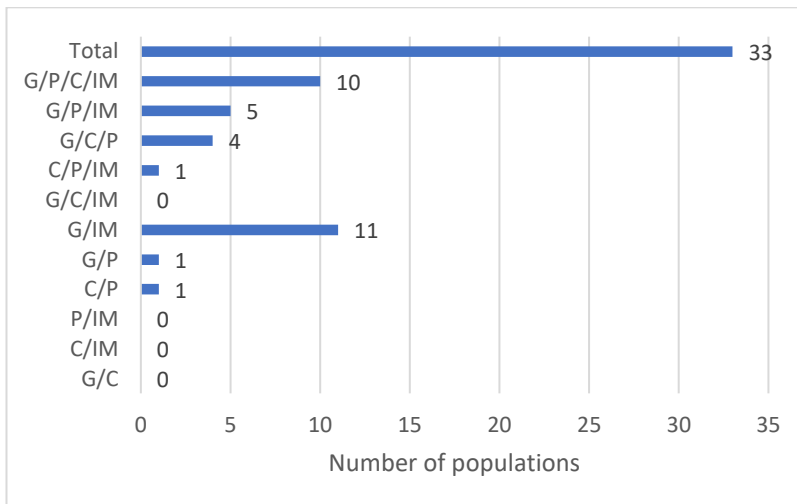


Figure 4. Frequency of resistance accumulation to glyphosate, clethodim, pinoxaden and iodosulfuron/mesosulfuron on 64 *Lolium multiflorum* populations sampled on agricultural fields from Uruguay. Populations were categorized as resistant if mortality 28 days after treatment at the recommended label dose was lower than 80%.



Abbreviations used: G: glyphosate, C: clethodim, P: pinoxadaen, IM: iodosulfuron-mesosulfuron.

Figure 5. Resistance patterns of populations that resisted more than one herbicide. Populations were categorized as resistant if mortality 28 days after treatment at the recommended label dose was lower than 80%.

A better characterization of the herbicide resistant populations was achieved with the resistance score (RS) proposed by Neve and Powles (2005). This score improves the resistance characterization made only with either plant mortality or growth reduction evaluation. It better represents cases where the relative biomass was low (similar to S population) but showed regrowth at the moment of evaluation; or cases where plants quickly accumulated biomass early after emergence and died slowly, but that were eventually dead at the moment of evaluation. The RS ranking also allowed for easy identification of resistant populations that did not even reduce their growth (biomass), suggesting strong resistance mechanisms in these highly resistant populations.

Correlation between RS for each pair of herbicides (Table 3) showed that resistance to clethodim and pinoxaden are highly associated ($R^2 = 0.84$). High correlations between resistance to different herbicides could be due to cross-resistance or a simultaneous selection processes in the same population due to similar history and frequency of use for both herbicides in a specific field. Until further identification of the resistance mechanism/s involved, it is difficult to unequivocally explain this high correlation. However, cross-resistance between these two ACCase inhibitors herbicides has been often reported. Beckie and Tardif (2012), reviewed mutations in the ACCase enzyme that confer cross-resistance, indicating that Ile1781Leu, Asp2078Gly and Cys2088Arg mutations in *Lolium* spp. confer resistance to herbicides of the three chemical families within the ACCase inhibitors. Cross resistance has important productive impacts as selection made by one herbicide compromises the efficacy of other herbicides that are not commonly applied on a specific field. It is likely that indiscriminate use of one of these ACCase inhibitors will select for resistant biotypes to both herbicides. The high association of resistance to these herbicides of the same MOA support one of the main recommendations for delaying herbicides resistance: rotation of herbicides with different site of action (SOA) (Busi et al 2019; Norsworthy et al., 2012).

This finding is critical for the design of weed management strategies since growers are inadvertently selecting for cross resistance to two of the most commonly used herbicides to control glyphosate resistant populations. Glyphosate resistant *Lolium* spp. populations are commonly sprayed during the fallow period or soybean cycle with clethodim. However, this work shows that by doing so, farmers are also compromising the efficacy of pinoxaden for controlling LOLMU during the winter cereals cycles and vice versa.

Table 3. Determination coefficients (R^2) between population's resistance scores for each pair of herbicides tested.

	Glyphosate	Clethodim	Pinoxaden	IodoMeso ¹
Glyphosate	1	0.003	0.015	0.003
Clethodim	-	1	0.839	0.097
Pinoxaden	-	-	1	0.037
IodoMeso ¹	-	-	-	1

¹Iodosulfuron/mesosulfuron mixture.

Farmers' answers to the questions gave an indication of their perception of the resistance issue in each field. For each sampled field, a comparison between the resistance pattern determined by the herbicide screening and the perception of the farmer was made. This comparison suggests that farmers are highly aware of glyphosate resistance as 93% of the populations categorized as glyphosate resistant were indicated to be so by the farmer. However, awareness of resistance to the rest of the herbicides, was between 24 to 44% (Supplementary material S4). This misperception could imply that multiple herbicide resistance is being selected inadvertently and consequently the ongoing loss of herbicide options is at imminent risk.

Herbicide resistant LOLMU populations are a growing concern because as a cross pollinated species adapted to almost all Uruguayan territory, multiple herbicide resistance can increase rapidly affecting large areas. The loss of chemical control efficiency could lead to an increase in production costs and higher risks of negative environmental impact. Additionally, LOLMU is also cultivated for livestock forage and seed multiplication and commercialization of LOLMU cultivars can be affected by the potential risk of seed lots contamination with resistant seeds and/or genes. Although further studies of resistance mechanisms are needed for better understanding of herbicide resistance evolution, the results of the present study represent the first detailed characterization of herbicide resistance in LOLMU populations of Uruguay and provide an overview of this issue in agricultural fields in this country. It shows herbicide resistant LOLMU to be widely distributed in Uruguay's agricultural land and that multiple herbicide resistance is evolving and can quickly escalate if better management practices are not adopted.

2.6. CITED LITERATURE

Aapresid (Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa) (2020) Mapa Lolium spp. RG 2019. Mapas de malezas - REM (Red de conocimiento en Malezas resistentes). https://www.aapresid.org.ar/rem-malezas/#tipo_mapa=abundancia_maleza&maleza%5B%5D=lolium-sp-rg

Anthimidou E, Ntoanidou S, Madesis P, Eleftherohorinos I (2020) Mechanisms of *Lolium rigidum* multiple resistance to ALS-and ACCase-inhibiting herbicides and their impact on plant fitness. *Pestic Biochem Physiol*, 164: 65-72.

Beckie HJ (2006) Herbicide-resistant weeds: Management tactics and practices. *Weed technol* 20(3): 793-814.

Beckie HJ, Tardif FJ (2012) Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Prot* 35: 15-28.

- Boutsalis P, Gill GS, Preston C (2012) Incidence of herbicide resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) across southeastern Australia. *Weed Technol* 26(3): 391-398.
- Busi R, Powles SB, Beckie HJ, Renton M (2019) Rotations and mixtures of soil-applied herbicides delay resistance. *Pest Manage Sci* 76(2): 487-496.
- Busi R, Neve P, Powles S (2013) Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. *Evol Appl* 6(2): 231-242.
- Délye C, Jasieniuk M, Corre V (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends Genet* 29(11): 649-658.
- Ernst O, Siri-Prieto G (2011) La agricultura en Uruguay: Su trayectoria y consecuencias. Pages 149-163 in *Proceedings of the II Simposio Nacional de Agricultura*, Paysandú, Uruguay.
- Félix E, Urioste S (2016) Primer reporte de resistencia a glifosato en poblaciones de *Lolium multiflorum* Lam. en Uruguay y susceptibilidad de estas a herbicidas inhibidores de la Accasa. Undergraduate Thesis. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 43 p
- Gigón R, Vigna M, Yanniccari M (2017) Manejo de malezas problema: Raigrás (*Lolium spp.*). Bases para su manejo y control en sistemas de producción. Rem-Aapresid. <https://www.aapresid.org.ar/rem/manejo-de-malezas-problema-raigras-lolium-spp/>
- Heap I (2021) The International Herbicide-Resistant Weed Database. www.weedscience.org
- Loureiro I, Escorial C, Plaza EH, Andújar JLG, Chueca MC (2017) Current status in herbicide resistance in *Lolium rigidum* in winter cereal fields in Spain: Evolution of resistance 12 years after. *Crop prot*, 102: 10-18.

- [MGAP-DIEA] Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca - Dirección de Estadísticas Agropecuarias (2020) Encuesta Agrícola "Invierno 2020". Informe N° 362. p 14
- Neve P, Powles S (2005) Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Theor Appl Genet* 110(6): 1154-1166.
- Norsworthy JK, Ward SM, Shaw DR, Llewellyn RS, Nichols RL, Webster TM, Bradley KW, Frisvold G, Powles SB, Burgos NR, others (2012) Reducing the risks of herbicide resistance: Best management practices and recommendations. *Weed Sci* 60(SP1): 31-62.
- Owen MJ, Martinez NJ, Powles SB (2014) Multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* (annual ryegrass) now dominates across the Western Australian grain belt. *Weed Res* 54(3): 314-324.
- Owen MJ, Walsh MJ, Llewellyn RS, Powles SB (2007) Widespread occurrence of multiple herbicide resistance in Western Australian annual ryegrass (*Lolium rigidum*) populations. *Aust J Agri Res* 58(7): 711-718.
- Powles SB, Yu Q (2010) Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annu Rev Plant Biol* 61(1): 317-347.
- R Core Team. (2020). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rauch TA, Thill DC, Gersdorf SA, Price WJ (2010) Widespread occurrence of herbicide-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Northern Idaho and Eastern Washington. *Weed Technol* 24(3): 281-288.
- Ríos A, García M, Belgeri A, Caulin M, Mailhos V, San Roman G. 2008. Comunidades de malezas asociadas a los sistemas de siembra directa en Uruguay. Pages 135-142 *in* Congreso de la Sociedad Española de Malherbología. Albacete, España.

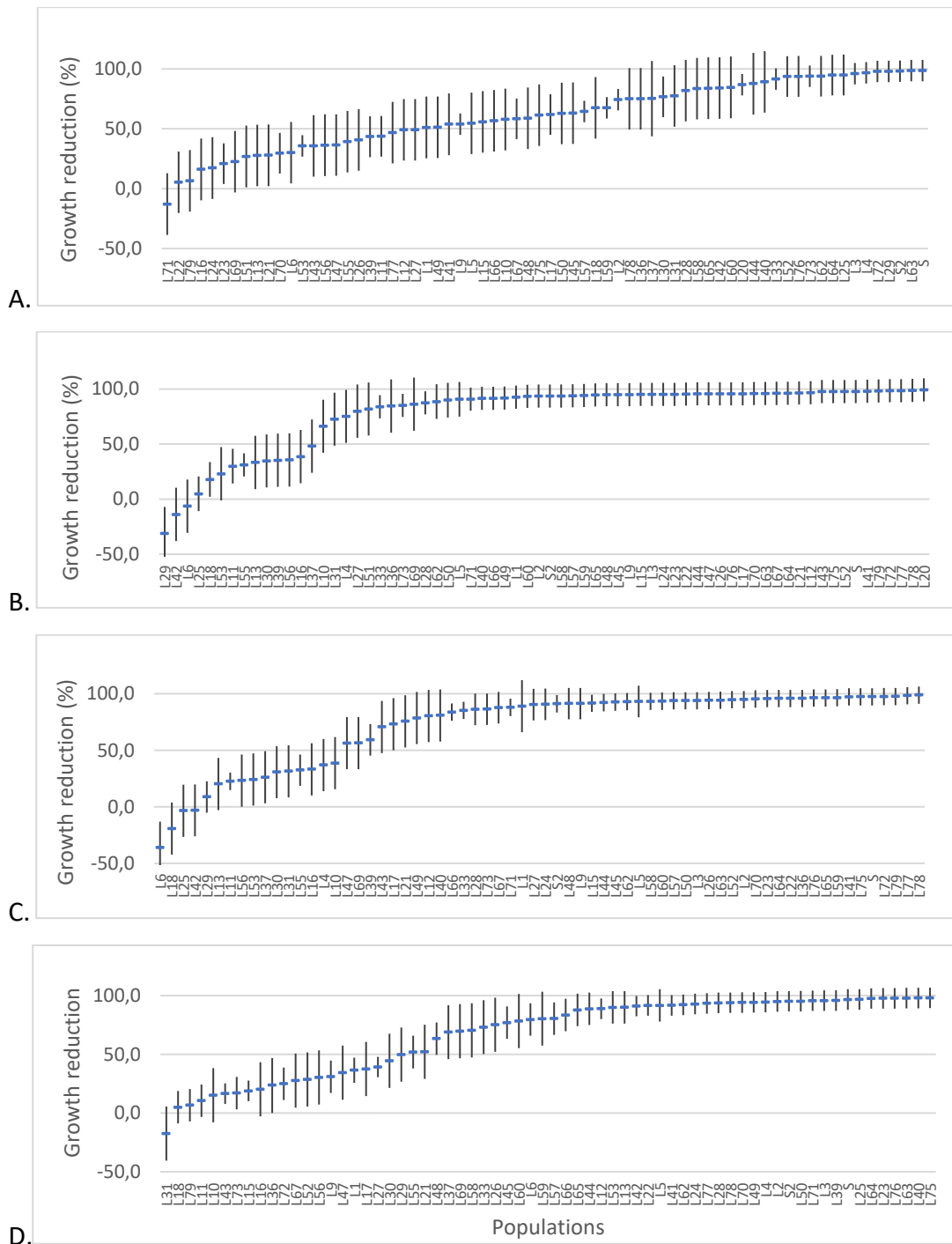
- Salas R, Burgos N, Mauromoustakos A, Lassiter R, Scott R, Alcober E (2013) Resistance to ACCase and ALS inhibitors in *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* in the United States. *J Crop and Weed*, 9: 168-183.
- Singh V, Maity A, Abugho S, Swart J, Drake D, Bagavathiannan M (2020) Multiple herbicide-resistant *Lolium* spp. Is prevalent in wheat production in Texas Blacklands. *Weed Technol* 34(5): 652 - 660
- Takano HK, Ovejero RFL, Belchior GG, Maymone GPL, Dayan FE (2021) ACCase-inhibiting herbicides: Mechanism of action, resistance evolution and stewardship. *Sci Agri* 78(1).
- Vargas L, Henckes J, Schmitz M, Piasecki C, Cechin J, Torchelsen J, Agostinetto D (2018) Caracterização e manejo de azevém (*Lolium multiflorum* L.) resistente a herbicidas em áreas agrícolas. *Plantio Direito y Tecnologia Agrícola* 162: 15-19.
- Vargas L, Adegas F, Gazziero D, Karam D, Agostinetto D, da Silva, W (2016) de plantas daninhas a herbicidas no Brasil: Histórico, distribuição, impacto econômico, manejo e prevenção. Pages 219-239 *in* Meschede DK, Gazziero DLP, ed. *A era glyphosate: agricultura, meio ambiente e homem*. Londrina: Midiograf II.
- [WSSA] Weed Science Society of America (1998) "Herbicide Resistance" and "Herbicide Tolerance" Defined. *Weed Technol* 12(4): 789-789.
- Yu Q, Powles S (2014) Metabolism-Based Herbicide Resistance and Cross-Resistance in Crop Weeds: A Threat to Herbicide Sustainability and Global Crop Production. *Plant Physiol* 166(3): 1106-1118.
- Zangeneh HS, Chamanabad HM, Zand E, Asghari A, Alamisaeid K, Travlos I, Alebrahim M (2018) Cross-and Multiple Herbicide Resistant *Lolium rigidum* Gaud.(Rigid Ryegrass) Biotypes in Iran. *J Agr Sci Tech* 20: 1187-1200.

2.7. SUPPLEMENTARY MATERIAL

S1. Questionnaire sent to farmers/technician for each field sampled

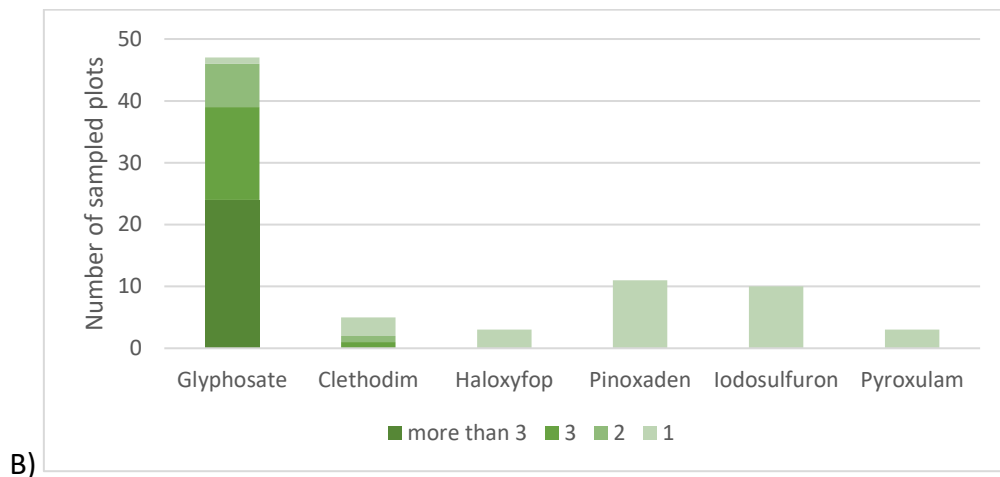
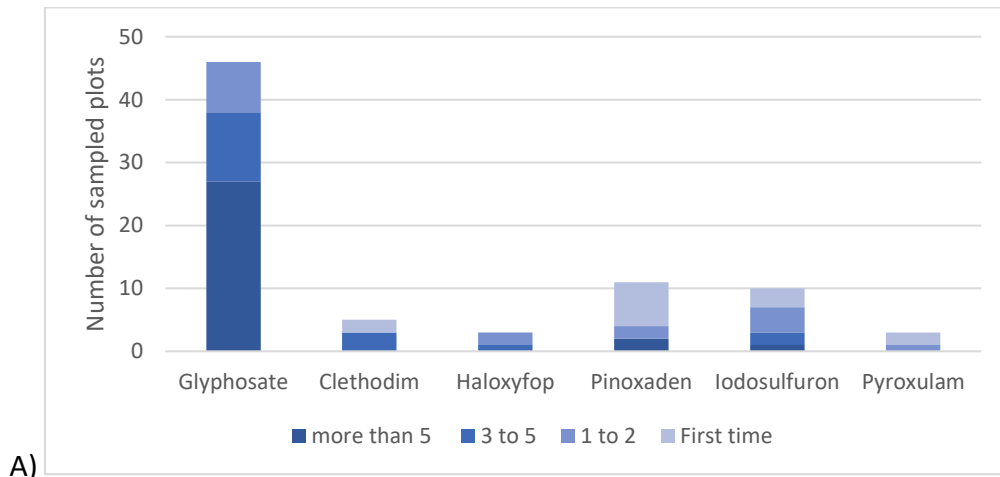
Questions	Options
1. Field tenure	<i>a. Own</i> <i>b. Leased</i>
2. For how long have you managed this field?	<i>a. 1 year or less</i> <i>b. 2 - 4 years</i> <i>c. more than 4 years</i>
3. In case of direct sowing, how many years have you been using this sowing method?	
4. Which of the following active ingredients do you consider have failed to control ryegrass in this field?*	<i>a. Glyphosate</i> <i>b. Clethodim</i> <i>c. Haloxifop</i> <i>d. Pinoxaden</i> <i>e. Iodosulfuron</i> <i>f. Pyroxulam</i>
4.1. How long have you been using these active ingredients in this field?	<i>a. First time</i> <i>b. 1-2 years</i> <i>c. 3-5 years</i> <i>d. More than 5 years</i>
4.2. How many times per year do you apply these active ingredients?	<i>a. 1</i> <i>b. 2</i> <i>c. 3</i> <i>d. more than 3</i>
4.3. For how long have you been observing ryegrass survival after applying these active ingredients?	<i>a. First time</i> <i>b. 1-2 years</i> <i>c. 3-4 years</i> <i>d. More than 4 years</i>
5. Have you ever increased the dose you usually sprayed because of previous control failure?	<i>a. No</i> <i>b. Sometimes</i> <i>c. Yes</i>
6. Crop sequence	
7. Do you use some of these practices to control Ryegrass?	<i>a. Active ingredient rotation</i> <i>b. Row distance reduction</i> <i>c. Machinery cleaning</i> <i>d. Ocassional tilling</i> <i>e. Changes in planting date</i> <i>f. Changes in crop rotation</i> <i>g. Other:</i>

* This question was asked three times so that users were able to answer up to three active ingredients with which they were having problems



S2. Growth reduction 28 DAT in *Lolium multiflorum* populations treated with the recommended label dose (1x) of glyphosate (A), clethodim (B), pinoxaden (C) and iodosulfuron/mesosulfuron mixture (D). Small dashes represent the average wait of

aerial biomass in three pots containing 15 plants each and error bars indicate the range from lower to upper 95% confidence limit.



S3. Farmer's answers (n = 51 fields) on: Number of years the field received the herbicide that fails to control *Lolium multiflorum* (problem herbicide) (A) and number of times per year the problem herbicide is regularly applied (B).

S4. Percentage of the tested *Lolium multiflorum* populations that were perceived to be resistant by farmers and that were categorized as resistant after the screening for each herbicide (n = 51).

<i>Herbicide</i>	<i>Number of populations categorized as resistant</i>	<i>Number of populations indicated as resistant in the form</i>	<i>Perception (%)</i>
Glifosato	42	39	93
Clethodim	11	4	36
Pinoxaden	16	7	44
IodoMeso ¹	21	5	24

¹Iodomesosulfuron-mesosulfuron mixture.

3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo cumplió con los objetivos de obtener una colección de semillas de poblaciones de LOLMU resistentes a herbicidas, caracterizar su nivel y patrones de resistencia a los cuatro herbicidas postemergentes más utilizados para el control de esta maleza en el país, y representar su distribución geográfica. Los resultados describen un problema que es percibido por productores, técnicos e investigadores, pero que carecía de una caracterización formal y metódica. Si bien el muestreo no fue aleatorio y por lo tanto no puede tomarse como una estimación de la frecuencia de la resistencia a herbicidas en las poblaciones de LOLMU maleza del país, cabe destacar que el muestreo dirigido permitió detectar casos de resistencia múltiple en poblaciones de esta maleza que resistieron a los cuatro herbicidas testados (3 modos de acción). En este sentido el diseño del muestreo cumplió con el objetivo de identificar los casos más problemáticos, ya que es probable que productores y técnicos con casos más severos de resistencia y con la urgencia de diseñar un plan de mitigación para esta problemática, fueran más sensibles al pedido de identificar las chacras y brindar la información correspondiente. Sin embargo, la metodología basada en la identificación de las chacras por parte de actores del sector productivo pudo afectar la cantidad de chacras muestreadas en algunas zonas agrícolas del país. Esto probablemente determinó que los departamentos de Paysandú y Río Negro quedaran subrepresentados en el muestreo si consideramos el área agrícola en estos departamentos.

Las poblaciones resistentes caracterizadas en este relevamiento muestran una clara conexión con la historia e intensidad de uso de herbicidas, indicado como el factor principal en determinar la evolución de poblaciones resistentes. En Uruguay, donde el cultivo de cereales de invierno tiene una gran tradición y la siembra directa es altamente utilizada, era esperable encontrar poblaciones resistentes a glifosato y a herbicidas post-emergentes selectivos para trigo y cebada. La resistencia de LOLMU a estos herbicidas tiene un gran impacto a nivel productivo ya que complejiza el

diseño de estrategias de control, haciendo necesaria la rotación y mezclas con herbicidas de otros modos de acción a veces menos eficaces. Las alternativas se reducen aún más en los casos de resistencia múltiple. Este tipo de resistencia en LOLMU es una amenaza importante para los sistemas agrícolas de nuestro país ya que se trata de una especie alógama muy adaptada en todo el territorio y que además es utilizada en sistemas ganaderos como alternativa forrajera.

El reconocimiento y la caracterización temprana de resistencia a herbicidas es fundamental para retrasar su evolución, siendo este trabajo una alerta clara para el país en el cual se pone de manifiesto la importancia de practicar un manejo realmente integrado para el control de malezas. Es necesario planificar rotaciones y mezclas criteriosas de diferentes modos de acción antes de que la resistencia múltiple se generalice, así como integrar lo más posible prácticas de control culturales y mecánicas según cada caso particular. Los datos relevados deberían promover la rotación de los herbicidas comúnmente usados con otros modos de acción, como pueden ser algunos herbicidas pre-emergentes, así como también la inclusión de otras herramientas no químicas, antes de que se agoten las alternativas más eficientes. Para esto es importante que los actores del sector productivo perciban correctamente el problema y estén dispuestos a accionar pensando en el mediano y largo plazo. Las respuestas al cuestionario realizado a los productores sugieren que la percepción de la resistencia varía según el herbicida. Aunque el análisis de las respuestas se basó en los 51 formularios devueltos, sugiere que existen algunas dificultades en la percepción del problema, ya sea por fallas en el diagnóstico o por una selección de resistencia cruzada que no es correctamente advertida. Este tipo de resistencia complejiza aún más el manejo de poblaciones resistentes ya que puede significar la sobrevivencia de plantas a herbicidas a los que pocas veces o nunca estuvo expuesta, incluso herbicidas que no han salido aún al mercado. En este sentido, los mecanismos de resistencia más peligrosos de seleccionar serían aquellos ajenos a la inhibición específica del sitio de acción ya que podría generar resistencia cruzada a herbicidas de diferente modo de acción. Estos mecanismos suelen estar

explicados por varios genes menores que se pueden acumular por recombinación y generar poblaciones altamente resistentes. La selección de estos genes menores se puede dar con la aplicación de subdosis, muchas veces no intencionales, que seleccionan plantas con bajos niveles de resistencia. Esto podría contribuir a explicar los resultados a la mitad de la dosis recomendada de etiqueta (1/2x), donde algunas poblaciones categorizadas como susceptibles a la dosis 1x presentaron mayor sobrevivencia que la población S a 1/2x indicando que el proceso de selección por resistencia se está desarrollando. En este contexto, se debe resaltar la importancia de la calidad de las aplicaciones de herbicidas y el momento de aplicación respecto al desarrollo de las malezas para evitar favorecer la selección de este tipo de genes menores.

Un banco de germoplasma de poblaciones de LOLMU resistentes inicialmente caracterizadas, georreferenciadas y con información básica de la historia de chacra donde fueron colectadas, constituyen un legado no menor de este trabajo, que puede ser utilizado en futuros proyectos de investigación. La información generada por este trabajo establece un punto de partida para el futuro monitoreo de la evolución y dispersión de la resistencia a herbicidas en el país.

Paralelamente a la contribución en información que realiza este trabajo, aún quedan muchas incógnitas que responder relativas a la problemática de resistencia a herbicidas. La primer interrogante que surge de este trabajo sería la de conocer cuáles son los mecanismos de resistencia que están presentes en estas poblaciones. Esta información es clave para desarrollar estrategias de prevención y mitigación de la problemática de resistencia a herbicidas.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Aapresid (Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa). 2020. Mapa Lolium spp. RG 2019. Mapas de malezas - REM (Red de conocimiento en Malezas resistentes). [en línea]. 15 junio 2020 Disponible en: https://www.aapresid.org.ar/rem-malezas/#tipo_mapa=abundancia_maleza&maleza%5B%5D=lolium-sp-rg
- Acciaresi H, Picapietra G. 2018. Malezas mes a mes. Raygrass annual. [en línea]. 12 abril 2020. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/raygrass-anual-lolium-multiflorum>
- Acciaresi HA, Chidichimo HO, Sarandón SJ. 2001. Traits Related to Competitive Ability of Wheat (*Triticum aestivum*) Varieties Against Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Biological Agriculture and Horticulture*, 19(3): 275-286.
- Arregui C, Puricelli E. 2014. Sitio de acción de los herbicidas. En: Fernández OA, Leguizamón ES, Acciaresi HA. Malezas e invasoras de la Argentina. Tomo I: Ecología y Manejo. Bahía Blanca: Ediuns. (1.^a ed.) 964p.
- Beckie HJ. 2006. Herbicide-resistant Weeds: Management Tactics and Practices. *Weed Technology*, 20(3): 793-814. doi: <https://doi.org/10.1614/WT-05-084R1.1>
- Beckie HJ, Heap I, Smeda RJ, Hall LM. 2000. Screening for Herbicide Resistance in Weeds. *Weed Technology*, 14(2): 428-445. doi: [https://doi.org/10.1614/0890-037X\(2000\)014\[0428:SFHRIW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0890-037X(2000)014[0428:SFHRIW]2.0.CO;2)
- Bergelson J, Purrington CB. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *American Naturalist*, 148(3): 536-558.
- Boutsalis P, Gill GS, Preston C. 2012. Incidence of Herbicide Resistance in Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) Across Southeastern Australia. *Weed Technology*, 26(3): 391-398. doi: <https://doi.org/10.1614/WT-D-11-00150.1>

- Burgos NR, Tranel PJ, Streibig JC, Davis VM, Shaner D, Norsworthy JK, Ritz C. 2013. Confirmation of Resistance to Herbicides and Evaluation of Resistance Levels. *Weed Science*, 61(1): 4-20. doi: <https://doi.org/10.1614/WS-D-12-00032.1>
- Busi R, Powles SB, Beckie HJ, Renton M. 2019. Rotations and Mixtures of Soil-Applied Herbicides Delay Resistance. *Pest Management Science*, 76(2): 487-496. doi: 0.1002/ps.5534
- Busi R, Neve P, Powles S. 2013. Evolved Polygenic Herbicide Resistance in *Lolium rigidum* by Low-dose Herbicide Selection Within Standing Genetic Variation. *Evolutionary Applications*, 6: 231-242.
- Davis VM, Gibson KD, Johnson WG. 2008. A Field Survey to Determine Distribution and Frequency of Glyphosate-resistant Horseweed (*Conyza canadensis*) in Indiana. *Weed Technology*, 22(2): 331-338. doi: <https://doi.org/10.1614/WT-07-147.1>
- Della Valle EA., Ferrari JF. 2011. Susceptibilidad de *Lolium multiflorum* Lam. a aplicaciones de glifosato en rastrojos de cultivos de verano. Tesis de grado. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 85 p.
- Délye C, Jasieniuk M, Corre V. 2013. Deciphering the Evolution of Herbicide Resistance in Weeds. *Trends in Genetics*, 29(11): 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.001>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2020a. Encuesta Agrícola Primavera 2020. [en línea]. 06 marzo 2021. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/diea-presenta-resultados-encuesta-agricola-primavera-2020>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2020b. Encuesta Agrícola Invierno 2020. [en línea]. 06 marzo 2021. Disponible en:

<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/diea-presenta-resultados-encuesta-agricola-invierno-2020>

Diez de Ulzurrun P. 2013. Manejo de malezas problema: Modos de acción herbicida. REM-Aapresid, 52. [en línea]. 8 mayo 2019. Disponible en: <https://www.aapresid.org.ar/rem/publicacion-rem-sobre-modos-de-accion-herbicida/>

Duggleby RG, Pang SS. 2000. Acetohydroxyacid synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1): 1-36.

Duke SO, Baerson SR., Rimando AM. 2003. Glyphosate. *Encyclopedia of Agrochemicals*. doi: <https://doi.org/10.1002/047126363X.agr119>

Félix E, Urioste S. 2016. Primer reporte de resistencia a glifosato en poblaciones de *Lolium multiflorum* Lam en Uruguay y susceptibilidad de estas a herbicidas inhibidores de la Accasa. Tesis de grado. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 43 p.

Gaines TA, Duke SO, Morran S, Rigon CA, Tranel PJ., Küpper A, Dayan FE. 2020. Mechanisms of Evolved Herbicide Resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 295(30): 10307-10330. doi: 10.1074/jbc.REV120.013572.

Gigón R, Vigna M, Yannicari M. 2017. Manejo de malezas problema: Raigrás (*Lolium* spp.). Bases para su manejo y control en sistemas de producción. [en línea]. 15 febrero 2019. Disponible en: <https://www.aapresid.org.ar/rem/manejo-de-malezas-problema-raigras-lolium-spp/>

Gressel J. 2009. Evolving Understanding of the Evolution of Herbicide Resistance. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(11): 1164-1173. doi: 10.1002/ps.1842

Gressel J. 2002. *Molecular Biology of Weed Control*. Boca Raton, Florida, United States of America. CRC Press. 504p

- Hanson BD, Wright SD, Sosnoskie LM, Fischer A, Jasieniuk M, Roncoroni JA, Hembree KJ, Orloff S, Shrestha A, I-Khatib K. 2014. Maintaining Long-term Management: Herbicide-resistant Weeds Challenge Some Signature Cropping Systems. *California Agriculture*, 68(4): 142-152.
- Heap I. 2021. The International Herbicide-Resistant Weed Database. [en línea]. 29 abril 2021. Disponible en: www.weedscience.org
- HRAC (Herbicide Resistance Action Comitee). 2020. HRAC Mode of Action Classification 2020. [en línea]. 7 agosto 2020. Disponible en: [https://hracglobal.com/files/HRAC Revised MOA Classification Herbicides Poster.png](https://hracglobal.com/files/HRAC_Revised_MOA_Classification_Herbicides_Poster.png)
- Inda-Aramendía LAI. 2005. El género *Lolium*: Claves dicotómicas. *Revista Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza*, 60: 143-155.
- Jasieniuk M, Brûlé-Babel AL, Morrison IN. 1996. The Evolution and Genetics of Herbicide Resistance in Weeds. *Weed Science*, 44(1): 176-193.
- Jensen PK. 2010. Longevity of Seeds of *Poa pratensis* and *Lolium perenne* as Affected by Simulated Soil Tillage Practices and its Implications for Contamination of Herbage seed crops. *Grass and Forage Science*, 65(1): 85-91.
- Kogan M, Pérez J. 2003. *Herbicidas: Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción*. Santiago de Chile, Chile. Universidad Católica de Chile. 147p
- Lodovichi MV. 2018. Modelado poblacional del raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) en cultivos de trigo de la región semiárida. Tesis de Doctorado. Bahía Blanca, Argentina. Universidad Nacional del Sur. 141p
- Loureiro I, Escorial C, Plaza EH, Andújar JLG., Chueca MC. 2017. Current Status in Herbicide Resistance in *Lolium rigidum* in Winter Cereal Fields in Spain: Evolution of Resistance 12 Years After. *Crop Protection*, 102: 10-18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.08.001>

- Malone J, Boutsalis P, Baker J, Preston C. 2014. Distribution of Herbicide-resistant Acetyl-coenzyme A Carboxylase Alleles in *Lolium rigidum* Across Grain Cropping Areas of South Australia. *Weed Research*, 54(1): 78-86.
- Moss S, Clarke J, Blair A, Culley T. 1999. The Occurrence of Herbicide-resistant Grass-weeds in the United Kingdom and a New System for Designating Resistance in Screening Assays. *Brighton Crop protection Conference Weeds*, 3: 179-184.
- Neve P, Powles S. 2005. Recurrent Selection with Reduced Herbicide Rates Results in the Rapid Evolution of Herbicide Resistance in *Lolium rigidum*. *Theoretical and Applied Genetics* 110(6): 1154-1166.
- Norsworthy JK, Ward SM, Shaw DR, Llewellyn RS, Nichols RL, Webster TM, Bradley KW, Frisvold G, Powles SB, Burgos NR, Jason K. 2012. Reducing the Risks of Herbicide Resistance: Best Management Practices and Recommendations. *Weed Science*, 60(SP1):31-62. doi:10.1614/WS-D-11-00155.1
- Owen MJ, Martinez NJ, Powles SB. 2014. Multiple Herbicide-resistant *Lolium rigidum* (Annual Ryegrass) Now Dominates Across the Western Australian Grain Belt. *Weed Research*, 54(3): 314-324. doi: <https://doi.org/10.1111/wre.12068>
- Owen MJ, Walsh MJ, Llewellyn RS, Powles SB. 2007. Widespread Occurrence of Multiple Herbicide Resistance in Western Australian Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*) Populations. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(7): 711-718.
- Powles SB, Yu Q. 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1): 317-347. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112119
- Rauch TA, Thill DC, Gersdorf SA, Price WJ. 2010. Widespread Occurrence of herbicide-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Northern Idaho and Eastern Washington. *Weed Technology*, 24(3): 281-288. doi: <https://doi.org/10.1614/WT-D-09-00059.1>

- Rigon C, Gaines T, Kuepper A, Dayan F. 2020. Metabolism-Based Herbicide Resistance, the Major Threat Among the Non-Target Site Resistance Mechanisms. *Outlooks on Pest Management*, 31: 162-168. doi:https://doi.org/10.1564/v31_aug_04
- Ríos A, García M, Belgeri A, Caulin M, Mailhos V, San Roman G. 2008. Comunidades de malezas asociadas a los sistemas de siembra directa en Uruguay. En: Congreso de la Sociedad Española de Malherbología. Albacete, España. 135-142.
- Shields EJ, Dauer JT, VanGessel MJ, Neumann G. 2006. Horseweed (*Conyza canadensis*) Seed Collected in the Planetary Boundary Layer. *Weed Science*, 54(6): 1063-1067.
- Singh V, Maity A, Abugho S, Swart J, Drake D, Bagavathiannan M. 2020. Multiple Herbicide-resistant *Lolium* spp. Is Prevalent in Wheat Production in Texas Blacklands. *Weed Technology*, 34(5): 652-660 doi:<https://doi.org/10.1017/wet.2020.23>
- Sprankle P, Meggitt WF, Penner D. 1975. Absorption, Action, and Translocation of Glyphosate. *Weed Science*, 23(3):235-240.
- Taberner A, Cirujeda A, Zaragoza C. 2007. Manejo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas. 100 preguntas sobre resistencias. Roma, Italia. FAO. 26p.
- Takano HK, Ovejero RFL, Belchior GG, Maymone GPL., Dayan FE. 2021. ACCase-inhibiting Herbicides: Mechanism of Action, Resistance Evolution and Stewardship. *Scientia Agricola*, 78(1): 1-9. doi: 10.1590/1678-992X-2019-0102
- Vargas L, Henckes J, Schmitz M, Piasecki C, Cechin J, Torchelsen J, Agostinetto D. 2018. Caracterização e manejo de azevém (*Lolium multiflorum* L.) resistente a herbicidas em áreas agrícolas. *Revista Plantio Direto & Tecnologia Agrícola*, 28 (162): 15-19.

- Vargas L, Adegas F, Gazziero D, Karam D, Agostinetto D, da Silva W. 2016a. Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil: Histórico, distribuição, impacto econômico, manejo e prevenção. En: Meschede, DK, Gazziero, DLP. A era glyphosate: agricultura, meio ambiente e homem. Londrina: Midiograf II. 219-239.
- Vargas L, Schneider, T, Agostinetto D, Bianchi M. 2016b. Geographic Distribution of Ryegrass Resistent to the Clethodim Herbicide in Rio Grande do Sul. *Planta Daninha*, 34(2): 365-376.
- Vigna MR, López R, Gigón R. 2013. Situación de la problemática y propuesta de manejo para Lolium y Avena fatua resistentes a herbicidas en el sur de Buenos Aires. En: Ríos A. Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. Montevideo, Uruguay. Serie técnica INIA No 204. 75-82
- Vila-Aiub M, Fischer A. 2014. Resistencia a herbicidas. En: Fernández OA, Leguizamón ES, Acciaresi HA. Malezas e invasoras de la Argentina. Tomo I: Ecología y Manejo. Bahía Blanca: Ediuns. (1.a ed., p. 964).
- Vila-Aiub M, Neve P, Powles SB. (2009). Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist*, 184: 751-767.
- WSSA (Weed Science Society of America). 2011. Lesson 3—Herbicide resistance management.[en línea]. 2 junio 2020. Disponible en: <http://wssa.net/wp-content/uploads/resistancemodules/three/index.htm>
- WSSA (Weed Science Society of America). 1998. “Herbicide Resistance” and “Herbicide Tolerance” Defined. *Weed Technology*, 12(4): 789-789. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00044766>
- Yanniccari M, Vila-Aiub M, Istilart C, Acciaresi H, Castro AM. 2016. Glyphosate Resistance in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) is Associated With a Fitness Penalty. *Weed Science*, 64(1): 71-79.

- Yanniccari M. 2014. Estudio fisiológico y genético de biotipos de *Lolium perenne* L. resistentes a glifosato. Tesis de Doctorado. La Plata, Argentina. Universidad Nacional de la Plata. 229p.
- Yu LPC, Kim YS, Tong L. 2010. Mechanism for the Inhibition of the Carboxyltransferase Domain of Acetyl-coenzyme A Carboxylase by Pinoxaden. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51): 22072-22077. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1012039107>
- Yu Q, Powles S. 2014. Metabolism-Based Herbicide Resistance and Cross-Resistance in Crop Weeds: A Threat to Herbicide Sustainability and Global Crop Production. *Plant Physiology*, 166(3): 1106-1118. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.114.242750>