



**UNL • FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS**

Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Agrarias

**RESISTENCIA DE *Rapistrum rugosum* (L) Allioni A HERBICIDAS
INHIBIDORES DE LA ENZIMA AHAS**

Ing. Agr. AYALA Fabián Abel

**Trabajo Final de Graduación presentado como requisito parcial para
optar por el título de Magister en Protección Vegetal**

Director: Lic. TUESCA, Daniel Horacio

Co-Director: Ing. Agr. (M.Sc.) LUTZ, Alejandra

Fecha: septiembre de 2024

Esperanza, Santa Fe, Argentina

CONTENIDO

RESUMEN	4
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	6
Efectos perjudiciales de las malezas sobre los cultivos y su control	7
Herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada	9
Descripción de las principales familias químicas	11
Resistencia de las malezas a los herbicidas	13
Casos de resistencia a nivel mundial	13
Casos de resistencia en Argentina	13
Mecanismos de resistencia	14
Evaluación de la resistencia	17
Problemática de la resistencia de <i>Rapistrum rugosum</i> (L.) All. a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS	17
Taxonomía y descripción morfológica	17
Resistencia de <i>R. rugosum</i> a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS a nivel mundial	18
Antecedentes locales	18
OBJETIVOS	20
Objetivos generales	20
Objetivos específicos	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Material vegetal	21
Herbicidas comerciales utilizados en los experimentos	22
Evaluación de la sensibilidad a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS del biotipo de <i>R. rugosum</i> con sospecha de resistencia	22
En condiciones de campo	22
Experimento en macetas	23
Determinación de la actividad enzimática AHAS in vitro	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
En condiciones de campo	29
Experimento en macetas	29
Determinación de la actividad enzimática AHAS in vitro	33
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS	43
Evaluación de la sensibilidad a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS del biotipo de <i>R. rugosum</i> con sospecha de resistencia	43

En condiciones de campo

43

Ensayo en macetas

49

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS

Ayala, Fabián A.; Ledesma, Silvia G.; Santamaría, Ricardo M. AVANCES EN LA DETECCIÓN DE BIOTIPOS DE *Rapistrum rugosum* L. (ALL.) RESISTENTES A INHIBIDORES DE ALS, A PARTIR DE SEMILLAS PRESENTES EN COSECHA DE TRIGO. IV Congreso de la ASACIM Malezas 2023. Mar del Plata. 14 y 15 de septiembre de 2023.

Ayala, Fabián A., Esteban T. Muñiz Padilla, Mara Depetris, Ayelén Seipel, Miguel Ahumada, Gabriela Breccia, Daniel Tuesca. RESISTENCIA A SULFONILUREAS DE POBLACIONES DE *Rapistrum rugosum* (L.) All. DETECTADAS EN LOTES AGRÍCOLAS DE ENTRE RIOS. IV Congreso de la ASACIM Malezas 2023. Mar del Plata. 14 y 15 de septiembre de 2023.

Ayala, Fabián A., Mara Depetris, Esteban Muñiz Padilla, Daniel Tuesca, Gabriela Breccia. RESISTENCIA CRUZADA A INHIBIDORES DE AHAS/ALS MEDIADA POR INSENSIBILIDAD EN EL SITIO DE ACCIÓN EN UNA POBLACIÓN DE *Rapistrum rugosum* (L) All. IV Congreso de la ASACIM Malezas 2023. Mar del Plata. 14 y 15 de septiembre de 2023.

RESUMEN

La mostacilla, *Rapistrum rugosum* (L) Alloni, es una especie de la familia Brassicaceae, originaria de la cuenca del Mediterráneo y del oeste de Asia. En Entre Ríos está presente en los cultivos de invierno como trigo y colza, entre otros. Una práctica muy utilizada para el control de malezas en el cultivo de trigo es el empleo de herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS). La AHAS es una enzima fundamental en las síntesis de los aminoácidos esenciales de cadena ramificada, tales como, leucina, valina e isoleucina. El uso continuo de productos con idénticos mecanismos de acción puede seleccionar biotipos resistentes, especialmente cuando es la única práctica de manejo empleada. Los objetivos del presente trabajo fueron analizar la sensibilidad a metsulfuron-metil, imazetapir y diclosulam, herbicidas inhibidores de la enzima AHAS, de un biotipo de *R. rugosum* (Espinillo), determinar su factor de resistencia y comparar la actividad enzimática AHAS con un biotipo susceptible (Colonia Ensayo). El ensayo preliminar realizado en el campo, mostró que la población con sospecha de resistencia tiene baja sensibilidad a metsulfuron-metil, imazetapir y diclosulam. El ensayo de dosis/respuesta con planta entera del biotipo Espinillo confirmó altos valores de resistencia para metsulfuron-metil (FR > 60) y para imazetapir y diclosulam (FR > 500), respecto al biotipo Colonia Ensayo, evidenciando, además, resistencia cruzada a los herbicidas metsulfuron-metil, imazetapir y diclosulam. En el mismo sentido, los ensayos de actividad AHAS mostraron altos niveles de resistencia en el biotipo Espinillo, requiriendo, para una inhibición del 50% (I_{50}) de la población tratada, una concentración de herbicidas 500 veces superior respecto al biotipo sensible. La gran actividad de la enzima AHAS en el biotipo Espinillo, aún después del agregado de los herbicidas testeados, indica que la resistencia puede estar asociada con un cambio en la estructura de la enzima blanco. Este es el primer reporte de resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS en *R. rugosum* de Argentina.

Palabras clave: mostacilla, resistencia a herbicidas, herbicidas inhibidores de AHAS, actividad AHAS.

SUMMARY

The turnip weed, *Rapistrum rugosum* (L) Alloni, is a species of the Brassicaceae family, native to the Mediterranean basin and western Asia. In Entre Ríos, it is present in winter crops such as wheat and rapeseed, among others. A widely used practice to control weeds in wheat crops is the use of herbicides that inhibit the enzyme acetohydroxyacid synthase (AHAS). AHAS is a fundamental enzyme in the synthesis of essential branched-chain amino acids, such as leucine, valine, and isoleucine. The continuous use of products with identical mechanisms of action can select for resistant biotypes, especially when it is the only management practice used. The objectives of this study were to analyze the sensitivity to metsulfuron-methyl, imazethapyr and diclosulam, herbicides that inhibit the AHAS enzyme, of a biotype of *R. rugosum* (Espinillo), determine its resistance factor and compare the AHAS enzyme activity with a biotype susceptible (Colony Assay). The preliminary trial carried out in the field showed that the population suspected of resistance has low sensitivity to metsulfuron-methyl, imazethapyr, and diclosulam. The dose/response assay with a whole plant of the Espinillo biotype consolidated high resistance values for metsulfuron-methyl (RF > 60) and for imazethapyr and diclosulam (RF > 500), concerning the Colonia Ensayo biotype, AHAS o evidencing cross-resistance to the herbicides metsulfuron-methyl, imazethapyr and diclosulam. In it, the AHAS activity assays showed high levels of resistance in the sense of the Espinillo biotype, requiring, for a 50% inhibition (I50) of the treated population, a concentration of herbicides 500 times higher than the sensitive biotype. The high activity of the AHAS enzyme in the Espinillo biotype, even after the addition of the tested herbicides, indicates that resistance may be associated with a change in the structure of the white enzyme. This is the first report of resistance to herbicides that inhibit the AHAS enzyme in *R. rugosum* from Argentina.

Keywords: turnip weed, herbicide resistance, AHAS-inhibiting herbicides, AHAS activity.

INTRODUCCIÓN

A una especie vegetal se le concede la categoría de “maleza” cuando interfiere con la utilización de los recursos del suelo o aéreos, y/o afecta a la economía, el bienestar o la salud del hombre. No existe un carácter biológico o ecológico que sea común a todas las malezas ya que dependen de la fisiología, la morfología y el hábito de crecimiento de la especie, aunque todas ellas exhiben la característica común de interferir negativamente con las plantas cultivadas, al adaptarse a vivir con el hombre, sus animales domésticos y las plantas que cultiva (Fernández et al, 2014).

De este modo, las malezas representan la categoría de plaga en la agricultura que mayores costos genera debido a las grandes pérdidas potenciales (Oerke, 2006). Según Fernández et al. (2014), a nivel mundial las malezas causan más pérdidas en el rendimiento de los cultivos (alcanzando un valor aproximado del 10%) y mayores costos de producción que el ocasionado por insectos, patógenos o nematodos fitófagos.

Las malezas presentan mecanismos evolucionados para aprovechar las oportunidades y afrontar las dificultades de las alteraciones del medio en el cual se desarrollan, entre las que se encuentran: germinación rápida de las semillas en respuesta a la luz u otros estímulos; crecimiento rápido y reproducción sexual (a través de semillas), asexual o ambos; capacidad de absorber y utilizar grandes cantidades de nutrientes solubles; producción prolífica de semillas; características distintivas de las semillas que favorecen una amplia dispersión; mecanismos de dormición que aseguran la durabilidad de las semillas viables en el tiempo; alta tolerancia a un gran número de adversidades y otros (Mohler, 2001)

Efectos perjudiciales de las malezas sobre los cultivos y su control

El daño causado por las malezas en los cultivos se manifiesta de diferentes maneras: competencia por nutrientes, agua y luz; liberación de sustancias a través de raíces y hojas que resultan ser tóxicas para los cultivos (alelopatía); desarrollo de un hábitat favorable para la proliferación de otras plagas (artrópodos, ácaros, patógenos) al servir de hospederas de éstas; interferencia en el proceso normal de cosecha y contaminación de la producción obtenida, entre otras (Labrada, 2006).

Las pérdidas económicas han motivado el desarrollo de prácticas de control de malezas desde el origen de la agricultura. Estas prácticas han ido desde el desmalezado manual y el empleo de herramientas para el control mecánicos, pasando por el uso de sales y ácidos

inorgánicos como primeros métodos químicos, hasta las aplicaciones de compuestos orgánicos de síntesis, como los actuales herbicidas (Yannicari, 2014). Sin embargo, las malezas siguen presentes en todos los agroecosistemas y la causa más importante de las fallas en el control es su gran diversidad y capacidad de adaptación a ambientes con disturbios.

Los herbicidas son actualmente la herramienta más efectiva para el control de las malezas. El control químico (con herbicidas) comenzó a realizarse en forma masiva a partir de la década del 40 del siglo pasado, siendo actualmente, el método más utilizado en los países con una agricultura desarrollada (Labrada et al, 1996).

Según Marzoca (1993), herbicida es todo producto químico fitotóxico, utilizado para destruir o inhibir el desarrollo de las plantas o la germinación de las semillas. La utilización de herbicidas para controlar malezas permitió incorporar grandes extensiones de tierra a la agricultura, ya que los métodos tradicionales de escardas manuales y mecánicas son más adecuados a pequeñas y medianas extensiones y dificultaba la mantención del cultivo libre de competencia de malezas en grandes lotes.

Existen varias formas de clasificar los herbicidas, incluyendo la forma de uso, sus propiedades químicas y su modo de acción. El modo de acción es la clasificación más aceptada, ya que permite elegir herbicidas con diferentes mecanismos de acción y hacer combinaciones de principios activos o mezclas, para aumentar el espectro de control y evitar la selección de malezas resistentes o retardar su aparición. El Comité para la acción contra la resistencia de herbicidas, HRAC según sus siglas en inglés (Herbicide Resistance Action Committee) y la Sociedad Americana de Ciencias de las Malezas, WSSA según sus siglas en inglés (Weed Science Society of America), clasifican a los herbicidas en grupos según su modo de acción (Figura 1). Estas familias incluyen por ejemplo a los inhibidores de la enzima acetil-CoA carboxilasa que afectan la síntesis de lípidos, inhibidores del fotosistema II, inhibidores de la síntesis de pigmentos carotenoides, de la síntesis de celulosa, entre otros. Sin embargo, la mayoría de los herbicidas actualmente comercializados actúan bloqueando la biosíntesis de ciertos aminoácidos, tales como aquellos de cadena ramificada, en plantas (Tan et al., 2006).

Grupo	Mode de acción	Grupo	Mode de acción
1	Inhibición de ACCasa	19	Inhibidores del transporte de auxinas
2	Inhibición de la AHAS/ALS	22	Diversión de electrones PS I
3	Inhibición del ensamblaje de microtúbulos	23	Inhibición de la organización de microtúbulos
4	Imitaciones de auxinas	24	Desacopladores
5	Inhibición de la fotosíntesis PSII – Serine 264	27	Inhibición de HPPD
6	Inhibición de la fotosíntesis PSII – Histidina 215	28	Inhibición de la dihidroorotato deshidrogenasa
9	Inhibición de la EPSP sintasa	29	Inhibición de la síntesis de celulosa
10	Inhibición de la glutamina sintetasa	30	Inhibición de la tioesterasa de ácidos grasos
12	Inhibición de PDS	31	Inhibición de la proteína serina treonina fosfatasa
13	Inhibición de la DOXP sintasa	32	Inhibición de solanesil difosfato sintasa
14	Inhibición de la PPO	33	Inhibición de homogentisato solanesiltransferasa
15	Inhibición de VLCFAs	34	Inhibición de la licopeno ciclasa
18	Inhibición de DHP	0	Modo de acción desconocido.

Figura 1. Clasificación de los herbicidas de acuerdo al Herbicide Resistance Action Committee (HRAC) y la Weed Science Society of America (WSSA) 2022.

Herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada

De acuerdo al Informe del grupo de trabajo de clasificación de Modo de Acción de HRAC global de junio de 2020, los herbicidas inhibidores de AHAS (Grupo 2), incluyen siete familias químicas estructuralmente diversas: sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas tipo 1, triazolopirimidinas tipo 2, pirimidinil benzoatos, triazolinonas y sulfonanilidas (Figura 2) (HRAC, 2020).

Ingrediente activo	Clasificación previa	Nueva clasificación
clorimuron-etilo, clorsulfuron, cinsulfuron, flazasulfuron, foramsulfuron, halosulfuron-metil, yodosulfuron-metil-Na, metsulfuron-metil, nicosulfuron, primisulfuron-metil, pirazosulfuron-etilo, rimsulfuron, sulfometuron-metil, sulfosulfuron, triasulfuron, tribenuron-metil.	Sulfonilureas	Sin cambios
bispiribac-sodio, pirifalida, piriminoac-metilo, piritiobac-sodio	Benzoatos de pirimidinilo (tio)	Benzoatos de pirimidinilo
pirimisulfán, triafamona	Benzoatos de pirimidinilo (tio)	Sulfonanilidas
cloransulam-metil, diclosulam, florasulam, flumetsulam,	Triazolopirimidina	Triazolopirimidina tipo 1
penoxsulam, piroxsulam	Triazolopirimidina	Triazolopirimidina tipo 2
imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir	Imidazolinonas	Sin Cambios
flucarbazona-Na, propoxicarbazona-Na, tienicarbazona-metil	Sulfonil amino-carbonil-triazolinonas	Triazolinonas

Figura 2. Clasificación revisada del modo de acción (MOA) de herbicidas inhibidores de la enzima AHAS (HRAC, 2020)

Los herbicidas del grupo 2 actúan inhibiendo la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS), cuya función es catalizar dos reacciones en la ruta de biosíntesis de aminoácidos esenciales de cadena ramificada (Figura 3). Para la biosíntesis de valina y leucina, dos moléculas de piruvato se condensan para formar 2-acetolactato; mientras que, para la isoleucina, el 2-acetohidroxibutirato se sintetiza a partir de piruvato y 2-cetobutirato (Chipman et al., 1998). La AHAS se encuentra codificada en el núcleo de la célula, pero

la localización subcelular de la proteína en las plantas superiores es en el cloroplasto (Jones et al., 1985; Mifflin, 1974).

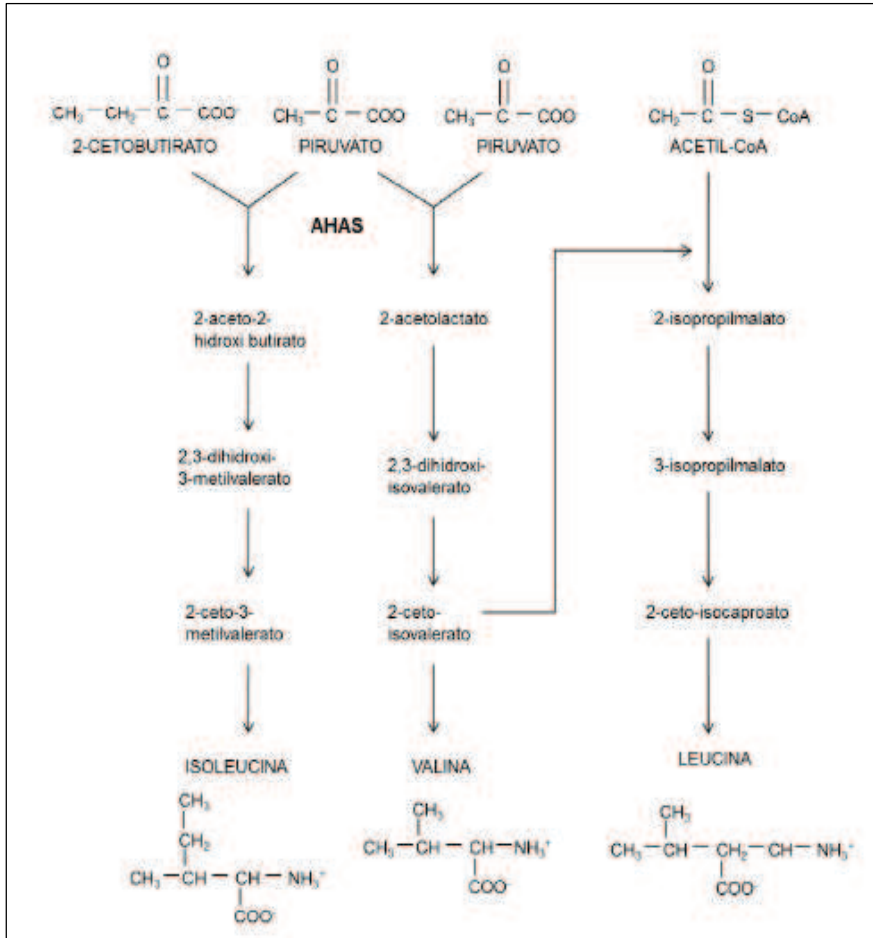


Figura 3. Vías de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada en plantas superiores. La enzima AHAS participa en las dos primeras reacciones (Adaptado Duggleby & Pang, 2000)

Los herbicidas inhibidores de la enzima AHAS bloquean el canal a través del cual la enzima ingresa al sitio activo, esto impide la unión entre las moléculas de piruvato o entre la molécula de piruvato y α -cetobutirato (Arregui y Puricelli, 2018). Al inhibir la enzima AHAS producen la muerte del vegetal debido a la falta de los aminoácidos esenciales valina, leucina e isoleucina (Arregui y Puricelli, 2014).

Los herbicidas inhibidores de la enzima AHAS se han utilizado ampliamente desde su introducción a principios de la década de 1980. Este tipo de herbicidas tiene alta actividad contra las plantas objetivo, permitiendo una baja tasa de aplicación (sus dosis de uso son en g ha^{-1}). Además de esto, son altamente selectivos para las plantas cultivadas, y tienen un amplio espectro de actividad de control de malezas (Zhou *et al.*, 2007). Si bien el uso de inhibidores de la AHAS tiene muchas ventajas, su uso extensivo ha llevado a la

evolución de la resistencia en varias especies de malezas. Según Heap (2022), actualmente, hay más especies/biotipos confirmados resistentes a los inhibidores de la enzima AHAS (33%) que a cualquier otro grupo de modo de acción de herbicida (Figura 4).

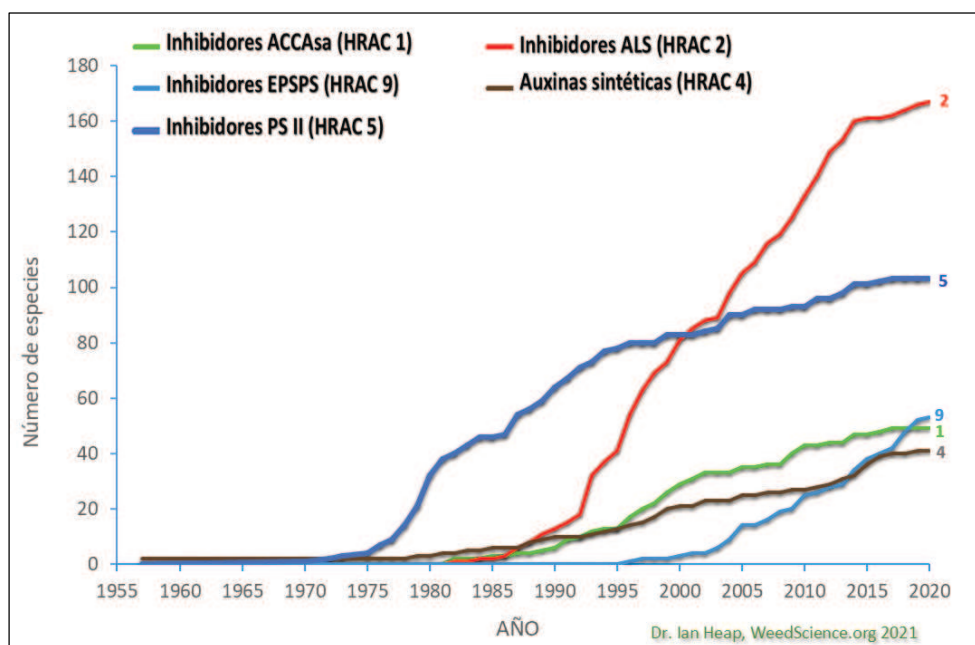


Figura 4. Aumento cronológico de malezas resistentes a los herbicidas más importantes a nivel mundial (Adaptado de Heap, 2021).

Descripción de las principales familias químicas

Sulfonilureas

Las sulfonilureas como potentes inhibidores de la AHAS fueron descritas por científicos de Dupont a mediados de los 70 (Levitt, 1978). Los herbicidas de esta familia química pueden usarse en pre y post-emergencia en una amplia variedad de cultivos (Beyer *et al.*, 1988). Se absorben tanto por la raíz como por las hojas y son traslocados vía floema y xilema. Su estructura básica consiste en XSO₂-NH-CO-NH-Y, donde X es normalmente un grupo fenilo e Y es un anillo pirimidina o triazina (Figura 5.A).

Metsulfuron-metil

Es un herbicida post emergente para el control de malezas de hoja ancha en cultivos de trigo (Figura 5 A). Una vez aplicado es absorbido rápidamente a través del follaje y raíces de las plantas, inhibiendo el crecimiento de las malezas susceptibles. Este producto es más efectivo sobre malezas pequeñas, en activo crecimiento. Tiene además una actividad residual que permite el control de muchas malezas que germinan después del tratamiento.

El síntoma típico de las malezas afectadas es la decoloración o enrojecimiento, que aparece una a tres semanas después de la aplicación. Esto depende de las condiciones de crecimiento y grado de susceptibilidad de aquéllas. Cuando las condiciones climáticas que siguen al tratamiento son de alta humedad y temperatura, la actividad del herbicida aumenta. Por el contrario, condiciones de sequía y frío la retardan. (Casafe, 2017)

Imidazolinonas

En la década de los 80, American Cyanamid desarrolló una serie de herbicidas con estructura de imidazolinona que también inhibían la AHAS (Shaner et al., 1984). Las imidazolinonas presentan en su estructura un núcleo 4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il unido en la posición 2 a un anillo aromático (usualmente heterocíclico). Son herbicidas que controlan un amplio espectro de malezas y se usan de forma generalizada en cultivos de cereales, leguminosas y en plantaciones forestales. Son compuestos que se traslocan en la planta y se absorben tanto por vía radicular como foliar, estando su uso indicado generalmente para aplicaciones en post-emergencia, aunque también pueden usarse para tratamientos en pre-emergencia (Shaner et al., 1990).

Imazetapir

Es un herbicida post-emergente sistémico selectivo y con acción residual para alfalfa, arveja, maíz resistente a imidazolinonas, maní, soja y en pre-emergencia para poroto (figura 5 B). Luego de la aplicación, las malezas susceptibles detienen su crecimiento dejando de competir con el cultivo; la muerte de ellas puede demorar 3 a 4 semanas. Provee además control residual de malezas susceptibles que germinan después de la aplicación. (Casafe, 2017)

Triazolopirimidinas

Las triazolopirimidinas contienen dos tipos de enlaces. Uno de estos tipos de enlace implica una sulfona unida directamente al anillo de triazolopirimidina, mientras que el otro tipo de enlace tiene un nitrógeno unido directamente al anillo de triazolopirimidina. En el sistema de clasificación revisado, estos dos tipos de familias químicas se distinguen como Triazolopirimidina Tipo 1 y Triazolopirimidina Tipo 2 (HRAC, 2020).

Diclosulam

Clasificado en la actualidad como triazolopirimidina tipo 1 (figura 5C), es un herbicida selectivo para el control de malezas de hoja ancha, que compiten con los cultivos de soja y maní. Es activo en tratamientos de suelo en pre-siembra y preemergencia y en

posemergencia. Los controles más eficientes se logran cuando se producen lluvias después de la aplicación, independientemente de la humedad del suelo (Casafe, 2017).

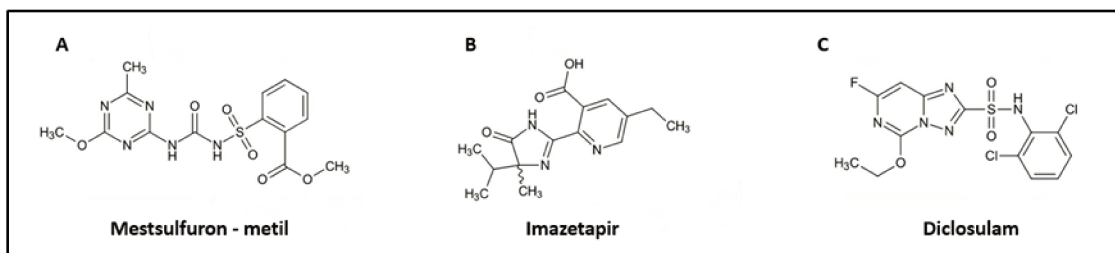


Figura 5. Estructura química de metsulfuron - metil (A), imazetapir (B) y diclosulam (C).

Resistencia de las malezas a los herbicidas

El uso repetido de herbicidas con el mismo mecanismo de acción puede seleccionar rápidamente biotipos resistentes en malezas, especialmente cuando es la única práctica de control empleada (Vencill et al., 2012). La resistencia de malezas a herbicidas se define como la habilidad hereditaria que adquieren algunos biotipos, dentro de una población, para sobrevivir y reproducirse luego de la aplicación de determinadas dosis de un herbicida a las cuales la población original era susceptible (WSSA, 1998). La resistencia a herbicidas puede involucrar uno o varios mecanismos, generando insensibilidad a uno o varios herbicidas.

Casos de resistencia de malezas a herbicidas a nivel mundial

Actualmente hay 523 casos únicos de malezas resistentes a herbicidas a nivel mundial, con 269 especies (154 dicotiledóneas y 115 monocotiledóneas) (Heap, 2023). Las malezas han desarrollado resistencia a 21 de los 31 sitios de acción de herbicidas conocidos y a 165 herbicidas diferentes, siendo la resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS la que presenta mayor cantidad de biotipos (Heap, 2023).

Casos de resistencia de malezas a herbicidas en Argentina

El primer caso de resistencia a herbicida data del año 1996 y se registra en *Amaranthus hybridus* resistente a imazetapir (Pivot), herbicida inhibidor de la enzima AHAS (Lanfranconi et al., 2013). Según la encuesta nacional de la Red de Malezas de AAPRESID (Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa), en la actualidad hay 43 biotipos resistentes de 24 especies diferentes de malezas. Para el caso de resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS, se encuentran distribuidas 10 especies con 15 biotipos (Figura 6).

Especie	Nombre común	Sitio de acción
Amaranthus hybridus	Yuyo colorado	B/2 (Inhibidores de ALS)
Raphanus sativus	Nabón	B/2 (Inhibidores de ALS)
Lolium multiflorum	Raiigrás anual	B/2 (Inhibidores de ALS) G/9 (Glifosato)
Lolium multiflorum	Raiigrás anual	A/1 (Inhibidores de ACCasa) B/2 (Inhibidores de ALS) G/9 (Glifosato)
Amaranthus palmeri	Yuyo colorado	B/2 (Inhibidores de ALS)
Amaranthus hybridus	Yuyo colorado	B/2 (Inhibidores de ALS) G/9 (Glifosato)
Hirschfeldia incana	Nabo, Nabillo	B/2 (Inhibidores de ALS)
Hirschfeldia incana	Nabo, Nabillo	B/2 (Inhibidores de ALS) O/4 (2,4-D)
Rapistrum rugosum	Mostacilla	B/2 (Inhibidores de ALS)
Echinochloa crus-galli	Capín arroz	B/2 (Inhibidores de ALS)
Echinochloa crus-galli	Capín arroz	B/2 (Inhibidores de ALS) G/9 (Glifosato)
Conyza sumatrensis	Rama negra	B/2 (Inhibidores de ALS)
Brassica rapa	Nabo	B/2 (Inhibidores de ALS) G/9 (Glifosato) O/4 (2,4-D)
Brassica rapa	Nabo	B/2 (Inhibidores de ALS) G/9 (Glifosato)
Bassia scoparia	Morenita	B/2 (Inhibidores de ALS)

Figura 6. Biotipos de malezas resistentes en Argentina y sitio de acción de herbicidas (tomado de <https://www.aapresid.org.ar/>. 2023)

Mecanismos de resistencia

Una vez que el herbicida es aplicado y llega a la maleza, ocurren los siguientes procesos o etapas: (1) Penetración del herbicida en la planta y traslocación del mismo hasta su sitio de acción; (2) acumulación del herbicida en el sitio de acción (enzima específica o sitio de unión afectado por un herbicida, también llamado sitio de destino) y (3) unión del herbicida a la proteína/enzima blanco, causando la disrupción de alguna vía metabólica o estructura funcional. Esta última etapa puede, adicionalmente, causar otros efectos como la generación de especies reactivas de oxígeno que dañan estructuras celulares y aceleran la muerte de la planta (Délye, 2013).

Teniendo en cuenta las etapas mencionadas anteriormente, comprendidas en el modo de acción, los mecanismos que confieren resistencia pueden ser agrupados en dos categorías: a) resistencia de sitio de acción (TSR target site resistance) que corresponderían a la Etapa 3, y b) resistencia fuera del sitio objetivo o resistencia metabólica (NTSR no target site resistance) que se corresponderían con las Etapas 1 y 2 (Mithila & Godar, 2013).

Dependiendo del tipo de mecanismo de resistencia detectado, la maleza presentará un patrón específico en su nivel de resistencia a herbicidas, que podrá variar desde una moderada resistencia a un amplio espectro de herbicidas a un alto grado de resistencia a determinados compuestos de una misma familia química (Cruz-Hipólito *et al.*, 2010).

La resistencia de sitio de acción (TSR) ocurre por mutaciones que provocan cambios en el comportamiento de la proteína blanco frente al herbicida. Estas alteraciones pueden causar un incremento en la expresión o en la actividad intrínseca de la proteína blanco

que compensa la acción inhibitoria del herbicida o una disminución de la afinidad entre la molécula herbicida y su sitio de acción (Délye, 2013).

La resistencia fuera del sitio objetivo (NTSR), es producida por diferentes mecanismos que pueden ser altamente complejos y variables, tanto entre diferentes especies como entre diferentes genotipos de la misma especie (Figura 7). En los biotipos resistentes puede existir una menor absorción del herbicida, traslocación reducida, disminución de la concentración del principio activo en el sitio de acción (Qasem, 2013; Sammons & Gaines, 2014), secuestro del herbicida en la vacuola (Ge *et al.*, 2010), detoxificación del herbicida por metabolización (Yuan *et al.*, 2007) o aumento en la función de enzimas protectoras de sustancias con oxígeno altamente reactivo (Délye, 2013; Powles, 2010; Yuan *et al.*, 2007). Este tipo de resistencia generalmente es controlada por múltiples loci (Mithila & Godar, 2013) y avanza en las poblaciones debido a acumulación de genes con efecto pequeño, luego de sucesivos ciclos de selección por el herbicida y a cruzamientos entre individuos con algún grado de resistencia (Délye, 2013).

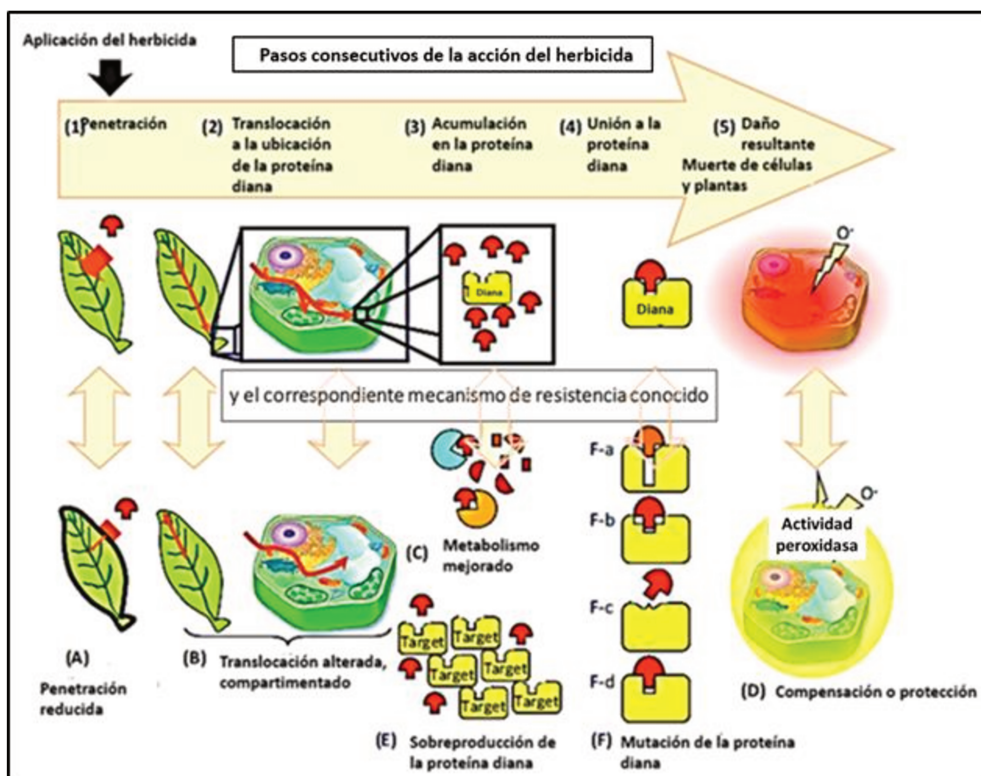


Figura 7. Acción de los herbicidas luego de su aplicación: penetración (1), translocación a la ubicación de la proteína blanco (2), Acumulación en la proteína diana (3), unión a la proteína diana (4) y daño resultante (5). Mecanismos de resistencias identificados en malezas: penetración reducida (A), translocación alterada, compartimentado (B), metabolismo mejorado

(C), sobreproducción de la proteína diana (D) y mutación de la proteína diana (F). (Adaptado de Délye, 2013).

La tasa de evolución de resistencia en poblaciones de malezas depende de un gran número de factores, algunos propios de la especie (variabilidad genética, frecuencia de mutaciones, ciclo de vida, entre otros) y otros relacionados a los herbicidas (presión de selección, dosis y frecuencia de uso) (Tuesca, 2011; Vila-Aiub & Fischer, 2014).

La resistencia de sitio de acción (TSR) es la más frecuente entre los casos conocidos de resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS. El número relativamente mayor de mutaciones que imparten resistencia a varias clases de herbicidas inhibidores de AHAS, en comparación con otros grupos de herbicidas, se debe a que estas moléculas no compiten con el sustrato por el dominio catalítico de la enzima. En cambio, bloquean la apertura del canal que conduce al dominio catalítico. En consecuencia, las mutaciones que generan resistencia a menudo no tienen impacto en las propiedades cinéticas de la AHAS (Gaines *et al.*, 2020). En la mayoría de los casos reportados, se debe a mutaciones de un solo punto en el gen AHAS, que reduce la sensibilidad de la enzima (Yu & Powles, 2014). La sustitución de aminoácidos puede ocurrir en varios sitios, resultando en un aumento de la resistencia para diferentes familias en este grupo de herbicidas (Powles & Yu, 2010).

Se estima que la frecuencia de genes de resistencia a las sulfonilureas es de alrededor de 10^{-6} . Esta proporción se incrementa conforme la presión de selección aumenta por el uso continuado del mismo herbicida, o de compuestos que pertenecen a la misma familia química, o que comparten el mismo modo de acción. A medida que aumenta la tasa de mortalidad obtenida con el herbicida, aumenta también la presión de selección (Cruz-Hipólito *et al.*, 2010). Otro aumento de la presión de selección es debido al desarrollo de cultivares comerciales resistentes a herbicidas inhibidores de AHAS, lo que enfatiza la necesidad de un manejo cuidadoso de estas herramientas para mantener la utilidad a largo plazo de estos herbicidas (Devine, 2000).

De acuerdo a lo precedente, pueden ocurrir 3 tipos de resistencia:

-La *resistencia cruzada por sitio de acción*, sucede cuando un biotipo es resistente a dos o más herbicidas diferentes, a través de un mismo mecanismo fisiológico; se trata de un único evento evolutivo resultante de la selección ejercida por un mismo agente selector.

-La *resistencia cruzada ajena al sitio de acción*, ocurre cuando se produce la selección de un mecanismo que involucra la resistencia a distintos herbicidas, que comparten una misma ruta o red coordinada de procesos que resulta en su inactivación dentro de la planta.

-La *resistencia múltiple*, se da cuando el empleo secuencial o simultáneo de herbicidas determina procesos de selección diferentes que con el tiempo acumulan mecanismos de resistencia distintos y controlados por genes diferentes en un mismo biotipo (Vila-Aiub & Fisher, 2014).

Evaluación de la resistencia

Detección de resistencia a herbicidas

Para que un biotipo de una maleza pueda ser considerado resistente es necesario utilizar protocolos de detección adecuados, a fin de que las conclusiones a las que se arriben no sean erróneas. Además, el biotipo considerado resistente debe satisfacer los siguientes criterios: 1) obedecer plenamente a la definición de resistencia de la WSSA; 2) la confirmación de la resistencia debe hacerse utilizando protocolos científicos adecuados; 3) la resistencia debe ser heredable; 4) debe ser demostrado el impacto práctico del problema a nivel de campo; y 5) la resistencia debe demostrarse a nivel de especie, no como resultado de selección artificial (Christoffoleti *et al.*, 2006).

Problemática de la resistencia de *Rapistrum rugosum* (L.) All. a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS

Taxonomía y descripción morfológica

Rapistrum rugosum (n.v. mostacilla) pertenece a la familia *Brassicaceae*. Es una especie presente en lotes agrícolas de la región pampeana. Es originaria de la cuenca del Mediterráneo y del oeste de Asia y se ha naturalizado en diversas partes del mundo (Burkart & Bacigalupo, 1969). Es una hierba anual o bienal, pubescente, mide entre 0,2 y 1,5 m de altura, con tallo erecto, muy ramificado, con pelos tiesos abajo (Figura 8 A). Hojas basales de 3-25 x 1-11 cm, pecioladas, elípticas, de enteras a lirado-pinnatisectas, dentadas, las caulinares menores, sentadas y menos divididas. Flores en racimos largos, con numerosas flores con cuatro sépalos de 3-4 mm, glabros, verdosos, y cuatro pétalos de 6-9 mm, obovados amarillos (Figura 8 B). Posee seis estambres, dos de ellos más cortos que el resto. Los frutos se ubican en racimos (Figura 9 C) y son tipo silícula (Figura

8 D), con la parte inferior de 1-3 mm, hasta con tres semillas, y la parte superior de 2-4 mm, globosa, acanalada, con una semilla, y que acaba en un estilo de 1-2 mm, cónico. Semillas de 2 mm (Figura 8 E), lisas, color pardo (Pardo de Santayana *et al.*, 2018). Fructifica en invierno y primavera, aunque pueden encontrarse plantas floreciendo todo el año. En Entre Ríos se la encuentra de manera frecuente en los cultivos de invierno (trigo, lino y colza), en banquinas y en potreros (Faya *et al.*, 1992). Manalil & Chauhan (2019), a través de estudios de campo en regiones de cultivo del norte de Australia, durante 2016 y 2017, determinaron que densidades de 18,2 y 24,3 plantas m⁻² causaron una reducción del rendimiento del 50 % en trigo (*Triticum aestivum* L.), y, también en Australia, Gurjeet *et al.*, (2021) determinaron que una alta densidad de mostacilla (47 a 48 plantas m⁻²) resultó en reducciones de rendimiento en trigo de 72 a 78%, manifestando alta habilidad competitiva.



Figura 8. *Rapistrum rugosum* (L.) All. A: planta adulta en floración. B: detalle de inflorescencia. C: rama con frutos. D: silícula. E: semillas.

Resistencia de *R. rugosum* a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS a nivel mundial

El primer caso de resistencia de *R. rugosum* a este grupo de herbicidas se registró en 1996 en cultivos de cereales en Queensland (Australia), al herbicida clorsulfuron. En 2010, se comprobó la resistencia al bispiribac sodio, florasulam, flucarbazone sódico y tribenuron metil en cultivos de trigo de Irán. En 2018, en España, se corroboró por primera vez resistencia a los herbicidas yodosulfuron metil sodio y al tribenuron metil, en cultivos de cebada y trigo. En 2021, en Nueva Gales del Sur (Australia) se confirmó la resistencia de *R. rugosum* a imazamox e imazapir (Heap, 2022).

Antecedentes locales

En las campañas agrícolas 2015-2016 y 2016-2017, en el centro oeste de Entre Ríos, se observó una disminución en la eficacia de control de *R. rugosum* utilizando el herbicida metsulfuron-metil como postemergente en el cultivo de trigo, resultando la primera mención de probable resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS para esta maleza. Es importante considerar que la superficie cultivada con trigo en Entre Ríos alcanzó las 568.000 ha, representando el 96 % del área sembrada con cultivos invernales y el 26 por ciento del area total cultivada en la campaña 2022/2023 (Tabla 1) y ocupando el cuarto lugar a nivel nacional con el 12% del total.

Tabla 1. Superficie sembrada con cultivos extensivos en la provincia de Entre Ríos campaña 2022/2023 (adaptada del Proyecto SIBER, Bolsa de Cereales de Entre Ríos).

CULTIVOS	SUPERFICIE SEMBARADA (ha)
Arroz	54800
Colza	9800
Girasol	16880
Lino	12200
Maíz	444700
Soja	970000
Sorgo	98000
Trigo	568000
Total	2174380

Considerando esta situación, se iniciaron los primeros ensayos en macetas para evaluar la posible resistencia de las poblaciones de *Rapistrum rugosum* a herbicidas sulfonilureas, que son inhibidores de la enzima AHAS. Se realizaron pruebas con los herbicidas metsulfuron-metil y clorsulfuron, observando que los controles fueron inferiores al 29% en el caso del metsulfuron-metil y nulos en el caso del clorsulfuron. En ambos casos, las dosis utilizadas fueron 16 veces superiores a las indicadas en el marbete.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar y caracterizar la resistencia de un biotipo de *Rapistrum rugosum* a herbicidas inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS), específicamente a los compuestos metsulfuron-metil, imazetapir y diclosulam.

Objetivos específicos

- Analizar la sensibilidad a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS de un biotipo de *R. rugosum* del centro-oeste de Entre Ríos.
- Determinar el factor de resistencia del biotipo resistente a través de ensayos de dosis-respuesta para los herbicidas metsulfuron-metil, imazetapir y diclosulam.
- Comparar la actividad enzimática AHAS de los biotipos resistente y susceptible en respuesta a los herbicidas metsulfuron-metil, imazetapir y diclosulam.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron semillas (11/10/2019) de 15 plantas del biotipo de *R. rugosum* con sospecha de resistencia (denominado en este trabajo biotipo “Espinillo”), sobrevivientes a un tratamiento con 4,8 g de metsulfuron-metil (23/04/2019), en un lote ubicado en el distrito Espinillo Norte (31° 50’ 20’’ S; 60° 15’ 44’’ O). Las semillas del biotipo susceptible conocido (denominado en este trabajo biotipo “Colonia Ensayo”) se recolectaron en el campo Experimental Ramón Roldán perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias – UNER, ubicado en las cercanías de Colonia Ensayo (31° 51’ 40’’ S, 60° 30’ 35’’ O). Ambas localidades se encuentran ubicadas en el departamento Paraná, Entre Ríos (Figura 9).

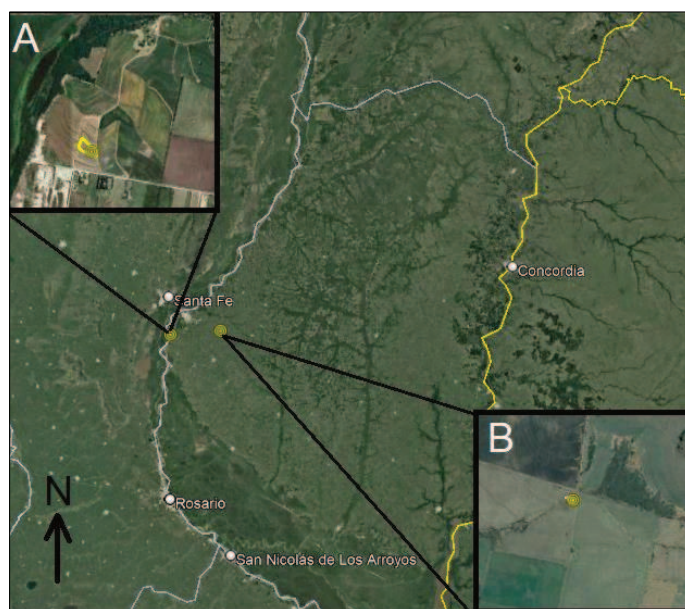


Figura 9. Procedencia de los biotipos evaluados. A: Colonia Ensayo (susceptible). B: Espinillo (con sospecha de resistencia).

El pool de semillas de cada población se almacenó en bolsas de papel, a temperatura ambiente, hasta su utilización (Figura 10).

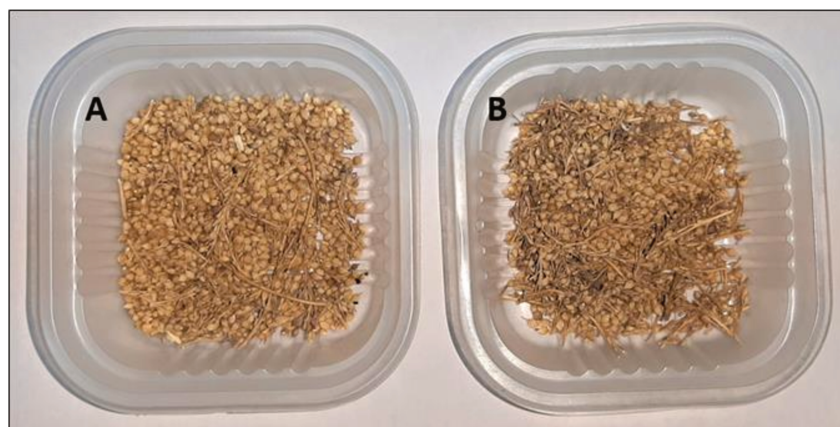


Figura 10. Lote de silículas de plantas del biotipo sensible (A) y de plantas sobrevivientes al tratamiento con metsulfuron-metil (B) del biotipo sospechoso.

Herbicidas comerciales utilizados en los experimentos

Se utilizaron tres herbicidas inhibidores de la enzima AHAS en las formulaciones comerciales descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Herbicidas utilizados en los ensayos *in-vivo* e *in-vitro*

Herbicidas ensayados				
Formulado comercial	Herbicida	Familia química	Sitio de acción	g i.a./ha*
Metsulfuron 60, Sigma Agro	Metsulfuron-metil	Sulfonilureas	enzima AHAS	4,8
Imazetapir 10 SL, DVA	Imazetapir	Imidazolinonas	enzima AHAS	100
Spider®, Corteva Agriscience	Diclosulam	Triazolopirimidinas Tipo 1	enzima AHAS	33,6

* Dosis agrícola de ingrediente activo recomendada.

Evaluación de la sensibilidad a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS del biotipo de *R. rugosum* con sospecha de resistencia

Para evaluar la sensibilidad del biotipo Espinillo se llevaron a cabo experimentos de eficacia de control con los diferentes herbicidas seleccionados, en condiciones de campo y en macetas, en condiciones semi controladas.

En condiciones de campo

El experimento se realizó en un lote agrícola ubicado en el distrito Espinillo Norte (31° 50' 20'' S; 60° 15' 44'' O) del departamento Paraná, provincia de Entre Ríos. El ensayo se llevó a cabo durante la temporada de cultivo de trigo, entre los meses de junio y agosto de 2019.

La cobertura promedio de todas las malezas en el área fue de 60,5% (estimada con el programa Conopeo®). Otras malezas presentes fueron *Lolium multiflorum*, *Conyza sp*,

Gamochaeta spicata, *Avena fatua* y *Bowlesia incana*. Al momento de la aplicación, las plantas de *R. rugosum* estaban en estado de roseta, con diámetro menor a 12 cm. Se realizaron aplicaciones de herbicidas a diferentes dosis, según se detalla en la Tabla 3, incluyendo 0,25% (v/v) de surfactante no iónico (Eco Rizospray, Rizobacter Argentina).

Tabla 3. Tratamientos y dosis de herbicidas evaluados en parcelas a campo.

Tratamiento	Ingrediente activo	Dosis (g)
T0	Testigo	0
T1	Metsulfuron metil	4,8
T2	Metsulfuron metil	9,6
T3	Metsulfuron metil	19,2
T4	Diclosulam	33,6
T5	Diclosulam	67,2
T6	Diclosulam	134,4
T7	Imazetapir	100
T8	Imazetapir	200
T9	Imazetapir	400

Los tratamientos se realizaron en parcelas de 3m x 10m, con parcelas testigos apareadas sin aplicación, para una mejor evaluación visual del control. El diseño del experimento fue de bloques completamente aleatorizados con 3 repeticiones. Los herbicidas se aplicaron en condiciones ambientales adecuadas el 3 de junio de 2019 (día soleado sin presencia de rocío sobre las plantas; 16,3°C de temperatura ambiente; 63% de HR y 6.5 km/h de velocidad de viento), mediante un equipo pulverizador experimental provisto de 4 picos con pastillas Hypro ULD 120015, calibrado para pulverizar un caudal de 150 L de caldo.ha⁻¹, a 3,5 bares de presión. A los 13, 35 y 55 días después de la aplicación (DDA) se realizó una evaluación visual de la inhibición del crecimiento de la planta y síntomas de daño y grado de control, usando una escala de 0 a 100 %, donde 0 % indica que no hay daño a la planta, en comparación con el control sin tratar, y 100% indica muerte completa de la planta (ALAM, 1974). Los datos se analizaron a través de ANOVA y las medias se compararon utilizando el test DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) del programa INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Experimento en macetas

Las semillas de los biotipos Espinillo y Colonia Ensayo se sembraron a 1cm de profundidad en bandejas plásticas de 40cm x 30cm x 10cm, que contenían una mezcla de tierra (60%), turba (30%) y perlita (10%) (Figura 11).



Figura 11. Emergencia de plántulas de *R. rugosum* en bandejas.

Cuando las plántulas alcanzaron el estado de 2 hojas verdaderas se trasladaron a macetas plásticas de 1,2 L de capacidad (una planta por maceta), rellenas con la misma mezcla descrita anteriormente (Figura 12).



Figura 12. Trasplante de plántulas de *R. rugosum* a macetas.

Los tratamientos con herbicidas se realizaron cuando las plantas tenían 4-5 hojas, en estado de roseta (Figura 13).



Figura 13. Estado de desarrollo de las plántulas de *R. rugosum* al momento de la aplicación de los tratamientos.

La evaluación de resistencia se realizó en experimentos semi controlados, comparando las respuestas del biotipo bajo sospecha de resistencia (Espinillo) con el biotipo sensible (Colonia Ensayo) bien caracterizado, utilizando una serie de siete dosis de herbicida (Tabla 4) (Beffa *et al.*, 2012), donde “X” representa la dosis de marbete del producto comercial.

Tabla 4. Biotipos, principios activos y dosis utilizadas en la evaluación en macetas

TRATAMIENTOS		Metsulfuron 60% WP	BIOTIPOS	
T0	Testigo	0	Col. Ensayo	ESPINILLO
T1	1/8X	1 g/ha	Col. Ensayo	-
T2	1/4X	2 g/ha	Col. Ensayo	-
T3	1/2X	4 g/ha	Col. Ensayo	-
T4	X	8 g/ha	Col. Ensayo	ESPINILLO
T5	2X	16 g/ha	Col. Ensayo	ESPINILLO
T6	4X	32 g/ha	Col. Ensayo	ESPINILLO
T7	8X	64 g/ha	-	ESPINILLO
T8	16X	128 g/ha	-	ESPINILLO
T9	32X	256 g/ha	-	ESPINILLO

TRATAMIENTOS		Imazetapir 10% SL	BIOTIPOS	
T0	Testigo	0	Col. Ensayo	ESPINILLO
T1	1/8X	125 ml/ha	Col. Ensayo	-
T2	1/4X	250 ml/ha	Col. Ensayo	-
T3	1/2X	500 ml/ha	Col. Ensayo	-
T4	X	1000 ml	Col. Ensayo	ESPINILLO
T5	2X	2000 ml/ha	Col. Ensayo	ESPINILLO
T6	4X	4000 ml/ha	Col. Ensayo	ESPINILLO
T7	8X	8000 ml/ha	-	ESPINILLO
T8	16X	16000 ml/ha	-	ESPINILLO
T9	32X	32000 ml/ha	-	ESPINILLO

TRATAMIENTOS		Diclosulam 84% WG	BIOTIPOS	
T0	Testigo	0	Col. Ensayo	ESPINILLO
T1	1/8X	5 g/ha	Col. Ensayo	-
T2	1/4X	10g/ha	Col. Ensayo	-
T3	1/2X	20 g/ha	Col. Ensayo	-
T4	X	40 g/ha	Col. Ensayo	ESPINILLO
T5	2X	80 g/ha	Col. Ensayo	ESPINILLO
T6	4X	160 g/ha	Col. Ensayo	ESPINILLO
T7	8X	320 g/ha	-	ESPINILLO
T8	16X	640 g/ha	-	ESPINILLO
T9	32X	1280 g/ha	-	ESPINILLO

La aplicación de los tratamientos herbicidas se realizó con un equipo pulverizador experimental, presurizado con CO₂, provisto de 4 picos con pastillas Hypro ULD 120015,

calibrado para pulverizar un caudal de 150 l de caldo/ha. Se evaluó la calidad de aplicación (número, distribución y tamaño de gotas) utilizando tarjetas hidrosensibles. Para cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones (una planta por repetición). A los 30 DDA, las plantas se cortaron en la superficie del suelo y se registró la biomasa secando en estufa los brotes verdes hasta peso constante (60 °C). El diseño experimental fue completamente aleatorizado y el análisis de datos se realizó con el módulo de modelos lineales generales y mixtos del software InfoStat, la comparación de medias con el test DGC del mismo software (Di Rienzo *et al.*, 2018).

El estudio de las curvas entre la dosis de herbicida y la respuesta de la planta se realizó con el programa R análisis DRC. Para cuantificar el nivel de resistencia se calculó el factor de resistencia (FR) como la relación de los valores GR₅₀ (dosis de herbicida que da una respuesta del 50% de control) de la población resistente con respecto a la población susceptible: $FR = (GR_{50R}/GR_{50S})$ (Seefeldt *et al.*, 1995).

Determinación de la actividad enzimática AHAS in vitro

La actividad de AHAS se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Anastasini *et al.*, (2021). Se cultivaron cinco plantas de cada biotipo bajo estudio. La extracción de la enzima AHAS se realizó a partir de 150 mg de hojas jóvenes de plantas en estadio de 4-5 hojas. El tejido fue pulverizado en nitrógeno líquido en microtubos de 1,5 ml y se agregó 1 ml de solución de extracción y reacción (Yu *et al.*, 2003). Las muestras fueron homogeneizadas y filtradas en gasa estéril manteniendo las muestras a 4°C. (Figura 14). Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 10.000 g a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante fue utilizado como extracto crudo para el ensayo enzimático: 100 µl del sobrenadante se mezclaron con el mismo volumen de agua destilada o diferentes concentraciones de imazetapir (0,01–1000 µM), metsulfurón-metil (0,0001–100 µM) o diclosulam (0,001–1000 µM). Los tubos se incubaron 1 hora a 37°C. Posteriormente se les agregó 60 µl de ácido sulfúrico 5 M y los tubos fueron incubados a 60 °C por 30 minutos. La cuantificación del producto final de reacción se llevó a cabo por el método colorimétrico de Westerfeld (1945), para lo cual se agregó a cada tubo 500 µl de una solución de 2,5% de α-naftol y 0,25% de creatina preparado en hidróxido de sodio 2,5 M inmediatamente antes de ser utilizado. Los tubos fueron incubados a 60°C por 15 minutos

y centrifugados a temperatura ambiente por 10 minutos a 10.000 g. El sobrenadante fue utilizado para la lectura de absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Figura 15).

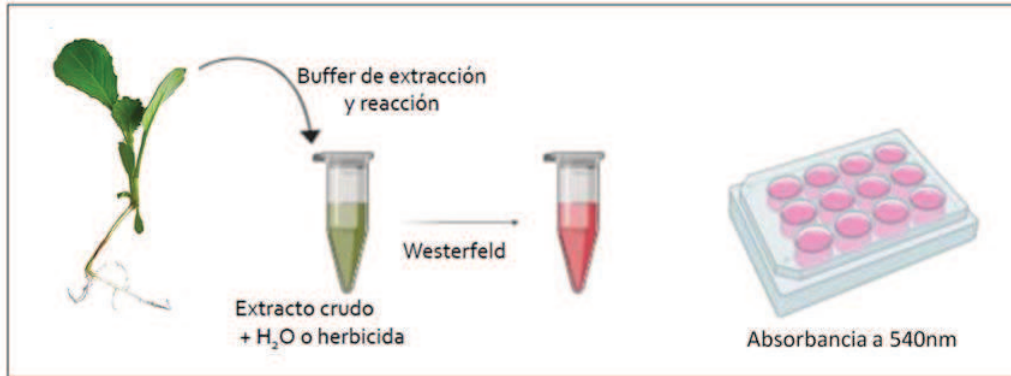


Figura 14. Esquema de metodología de la cuantificación de la actividad AHAS in vitro.

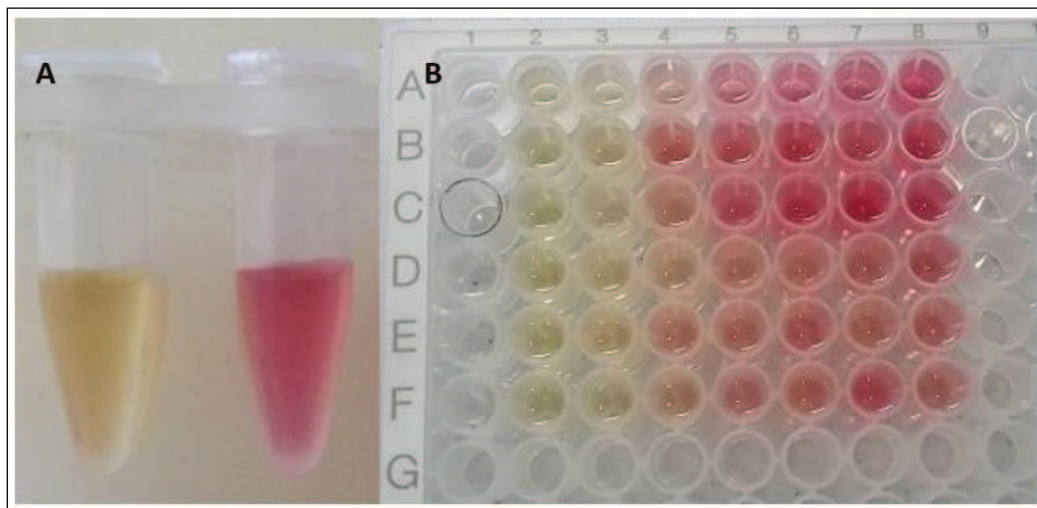


Figura 15: A tubos y B placas para estimar la actividad enzimática. El color más intenso muestra mayor actividad de la enzima AHAS.

Para la determinación de actividad enzimática de AHAS basal se realizaron 4 repeticiones para cada biotipo en ausencia de herbicida y se realizó una prueba t de Student. Los datos de absorbancia a 540 nm fueron utilizados para obtener el porcentaje de acetolactato producido con respecto al control (ausencia de herbicida). Se realizaron 4 repeticiones para cada concentración de herbicidas. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete *drc* (Ritz *et al.*, 2016) en el entorno de R (R Core Team, 2019). La respuesta al herbicida fue analizada por regresión no lineal según el modelo log-logístico con límite superior igual a 100 y límite inferior igual a cero:

$$f(x) = \frac{100}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b}$$

Dónde: x es la concentración de herbicida, b es la pendiente en el punto de inflexión y e (también llamado I_{50}) es el valor de x que reduce la actividad enzimática en un 50%. El factor de resistencia (**FR**) fue calculado como la relación entre los valores de I_{50} del biotipo resistente y susceptible.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sensibilidad a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS del biotipo de *R. rugosum* con sospecha de resistencia

En condiciones de campo

Si bien hubo diferencias significativas en los porcentajes de control del biotipo Espinillo de *R. rugosum*, en los diferentes tratamientos y fechas de evaluación, el mismo fue muy bajo (menor al 40% de control) para todos los tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5: Eficacia de control (% respecto a un testigo no tratado) de los diferentes tratamientos sobre *R. rugosum* biotipo Espinillo.

Tratamiento	Ingrediente activo	Dosis (g)	13 DDA		35 DDA		55 DDA	
T0	Testigo	0	0	C	0	C	0	C
T1	Metsulfuron metil	4,8	6.67	C	8.33	B	1.67	C
T2	Metsulfuron metil	9,6	23.33	A	33.33	A	6.67	B
T3	Metsulfuron metil	19,2	26.67	A	36.67	A	16.67	A
T4	Diclosulam	33,6	0	C	0	C	0	C
T5	Diclosulam	67,2	1.67	C	0	C	0	C
T6	Diclosulam	134,4	1.67	C	11.67	B	6.67	B
T7	Imazetapir	100	1.67	C	0	C	0	C
T8	Imazetapir	200	11.67	B	6.67	B	10	B
T9	Imazetapir	400	13.33	B	5	B	5	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) de acuerdo al test DGC (Di Rienzo et al., 2018).

1. Metsulfuron-metil (T1, T2 y T3):

- Las aplicaciones de Metsulfuron-metil mostraron un porcentaje de control significativamente mayor a medida que se incrementó la dosis.

- T3 (19.2 g) fue el más efectivo, alcanzando un 26.67% de control a los 13 DDA y 36.67% a los 35 DDA, clasificándose como "A" en ambas instancias.

- T2 (9.6 g) también mostró un buen desempeño, con un control de 23.33% a los 13 DDA y 33.33% a los 35 DDA.

- T1 (4.8 g), presentó resultados mucho más bajos respecto a T2 y T3, con un máximo de 8.33% de control a los 35 DDA.

2. Diclosulam (T4, T5 y T6):

- Los tratamientos con Diclosulam resultaron en un control muy limitado. T4 no mostró ningún control en las tres evaluaciones.

- T5 y T6 lograron un control extremadamente bajo (1.67% en el mejor de los casos) e incluso con la dosis mayor (T6 a 134.4 g), el control no superó el 11.67% a los 35 DDA.

3. Imazetapir (T7, T8 y T9):

- Los tratamientos con Imazetapir presentaron resultados variables pero inferiores a los de Metsulfuron-metil. T8 (200 g) y T9 (400 g) lograron control moderado con 11.67% y 13.33% a los 13 DDA, respectivamente.

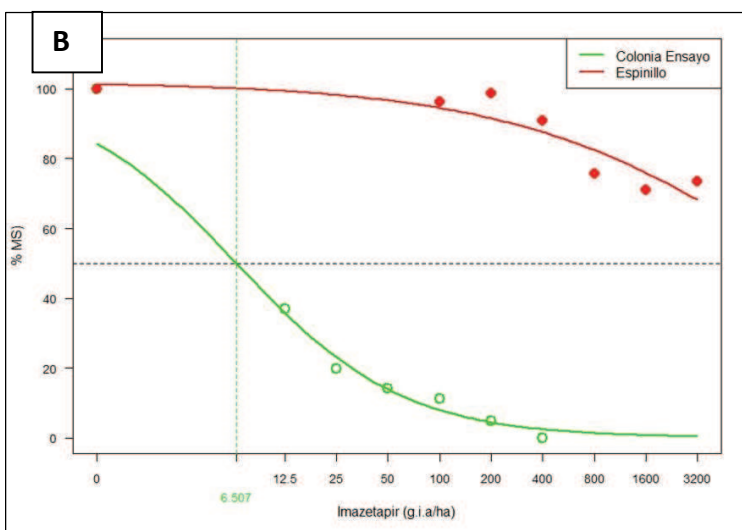
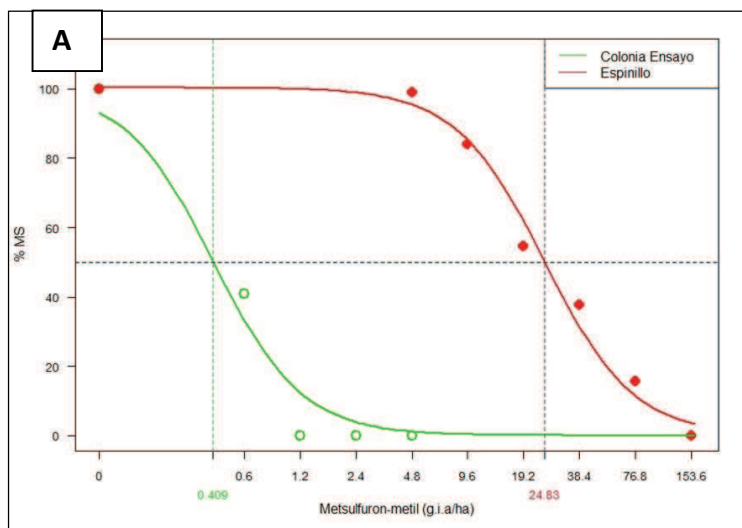
- Sin embargo, el porcentaje de control se redujo significativamente en las evaluaciones siguientes, con T9 manteniendo solo un 5% de control a los 55 DDA.

De esta manera, queda en evidencia la baja sensibilidad de este biotipo a los herbicidas inhibidores de la enzima AHAS probados en este trabajo (ANEXO Figuras 1 a 5).

Experimento en macetas

Las diferencias entre las curvas de dosis-respuesta del biotipo Espinillo y Colonia Ensayo fueron muy pronunciadas para los tres herbicidas probados (Figura 16). La aplicación de las dosis de campo recomendadas de metsulfuron-metil (4,8 g i.a. ha⁻¹), imazetapir (100 g i.a. ha⁻¹) o diclosulam (33,6 g i.a. ha⁻¹) disminuyeron drásticamente el peso seco de los brotes en las plantas susceptibles del biotipo Colonia Ensayo pero no afectaron el peso seco de las plantas resistentes del biotipo Espinillo (Figuras 17, 18 y 19). Los análisis estadísticos pueden consultarse en el Anexo (Cuadros 1 al 6).

El factor de resistencia calculado para metsulfuron-metil resultó 48,3 veces mayor en el biotipo resistente (Espinillo) respecto al biotipo sensible (Colonia Ensayo). En el caso de los herbicidas imazetapir y diclosulam los factores de resistencia para el biotipo Espinillo fueron >560 y >1031, respectivamente (Tabla 6).



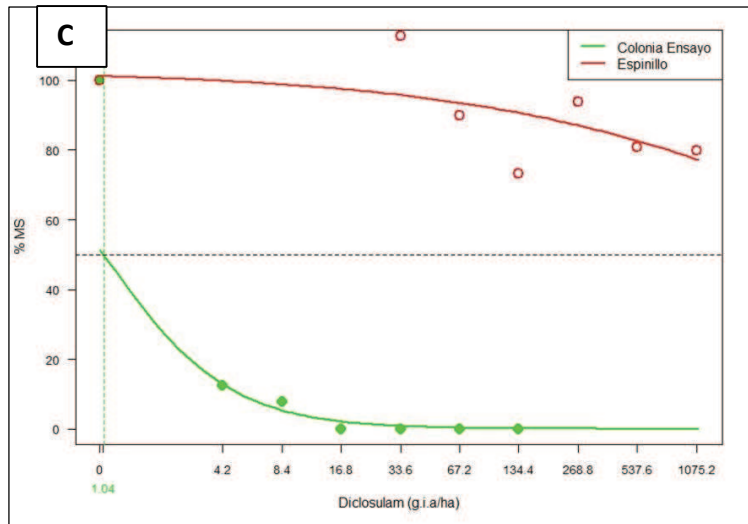


Figura 16. Curvas dosis-respuesta del porcentaje de materia seca de las poblaciones Espinillo (R) y de Colonia Ensayo (S), a los herbicidas metsulfuron-metil (A), imazetapir (B) y diclosulam (C).

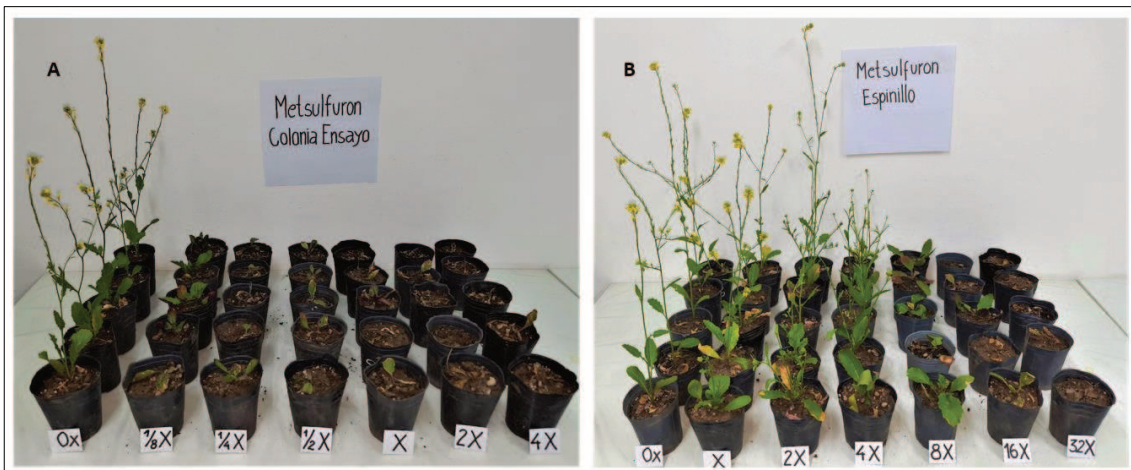


Figura 17. Respuestas observadas de los biotipos Colonia Ensayo (A) y Espinillo (B) a las diferentes dosis de metsulfuron-metil.

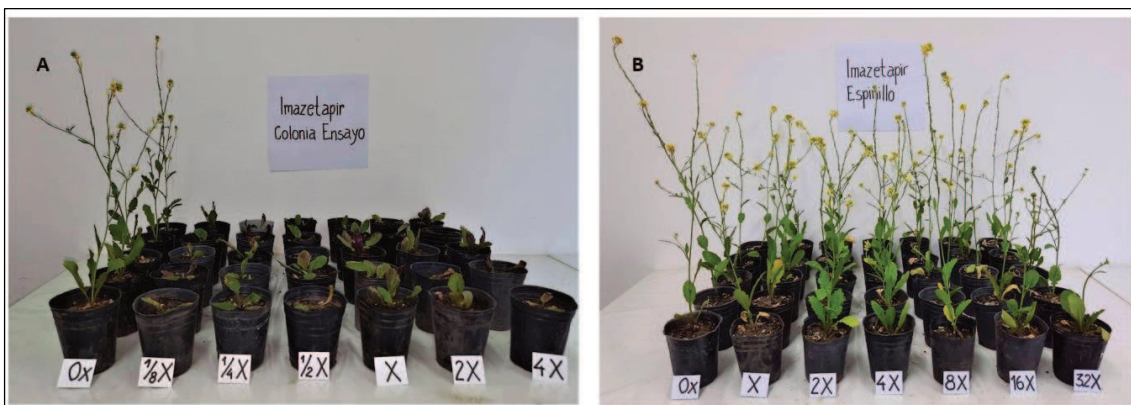


Figura 18. Respuestas observadas de los biotipos Colonia Ensayo(A) y Espinillo (B) a las diferentes dosis de imazetapir.

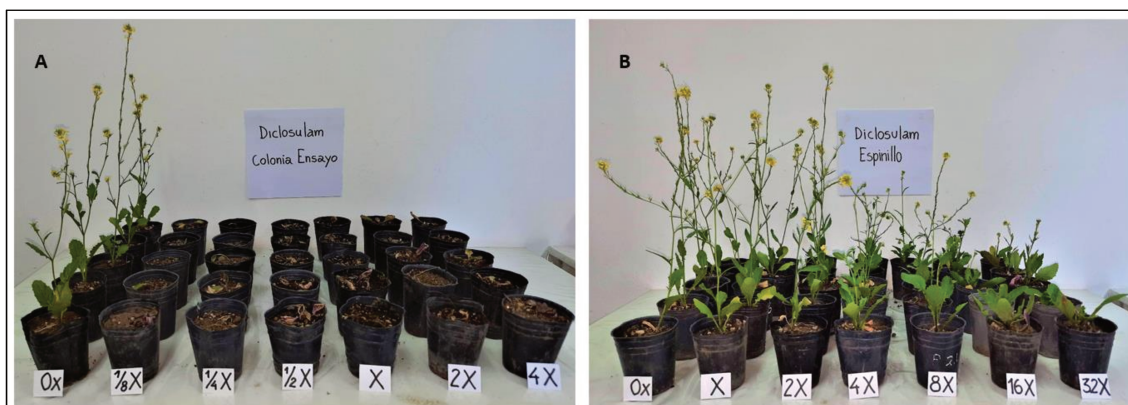


Figura 19. Respuestas observadas de los biotipos Colonia Ensayo (A) y Espinillo (B) a las diferentes dosis de diclosulam.

Tabla 6. Dosis requerida para reducir el peso en un 50% (GR50) y factor de resistencia (FR).

Herbicida	Biotipo	GR50(g)	FR
Metsulfurón-metil	Colonia Ensayo	0,409	
	Espinillo	24,835	60,72
Imazetapir	Colonia Ensayo	6,507	
	Espinillo	ND*	>560,22
Diclosulam	Colonia Ensayo	1,042	
	Espinillo	ND*	>1.031,86

*No Determinado

El biotipo Colonia Ensayo (CE) mostró alta sensibilidad a los tres herbicidas ensayados (Figuras 17A, 18A y 19A), siendo totalmente controlado, incluso, con 1/8 de la dosis de uso recomendada, en el caso del herbicida diclosulam (Figura 19 A).

El biotipo Espinillo presentó resistencia cruzada a los herbicidas metsulfurón-metil, imazetapir y diclosulam, mostrando altos factores de resistencia (FR). El factor de resistencia del biotipo Espinillo para metsulfurón-metil fue de 60,72. Este valor de FR es muy superior a los informados por Hatami *et al* (2016) en biotipos con FR de 2,5 – 6,6 para el herbicida tribenuron-metil (también perteneciente a la familia de las sulfonilureas), aunque muy inferior a los reportados por Pardo *et al* (2019) en España, donde el factor de resistencia para este mismo herbicida varió entre 188 y 253. Respecto a los herbicidas imazetapir y diclosulam, los factores de resistencia del biotipo Espinillo fueron mayores a 560,22 y 1031,86, respectivamente.

Determinación de la actividad enzimática AHAS in vitro

Los datos de la actividad enzimática en respuesta al herbicida ajustaron adecuadamente a un modelo log-logístico de 3 parámetros ($p > 0,05$). En la Figura 20 se muestran las curvas ajustadas de dosis-respuesta de acetolactato (AHAS) in vitro de las poblaciones Espinillo (R) y Colonia Ensayo (S).

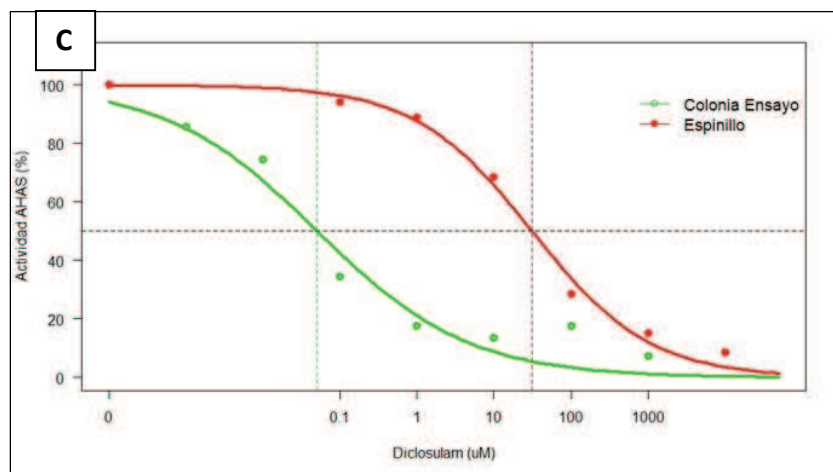
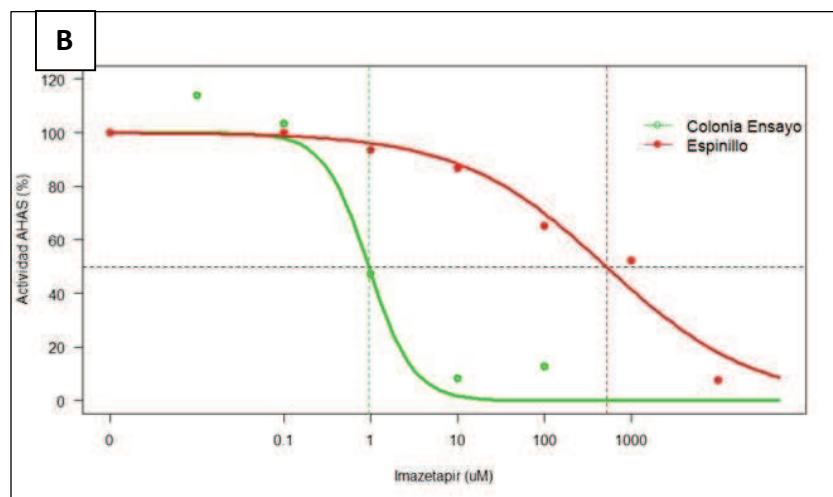
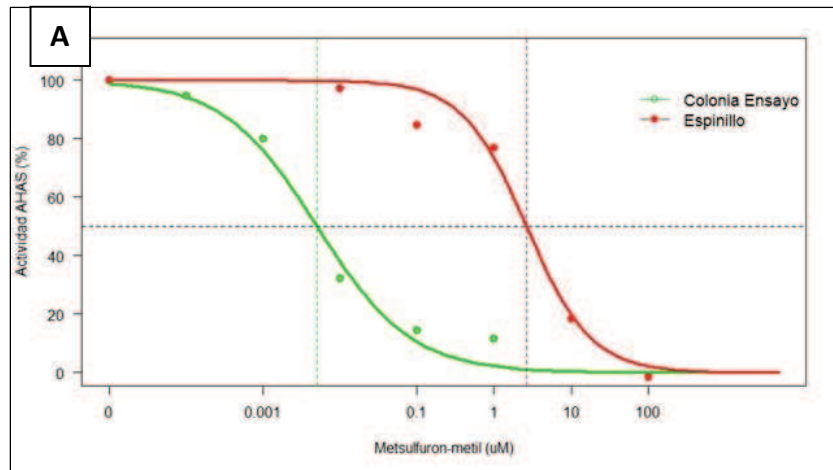


Figura 20: Curvas dosis-respuesta de la actividad in vitro del acetolactato (AHAS) de las poblaciones Espinillo (R) y de Colonia Ensayo (S), a los herbicidas metsulfuron-metil (A), imazetapir (B) y diclosulam (C).

Las concentraciones de herbicidas para reducir la actividad enzimática AHAS un 50% (I_{50}), difieren mucho entre las poblaciones estudiadas. Los valores de resistencia estimados para el biotipo Espinillo fueron 500 veces mayores que en el biotipo Colonia Ensayo para los herbicidas metsulfuron-metil, imazetapir y diclosulam (Tabla 7). Estos valores de FR son superiores a los determinados por Hatami et al. (2016) para tribenuron-metil (FR 28.6 a 39.2), florasulam (FR 11.52 a 17.29) y por Ntoanidou *et al.* (2019) para tribenuron-metil, los cuales fueron 230 a 472 veces al biotipo susceptible. Estos resultados concuerdan con los ensayos de planta entera en macetas y avalan firmemente que la resistencia se debe a una alteración de la enzima AHAS, aunque debería realizarse un análisis molecular para determinar la posible mutación en la secuencia o secuencias del gen AHAS de la población de Espinillo.

Tabla 7. Estimación de la inhibición de la actividad enzimática AHAS media (I_{50}) y del factor de resistencia (FR)

Herbicida	Biotipo	$I_{50}(\mu\text{M})^*$	FR
Metsulfurón-metil	Colonia Ensayo	0,005	
	Espinillo	2,64	528
Imazetapir	Colonia Ensayo	0,952	
	Espinillo	513,57	539
Diclosulam	Colonia Ensayo	0,051	
	Espinillo	31,033	608

* I_{50} es la concentración (en micro moles) de herbicida que reduce la actividad AHAS al 50%.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, verifican que el biotipo Colonia Ensayo presenta gran sensibilidad a los herbicidas metsulfuron-metil, imazetapir y diclosulam y demuestran que el biotipo Espinillo presenta resistencia cruzada a los herbicidas ensayados. Los factores de resistencia del biotipo Espinillo para los herbicidas metsulfuron-metil, imazetapir y diclosulam son muy superiores a los hallados por diferentes autores en otros países y pueden estar asociados con un cambio en la estructura de la enzima blanco, ya que se observa una gran actividad de la enzima AHAS aún después del agregado de los herbicidas testeados.

DISCUSIÓN FINAL

Se sugiere realizar un análisis molecular para determinar la posible mutación en la secuencia o secuencias del gen AHAS de la población Espinillo que le estaría otorgando resistencia a este grupo de herbicidas. Para evitar la aparición de biotipos resistentes, es necesario el estudio de la eficacia de herbicidas alternativos para el control de *Rapistrum rugosum* ya que se conoce la presencia en Argentina de otras *Brasicáceas* resistentes, además, a herbicidas hormonales.

BIBLIOGRAFÍA

- ALAM (1974). Revista de la Asociación Latinoamericana de Malezas, pág. 6 - 12. Resumen del panel sobre Métodos para la Evaluación de Ensayos en Control de Malezas en Latinoamérica. II Congreso de ALAM. Cali, Colombia.
- Anastasini V, Depetris, M. B., Ochogavía, A. C., Nestares, G. and Breccia, G. (2021). An integrated approach for the characterization of one- and two-gene imazamox-resistant wheat lines, *Crop Sci* 61:580-590.
- Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa. <https://www.aapresid.org.ar/>. Consulta junio de 2023.
- Arregui, C. & Puricelli, E. (2014). Sitio de acción de los herbicidas. En: *Malezas e Invasoras de la Argentina: su identificación, biología y manejo*. Editores: Osvaldo A. Fernández (UNSur), Eduardo S. Leguizamón (UNR) y Horacio Acciaresi (UNLa Plata). Editorial: Universidad Nacional del Sur. (pp. 391-406) ISBN 978-987-1907-70-0.
- Arregui, C. & Puricelli, E. (2018). *Mecanismos de acción de plaguicidas*. ISBN: 978-987-702-017-5. 264 pp.
- Beffa, R.; Figge, A., Lorentz, L., Hess, M., Laber, B., Ruiz-Santaella, J. y Streck, H. (2012). Weed resistance diagnostic technologies to detect herbicide resistance in cereal growing areas. A review. 25 th German Conference on Weed Biology and Weed Control, March 13-15, 2012, Braunschweig, Germany.
- Beyer E.M., Duffy, M. J., Hay, J. V., Schlueter, D. D. (1988) Sulfonylureas. En: *Herbicides-Chemistry, Degradation, and Mode of Action* (eds. PC Kearney y DD Kaufman), pp. 117-189, Marcel Dekker, New York.
- Bolsa de Cereales de Entre Ríos. Informe Final de Producción - Campaña 2022/23. En bolsacer.org.ar. Consulta septiembre de 2023.

- Burkart, A.E., y Bacigalupo, N. M. (1969). Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- CASAFE. (2017). Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. 18° edición.
- Chipman, D., Barak, Z. and Schloss, J.V. (1998). Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. En <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167483898000831>. Consulta abril 2021.
- Christoffoleti, P., Moreyra, M., Rivero, D., Carvalho, S., Nicolai, M. (2006). Considerações sobre métodos de caracterização da resistência e resultados experimentais obtidos no Brasil e no exterior para resistência ao glifosato. In: Congresso Brasileiro de Ciência das Plantas Daninhas, 2006, Brasília. Palestras. P 1-7.
- Cruz-Hipólito, H., Domínguez-Valenzuela, J. A. y De Prado, R. (2010). Mecanismos de resistencia de malezas a herbicidas. En <https://www.researchgate.net/publication/296332280>. Acceso: junio de 2021.
- Délye, C. (2013). Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science* 69: 176–187. doi:10.1002/ps.3318.
- Devine, M. D., Duke, S. O. y Fedtke, C. (1993). *Physiology of herbicide action*, Eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, USA. 441 pp.
- Devine M. D, Shukla, A. (2000). Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop protection* 19. En <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026121940000123X>. Consulta octubre de 2020.

- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Di Rienzo, J., Guzman, A., Casanoves, F. (2002). A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. JABES 7, 129–142. <https://doi.org/10.1198/10857110260141193>
- Duggleby, R. G., & Pang, S. S. (2000). Acetohydroxyacid Synthase. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 33(1), 1–36. <http://doi.org/10.1107/S0907444901011635>.
- Faya De Falcon, L. M., Pieri, S. M. y Rodriguez, N. E. (1992). Malezas. Guía de reconocimiento de semillas y plántulas. Enciclopedia Agro de Cuyo. Manuales. Fascículo 3. INTA C.R. CUYO.
- Fernández, O. A., Leguizamón, E. S. y Acciaresi, H. A. (2014). Tomo I. Capítulo I Definiciones: visión y enfoque. En: Malezas e Invasoras de la Argentina: su identificación, biología y manejo. Editores: Osvaldo A. Fernández (UNSur), Eduardo S. Leguizamón (UNR) y Horacio Acciaresi (UNLa Plata). Editorial: Universidad Nacional del Sur, 964 pág., ISBN 978-987-1907-70-0.
- Gaines, T A, S. O. Duke, S. Morran, C. A. G. Rigon, P. J. Tranel, A. Küpper y F. E. Dayan. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. DOI 10.1074/jbc.REV120.013572. Consulta junio de 2021.
- Ge, X., D'Avignon, D., Ackerman, J. y Sammons, R. (2010). Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. Pest Management Science 66: 345-348.
- Global HRAC MOA classification working group report. (2020). En https://hracglobal.com/files/GHRAC_MOA_UPDATE_2020.pdf. Consulta mayo de 2021.

- Gurjeet Gill, Borger, C. and Chauhan, B. (2021). Turnip weed en Ecology of Major Emerging Weeds. 84 – 87. ISBN: 978-1-922342-18-8 (on line)
- Hatami, Z. M., Gherekhloo, J., M., A., Osuna, M. D., Alcántara, R., Fernández, P., Sadeghipour, H. R., & De Prado, R. (2016). Multiple mechanisms increase levels of resistance in *Rapistrum rugosum* to ALS herbicides. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00169>.
- Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. Online. Sunday, September 24, 2023. Available www.weedscience.org
- Jones, A.V., Young, R. M AND K.J. LETO. (1985). Subcellular localization and properties of acetolactate synthase, target site of the sulfonylurea herbicides. *Plant Physiology* 77: S-293.
- Labrada, R. (2006). Recomendaciones para el manejo de malezas. FAO. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0884s/a0884s00.pdf>. Consulta marzo de 2019.
- Lanfranconi, L.E.; Bragachini, M; Peiretti, J; Sánchez, F. (2013). El avance de las malezas resistentes a herbicidas en los sistemas agrícolas. ¿Podremos controlarlas? Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_lan-bra_-_malezas_resistentes__limpieza_de_sem.pdf. Consulta septiembre de 2021.
- Levitt, G. (1978) Herbicidal sulfonamides. US patent 4127405.
- Manalil, S. and Chauhan, B. S. (2019). Interference of turnip weed (*Rapistrum rugosum*) and Mexican prickly poppy (*Argemone mexicana*) in wheat. *Weed Sci.* 67: 666–672. doi: 10.1017/wsc.2019.42
- Marzoca, A. (1993). Manual de malezas. 4° ed. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires. Argentina. pp. 299 – 300.
- Mifflin, B. J. and CAVE, P. R. (1972). The control of leucine, isoleucine and valine biosynthesis in a range of higher plants. *J Exp Bot.* 23(2):511-516.

- Mithila, J. y Godar, A. S. (2013). Understanding Genetics of Herbicide Resistance in Weeds: Implications for Weed Management. *Advances in Crop Science and Technology* 1 (4): 1-3.
- Mohler, C. L. (2001). Weed life history: Identifying vulnerabilities. p. 40–98. In M. Liebman et al. *Ecological management of agricultural weeds*. Cambridge University Press, New York.
- Ntoanidou, S., Madesis, P., & Eleftherohorinos, I. (2019). Resistance of *Rapistrum rugosum* to tribenuron and imazamox due to Trp574 or Pro197 substitution in the acetolactate synthase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 154, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.12.001>.
- Oerke, E.C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144 (1): 31-43.
- Pardo, G., Marí, A. I., Aibar, J., Vilaplana, L., & Cirujeda, A. (2019). Bastard Cabbage (*Rapistrum rugosum* L.) Resistance to tribenuron-methyl and iodosulfuron-methyl-sodium in Spain and alternative herbicides for its control. *Agronomy*, 9(9), 492. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090492>.
- Pardo De Santayana, M., Morales, R., Tardío, J. & Molina, M. (2018). Inventario español de los conocimientos tradicionales relativos a la biodiversidad. Fase II (1). Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. 404 pp.
- Powles, S. B. (2010). Gene amplification delivers glyphosate-resistant weed evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (3) 955-956.
- Powles, S.B. and Yu, Q. (2010). Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61: 317 -347.

- Qasem, J.R. (2013). *Herbicide Resistant Weeds: The Technology and Weed Management*. *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*. Chapter 17.28 p. ISBN 978-953-51-1112-2
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. and D. Gerhard. (2015). Dose-response analysis using R, *PLoS One* 10:e0146021.
- Sammons, R. y Gaines, T. (2014). Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science* 70: 1367–1377.
- Seefeldt, S. S., Jensen, J. E. y Fuerst, E. P. (1995). Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology*. Volumen 9: 218-227. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00023253>. Consulta 4 mayo de 2019.
- Shaner, D. L., Anderson, P. C., Stidham, M. A. (1984) Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.*, 76: 545-546.
- Shaner, D. L., Singh, B. K., Stidham, M. A. (1990). Interaction of imidazolinone with plant acetohydroxyacid synthase: evidence for in vivo binding and competition with sulfometuron methyl. *J. Agric. Food Chem*, 38: 1279 – 1282.
- Tan, S., Evans, R., & Singh, B. (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino acids*, 30(2), 195-204. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0254-1>
- Tuesca, D. (2011). Resistencia de malezas a herbicidas. *Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina*. CASAFE. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Argentina. XV Edición: Tomo I: pp 152-157. ISBN: 978-987-1563-06-7.

- Vencill, W., Nichols, R., Webster, T., Soteris, C., Mallory-Smith, N., Burgos, W., Johnson, W. y McClelland, M. (2012). Herbicide Resistance: Toward an Understanding of Resistance Development and the Impact of Herbicide-Resistant Crops. *Weed Science* 60 (1): 2–30.
- Vila-Aiub, M. M. & Fischer, A. (2014). Resistencia a Herbicidas. En: Malezas e Invasoras de la Argentina: su identificación, biología y manejo. Editores: Osvaldo A. Fernández (UNSur), Eduardo S. Leguizamón (UNR) y Horacio Acciaresi (UNLa Plata). Editorial: Universidad Nacional del Sur, 964 pág., ISBN 978-987-1907-70-0.
- Weed Science Society of America (WSSA) (1998). “Herbicide resistance” and “herbicide tolerance” defined. *Weed Technology*. Vol. 12 (4), p 789. Disponible en <http://wssa.net/wssa/resistance/herbicide-resistance-and-herbicide-tolerance-definitions/>. Consulta 3 de marzo de 2019.
- Westerfeld, W.W. (1945). A colorimetric determination of blood acetoin. *J. Biol. Chem.* 161: 495– 502.
- Yannicari, M. (2014). Estudio fisiológico y genético de biotipos de *Lolium perenne* L. resistentes a glifosato. Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de La Plata. Tesis 229 p.
- Yu, Q., Zhang, X. Q., Hashem, A., Walsh, M. J. y Powles, S. B. (2003). ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Science*, 51:831–838.
- Yu, Q. y Powles, S. B. (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Management Science* 70 (9): 1340–1350.
- Yuan, J., Tranel, P. y Stewart, C (Jr). (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12 (1): 6-13.

ANEXOS

Evaluación de la sensibilidad a herbicidas inhibidores de la enzima AHAS del biotipo de *R. rugosum* con sospecha de resistencia

En condiciones de campo

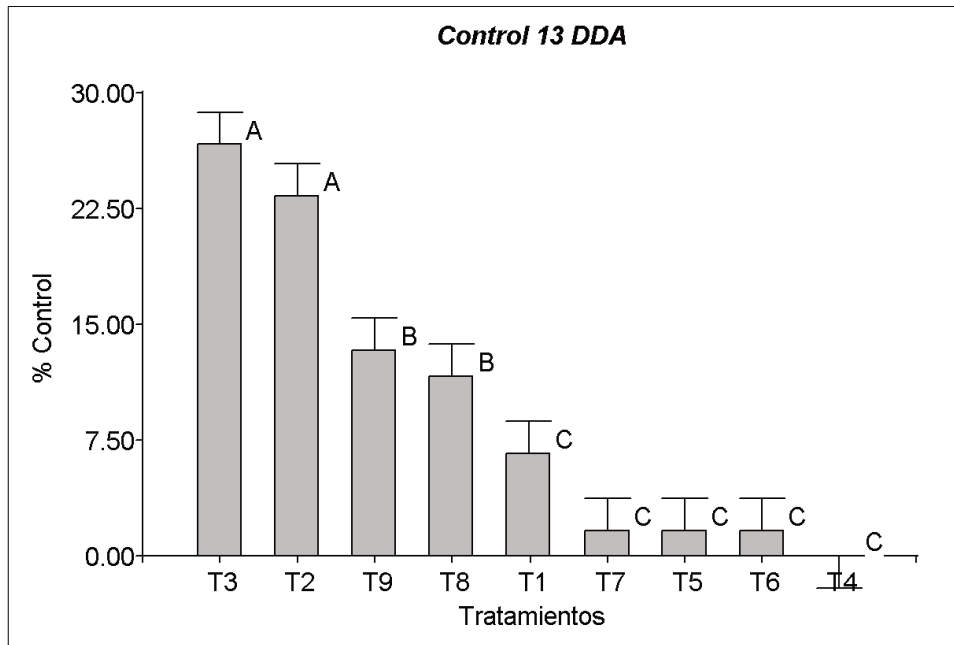


Figura 1. Evaluación de la eficacia de los distintos tratamientos a los 13 días después de la aplicación (DDA). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) de acuerdo al test DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002)

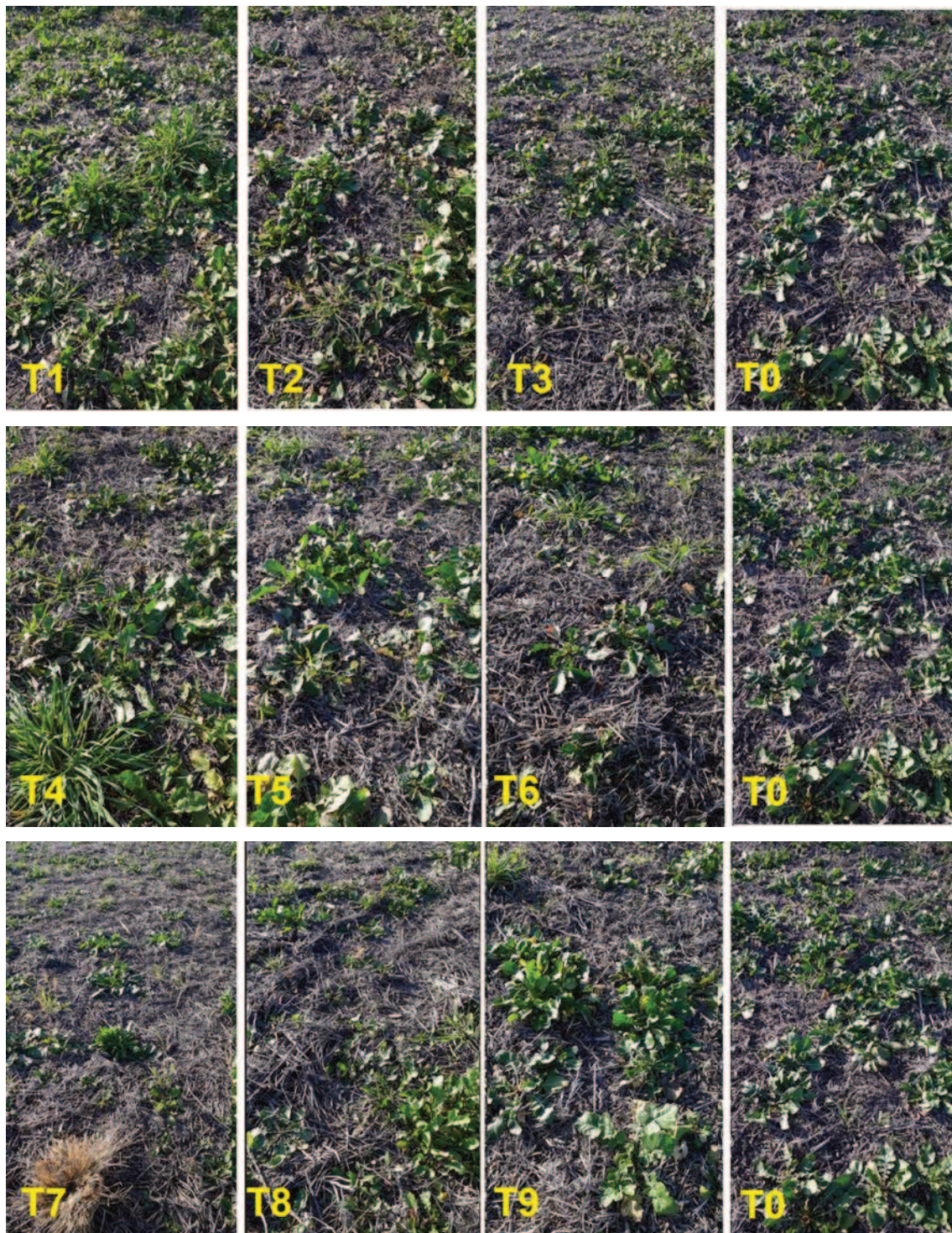


Figura 2. Evaluación visual de la eficacia de los distintos tratamientos a los 13 días después de la aplicación (DDA).

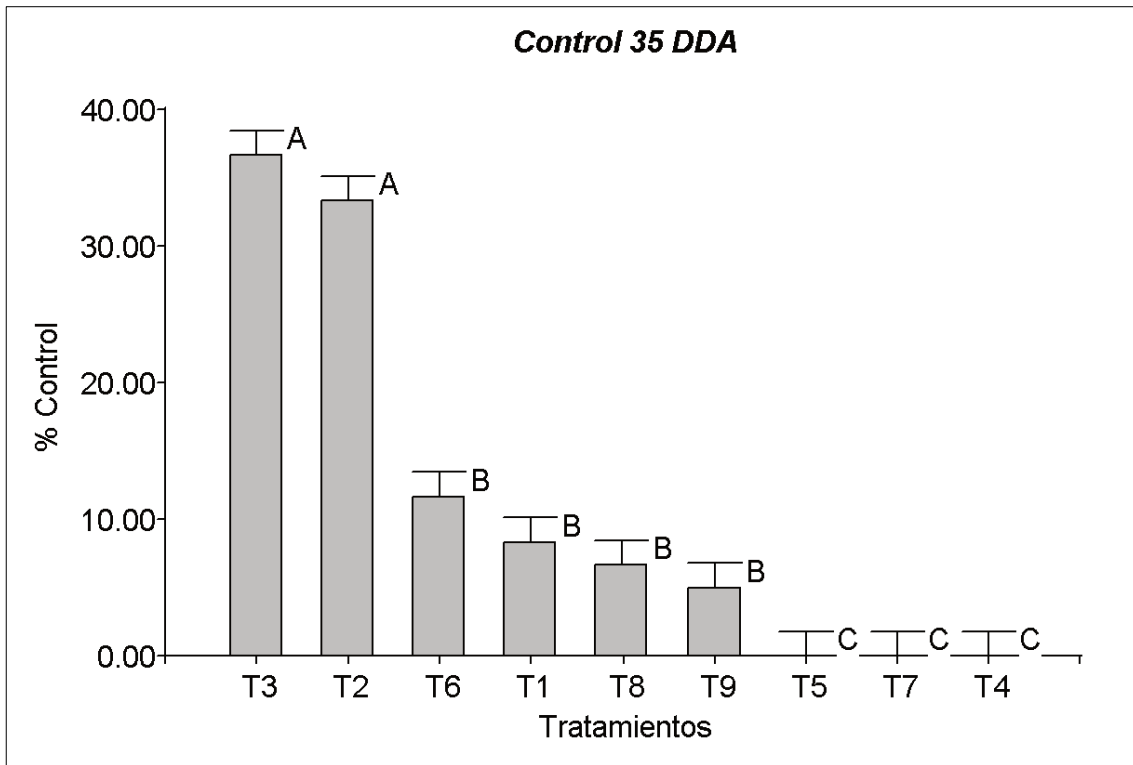


Figura 3. Evaluación de la eficacia de los distintos tratamientos a los 35 días después de la aplicación (DDA). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) de acuerdo al test DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002)

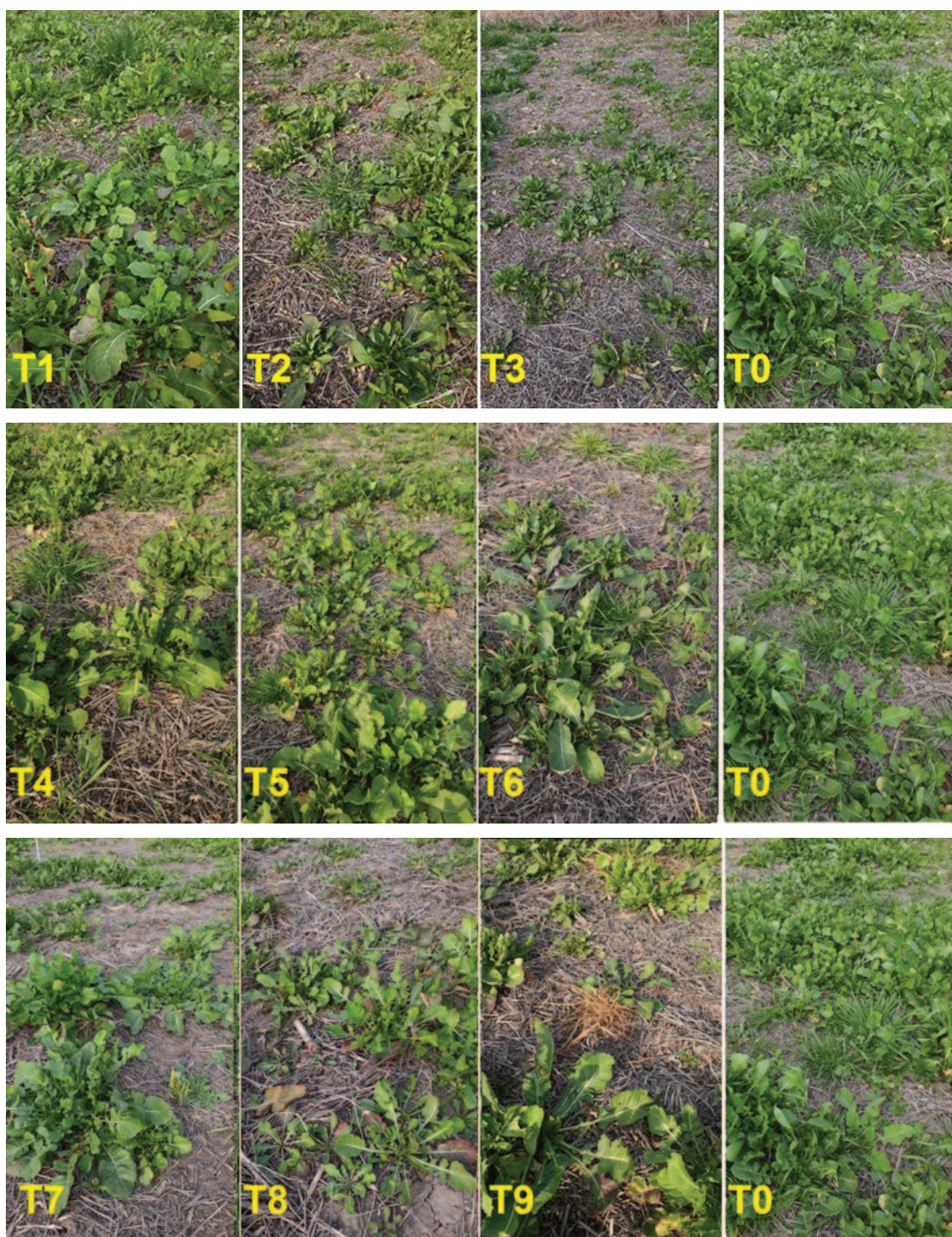


Figura 4. Evaluación visual de la eficacia de los distintos tratamientos a los 35 después de la aplicación (DDA).

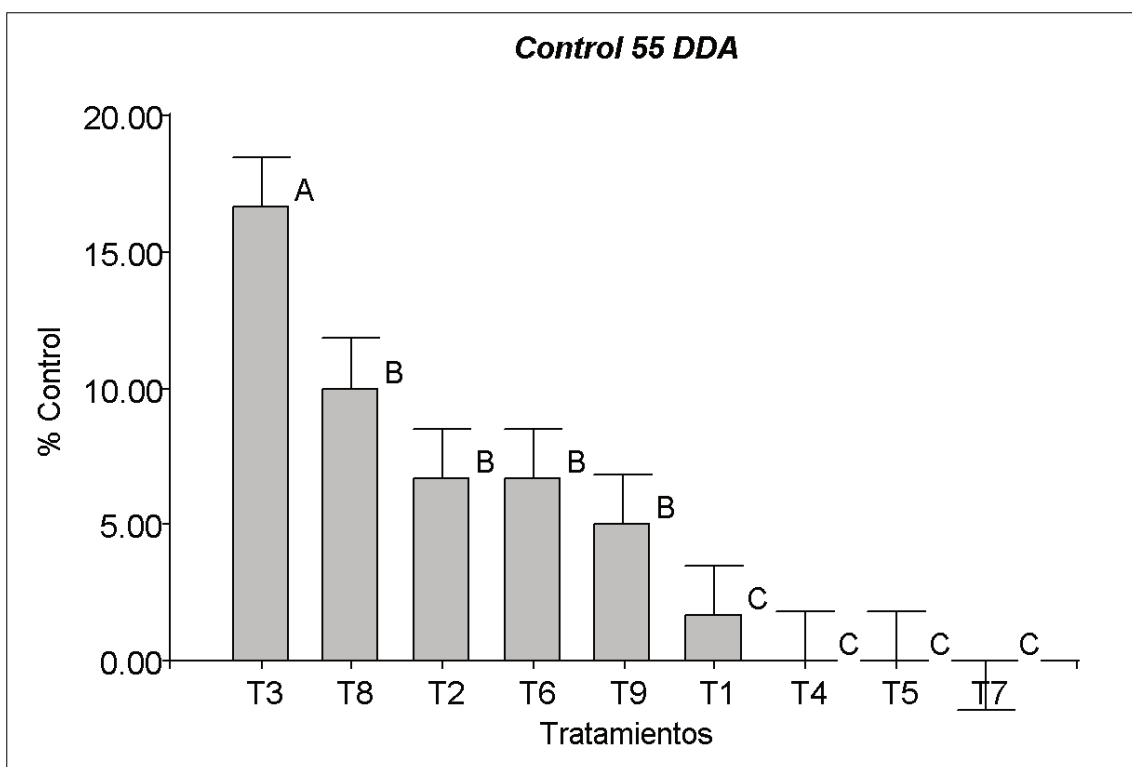


Figura 5. Evaluación de la eficacia de los distintos tratamientos a los 55 días después de la aplicación (DDA). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) de acuerdo al test DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002)



Figura 6. Evaluación visual de la eficacia de los distintos tratamientos a los 55 días después de la aplicación (DDA).

Ensayo en macetas

Resultados del análisis estadístico de MS en relación a la dosis de herbicidas

Cuadro 1: Efectos de las diferentes dosis de metsulfuron-metil sobre la MS. Biotipo Colonia Ensayo. MS - Medias ajustadas y errores estándares para Dosis. DGC (Alfa=0,01)

Dosis	Medias	E.E.			
0	1	0,04	A		
1	0,37	0,04		B	
2	0	0,04			C
4	0	0,04			C
8	0	0,04			C
16	0	0,04			C
32	0	0,04			C
64	0	0,04			C
128	0	0,04			C
256	0	0,04			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

Cuadro 2: Efectos de las diferentes dosis de metsulfuron-metil sobre la MS. Biotipo Espinillo. MS - Medias ajustadas y errores estándares para Dosis. DGC (Alfa=0,01)

Dosis	Medias	E.E.			
0	1	0,11	A		
8	0,99	0,11	A		
16	0,84	0,11	A		
32	0,55	0,11		B	
64	0,38	0,11		B	
128	0,16	0,11		B	
256	0	0,11		B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

Cuadro 3: Efectos de las diferentes dosis de imazetapir sobre la MS. Biotipo Colonia Ensayo. MS - Medias ajustadas y errores estándares para Dosis. DGC (Alfa=0,01)

Dosis	Medias	E.E.			
0	1	0,06	A		
12,5	0,33	0,06		B	
25	0,16	0,06			C
50	0,13	0,06			C
100	0,1	0,06			C
200	0,05	0,06			C
400	0	0,06			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

Cuadro 4: Efectos de las diferentes dosis de imazetapir sobre la MS. Biotipo Espinillo.
MS - Medias ajustadas y errores estándares para Dosis. DGC (Alfa=0,01)

Dosis	Medias	E.E.	
0	1	0,1	A
200	0,99	0,12	A
100	0,96	0,11	A
400	0,82	0,1	A
800	0,76	0,1	A
3200	0,74	0,1	A
1600	0,71	0,1	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

Cuadro 5: Efectos de las diferentes dosis de diclosulam sobre la MS. Biotipo Colonia
Ensayo. MS - Medias ajustadas y errores estándares para Dosis. DGC (Alfa=0,01)

Dosis	Medias	E.E.		
0	1	0,04	A	
4,2	0,12	0,04		B
8,4	0,08	0,04		B
16,8	0	0,04		B
33,6	0	0,04		B
67,2	0	0,04		B
134,4	0	0,04		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

Cuadro 6: Efectos de las diferentes dosis de diclosulam sobre la MS. Biotipo Espinillo.
MS - Medias ajustadas y errores estándares para Dosis. DGC (Alfa=0,01)

Dosis	Medias	E.E.	
33,6	1,13	0,09	A
0	1	0,09	A
268,8	0,94	0,09	A
67,2	0,9	0,09	A
537,6	0,81	0,09	A
1075,2	0,8	0,09	A
134,4	0,73	0,09	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

AGRADECIMIENTOS

A mi director Lic. Daniel Tuesca y a la co-directora Ms.Sc Alejandra Lutz por dedicar parte de su tiempo a este trabajo, por su apoyo durante las actividades de campo y en la redacción del proyecto.

Al tribunal, por su valiosa contribución a través de correcciones y sugerencias.

A los profesionales que me acompañaron y ayudaron en la realización de este trabajo y su redacción, Ing. Agr. Esteban Muñoz Padilla, Ing. Agr. Mara Depetris, Ing. Agr. Gabriela Breccia, quienes brindaron asistencia en la escritura, tareas de campo y laboratorio y corrección de la tesis.

Y un agradecimiento especial a mi madre Ramona y hermanos y en particular a mi compañera Irina, por su comprensión y apoyo, por enseñarme a no claudicar, a seguir frente a todas las dificultades.

A todos ellos dedico este logro.