

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A GLIFOSATO EN DOS BIOTIPOS DE *LOLIUM* SPP. PROCEDENTES DE ESPAÑA

Gil, D.¹, Cruz Hipólito, H. E.¹, Gauvrit, C.² y De Prado, R.¹

¹Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Edif. Marie Curie, Córdoba, España.

²UMR Biologie et Gestion des Adventices, INRA Dijon.

RESUMEN

La finalidad de este estudio es analizar los mecanismos de resistencia a glifosato en *Lolium multiflorum* y *Lolium rigidum*, ambas especies colectadas en España, la primera en la región de Andalucía en cultivos de olivar y la segunda en plantaciones de cítricos en la región de Valencia. Fueron comparadas con una población sensible de ambas especies, que nunca se han tratado con herbicidas. Se han realizado ensayos de absorción-translocación, ángulo de contacto y retención. El diseño experimental usado fue completamente al azar con seis repeticiones.

El estudio se realizó en consecuencia a los datos obtenidos anteriormente para los ensayos de screening y dosis-respuesta, y que sirvieron para confirmar la resistencia de los biotipos resistentes. En el caso de los ensayos de dosis-respuesta, estos se realizaron en diferentes estadios de crecimiento de las plantas aumentando los valores de ED₅₀ al aumentar el grado de desarrollo de las mismas.

Los resultados obtenidos en los estudios del presente trabajo muestran que no existen diferencias significativas en *L. multiflorum* para los ensayos realizados. En el caso de *L. rigidum* existen diferencias significativas en los ensayos de penetración foliar, absorbiendo alrededor del 20 % del ¹⁴C-glifosato depositado en el biotipo resistente; además se han encontrado diferencias en la translocación hacia la raíz y retención del formulado.

Palabras clave: *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, ED₅₀, ¹⁴C-glifosato.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the glyphosate resistance mechanisms in *Lolium multiflorum* and *Lolium rigidum*. Both these species were collected in Spain, the former in Andalusia in olive grove crops and the latter in citrus plantations in Valencia. These were compared to a susceptible population of both species, which had never been treated with herbicides. Absorption-translocation, contact angle and retention assays were performed. The experiment design used was completely random with six replications.

The study was performed as a consequence of data previously obtained for screening and dose-response trials, and which served to confirm the resistance of the resistant biotypes.

Regarding the dose-response tests, these were carried out at different growth stages of the plants, with the ED₅₀ values exhibiting an increase as their degree of growth increased. The results obtained in these trials showed that there were no significant differences in *L. multiflorum*. In the case of *L. rigidum*, there were significant differences in the foliar penetration tests, with around 20% of the ¹⁴C-glyphosate deposited on the resistant biotype being absorbed; differences in the translocation towards the root and in the retention of the glyphosate were also found.

Key words: *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, ED₅₀, ¹⁴C-glyphosate.

INTRODUCCIÓN

El glifosato se empezó a comercializar en 1974, y desde entonces se ha convertido en el más importante herbicida post-emergente, sistémico, no selectivo y de amplio espectro para el control de malas hierbas anuales y perennes (Baylis 2000). Actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (Steinrücken y Amrhein 1980). La resistencia ha sido encontrada en *Amaranthus hybridus* (USA), *Amaranthus rudis* (USA), *Ambrosia artemisifolia* (USA), *Ambrosia trifida* (USA), *Conyza bonariensis* (Sudáfrica, España, Brasil, Colombia y USA), *Conyza canadensis* (USA, Brasil, China y República Checa), *Echinochloa colona* (Australia), *Eleusine indica* (Malasia), *Euphorbia heterophylla* (Brasil), *Lolium multiflorum* (Chile, Brasil y USA), *Lolium rigidum* (Australia, USA, Sudáfrica y Francia), *Plantago lanceolata* (Sudáfrica) y *Sorghum halepense* (Argentina) (Heap 2007; Powles y Preston 2006) y la lista está en aumento año con año en diferentes países y cultivos.

El origen del género *Lolium* se sitúa en Oriente Medio, desde donde se extendió a los países mediterráneos y de aquí a África y Europa. Parece que la distribución está unida a la del cultivo del trigo (Jauzien, 1995). Los Ballicos (*L. multiflorum* y *Lolium rigidum*) son malas hierbas muy competitivas en numerosos cultivos del mundo. En España ha sido usado como cubierta vegetal en cultivos perennes (Olivo y Cítricos); sin embargo, en cierta época del año es necesario segar para que no compita con el cultivo en la época de sequía. El glifosato ha sido usado continuamente para controlar estas cubiertas por más de 10 años.

Recientemente la aplicación de este herbicida ha empezado a fallar, incluso aplicando el doble de las dosis recomendadas (Cruz-Hipólito et al., 2006) se han visto problemas de Tolerancia- Resistencia en dos regiones importantes: por un lado *Lolium multiflorum* en la región olivarera de Andalucía (Jaén) y por otro *Lolium rigidum* en la región citrícola de

Valencia. Los mecanismos de resistencia a glifosato han sido identificados para *Conyza* spp., *Eleusine indica* y *Lolium rigidum*. (Powles y Preston 2006). El problema se hace grave, pues el glifosato es un herbicida total de bajo coste, además en la actualidad hay pocos herbicidas autorizados para su aplicación en cultivos perennes. Actualmente muchos de los casos de resistencia mencionados anteriormente son ya conocidos, sin embargo algunos de ellos aun se desconoce.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de retención-absorción Foliar

Plántulas de *Lolium multiflorum* y *Lolium rigidum* fueron transplantadas a macetas de 0,2 L, rellenas con vermiculita. Las condiciones de crecimiento fueron: 17-11° C, humedad relativa del 60% y 16 h de fotoperiodo. La intensidad lumínica de las lámparas fluorescentes fue fijada en 210 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ correspondientes a radiación fotosintéticamente activa (PAR). Los macro y micronutrientes necesarios para el normal crecimiento de las plantas fueron aplicados a través del riego con solución nutritiva. La solución de tratamiento se preparó a partir del producto comercial de glifosato, para obtener una dosis de 1080 g i.a. ha^{-1} en un volumen de caldo de 200 L ha^{-1} . A esta solución se le adicionó glifosato radiomarcado (273,8 MBq mmol^{-1} , pureza radioquímica 95 %) hasta alcanzar una concentración de radioactividad de 30 - 50 Bq μL^{-1} . Las plantas se encontraban al estado BBCH 13-14 al momento del tratamiento. Éste consistió en el depósito de dos gotas de 1 μl en el tercio medio de la segunda hoja de las plantas. Cada tratamiento contó con 4 repeticiones. El herbicida que no había sido absorbido, se colectó mediante lavados con 0,5 mL de una solución de agua:acetona (1:1 v/v), después de 6, 24, 48 y 96h, en la cara adaxial. Una vez llevadas a peso seco constante en estufa a 80° C, las plantas enteras fueron quemadas en oxidador biológico (Perkin Elmer modelo 307). La radioactividad contenida en el CO₂ recuperado de las combustiones y en la solución de lavado fue cuantificada mediante contador de centelleo (modelo Beckman LS-6500). La radioactividad (glifosato) efectivamente absorbida, fue calculada según la siguiente fórmula:

$$\text{HA (\%)} = 100 * ([^{14}\text{C}] \text{CTV} / [^{14}\text{C}] \text{CTV} + [^{14}\text{C}] \text{L})$$

donde:

HA = Herbicida Absorbido, CTV = Combustión del tejido vegetal y L = Lavados.

Retención Foliar del Herbicida

Las plantas se obtuvieron de igual forma que lo explicado en el apartado de absorción de glifosato. El tratamiento se realizó sobre plantas de 3 a 4 hojas mediante un pulverizador de interiores. La solución de tratamiento contenía glifosato (Roundup, 360 g i.a. L⁻¹, Monsanto) a una dosis de 1080 g i.a. ha⁻¹ y 100 mg L⁻¹ de fluoresceína sódica. El equipo fue calibrado para pulverizar 200 L ha⁻¹ a una presión de 300 kPa. Al ser soluble en agua (Weast, 1971), la Na-fluoresceína es un buen indicador para ingredientes hidrofílicamente activos como es el caso del glifosato.

Cuando el asperjado se secó sobre el follaje, las plantas se cortaron a nivel del cuello, y la parte aérea fue introducida y lavada en 50 mL de una solución 5 mM de NaOH, durante 30 segundos. Las plantas fueron luego llevadas a peso seco constante en estufa a 80° C durante 48h.

Las lecturas de fluorescencia fueron hechas con espectrofluorímetro a 490/510 nm. Una vez realizada la transformación de fluorescencia a cantidad de glifosato, los resultados fueron expresados como mL g⁻¹ de materia seca.

Se realizó una experiencia, con diez repeticiones (plantas) por biotipo.

Medición del Ángulo de contacto

Las plantas se obtuvieron de la manera explicada para los experimentos de absorción. Al igual que en éstos, las mediciones se realizaron sobre plantas al estado de 3 hojas desplegadas. La experiencia contó con diez repeticiones por biotipo. El ángulo formado por la gota de herbicida fue estudiado en la cara adaxial de las hojas.

La segunda hoja de cada planta fue cortada y colocada sobre un portaobjeto. Mediante una micropipeta se realizó el depósito de una gota de 2 µL de solución acuosa de glifosato 3 L ha⁻¹ al centro de la hoja. Las gotas fueron observadas con un microscopio (modelo Mitsubishi CCD-100) situado horizontalmente, a 16x de aumento. Una cámara Olympus C-5050 fue adaptada al ocular del microscopio y la imagen fue analizada con el Software ImageJ 1.34v. Posteriormente los datos de ángulo izquierdo y ángulo derecho fueron tratados con el programa estadístico STATISTIX 8.0v.

Translocación

Las plantas fueron obtenidas de la misma forma que para los ensayos anteriores. Se colocaron 2 gotas de Glifosato radiomarcado (150 a 170 Bq ml⁻¹). La radiactividad no absorbida fue lavada después de 24 y 72 h en un primer experimento y después 24, 72, y 96 h en el segundo. Las plantas fueron divididas en tres partes: hoja tratada, resto de

planta y raíz. Cada parte fue quemada separadamente y el ^{14}C recuperado fue cuantificado como se ha descrito en absorción foliar y expresado como el porcentaje absorbido. El experimento consistió en cuatro repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Absorción Foliar

Como se observa en la fig. 1 la penetración es mayor en los biotipos sensibles. Esta tendencia es clara desde las 6 horas después de la deposición de las gotas hasta las 96 h, sin embargo las diferencias significativas las presenta *Lolium rigidum*, en el cual el biotipo sensible absorbe el triple del herbicida depositado, alcanzando un 60 %, mientras que en el biotipo resistente penetra menos del 30 % del total aplicado. La penetración es el mecanismo principal de la resistencia en *Lolium rigidum*, con lo cual es importante estudiar retención foliar, translocación y ángulo de contacto, para determinar si existen otros.

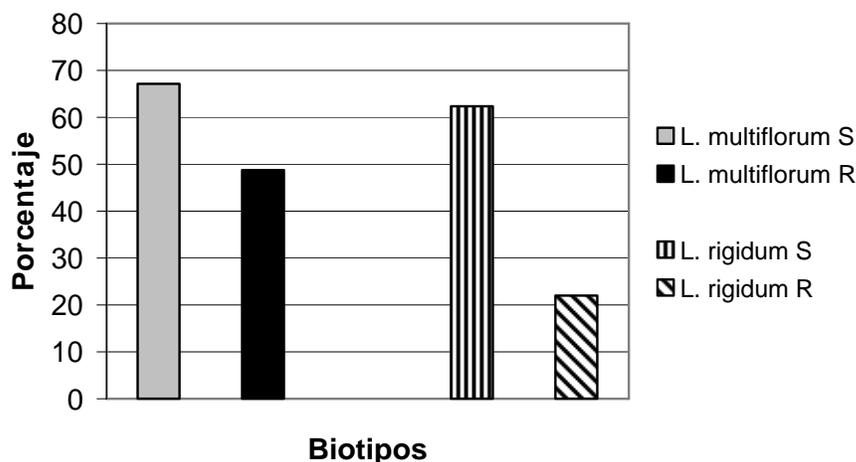


Figura 1. Porcentaje de penetración de ^{14}C -Glifosato en *Lolium multiflorum* y *Lolium rigidum* (Promedio de 6, 24, 72 y 96 horas).

Retención Foliar del Herbicida

La figura 2 muestra la retención de glifosato en plántulas de *Lolium* spp. en donde se aprecia que las mayores diferencias las presenta *Lolium Rigidum* (S y R). El biotipo resistente retiene mayor cantidad de la solución del pulverizado, sin embargo, esto no explica que éste sea un factor implicado en la resistencia, pues se ha observado que solo un 20 % de la solución es la que realmente penetra. Esto sugiere seguir con los ensayos de ceras epicuticulares, para estudiar si éstas son las responsables de la resistencia visto que el herbicida está retenido en la superficie foliar y existe una barrera física que impide el ingreso a la planta.

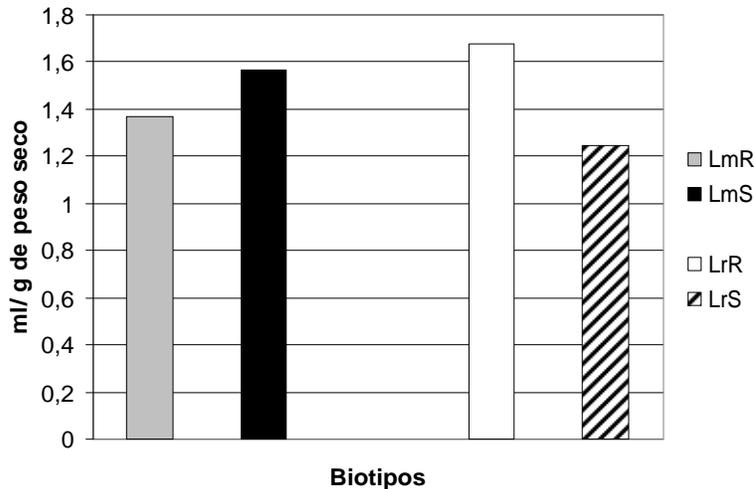


Figura 2. Retención de glifosato en plántulas de *Lolium* spp. Con formulado de 1080 g de i.a. ha⁻¹.

Medición del Ángulo de contacto

En las tablas 1 y 2 se observa el análisis de la varianza para el ángulo de contacto (izquierdo y derecho respectivamente), en donde se puede apreciar que no existen diferencias significativas de la interacción ángulo-biotipo. La tendencia es similar para el ángulo izquierdo que para el derecho, y confirma que el ángulo de contacto no está implicado en la resistencia de *Lolium* spp. a glifosato.

Tabla1. Ángulo de contacto izquierdo de *Lolium* spp. con gotitas de 2 µL de producto formulado.

Biotipo	Media	Agrupación
LrS	101.00	A
LmR	97.85	A
LrR	89.23	A
LmS	87.47	A

Tukey $\alpha=0.05$

Tabla2. Ángulo de contacto derecho de *Lolium* spp. con gotitas de 2 µL de producto formulado.

Biotipo	Media	Agrupación
LrS	98.383	A
LmR	96.950	A
LrR	87.300	A
LmS	85.017	A

Tukey $\alpha=0.05$

Translocación

El herbicida se distribuyó en la planta como se muestra en Tabla 3. Los errores estándar se presentan entre paréntesis. 24 horas después del tratamiento, alrededor del 50% del ¹⁴C-glifosato aplicado se localizaba en la hoja tratada. En las mediciones subsiguientes (72 y 96 horas después del tratamiento), se observó un incremento en la cantidad de herbicida translocado al resto de la planta (RP) y raíces (R). Al final de la experiencia, la raíz y la parte aérea de las plantas (exceptuando la hoja tratada), contenían cada una, aproximadamente el 20% de la radioactividad aplicada. La acumulación del herbicida en la raíz, fue la diferencia más importante hallada entre la translocación de uno y otro biotipos (*L. rigidum*). En efecto, 96 horas después del tratamiento, La raíz del biotipo S contenía sólo 8,4% del ¹⁴C aplicado, contra 25% (aprox.) encontrado en la misma proporción del biotipo R.

Los biotipos sensibles en general son en los que el herbicida presenta un mayor movimiento, encontrándose en el resto de la planta porcentajes medios de 30 % (Tabla 3). Se resaltan los valores en donde se encuentran diferencias significativas. El biotipo de *L. rigidum* presenta una mayor traslocación vía floema hacia las raíces, sin embargo cabe resaltar que estamos hablando de solo un 20 % del total aplicado.

Tabla 3. Translocación de ¹⁴C-Glifosato en *Lolium* spp. a distintos tiempos.

Órgano de la planta	Biotipo	24 H	72 H	96 H
HT	LmR	53.84 (9.70)	57.12(8.90)	69.50(9.25)
	LmS	39.51(4.53)	51.83(7.36)	52.17(6.69)
	LrR	46.64(5.93)	48.35(9.28)	48.48(6.46)
	LrS	58.46(8.68)	60.87(8.84)	61.80(3.40)
RP	LmR	22.39(7.19)	32.98(4.43)	34.51(8.64)
	LmS	32.36(8.50)	34.00(7.20)	42.20(6.78)
	LrR	18.20(7.47)	26.70(3.39)	29.88(3.90)
	LrS	25.32(4.15)	27.17(5.72)	28.75(5.47)
R	LmR	8.10(2.02)	9.89 (5.53)	11.63 (3.51)
	LmS	13.82(4.73)	15.79(3.42)	18.28(2.15)
	LrR	20.19(1.77)*	28.82(5.89)*	33.44(5.88)*
	LrS	10.36 ± (4.94)	11.02(3.82)	16.20(3.16)

Donde:

HT= hoja tratada; RP: resto de planta y R= raíz.

CONCLUSIONES

Este ensayo muestra que la falta de penetración ésta implicada en el fenómeno de resistencia en *L. rigidum*, al no encontrarse diferencias significativas en ángulo de contacto y retención.

Sugiere la búsqueda del mecanismo o mecanismos de resistencia en *Lolium multiflorum* pues ninguno de los ensayos realizados dan esta respuesta.

LITERATURA CITADA

- Baylis A (2000). Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag Sci* 56:299-308.
- Cruz-Hipólito, H. E., Ruiz-Santaella, J. P., Dominguez J. A., y De Prado, R. 2006. Mechanisms of tolerance to glyphosate in some legume species and in a biotipo of *Amaranthus hybridus*. WSSA abstracts of 46th Annual Meeting of the Weed Science Society of America.
- Heap, I. 2007. Internacional survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org/in.asp>.
- Jauzein, P. 1995. Flores des cultivés. Col. Techniques et pratiques. Ed Sopra-INRA. Paris 897 p.
- Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N. Ruiz-Santaella, J. P., y Gauvrit, C. Mechanisms of resistance to glyphosate in a Ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science* 2007 55:435-440.
- Powles, S. B. y Preston, C. 2006. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technol.* 20:282-289.
- Steinrücken H, Amrhein N (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94:1207-1212.
- Weast, R. C. 1971. Urain. Page C-530 in R. C. Weast, ed. Handbook of Chemistry and Physics. Cleveland: The Chemical Rubber Company.