

3 B.17 - RESISTENCIA CRUZADA A HERBICIDAS INHIBIDORES DE ALS EN *SINAPIS ALBA*

H. E. Cruz-Hipólito¹, R. Smeda², J. Rosario¹ y R. De Prado¹

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

E-mail: cruzhipolito@yahoo.com.mx.

²Division of Plant Sciences, University of Missouri, Columbia, MO 65211.

Resumen: Los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) son importantes para el control del jaramago (*Sinapis alba*), una mala hierba común de la zona sur central de España. Esta mala hierba infesta cultivos de cereales, principalmente trigo. Es controlada eficazmente con el herbicida tribenuron, pero el uso repetido de esta molécula ha sometido a gran presión de selección. Con el objetivo de corroborar la resistencia a Tribenuron, se recolectaron semillas de jaramago que sobrevivieron a los tratamientos con éste herbicida. Se está investigando en invernadero y laboratorio, los mecanismos de resistencia implicados y la respuesta que este biotipo presenta a herbicidas inhibidores de ALS. Los ensayos también están encaminados a estudiar si el biotipo resistente presenta resistencia cruzada a Imazamox, Flucarbazone, Iodosulfuron, Metsulfuron y Florasulam. Se ha determinado el ED₅₀, mediante curvas de dosis-respuesta para cada uno de los herbicidas. El factor de resistencia encontrado para tribenuron es 20, reafirmando con esto la resistencia observada en campo. Además se ha confirmado que el biotipo R presenta resistencia cruzada a los otros herbicidas estudiados.

Palabras clave: Tribenuron-metil, jaramago, dosis-respuesta, SINAL, Cereales.

INTRODUCCIÓN

La enzima Acetolactato sintasa (ALS) es la primer enzima común en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina, de vital importancia para las plantas (RAY, 1984; SHANER *et al.*, 1984; STIDHAM Y SHANER, 1990; SCHLOSS, 1990)

Se han descrito alrededor de 15 clases o familias de productos químicos como inhibidores de esta enzima; sin embargo sólo cinco han sido comercializados como herbicidas: sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinilbenzoatos (SAARI *et al.* 1994) y, más recientemente, sulfonilaminocarbonil triazolinonas (AMANN *et al.* 2000). Las cuatro familias de herbicidas se utilizan ampliamente debido a las bajas dosis en su aplicación, poco impacto ambiental, baja toxicidad en mamíferos, selectividad en muchos cultivos, y alta eficacia en el control y manejo de malas hierbas.

Un mal uso ha puesto de manifiesto la resistencia a herbicidas que inhiben esta enzima. Actualmente existen 97 especies de mala hierbas resistentes a herbicidas inhibidores de la ALS, de las cuales 63 son dicotiledóneas y 34 monocotiledóneas (HEAP, 2009). En España existen descritos 37 especies en total, de éstas 4 presentan resistencia a inhibidores de esta enzima.

S. alba es una mala hierba invasora en muchos cultivos y se ha convertido en la especie predominante en varias regiones de Andalucía, tal es el caso de la zona de estudio, en la cual los agricultores se muestran preocupados, pues el herbicida Granstar (Tribenuron-metil), que venían aplicando desde hace algunos años y presentaba un control total sobre las malas hierbas en trigo, actualmente el control es ineficaz, algunos empezaron a incrementar las dosis de aplicación o hacer

mezclas con otros herbicidas sin llegar a tener un control satisfactorio. El problema solo se ha detectado en Arriate un poblado cerca de Ronda, Málaga. Sin embargo; es una región aledaña a otras provincias (Huelva y Sevilla), existiendo una alta probabilidad que la resistencia se propague a estas provincias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ensayos de dosis-respuesta a los distintos herbicidas se realizaron en invernadero en invierno de 2009 en Columbia MO. Las semillas fueron pregerminadas en placas petri de 9 cm de diámetro conteniendo doble capa de papel filtro watman no. 5 y 5 ml de agua destilada. Posteriormente fueron incubadas a 4°C por 48 horas en oscuridad, transcurrido el tiempo se dejaron a temperatura ambiente y cuando empezaron a germinar se trasplantaron a 0,5 cm de profundidad en macetas de 10 cm de diámetro, que contenían una mezcla de suelo, turba, vermiculita y arena (3:2:2:2 volumen). Además de un fertilizante de liberación lenta (150 g de 26-13-00 en 75 L de sustrato para macetas). Los experimentos se hicieron en invernadero a temperatura de 18/14 °C día / noche 16 h fotoperiodo complementado con 230 mol m⁻² s⁻¹ de iluminación. Las macetas fueron regadas diariamente a capacidad de campo. Cuando las plántulas alcanzaron un estadio de crecimiento de tres hojas fueron tratadas con Tribenuron metil, Imazamox, Iodosulfuron, Florasulam, Flucarbazone y Mesosulfuron.

Los herbicidas se aplicaron en un pulverizador de interiores equipado con una boquilla de abanico plano 8002 EVS, calibrado para entregar 140,25 L ha⁻¹ del caldo a 210 kPa en una sola pasada. El diseño del experimento fue completamente al azar con cuatro repeticiones (una maceta por repetición). Cada uno de los ensayos con seis herbicidas (tabla 1), se hicieron por separado. El biotipo colectado en la zona que nunca ha sido tratado con herbicidas sirvió de control sensible. Las dosis de cada herbicida se muestran en la tabla 1. Los coadyuvantes se usaron a las dosis recomendadas: petroleum crop oil concentrate (Florasulam, Iodosulfuron); non-ionic surfactant (Flucarbazone, Tribenuron-metil); and methylated seed oil + urea ammonium nitrate (Imazamox).

Tabla 1. Dosis de herbicidas usadas en los ensayos

BIOTIPO	DOSIS (g i. a. ha ⁻¹)	HERBICIDA
R	0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.8, 6.4, 12.8, 25.6	TRIBENURON
S	0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8	TRIBENURON
R	0, 1.8, 3.6, 7.2, 14.4, 28.8, 57.6, 115.2	IMAZAMOX
S	0, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8	IMAZAMOX
R	0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.8, 6.4, 12.8, 25.6	IODOSULFURON
S	0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8	IODOSULFURON
R	0, 2.5, 3.75, 5, 7.5, 10, 15, 20	FLORASULAM
S	0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 3.75, 5, 7.5	FLORASULAM
R	0, 14, 28, 56, 84, 112, 168, 224	FLUCARBAZONE
S	0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84	FLUCARBAZONE
R	0, 16, 28, 40, 64, 80, 128, 160	MESOSULFURON
S	0, 8, 16, 32, 40, 52, 64, 80	MESOSULFURON

Transcurridos 21 días después de la aplicación se cortaron para determinar la dosis efectiva que reduce en un 50% el peso fresco en comparación con las plantas no tratadas (ED50). El factor de resistencia se calculo dividiendo el valor de ED50 del biotipo resistente por el valor del biotipo sensible.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensayo de dosis-respuesta muestra que las mayores dosis para reducir el peso fresco de *S. alba* son Flucarbazone y Mesosulfuron (Tabla 2). Los valores de ED₅₀ para flucarbazone es de 203,09 y 23,87 g ha⁻¹ para el biotipo resistente y susceptible, respectivamente. Los valores para Mesosulfuron fueron de 18,17 y 1,52 g ha⁻¹ para el resistente y susceptible, respectivamente. Sin embargo; los valores más altos en cuanto al factor de resistencia (FR) corresponden a Florasulam e Iodosulfuron (Tabla 2).

Todos los herbicidas redujeron el peso fresco de *S. alba* al menos un 90% en el biotipo sensible 14 DTT (datos no mostrados). El crecimiento y la fitotoxicidad aumentaba con respecto al tiempo, transcuridos los 21 DDT, la biomasa presentada en dosis medias-altas era muy baja. La reducción de peso fresco del jaramago en el biotipo sensible es aproximadamente del 96% a las máximas dosis. Por el contrario, las plantas resistentes a herbicidas inhibidores de la ALS mostraron síntomas de fitotoxicidad (clorosis) y disminución en el crecimiento entre un 6 a 29%.

A pesar de que anteriormente se ha hablado de la diferencia en la respuesta de los distintos herbicidas, hemos confirmado la resistencia cruzada a cuatro clases de herbicidas inhibidores de ALS.

Tabla 2. Parámetros estimados de la regresión no lineal para los distintos herbicidas

Herbicida	A	c	D	b	ED ₅₀ g i. a. ha ⁻¹	R ²	P	RF
Tribenuron	R	14,97	100,45	0,81	1,760	0,985	<0,0001	9,77
	S	2,113	101,09	1,66	0,180	0,993	<0,0001	---
Imazamox	R	5,267	100,03	1,78	1,905	0,997	<0,0001	4,50
	S	2,184	100,64	1,18	0,423	0,987	<0,0001	---
Iodosulfuron	R	0,456	98,09	0,97	2,462	0,975	<0,0001	17,45
	S	2,035	100,30	1,96	0,141	0,997	<0,0001	----
Florasulam	R	5,008	99,81	3,34	2,771	0,989	<0,0001	65,20
	S	2,083	100,00	0,89	0,042	0,999	<0,0001	----
Flucarbazone	R	7,147	100,00	0,50	203,091	0,998	<0,0001	8,50
	S	3,730	100,26	1,48	23,878	0,979	<0,0001	-----
Mesosulfuron	R	9,043	100,00	6,39	18,175	0,997	<0,0001	11,88
	S	0,600	100,00	1,23	1,529	0,999	<0,0001	-----

A= Acesión C= limite inferior D=limite superior b=pendiente de Hill FR=Factor de resistencia (ED₅₀ R/ED₅₀ S)

CONCLUSIONES

La principal herramienta de control de malas hierbas en monocultivos lo constituyen los herbicidas. Cuando se aplica el mismo producto y/o productos con el mismo modo de acción en varios ciclos de cultivo, existe una alta posibilidad de selección de biotipos que toleren o resistan a la aplicación del mismo. Esto es lo que ha ocurrido con *Sinapis alba* resistente a tribenuron-metil, siendo una causa de preocupación por parte de los agricultores, pues la diseminación de la resistencia va en aumento.

Una vez confirmada la resistencia en *Sinapis alba*, mediante ensayos de dosis-respuesta, es importante proseguir con los ensayos de laboratorio para determinar si existe resistencia cruzada y los mecanismos de resistencia.

BIBLIOGRAFIA

- HEAP I. 2009. International Survey of Herbicide-Resistant Weeds. Online. Internet. Tuesday, march 3, 2008. Available <http://www.weedscience.com>
- AMANN A., D. FEUCHT, and A. WELLMANN. 2000. A new herbicide for grass control in winter wheat, winter rye and triticale. *Z. Pflanzenkrank. Pflanzenschutz*. 17,545–553 (Spec. Iss.).
- RAY T.B.1984. Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant. Physiol.* 75: 827–831.
- SAARI, L. L., J. C. COTTERMAN, and D. C. THILL. 1994. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. Pages 83–140 in S. B. Powles and J.A.M. Holtum, eds. *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
- SCHLOSS J.V.1990 Acetolactate synthase, mechanism of action and its herbicide binding site. *Pestic. Sci.* 29:283–292.
- SHANER D.L., ANDERSON P.C. and STIDHAM M.A. 1984. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant. Physiol.* 76: 545–546.
- STIDHAM M.A. and SHANER D.L. 1990. Imidazolinone inhibition of acetohydroxyacid synthase in vitro and in vivo. *Pestic. Sci.* 29:335–340. Lugar, 213-223.

Summary: Cross resistance to als-inhibiting herbicides in *Sinapis alba*. acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides are important in the control of white mustard (*Sinapis alba*), a common weed in the centre of southern Spain. It infests cereal crops, mainly wheat, and, up to the past two years, it had been effectively controlled by Tribenuron. However, the repeated use of this molecule has subjected it to a high selection pressure so that this herbicide now has a very low control percentage, on some farms as low as 10%. With the aim of corroborating resistance to Tribenuron, some white mustard seeds which survived treatments with Tribenuron methyl have been examined. Laboratory and greenhouse investigations have been carried out to find the resistance mechanisms involved and the response of this biotype to ALS-inhibiting herbicides. These studies have been directed towards studying if the resistant biotype presented any cross resistance to other herbicides with the same action mode. These herbicides are: Imazamox, Flucarbazone, Iodosulfuron, Metsulfuron and Florasulam. The ED₅₀ was determined by dose-response curves for each of the herbicides. The resistance levels found for Tribenuron showed that the resistant biotype tolerated the dose for the susceptible one 20 times more, thus reaffirming the resistance observed in the field. The resistant biotype showed a resistance factor of 4 for the herbicide Imazamox, as well as a similar resistance factor for the herbicides Flucarbazone, Iodosulfuron and Florasulam.

Key words: Tribenuron-methyl, white mustard, dose-response, SINAL, Cereals.