

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**BIOTIPOS DE BALLICAS (*Lolium multiflorum* y *L. rigidum*)
RESISTENTES A HERBICIDAS ACCasa Y ALS EN EL SUR DE
CHILE**

Tesis de Grado presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

CARLOS VELÁSQUEZ CERNA

**TEMUCO - CHILE
2010**

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**BIOTIPOS DE BALLICAS (*Lolium multiflorum* y *L. rigidum*)
RESISTENTES A HERBICIDAS ACCasa Y ALS EN EL SUR DE
CHILE**

Tesis de Grado presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

CARLOS VELÁSQUEZ CERNA
PROFESOR GUÍA: NELSON ESPINOZA NEIRA
TEMUCO - CHILE
2010

**BIOTIPOS DE BALLICAS (*Lolium multiflorum* y *L. rigidum*)
RESISTENTES A HERBICIDAS ACCasa Y ALS EN EL SUR DE
CHILE**

PROFESOR GUÍA

**: Nelson Espinoza Neira
Ingeniero Agrónomo M.Sc.
Universidad de La Frontera**

PROFESOR CONSEJERO

**: Claudio Jobet Fornazzari
Ingeniero Agrónomo Ph.D.
Universidad de La Frontera**

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS

: 6,9

“A la naturaleza se la domina obedeciéndola.”

Francis Bacon.

Dedicado a Thelma.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Antecedentes generales.	4
2.2 Resistencia a herbicidas en el mundo.....	5
2.3 Resistencia a herbicidas en Chile.....	6
2.4 Definición de tolerancia, susceptibilidad y resistencia a herbicidas.	7
2.5 Desarrollo de la resistencia.	8
2.5.1 Presión de selección.	8
2.5.2 Factores que influyen en el desarrollo de la resistencia de malezas a herbicidas	10
2.5.2.1 Frecuencia inicial de individuos resistentes.....	10
2.5.2.2 Tamaño del banco de semillas del suelo.....	11
2.5.2.3 Adaptabilidad al medio.	11
2.5.2.4 Factores relativos al herbicida.....	11
2.6 Tipos de resistencia.	12
2.6.1 Resistencia cruzada.	12
2.6.1.1 Resistencia cruzada sitio de acción.	12
2.6.1.2 Resistencia cruzada no-sitio de acción.	12
2.6.2 Resistencia múltiple.....	12
2.7 Herbicidas inhibidores de la acetolactato sintetasa (ALS).	13
2.8 Resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintetasa (ALS).....	14
2.9 Herbicidas inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase).....	15
2.10 Resistencia a herbicidas inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase).	16
2.11 Mecanismos de resistencia a herbicidas.	17
2.11.1 Resistencia sitio de acción.	18
2.11.1.1 Pérdida de afinidad por el sitio de acción.	18

2.11.2 Resistencia no-sitio de acción.	18
2.11.2.1 Metabolización a compuestos no tóxicos.	18
2.11.2.2 Resistencia asociada a procesos de secuestación o compartimentación.	19
2.11.2.3 Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción.	19
2.11.2.4 Reparación de efectos fitotóxicos.....	19
2.12 Prevención y manejo de la resistencia.....	20
CAPÍTULO III	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Ubicación de los ensayos.....	23
3.2 Biotipos de ballicas utilizados y establecimiento.	23
3.3 Herbicidas aplicados.....	24
3.4 Evaluación del peso seco de los biotipos de ballicas.	26
3.5 Diseño experimental y análisis de los datos.	26
CAPÍTULO IV	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CAPÍTULO V.....	37
5. CONCLUSIONES	38
CAPÍTULO VI	39
6. RESUMEN.....	40
CAPÍTULO VII.....	41
7. SUMMARY.....	42
CAPÍTULO VIII.....	43
8. BIBLIOGRAFÍA.	44
ANEXOS.....	53
ANEXO 1	54
ANEXO 2	54
ANEXO 3	55
ANEXO 4	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Número de años de aplicación de un herbicida necesarios para que las malezas presenten resistencia (Preston <i>et al.</i> , 1999).	10
Tabla 2 Herbicidas ALS que controlan malezas gramíneas introducidos a Chile.	13
Tabla 3 Herbicidas ACCasa introducidos al país y recomendados en cereales y otros cultivos. ...	16
Tabla 4 Identificación de los biotipos de ballicas utilizados.	24
Tabla 5 Herbicidas aplicados.	25
Tabla 6 Desarrollo de las plantas de los biotipos de ballicas en la fecha de aplicación de los herbicidas.	25
Tabla 7 Resumen de la resistencia a los herbicidas.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incremento cronológico del número de malezas resistentes a herbicidas pertenecientes a distintos grupos (Adaptado de Heap, 2009).	5
Figura 2. Presión de selección ejercida sobre una población de malezas debido a la aplicación repetida de un mismo herbicida (Adaptado de Gunsolus, 1998).....	9
Figura 3. Sitios de colecta de los biotipos.	23
Figura 4. Peso seco del follaje de los biotipos de <i>L. multiflorum</i> 25 días después de la aplicación de los herbicidas ACCasa tralkoxidim (a) y pinoxaden (b). Las barras representan el promedio de 10 repeticiones y las líneas representan la desviación estándar de los valores promedios.	29
Figura 5. Peso seco del follaje de los biotipos de <i>L. multiflorum</i> 25 días después de la aplicación de los herbicidas ALS iodosulfuron metil sodio+ mesosulfuron metil (6+30 g/kg) (a) iodosulfuron metil sodio+ mesosulfuron metil (30+30 g/kg) (b). Las barras representan el promedio de 10 repeticiones y las líneas representan la desviación estándar de los valores promedios.	30
Figura 6. Peso seco del follaje de los biotipos de <i>L. rigidum</i> 25 días después de la aplicación de los herbicidas ACCasa (a) tralkoxidim y (b) pinoxaden. Las barras representan el promedio de 10 repeticiones y las líneas representan la desviación estándar de los valores promedios.	32
Figura 7. Peso seco del follaje de los biotipos de <i>L. rigidum</i> 25 días después de la aplicación de los herbicidas ALS (a) iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil (6+30 g/kg) y (b) iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil (30+30 g/kg). Las barras representan el promedio de 10 repeticiones y las líneas representan la desviación estándar de los valores promedios.	33

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La introducción de los primeros herbicidas en la década de 1940, mostró a los agricultores de todo el mundo el potencial de estos productos para controlar malezas en los principales cultivos. Como consecuencia de la gran eficacia de los herbicidas para controlar las malezas y la alta selectividad lograda en los cultivos, actualmente representan el principal método de control de malezas, desplazando en muchas situaciones a otros métodos como el manual y mecánico. Sin embargo, esta alta dependencia de los herbicidas también ha generado consecuencias negativas, tal como el surgimiento de biotipos de malezas resistentes.

En Chile la resistencia a herbicidas es un problema creciente, estimándose que del total de la superficie sembrada con trigo, cebada, avena, lupino y raps, aproximadamente 100 mil hectáreas están comprometidas con biotipos resistentes a herbicidas, específicamente de ballicas (*Lolium multiflorum* y *L. rigidum*.), avenilla (*Avena fatua*) y cola de zorro (*Cynosurus echinatus*). En ballicas los grupos de herbicidas afectados por la resistencia son los Inhibidores de la Acetil Coenzima A carboxilasa (ACCase) y los Inhibidores de la Acetolactato Sintetasa (ALS).

Dado que la resistencia de las malezas surge como consecuencia de un uso inadecuado de los herbicidas, es imprescindible un mayor conocimiento de esta problemática, a través del estudio de los biotipos resistentes, herbicidas a los que se ha generado resistencia y mecanismos de resistencia a cada herbicida. Sin embargo, como ningún método de control, por sí solo, es capaz de controlar adecuadamente y de forma sostenible el problema de resistencia, la prevención y el manejo integrado de las malezas parece ser la forma más indicada de enfrentar dicho problema.

El Objetivo general de la investigación fue:

- Confirmar la existencia de resistencia a herbicidas ACCasa y/o ALS en 15 biotipos de *L. multiflorum* y 4 biotipos de *L. rigidum*.

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar el nivel de resistencia de los biotipos *L. multiflorum* y *L. rigidum* a los herbicidas ACCasa y ALS.
- Determinar la extensión de la resistencia de los biotipos de *L. multiflorum* y *L. rigidum* a los herbicidas ACCasa y ALS.

Las hipótesis para cumplir los objetivos fueron las siguientes:

- H₀₁: No existen diferencias entre los biotipos en el nivel de resistencia a los distintos herbicidas ACCasa y ALS.
- H₀₂: No existe resistencia cruzada a los herbicidas ACCasa y ALS en los biotipos de ballicas evaluados.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes generales.

Los herbicidas constituyen el 45% del mercado de plaguicidas valorado en USD 35.000 millones (Uttley, 2009). Sin duda los herbicidas, cuyos primeros representantes selectivos fueron el 2,4-D y MCPA introducidos a mediados de la década de 1940, revolucionaron el control de malezas y han contribuido a aumentar el rendimiento de los cultivos en que se recomiendan. Actualmente, unos 260 ingredientes activos, pertenecientes a 70 familias químicas, con unos 13 modos de acción reconocidos, contribuyen a la producción agrícola en el mundo. No obstante, el uso de los herbicidas no ha estado exento de problemas, en particular por la selección de malezas resistentes a ellos (Valverde y Heap, 2009).

El primer caso inequívoco de resistencia a herbicidas se registró al final de la década de 1960, cuando biotipos de hierba cana (*Senecio vulgaris*) que procedían de un huerto de frutales, presentaron resistencia a las s-triazinas atrazina y simazina, donde la simazina venía utilizándose repetidamente durante muchos años (Ryan, 1970). Desde la identificación de este primer biotipo resistente un gran incremento en el número de especies y biotipos resistentes a herbicidas ha sido detectado por todo el mundo (De Prado *et al.*, 2001 b).

Dado que el agricultor utiliza el herbicida más eficaz y barato posible, el desarrollo de resistencia implica un incremento de los costos (Orson, 1999; Preston *et al.*, 2006). Por ello, la prevención se ve como obligatoria si se desea disponer de la mejor herramienta de control durante el máximo periodo de tiempo posible.

La resistencia, sin embargo, también ha generado aspectos positivos (Owen, 1997). Así, ha obligado a un mejor conocimiento de la biología de las distintas especies de malezas (Sans y Fernández-Quintanilla, 1997), de los herbicidas (Mallory-Smith y Retzinger, 2003)

y, en definitiva, a una adopción de métodos de control integrado de malezas (Catizone y Zanin, 2001).

2.2 Resistencia a herbicidas en el mundo.

En la última revisión realizada por Heap (2011) y la cual puede ser encontrada en Internet (www.weedscience.com) se reportan 357 biotipos resistentes, correspondientes a 197 especies, 115 dicotiledóneas y 82 monocotiledóneas en más de 60 países en todo el mundo (Figura 1).

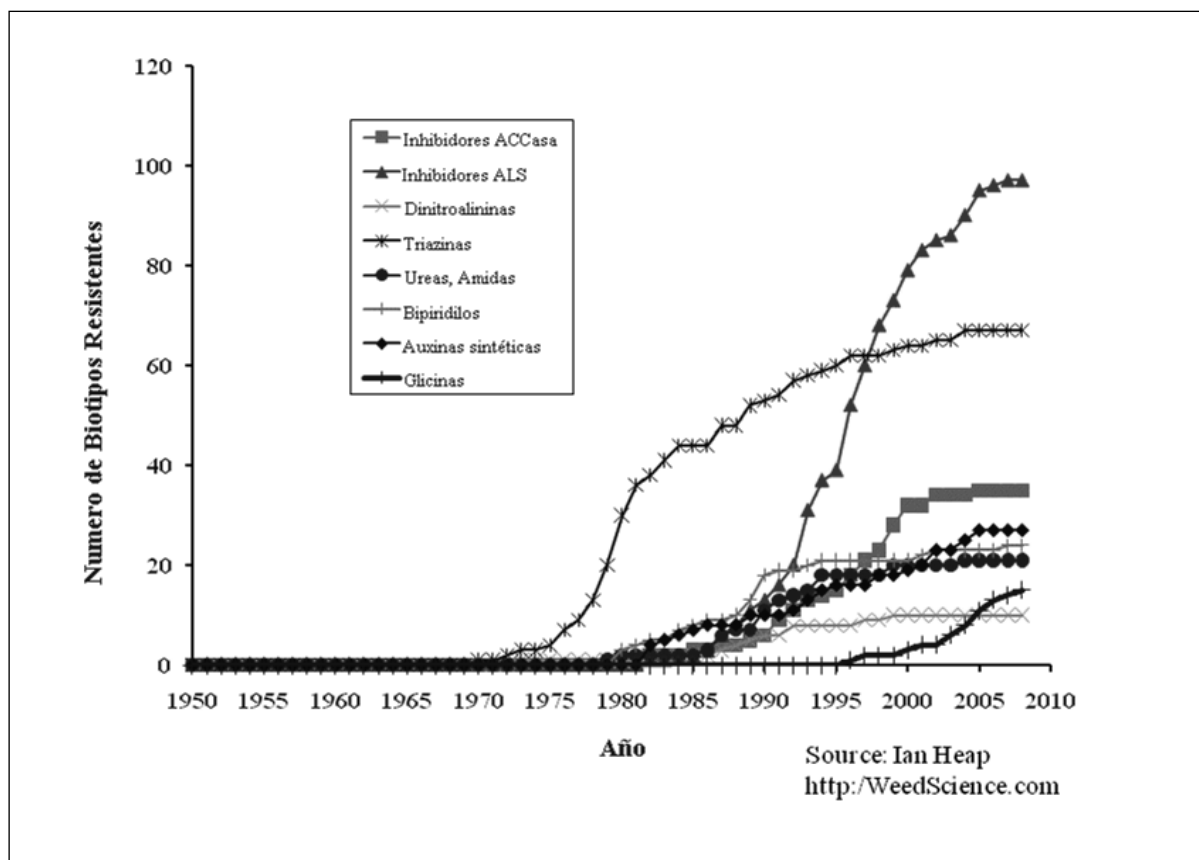


Figura 1. Incremento cronológico del número de malezas resistentes a herbicidas pertenecientes a distintos grupos (Adaptado de Heap, 2011).

Cabe resaltar que la mayoría de los biotipos resistentes se encuentran en países desarrollados, pero el número de casos detectados en otras regiones del mundo es sorprendentemente alto (De

Prado *et al.*, 2001 b). Al respecto Pérez y Kogan (2001) señalan que en países desarrollados los herbicidas son el principal método de control utilizado, realizándose aplicaciones de un mismo producto o de productos que presentan el mismo mecanismo de acción año tras año.

Fischer y Valverde (2005) indican que dos grupos de herbicidas cuyos modos de acción son relativamente nuevos, tales como aquellos que inhiben la enzima acetolactato sintasa (ALS) y los inhibidores de la Acetil Coenzima-A Carboxilasa (ACCase) han contribuido a agravar el problema de resistencia. Actualmente existen 107 especies resistentes a ALS y 39 especies resistentes a ACCase (Heap, 2011). Ambos grupos de herbicidas se emplean en trigo.

2.3 Resistencia a herbicidas en Chile.

La resistencia de las malezas a los herbicidas en el país no es un fenómeno tan reciente, sin embargo, se ha agudizado en los últimos años (Kogan y Pérez, 2003). Espinoza *et al.* (2009) señalan que en la zona centro sur el problema de la resistencia se ha desarrollado en la última década en la principal zona productora de trigo, cebada, avena, lupino y raps, debido al uso reiterativo de los herbicidas inhibidores de ACCase y ALS.

Espinoza *et al.* (2002) señalan que a principios de la década del noventa, en la localidad de Mulchén (Región del Biobío) se informó el deficiente control de una población de ballica (*L. rigidum*) en un cultivo de raps que había sido tratado con haloxyfop-metil. Los bioensayos con semillas provenientes de las plantas que no fueron controladas confirmaron la resistencia a este herbicida y resistencia cruzada a otros inhibidores de la ACCase como diclofop, clodinafop, tralkoxydim, clethodim y sethoxydim, pero no a los ALS iodosulfuron y flucarbazone.

En otra población de ballica (*Lolium sp.*) proveniente de un cultivo de trigo de la localidad de Cajón (Región de La Araucanía) y que no había sido controlada con diclofop metil en 1997, los estudios posteriores confirmaron resistencia cruzada a los herbicidas ACCase clodinafop y sethoxydim pero no a haloxyfop, clethodim y tralkoxydim. Ese mismo año en las localidades de Quino y Lautaro (Región de La Araucanía) se informó la resistencia de biotipos de avenilla (*A.*

fatua) a los ACCasa diclofop y clodinafop. Estos biotipos exhibieron resistencia a otros inhibidores de la ACCasa, pero permanecieron susceptibles a los ALS iodosulfuron y flucarbazone (Espinoza *et al.*, 2002; Espinoza y Zapata, 2000; Venegas *et al.*, 2001a, 2001b). En todos los casos anteriormente documentados el mecanismo de resistencia es desconocido (Galdames *et al.*, 2009).

En la actualidad se estima que del total de la superficie sembrada con trigo (*Triticum aestivum*), avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), raps (*Brassica napus*) y lupino (*Lupinus angustifolius*) en el país, aproximadamente 100 mil hectáreas se encuentran infestadas con biotipos resistentes de avenilla, ballica y cola de zorro (Espinoza y Díaz, 2005). De acuerdo con Díaz *et al.* (2008) el origen de este fenómeno sería atribuible a factores de manejo que se han practicado en los últimos años, tales como monocultivo del trigo y uso creciente de la cero labranza, donde el control de malezas se basa exclusivamente en el uso de herbicidas.

2.4 Definición de tolerancia, susceptibilidad y resistencia a herbicidas.

Los términos empleados para describir los niveles de respuesta de las plantas a los herbicidas son tolerancia, susceptibilidad y resistencia (Espinoza, 2002).

La tolerancia se refiere a la habilidad inherente de una especie de sobrevivir y reproducirse después de estar expuesta a un tratamiento herbicida. Esto implica que no hubo selección o manipulación genética que hiciera a una determinada especie tolerante a un herbicida (WSSA, 1998).

La susceptibilidad indica que la población de plantas muere con un herbicida en las dosis que normalmente no afecta a otras especies (Espinoza, 2002).

La resistencia se define como la capacidad hereditaria natural de biotipos que fueron susceptibles a un herbicida, dentro de una población, para sobrevivir y reproducirse después de la aplicación de un herbicida que, bajo condiciones normales de empleo, controla eficazmente esa

población de maleza (Valverde *et al.*, 2000; Fischer y Valverde, 2005). La parte resistente de la población se conoce como biotipos resistentes, los cuales no presentan características morfológicas que permitan diferenciarlos de las plantas susceptibles y sobreviven a dosis más altas que las requeridas que cuando no existe este fenómeno (Espinoza, 2002). En una planta, la resistencia puede ocurrir de una forma natural o puede ser inducida por técnicas como la ingeniería genética o selección de variantes resistentes obtenidas por cultivos de tejidos o mutagénesis, como es el caso de la resistencia a ciertos herbicidas en especies cultivadas (Kogan y Pérez, 2003).

2.5 Desarrollo de la resistencia.

El desarrollo de la resistencia en las poblaciones de malezas se presenta cuando la frecuencia de genes dentro de una población cambia como resultado de una selección, mutación, migración o deriva al azar (Stilkowski, 1998; De Prado *et al.*, 2001b). Para que el fenómeno de resistencia se manifieste, debe existir variación genética en la población, por lo cual los genes de resistencia deben estar presentes en la población de malezas antes que la selección pueda incrementar su frecuencia (Kogan y Pérez, 2003). Estos genes ocurren con una baja frecuencia ya que en ausencia de los herbicidas no confieren ninguna ventaja adaptativa a esas plantas (Devine y Preston, 2000).

2.5.1 Presión de selección. La presión de selección es el efecto del uso continuado del mismo herbicida o de herbicidas que comparten el mismo modo de acción o que son metabolizados de manera similar en la planta (De Prado *et al.*, 2009). Según Maxwell y Mortimer (1994), a medida que aumenta la tasa de mortalidad con el herbicida, aumenta también la presión de selección seleccionándose los biotipos resistentes (Figura 2). La presión de selección depende de la dosis de uso del herbicida, su eficacia y la frecuencia de aplicación (Taberner y Cirujeda, 2007). Por lo tanto, se puede disminuir la presión de selección mediante la aplicación de mezclas de herbicidas con distintos modos de acción y degradación que sean eficaces contra el mismo espectro de malezas (Wrubel y Gressel, 1999). Sin embargo, la mejor forma de disminuir la presión de

selección impuesta por los herbicidas es mediante una menor dependencia de estos (Espinoza *et al.*, 2009).

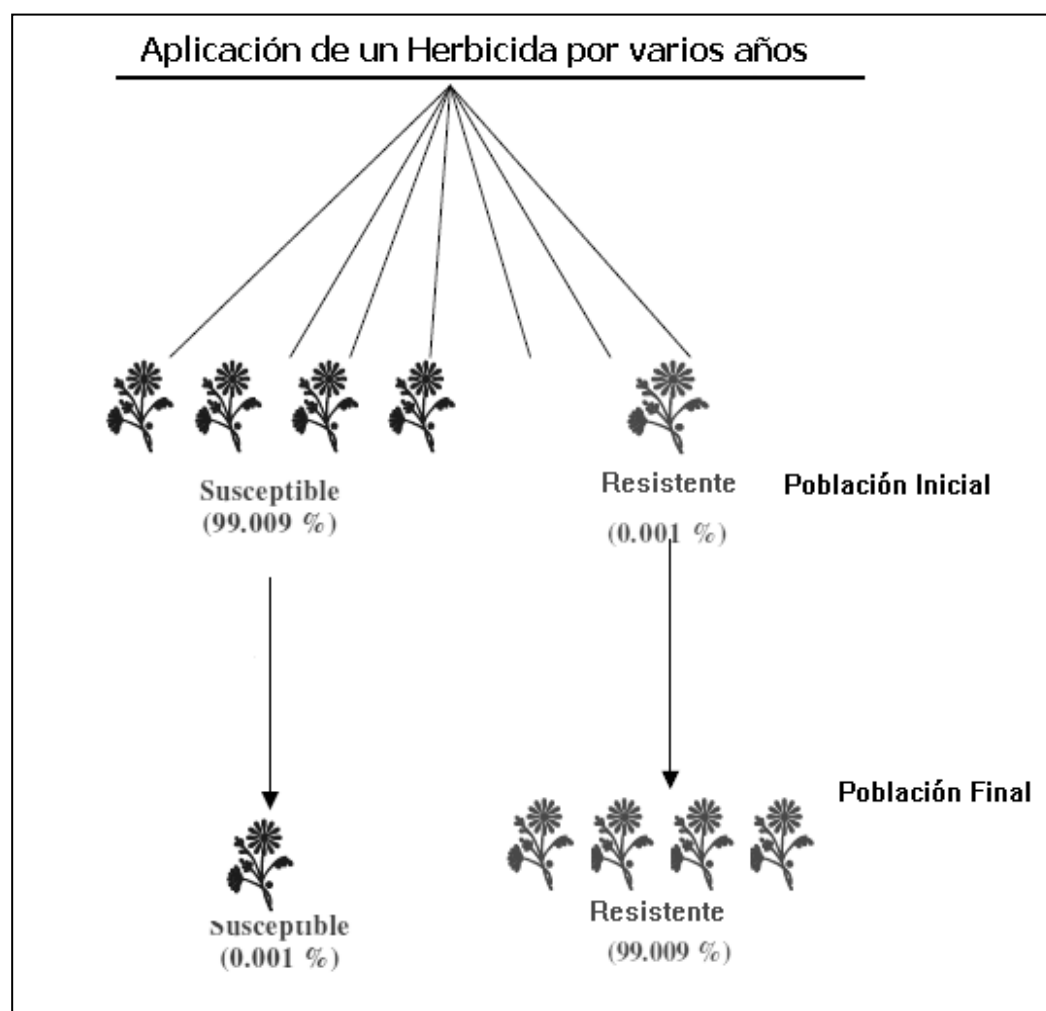


Figura 2. Presión de selección ejercida sobre una población de malezas debido a la aplicación repetida de un mismo herbicida (Adaptado de Gunsolus, 1998).

Algunos grupos de herbicidas pueden ejercer una mayor presión de selección que otros (Preston *et al.*, 1999), por lo tanto, presentan un mayor riesgo de que aparezca la resistencia después de pocos años de uso (Tabla 1).

Tabla 1 Número de años de aplicación de un herbicida necesarios para que las malezas presenten resistencia (Preston *et al.*, 1999).

<i>Grupo de herbicidas.</i>	<i>Herbicidas</i>	<i>Años de aplicación</i>	<i>Riesgo de que se presente resistencia.</i>
<i>Inhibidores ACCasa*</i>	<i>Diclofop-metil</i>	6-8	<i>Alto</i>
<i>Inhibidores ALS**</i>	<i>Clorsulfuron</i>	4	<i>Alto</i>
<i>Inhibidores fotosíntesis FS II</i>	<i>Atrazina</i>	10-15	<i>Medio</i>
<i>Bipiridilos</i>	<i>Paraquat</i>	10-15	<i>Medio</i>
<i>Inhibidores carotenoides</i>	<i>Amitrole</i>	10	<i>Medio</i>
<i>Inhibidores de celulosa</i>	<i>Diclobenil</i>	>15	<i>Bajo</i>
<i>Desacopladores membrana</i>	<i>Dinitrofenoles</i>	15	<i>Bajo</i>

*ACCasa: Acetil Coenzima A Carboxilasa

**ALS: Acetato lactato sintetasa

Fuente: Adaptado de Preston *et al.* (1999).

2.5.2 Factores que influyen en el desarrollo de la resistencia de malezas a herbicidas.

Los factores que más influyen en la evolución de la resistencia a herbicidas son la frecuencia de genes de resistencia, el tamaño y la viabilidad del banco de semillas del suelo, la adaptabilidad al medio y factores relativos al herbicida. La importancia relativa de estos factores se ha tratado de determinar mediante el uso de modelos (Gressel y Segel, 1990; Morrison y Friesen, 1996). Estos modelos y la experiencia práctica indican que el factor principal en la evolución de la resistencia es la presión de selección impuesta por el herbicida (Wrubel y Gressel, 1999).

2.5.2.1 Frecuencia inicial de individuos resistentes. Cada especie tiene una constitución genética particular y se considera que los genes de resistencia están presentes en las poblaciones silvestres, aunque en una proporción muy baja (Jasieniuk *et al.*, 1996; Jander *et al.*, 2003; De Prado *et al.*, 2009). Los genes de resistencia son normalmente el resultado de mutaciones al azar y pueden estar presentes en una población incluso antes de que ésta haya sido expuesta a la acción del herbicida (Jasieniuk *et al.*, 1996; Valverde *et al.*, 2001; Jander *et al.*, 2003). Kogan y Pérez (2003), señalan que no todos los genes presentan la misma tasa de mutación y, en algunos casos, el número inicial de individuos resistentes en poblaciones que no han sido sometidas a la aplicación de herbicidas puede ser sorprendentemente alto. Al respecto, Gressel (1991), estima que la frecuencia de genes de resistencia a las triazinas que se heredan a través del genoma de los

plástidios, es aproximadamente de 10^{-8} , mientras Preston y Powles (2002), señalan que en las sulfonilureas es alrededor de 10^{-6} . Según Díaz *et al.* (2008) este fenómeno es la causa de la gran cantidad de biotipos de avenilla (*A. fatua*.) resistentes a flucarbazone, un inhibidor de la ALS introducido al país el 2003.

2.5.2.2 Tamaño del banco de semillas del suelo. Si un herbicida elimina todos los individuos susceptibles dejando unos pocos sobrevivientes resistentes capaces de producir semilla, la frecuencia de individuos resistentes el siguiente año dependerá de cuánta semilla resistente se produjo y de la cantidad de semillas susceptibles que existan en el reservorio de semillas del suelo. Los individuos susceptibles que emerjan a partir del banco de semillas del suelo “diluirán” la frecuencia de individuos resistentes que provienen de la semilla producida por las plantas sobrevivientes del año anterior (Fischer y Valverde, 2005).

2.5.2.3 Adaptabilidad al medio. En el caso de la resistencia a triazinas es común encontrar poblaciones resistentes cuyas plantas son más pequeñas, se reproducen menos o tienen una adaptabilidad menor que las sensibles, pero en la resistencia a ALS y ACCasa, los biotipos resistentes muestran la misma capacidad de supervivencia y vigor que los sensibles (Gressel y Segel, 1990; Chueca *et al.*, 2005).

2.5.2.4 Factores relativos al herbicida. En el herbicida se deben considerar factores como eficacia, especificidad del sitio de acción, frecuencia de aplicación y persistencia en el suelo (Kogan y Pérez, 2003; De Prado *et al.*, 2009). La presión de selección se incrementa con la eficacia del herbicida y, por lo tanto, aumenta la probabilidad que se expresen individuos resistentes (Powles *et al.*, 1997). Según Mallory-Smith *et al.* (1990), los inhibidores de ACCasa y ALS por tener un solo sitio de acción tienen más probabilidades de que se genere resistencia a ellos en relación a aquellos que afectan a varios procesos. Esto contrasta con los antiguos herbicidas reguladores del crecimiento tipo auxinas con sitios de acción menos específicos, lo que se ha traducido en poca resistencia a ellos (Heap, 2010). La disminución de la dosis de herbicida puede agravar los problemas en vez de disminuirlos porque puede propiciar la selección de resistencia poligénica, es decir la resistencia que depende de más de un gen y que se

manifiesta como un incremento progresivo en el grado de resistencia de la planta de una generación a la siguiente (Cousens y Mortimer, 1995)

2.6 Tipos de resistencia.

2.6.1 Resistencia cruzada. La resistencia cruzada se define como la resistencia a dos o más herbicidas debido a la expresión de un mismo mecanismo fisiológico dotado genéticamente (Kogan y Pérez, 2003). Este tipo de resistencia se clasifica en dos categorías: Resistencia cruzada sitio de acción y resistencia cruzada no-sitio de acción.

2.6.1.1 Resistencia cruzada sitio de acción. Según Laplante *et al.* (2009) este tipo de resistencia está conferida por una modificación en el sitio de acople común (enzima o proteína específica) a varios herbicidas, como en el caso de los herbicidas pertenecientes a los grupos químicos de las sulfonilureas, imidazolinonas, triazolpirimidinas y piridinil benzoatos que inhiben la enzima ALS. Dependiendo de la mutación presente en la enzima ALS, se observarán distintos patrones de resistencia cruzada a estos grupos de herbicidas o a herbicidas individuales dentro de cada grupo.

2.6.1.2 Resistencia cruzada no-sitio de acción. En este caso la resistencia es atribuible a un único mecanismo que confiere resistencia a diversos herbicidas con distintos modos de acción. Este mecanismo de resistencia usualmente no tiene relación con el modo de acción del herbicida y más bien depende de la capacidad acrecentada de la maleza para metabolizar al herbicida, por ejemplo a través del citocromo P450 o mediante la participación de transferasas de glutatona (Gray *et al.*, 1996; Siminszky, 2006).

2.6.2 Resistencia múltiple. La resistencia múltiple se presenta cuando una planta o población acumula dos o más mecanismos de resistencia (Linton, 2007; Porcelli *et al.*, 2009). Este tipo de resistencia es sin duda la más difícil de manejar, debido a que disminuyen significativamente los herbicidas disponibles para controlar las poblaciones resistentes (Tan *et al.*, 2007). Los casos mas críticos en el mundo se presentan en *L. rigidum*. Así, en Australia el biotipo SLR31 evolucionó

resistencia a nueve clases de herbicidas después de ser tratado por 21 años con cinco herbicidas pertenecientes a distintas familias químicas. Las plantas de este biotipo son resistentes a ureas sustituidas (diurón), inhibidores de ALS (clorsulfurón, triasulfurón, sulfometurón, imazaquin e imazapir), triazinas (atrazina, simazina, ametrina y metribuzina) e inhibidores de ACCasa (varios ariloxi-fenoxipropionatos, incluidos el diclofop y ciclohexanodionas como tralkoxidim y setoxidim). Este biotipo también es resistente a metolaclor y propaclor (cloroacetamidas) y levemente resistente a paraquat (Burnet *et al.*, 1994).

2.7 Herbicidas inhibidores de la acetolactato sintetasa (ALS).

Las sulfonilureas (SU), primer grupo de herbicidas de los inhibidores de la ALS, fueron descubiertas por DuPont en 1975 y empezaron a comercializarse para trigo y cebada (*Hordeum vulgare*) en 1982 (Valverde y Heap, 2009). Su gran eficacia a dosis extremadamente bajas, gran selectividad a diversos cultivos y baja toxicidad para mamíferos las convirtió en uno de los grupos más importantes de herbicidas en el mercado (Duggleby *et al.*, 2003). Desde 1995 se han comercializado más de una docena de nuevos herbicidas SU y otros están en proceso de desarrollo. En la misma década, American Cyanamid trabaja en el desarrollo de las imidazolinonas (IMI), un grupo de herbicidas también muy potentes y de amplio espectro, ingresando al mercado en 1986 (Shaner *et al.*, 2007). Más recientemente (a mediados de los 1990) se unen las triazolopirimidinas y pirimidinil (oxi/tio) benzoatos que tienen este mismo mecanismo de acción (Valverde y Heap, 2009). En la Tabla 2 se presentan algunos herbicidas ALS que controlan malezas gramíneas introducidos a Chile (Espinoza *et al.*, 2009).

Tabla 2 Herbicidas ALS que controlan malezas gramíneas introducidos a Chile.

Grupo químico	Nombre común	Nombre comercial	Cultivo recomendado
Sulfonilureas	iodosulfuron metil sodio	Hussar 20 WG	Trigo
	iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil	Cossack 150 WG	Trigo
Sulfonilaminocarbo-nitriazolinonas	flucarbazone-Na	Vulcano 70 WG	Trigo
Imidazolinona	imazamox + imazapyr	Eurolightning	Trigo Clearfield®
Tiazolopirimidina	pyroxulam	Admitt	Trigo

Fuente: Espinoza *et al.* (2009)

2.8 Resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintetasa (ALS).

La enzima ALS cataliza el primer paso en la síntesis de aminoácidos ramificados en las plantas (valina, leucina e isoleucina) y es el blanco de herbicidas ALS como las sulfonilureas e imidazolinonas, los cuales actúan como potentes y específicos inhibidores (Duggleby *et al.*, 2003).

Diversas características de los herbicidas inhibidores de la ALS han determinado que estén dentro de los más ampliamente empleados en el mundo. Lamentablemente, se han caracterizado además, por su habilidad de seleccionar biotipos resistentes de malezas (Tranel y Wright, 2002). Los casos de resistencia a este tipo de herbicidas se han incrementado en forma alarmante en los últimos años, correspondiendo mayoritariamente a malezas dicotiledóneas, con un total de 102 biotipos (Tranel *et al.*, 2009; Heap, 2010).

Varias mutaciones o cambios nucleotídicos en el gen que codifica para la ALS han sido asociadas a resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS. Hasta ahora, mutaciones que conducen a sustituciones en 7 aminoácidos (Ala-122, Pro-197, Ala-205, Asp-376, Trp-574, Ser-653 y Gly-654), han sido implicadas en el fenotipo de resistencia en distintas malezas (Tranel *et al.*, 2009).

En gramíneas, a nivel mundial se han descrito biotipos resistentes para 6 especies, las que incluyen: *Bromus tectorum* (Park y Mallory, 2004), *Scirpus juncooides* (Uchino *et al.*, 2007), *H. leporinum* (Yu *et al.*, 2007), *L. rigidum* (Yu *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2007), *Alopecurus myosuroides* (Délye y Boucansaud, 2008) y *S. viridis* (Tan *et al.*, 2007; Laplante *et al.*, 2009). En estas especies, se han detectado sustituciones en 4 posiciones de aminoácidos, de las cuales cambios en Pro-197 y Trp-574 son los únicos descritos en *L. rigidum* (Galdames *et al.*, 2009). Las mutaciones correlacionan mayoritariamente con resistencia a sulfonilureas y en menor grado con imidazolinonas, pyrimidinyl-(thio)-benzoatos y sulfonylamino-carbonyl-triazolinona (Galdames *et al.*, 2009).

En biotipos resistentes de ballicas detectados en Chile, se ha logrado determinar la presencia de tres diferentes mutaciones, todas ellas conducen a sustituciones en Pro-197, de las cuales una no ha sido descrita previamente. No todos los biotipos resistentes estudiados presentan mutaciones en el gen de las ALS, lo cual sugiere la existencia de otro mecanismo de resistencia involucrado (Galdames *et al.*, 2008).

2.9 Herbicidas inhibidores de la Acetil Coenzima-A Carboxilasa (ACCasa).

Tres grupos químicos componen la familia de herbicidas inhibidores de la ACCasa: ariloxifenoxipropionatos (FOP), ciclohexanodionas (DIM) y fenilpirazolinas (DEN, representada por pinoxaden) (Porter *et al.*, 2005; Hofer *et al.*, 2006). Estos herbicidas son utilizados para controlar malezas gramíneas en cultivos de hoja ancha y cereales. En algunos casos, cuando se destinan a cereales, se les agrega antídotos en la formulación para mejorar su selectividad al cultivo, tal como ocurre con el herbicida pinoxaden que incluye al antídoto cloquintocet para mejorar su selectividad en trigo y cebada (Muehlebach *et al.*, 2009).

Los herbicidas inhibidores de la ACCasa son absorbidos rápidamente por las malezas y transportado a través del floema a las zonas meristemáticas, donde ejercen su acción, al inhibir la síntesis de lípidos y ácidos grasos (Fenton y Jutsum, 1991). Los síntomas de daño causado por estos herbicidas se evidencian una o dos semanas después de la aplicación, aunque las plantas cesan su crecimiento 2 a 3 días después de aplicados (Díaz *et al.*, 1992). Las plantas susceptibles tratadas pueden verse aparentemente sanas por varios días, pero las hojas nuevas pueden desprenderse con facilidad y presentar tejido muerto en su base. Las plantas se tornan gradualmente de un color rojizo a café y posteriormente mueren (Kogan y Pérez, 2003). Según Espinoza *et al.* (2005a), en Chile, desde la introducción de diclofop-metil a fines de los 70, los herbicidas inhibidores de la ACCasa se han utilizado ampliamente para el control pos-emergente de malezas gramíneas en trigo, cebada, lupino y raps. Específicamente en trigo, los más empleados han sido diclofop y clodinafop. Algunos herbicidas ACCasa que controlan malezas gramíneas introducidos a Chile se detallan en la Tabla 3 (Espinoza *et al.*, 2005a).

Tabla 3 Herbicidas ACCasa introducidos al país y recomendados en cereales y otros cultivos.

<i>Grupo químico</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Cultivo en que se recomienda</i>
Ariloxifenoxipropionatos (FOP)	clodinafop propargil	Topik 240 EC	Trigo
	diclofop metil	Cascabel 28 EC, Iloxan 28 EC	Trigo y cebada
	fluazifop-p-butil	Hache Uno 2000 175 EC	Lupino, canola y otras dicotiledóneas
	haloxyfop metil	Galant Plus	Lupino, canola y otras dicotiledóneas
	propaquizafop	Agil 100 EC	Lupino, canola y otras dicotiledóneas
	quizalofop-p-etil	Assure Plus, Flecha	Lupino, canola y otras dicotiledóneas
Ciclohexanodionas (DIM)	clethodim	Centurión 240 EC, Centurion Super	Lupino, canola y otras dicotiledóneas
	tralkoxydim	Grasp 80 WG , Grasp 250 SC	Trigo y cebada
	trepaloxymid	Aramo	Lupino, canola y otras dicotiledóneas
	sethoxydim	Poast	Lupino, canola y otras dicotiledóneas
Fenilpirazolinás (DEN)	pinoxaden	Axial	Trigo y cebada

Fuente: Espinoza *et al.* (2005a)

2.10 Resistencia a herbicidas inhibidores de la Acetil Coenzima-A Carboxilasa (ACCasa).

La ACCasa cumple un rol esencial en la síntesis y metabolismo de ácidos grasos y en la síntesis de importantes metabolitos secundarios, por lo que la inhibición de su actividad conduce a la muerte de la planta (Yu *et al.*, 2007). La ACCasa es una proteína multifuncional de alto peso molecular que cataliza la carboxilación de acetil-CoA para producir malonil-CoA, usando bicarbonato como fuente del grupo carboxil y ATP (Nikolskaya *et al.*, 1999). La actividad de la enzima en la planta, ocurre tanto en plástidos de semilla y tejidos no verdes como en los cloroplastos de tejidos verdes (Stilkowski, 1998). La selectividad a los herbicidas inhibidores de la ACCasa se debe a los diferentes tipos de la ACCasa plásticas. Las del tipo multidominio encontradas en el citosol de todas las plantas y la del tipo multisubunidad encontrada en plástidos de dicotiledóneas, son resistentes a herbicidas FOPs y DIMs. Por el contrario, la ACCasa plástica de gramíneas son sensibles a estos herbicidas. Aún cuando esto se considera la base de

la selectividad entre gramíneas y dicotiledóneas (Devine y Shukla, 2000), algunas gramíneas como los cereales, son tolerantes a estos herbicidas debido a su capacidad de metabolizar estos herbicidas a compuestos inactivos (Devine y Shimabukuro, 1994).

Según Nikolskaya *et al.* (1999) la región que comprende el dominio carboxil transferasa (CT) de la ACCasa plastídica posee los principales determinantes de sensibilidad a herbicidas FOPs y DIMs. Diferentes sustituciones aminoacídicas en el dominio CT de la ACCasa plastídica, han sido implicadas en la resistencia a herbicidas FOPs y DIMs en distintas especies de malezas gramíneas, las que incluyen: *L. rigidum* (Zagnitko *et al.*, 2001; Delye *et al.*, 2002a; Zhang y Powles, 2006), *L. multiflorum* (White *et al.*, 2005); *A. fatua* (Christoffers *et al.*, 2002), *A. sterilis* (Liu *et al.*, 2007), *S. viridis* (Délye *et al.*, 2002b) y *A. myosuroides* (Délye *et al.*, 2002a).

En biotipos resistentes de ballicas (*L. multiflorum* y *L. rigidum*) chilenos, se ha logrado confirmar la presencia de 7 mutaciones diferentes, sin embargo, dos no han sido descritas previamente (Galdames *et al.*, 2008), por lo que su implicancia en conferir resistencia a diversos herbicidas FOPs y DIMs aún no ha sido determinada (Díaz *et al.*, 2008).

2.11 Mecanismos de resistencia a herbicidas.

Se describe como mecanismo de resistencia al proceso mediante el cual una planta consigue anular la actividad fitotóxica del herbicida (Chueca *et al.*, 2005). De Prado *et al.* (2009), señalan que de todos los mecanismos detectados en malezas el/los cambio/s aminoácido/s que conlleva un cambio estructural en el sitio de acción (proteína) y una pérdida de afinidad por el herbicida, es el mecanismo más determinante en malezas resistentes. Existen al menos cinco mecanismos generales, no necesariamente excluyentes que podrían justificar la resistencia a herbicidas (Sherman *et al.*, 1996).

2.11.1 Resistencia sitio de acción.

2.11.1.1 Pérdida de afinidad por el sitio de acción. Los herbicidas resultan letales para las plantas debido a que actúan sobre un sitio de acción primario, generalmente una proteína, de especial relevancia biológica. Este sitio primario suele ser específico y la acción del herbicida sobre él (efecto primario), suele conducir al desarrollo de efectos secundarios, de naturaleza mucho más general que normalmente acaban produciendo la muerte de la planta (Corbett *et al.*, 1994). Una o varias mutaciones en la secuencia aminoacídica del sitio primario de acción pueden resultar en una pérdida de afinidad del herbicida por éste, imposibilitando la unión efectiva de ambos e impidiendo la continuidad del proceso vital mediado por dicho sitio (Gronwald, 1994, Délye *et al.*, 2005, Whaley *et al.*, 2007). Este tipo de mecanismo de resistencia en la mayoría de los biotipos resistentes descritos hasta el momento, se caracteriza por conferir un alto grado de resistencia al herbicida empleado, pudiéndose extender ésta a otras moléculas pertenecientes a la misma familia química (Cruz-Hipolito *et al.*, 2009a).

2.11.2 Resistencia no-sitio de acción.

2.11.2.1 Metabolización a compuestos no tóxicos. En los procesos de detoxificación metabólica, entendido como aquellos procesos biológicos en que las moléculas fitotóxicas son metabolizadas a compuestos inocuos o menos tóxicos, los biotipos resistentes son capaces de degradar el herbicida antes de que éste cause daños irreversibles (Devine y Preston, 2000). La velocidad de degradación enzimática puede variar con factores endógenos y exógenos, tales como el estado de crecimiento de la planta y las condiciones climáticas (De Prado *et al.*, 2009). Muchas de estas reacciones están mediadas por enzimas oxidativas, por ejemplo el citocromo P450, que es la enzima más importante en la primera fase del metabolismo de un herbicida (Barret, 2000). La resistencia a herbicidas por detoxificación es un proceso muy frecuente. Sin embargo, este mecanismo suele venir asociado a fenómenos de resistencia cruzada, lo que implica que un mismo individuo tiene la capacidad de metabolizar moléculas muy diferentes pertenecientes a diversas familias químicas. Esta moderada resistencia a un amplio espectro de productos hace extremadamente difícil el control de estos biotipos de malezas mediante sólo métodos químicos (De Prado *et al.*, 2009).

2.11.2.2 Resistencia asociada a procesos de secuestación o compartimentación. Los pocos casos existentes en la bibliografía relacionan este tipo de mecanismos de resistencia con herbicidas de acción hormonal e inhibidores del fotosistema I. Estos mecanismos de resistencia se sustentan en un incremento en la capacidad de secuestrar el herbicida o los metabolitos potencialmente fitotóxicos dentro de la vacuola celular (Coupland, 1991; Owen, 1991).

2.11.2.3 Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción. Una condición necesaria para lograr la eficacia de un herbicida es que alcance su sitio de acción en una concentración suficiente para que su efecto sea letal (Hess, 1985). La falta de movimiento de un herbicida posibilitará reducir la concentración de éste en el sitio de acción, lo que permitirá mantenerse funcional (Michitte *et al.*, 2004). Según De Prado *et al.* (2001), estas bajas concentraciones pueden lograrse, ya sea mediante una reducción en la penetración, absorción o translocación o, por la existencia de fenómenos de secuestación en la vacuola celular. La falta de absorción/penetración/translocación de herbicidas es básicamente un mecanismo de tolerancia existente en numerosos cultivos y algunas malas hierbas (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006; Cruz-Hipólito *et al.*, 2009b).

2.11.2.4 Reparación de efectos fitotóxicos. Algunos herbicidas ariloxifenoxipropanoatos como diclofop-metil y haloxifop, despolarizan el potencial de la membrana plasmática en células parenquimáticas de gramíneas. La capacidad despolarizadora del diclofop-metil se atribuye al flujo específico de protones que este compuesto produce hacia el interior de la célula (Shimabukuro y Hoffer, 1997). Recientemente han sido identificados biotipos de malas hierbas cuyo mecanismo de resistencia al diclofop-metil parece ser debido a la capacidad de recobrar el potencial de membrana una vez que se ha retirado el herbicida causante de la despolarización (De Prado *et al.*, 1999).

2.12 Prevención y manejo de la resistencia.

Para prevenir la resistencia es fundamental realizar un manejo integrado de las malezas, dado que ningún método de control, por si solo, es capaz de controlarlas adecuadamente y de forma sostenible (Zwerger, 1996; Storrie, 2006).

Según Espinoza *et al.* (2009), las principales estrategias de prevención y control son:

- ✓ **Alternar métodos no químicos de control de malezas con herbicidas.** Ayuda a reducir la presión de selección de los herbicidas. Sin embargo, las prácticas de control no químicas de malezas pueden ser limitadas en número y/o traducirse en resultados poco eficaces de control de malezas.
- ✓ **Mezclar herbicidas con diferentes mecanismos de acción.** Las mezclas de herbicidas en el estanque del aspersor o el tratamiento secuencial (el mismo año) de herbicidas con diferentes mecanismo de acción retarda el desarrollo de resistencia (Diggle *et al.*, 2003). Las plantas que escapan a un herbicida serán controladas por el otro herbicida. Para implementar esta práctica se asume que ambos herbicidas tienen acción de control sobre la maleza objetivo.
- ✓ **Rotar herbicidas con diferentes mecanismos de acción.** La rotación de herbicidas con diferentes mecanismos de acción año a año puede retrasar la resistencia. Sin embargo, esta técnica puede ser menos eficaz que el uso de mezclas en el estanque y/o aplicaciones secuenciales en el mismo año, ya que parte de la población sobrevivirá el año en la que se usa el otro herbicida con diferente mecanismo de acción (Diggle *et al.*, 2003; Powles *et al.*, 1997).
- ✓ **Rotar cultivos.** Puede retrasar la resistencia siempre y cuando los herbicidas usados tengan diferentes modos de acción y los otros métodos de control difieran para cada cultivo (Powles *et al.*, 1997).

- ✓ **Contener la infestación resistente en cuanto aparezca.** Una maleza resistente presenta la misma amenaza que una maleza nueva e invasora y al no ser controlada se favorece su diseminación. Las prácticas de control diferentes a la aplicación estándar del herbicida, como por ejemplo arrancar a mano y aplicar en manchas o en forma localizada con otros herbicidas ayudarán a eliminar las plantas que escaparon al herbicida.
- ✓ **Otras prácticas.** Las siguientes prácticas culturales también pueden ser muy útiles para prevenir o atrasar la resistencia, tales como: uso de semilla certificada; limpieza de toda la maquinaria agrícola, tanto de preparación del suelo como de cosecha, para evitar el transporte y dispersión de las semillas de malezas de un campo a otro; retraso en la siembra para que puedan emerger las malezas y poder controlarlas en una o más oportunidades, ya sea con herbicidas y/o mecánicamente; quema de rastrojos, donde sea recomendable y permitido, para reducir la viabilidad de las semillas de malezas existentes en el suelo.

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de los ensayos.

Los ensayos se realizaron en el Centro Regional de Investigación Carillanca, dependiente del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en la comuna de Vilcún, Región de La Araucanía, Chile (38°41' Lat. S. y 72°25' Long. W.).

3.2 Biotipos de ballicas utilizados y establecimiento.

Se utilizaron diecinueve biotipos de ballicas, quince correspondientes a la especie *L. multiflorum* y cuatro a la especie *L. rigidum*, todos sospechosos de presentar resistencia a herbicidas ALS y/o ACCasa colectados en campos de agricultores de diferentes localidades de las regiones del Biobío, La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos (Tabla 4 y Figura 3). También se utilizaron dos biotipos de referencia correspondiente a las variedades comerciales Tama (*L. multiflorum*) y Wimmera (*L. rigidum*). Las semillas de los diversos biotipos se pusieron sobre papel filtro humedecido y en bandejas de plástico para su germinación el 16 de enero de 2007.

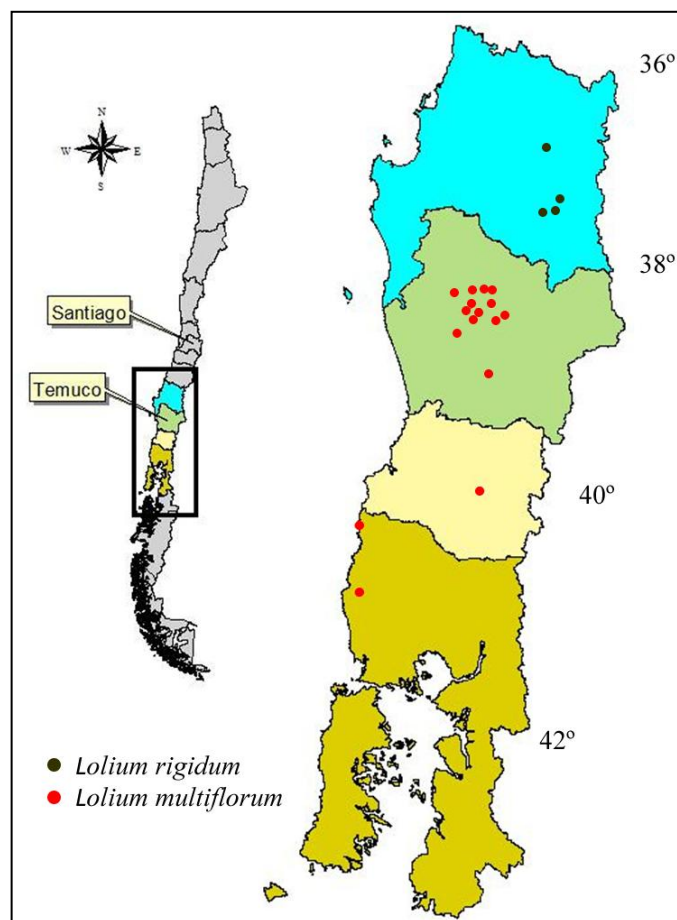


Figura 3. Sitios de colecta de los biotipos.

Transcurridos 10 a 15 días, se realizó el trasplante en maceteros de plásticos de 500 ml (10 por 9 cm). Como sustrato se empleó una mezcla de suelo trumao (60%) y arena (40%), fertilizado previo al trasplante en cantidades equivalentes a 120 kg ha⁻¹ de N, 150 kg ha⁻¹ de P₂O₅ y 50 kg ha⁻¹ de K₂O. Las plantas fueron regadas, según necesidad, basado en la observación visual de la superficie del suelo.

Tabla 4 Identificación de los biotipos de ballicas utilizados.

<i>Biotipo</i>	<i>Especie</i>	<i>Región de procedencia</i>
TAMA	<i>Lolium multiflorum</i>	----
LM-6	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-7	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-16	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-19	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-20	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-22	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-26	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-27	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-28	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-29	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
LM-30	<i>Lolium multiflorum</i>	Los Lagos
LM-31	<i>Lolium multiflorum</i>	Los Ríos
LM-32	<i>Lolium multiflorum</i>	Los Lagos
LM-33	<i>Lolium multiflorum</i>	Los Lagos
LM-34	<i>Lolium multiflorum</i>	La Araucanía
WIMMERA	<i>Lolium rigidum</i>	----
LR-10	<i>Lolium rigidum</i>	Biobío
LR-23	<i>Lolium rigidum</i>	Biobío
LR-24	<i>Lolium rigidum</i>	Biobío
LR-25	<i>Lolium rigidum</i>	Biobío

Fuente: Espinoza, comunicación personal.

3.3 Herbicidas aplicados.

Se utilizaron cuatro herbicidas post-emergentes recomendados en trigo, dos ACCasa y dos ALS. Cada herbicida se aplicó en una sola dosis que fue superior en un 50% a la dosis recomendada (Tabla 5). Todos los biotipos fueron asperjados con los herbicidas el 19 de febrero de 2007, cuando las plantas presentaban el desarrollo indicado en la Tabla 6. Los herbicidas se aplicaron con un aspersor tipo bicicleta modelo MAT-OSU con barra de aplicación y boquillas de

abanico plano Tee-Jeet 8002, en un volumen de agua de 200 L ha⁻¹ y presión de 30 lb pulg⁻². Durante la aplicación, la temperatura del aire y la humedad relativa promedio fueron 16 °C y 70%, respectivamente.

Tabla 5 Herbicidas aplicados.

<i>Herbicidas</i>	<i>Dosis aplicada (g ha⁻¹)</i>	<i>Modo de acción</i>	<i>Grupo químico</i>
Pinoxaden	75	Inhibidor ACCasa	Fenilpirazolina
Tralkoxydim	563	Inhibidor ACCasa	Ciclohexanodiona
Iodosulfuron metil-sodio + mesosulfuron metil (6+30 g kg ⁻¹)	3,6 + 18	Inhibidor ALS	Sulfonilurea
Iodosulfuron metil-sodio + mesosulfuron metil (30+30 g kg ⁻¹)	18 + 18	Inhibidor ALS	Sulfonilurea

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Desarrollo de las plantas de los biotipos de ballicas en la fecha de aplicación de los herbicidas.

<i>Biotipo</i>	<i>Desarrollo de las plantas (%)¹</i>				
	<i>4 hojas</i>	<i>1 macolla</i>	<i>2 macollas</i>	<i>3 macollas</i>	<i>4 macollas</i>
Tama	0	0	0	40	60
LM- 6	50	0	30	20	0
LM - 7	50	10	30	0	10
LM - 16	40	0	50	10	0
LM - 19	20	10	20	30	20
LM - 20	30	30	10	30	0
LM - 22	0	30	40	10	20
LM - 26	10	30	20	20	20
LM - 27	0	10	50	40	0
LM - 28	30	50	20	0	0
LM - 29	10	30	30	30	0
LM - 30	10	20	20	20	30
LM - 31	50	20	30	0	0
LM - 32	40	0	20	20	20
LM - 33	20	10	20	30	20
LM - 34	0	10	50	30	10
Wimmera	40	40	10	10	0
LR - 10	30	30	20	20	0
LR - 23	10	30	20	40	0
LR - 24	0	20	60	10	10
LR - 25	20	30	20	30	0

¹Corresponde al porcentaje de la población con el desarrollo indicado. LM y LR indica *L. multiflorum* y *L. rigidum*, respectivamente. Fuente: Elaboración propia.

3.4 Evaluación del peso seco de los biotipos de ballicas.

Veinticinco días después de la aplicación de los herbicidas inhibidores de la ACCasa y ALS, se cortó con tijera y a nivel del cuello la parte aérea de las plantas. Enseguida el material cortado fue puesto en un horno de aire forzado a 65 °C durante 48 horas para determinar peso seco de la parte aérea.

3.5 Diseño experimental y análisis de los datos.

El diseño experimental correspondió al completamente al azar. Cada biotipo representó un ensayo independiente. Cada maceta incluyó una planta y cada planta representó una repetición. El número de repeticiones por tratamiento fueron diez. Los datos de peso seco fueron sometidos al análisis de varianza y las medias de los tratamientos al test de Tukey al 0,05 de probabilidad, utilizando el programa estadístico SPSS. Los biotipos de ballica se agruparon en tres categorías según el porcentaje de reducción de peso seco de las plantas tratadas con los herbicidas con respecto a las plantas de un tratamiento testigo sin herbicida en: con resistencia, con resistencia en desarrollo y sensibles. Se consideró biotipo resistente cuando no hubo reducción de peso seco o la reducción fue inferior a 50 %, con resistencia en desarrollo cuando la reducción del peso seco fluctuó entre 50-90% y sensible cuando la reducción del peso seco fue superior al 90%.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Confirmación de la existencia de resistencia a herbicidas inhibidores de ACCasa y/o ALS en biotipos de *L. multiflorum*.

4.1.1 Resistencia a herbicidas inhibidores de ACCasa.

Transcurridos 25 días desde la aplicación de los diferentes herbicidas ACCasa el peso seco de la parte aérea de las plantas del cv. Tama incluido como referencia, fue reducido significativamente (Tukey $P \geq 0,05$) con los herbicidas tralkoxidim y pinoxaden en relación al tratamiento testigo en que no se aplicó herbicida (Figura 4 y Anexo 1). Sin embargo, este tipo de respuesta era el esperado, ya que el cv. Tama se caracteriza por su alta susceptibilidad a ambos herbicidas ACCasa debido a que no presenta resistencia. Por el contrario, un 80% de los biotipos sospechosos (LM-7, LM-16, LM-19, LM-20, LM-22, L- 26, L- 27, LM-28, LM-29, LM-30 y LM-33) la reducción del peso seco de las plantas fue baja o nula tratados con tralkoxidim (Figura 4a y Anexo 1), lo que indica una resistencia alta a este herbicida. En contraste, en todos los biotipos sospechosos, exceptuando el LM-22, hubo una disminución significativa del peso seco con pinoxaden, lo que indica una alta sensibilidad (Figura 4b y Anexo 1). La resistencia de la mayoría de los biotipos al ACCasa tralkoxidim se explica por la gran cantidad de años de uso de este herbicida en el mercado debido a su uso masivo en cultivos extensivos como trigo, por lo tanto, a una mayor presión de selección. Kuk *et al.* (2008) trabajando con 25 biotipos de *L. multiflorum* provenientes del Sur de EE.UU. encontraron que la mayoría de los biotipos fueron resistentes a los herbicidas ACCasa que habían sido utilizados por años en el cultivo de trigo, a excepción de pinoxaden al que solo un 13% de los biotipos fueron resistentes. La resistencia del biotipo LM-22 a pinoxaden, probablemente se deba a mutaciones existentes antes de la colecta, ya que este herbicida fue introducido al país recién el 2007, el mismo año de la colecta de los biotipos. La ausencia de relación entre la resistencia de este biotipo con la frecuencia de uso de pinoxaden, sugiere que la presión impuesta por tralkoxidim pudo haber contribuido en la selección de resistencia a pinoxaden. Al respecto, varios autores (Devine, 1997; Christoffers *et al.*, 2002; Délye *et al.*, 2002, 2003; Wenjie *et al.*, 2004; Zhang and Powles 2006; Yu, 2007)

señalan que mutaciones específicas en la ACCasa confieren patrones específicos de resistencia cruzada a los herbicidas ACCasa en gramíneas y que algunas mutaciones confieren resistencia sólo a FOP y otras a FOP y DIM.

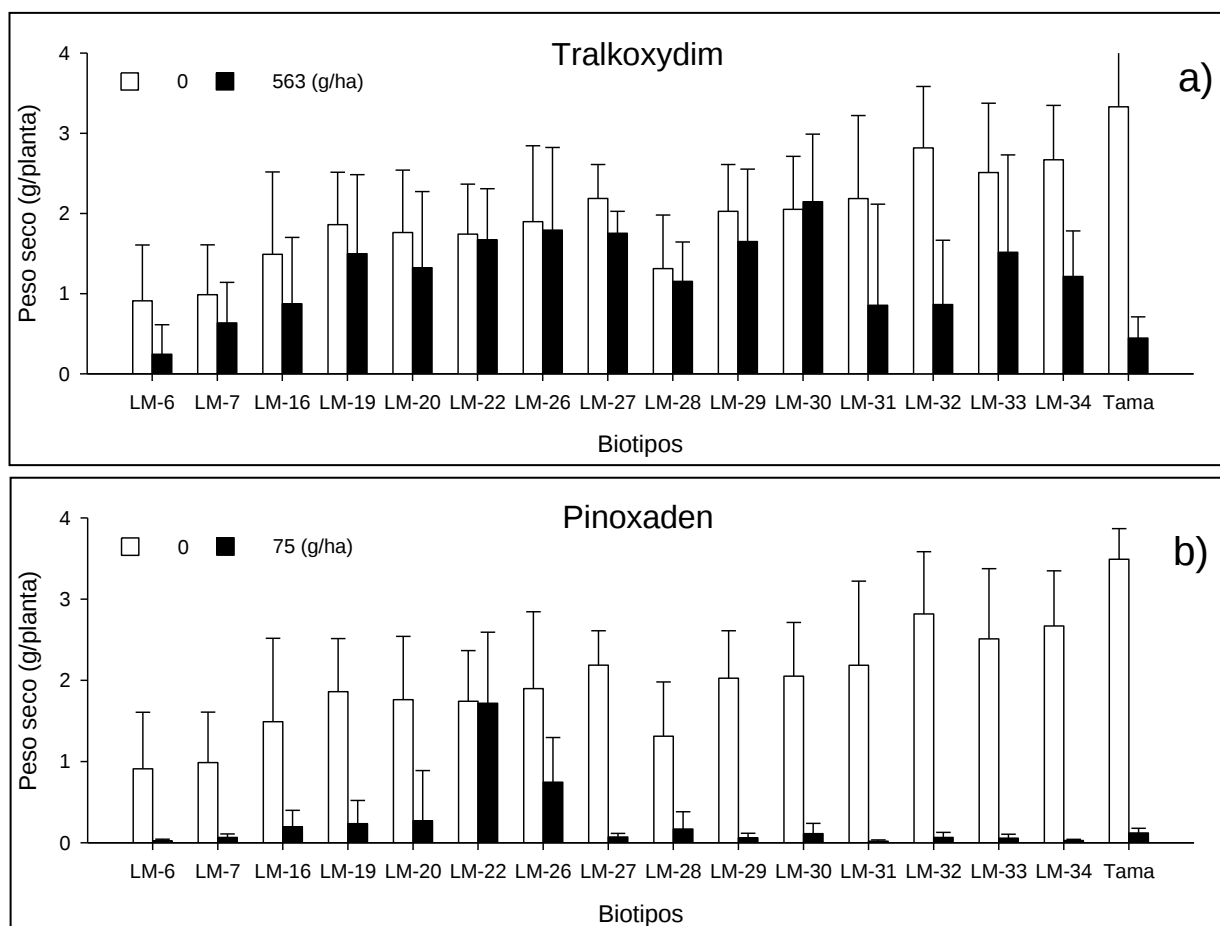


Figura 4. Peso seco del follaje de los biotipos de *L. multiflorum* 25 días después de la aplicación de los herbicidas ACCasa tralkoxydim (a) y pinoxaden (b). Las barras representan el promedio de 10 repeticiones y las líneas representan la desviación estándar de los valores promedios.

4.1.2 Resistencia a herbicidas inhibidores de ALS.

La respuesta de los biotipos de ballica de la especie *L. multiflorum* a los herbicidas ALS se caracterizó porque solamente en un número reducido de biotipos no hubo disminución del peso seco o fue de poca magnitud (Figura 5 y Anexo 2). A la mezcla de iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil (6+30 g kg⁻¹) esto se observó en los biotipos LM-19, LM-20 y LM-22,

mientras que a la mezcla de iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil ($30+30 \text{ g kg}^{-1}$) solamente en el biotipo LM-22. En el resto de los biotipos, con ambos herbicidas ALS, hubo una disminución significativa del peso respecto al tratamiento testigo sin herbicida (Tukey $P \geq 0,05$). No obstante, en los biotipos sospechosos LM-26, LM-27, LM-28, LM-29 y LM-33 la disminución del peso seco con iodosulfuron + mesosulfuron ($6+30 \text{ g kg}^{-1}$) fue un poco menor, lo que podría indicar una resistencia incipiente (Figura 5 y Anexo 2). El hecho que un mayor número de biotipos exhibiera resistencia a la mezcla con menor concentración de iodosulfuron, sugiere que este ingrediente activo fue el principal responsable del control de los biotipos y que hubo una respuesta positiva al incremento de la dosis de iodosulfuron aplicada.

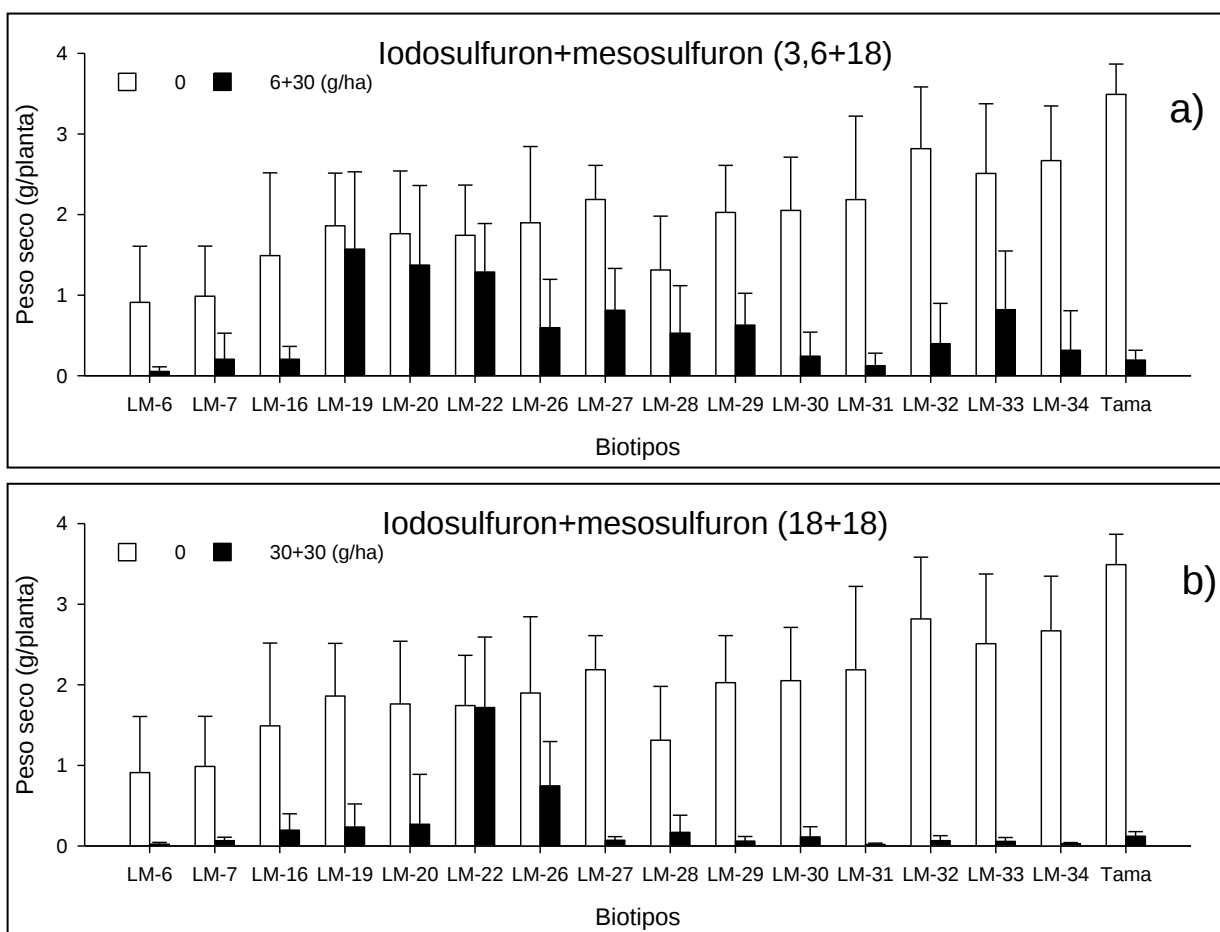


Figura 5. Peso seco del follaje de los biotipos de *L. multiflorum* 25 días después de la aplicación de los herbicidas ALS iodosulfuron metil sodio+ mesosulfuron metil ($6+30 \text{ g kg}^{-1}$) (a) iodosulfuron metil sodio+ mesosulfuron metil ($30+30 \text{ g kg}^{-1}$) (b). Las barras representan el promedio de 10 repeticiones y las líneas representan la desviación estándar de los valores promedios.

4.1.3 Resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de ACCasa y ALS.

Del total de biotipos de *L. multiflorum* que fueron evaluados, un biotipo, específicamente el LM-22, no exhibió ninguna disminución del peso seco, ya sea con los herbicidas ACCasa tralkoxidim y pinoxaden (Figura 4 y Tabla 7) y los ALS iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron (6+30 g kg⁻¹) y iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil (30+30 g kg⁻¹) (Figura 5 y Tabla 7). Esto indica que el biotipo LM-22 presentó resistencia cruzada a herbicidas con diferentes modos de acción, lo que supone una mayor dificultad para su control, dado que se reducen significativamente los herbicidas alternativos con potencial para poder usarse con algún grado de éxito. También los biotipos LM-19 y LM-20 resultaron resistentes a ACCasa y ALS simultáneamente, pero a diferencia de LM-22, estos biotipos lo fueron solo al ACCasa tralkoxidim (Figura 4a) y al ALS iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron (6+30 g kg⁻¹) (Figura 5a). Según Fisher (2008) la resistencia a ACCasa y ALS es frecuente y rápida de seleccionar debido a que son posibles muchas mutaciones.

4.2 Confirmación de la existencia de resistencia a herbicidas ACCasa y/o ALS en biotipos de *Lolium rigidum*.

4.2.1 Resistencia a herbicidas inhibidores de ACCasa.

Transcurridos 25 días desde la aplicación de los herbicidas ACCasa, el peso seco de la parte aérea de las plantas del cv. Wimmera fue reducido significativamente (Tukey $P \geq 0,05$) con tralkoxidim y pinoxaden en relación al tratamiento testigo en que no se aplicó herbicida (Figura 6 y Anexo 3). Este tipo de respuesta era el esperado, ya que el cv. Wimmera se caracteriza por una alta sensibilidad a estos herbicidas, debido a que no presenta resistencia. Por el contrario, en un 100% de los biotipos sospechosos (LR-10, LR-23 LR-24 y LR-25) no hubo disminución del peso seco o fue de poca magnitud con tralkoxidim (Figura 6a y Anexo 3). Con pinoxaden la resistencia se observó menos extendida, ya que si bien no hubo reducción del peso seco en los biotipos LR-23 y LR-25, hubo una drástica disminución del peso en los biotipos LR-10 y LR-24 (Figura 6b y Anexo 3). Estos resultados indican que los biotipos LR-23 y LR-25 exhibieron una alta

resistencia a los ACCasa tralkoxidim y pinoxaden. Por el contrario, en los biotipos LR-10 y LR-24 la resistencia pareció estar en desarrollo a tralkoxidim y no existió a pinoxaden. Rauch *et al.* (2010), en una encuesta de 75 campos en la región de Palouse, EE.UU. encontraron que el 12% de la población de ballicas fueron resistentes a pinoxaden, mientras que el 19% estaban desarrollando resistencia. El herbicida pinoxaden fue introducido para su uso en trigo y cebada en el país en 2007. Posiblemente en los biotipos chilenos y estadounidenses las poblaciones fueran previamente resistentes a uno o más herbicidas inhibidores de ACCasa y que expresan resistencia cruzada a pinoxaden. Esto podría estar basado en una mutación de la ACCasa en el sitio-blanco en biotipos seleccionados previamente por herbicidas ACCasa, tales como tralkoxidim, que también confiere resistencia a pinoxaden (Yu *et al.*, 2007).

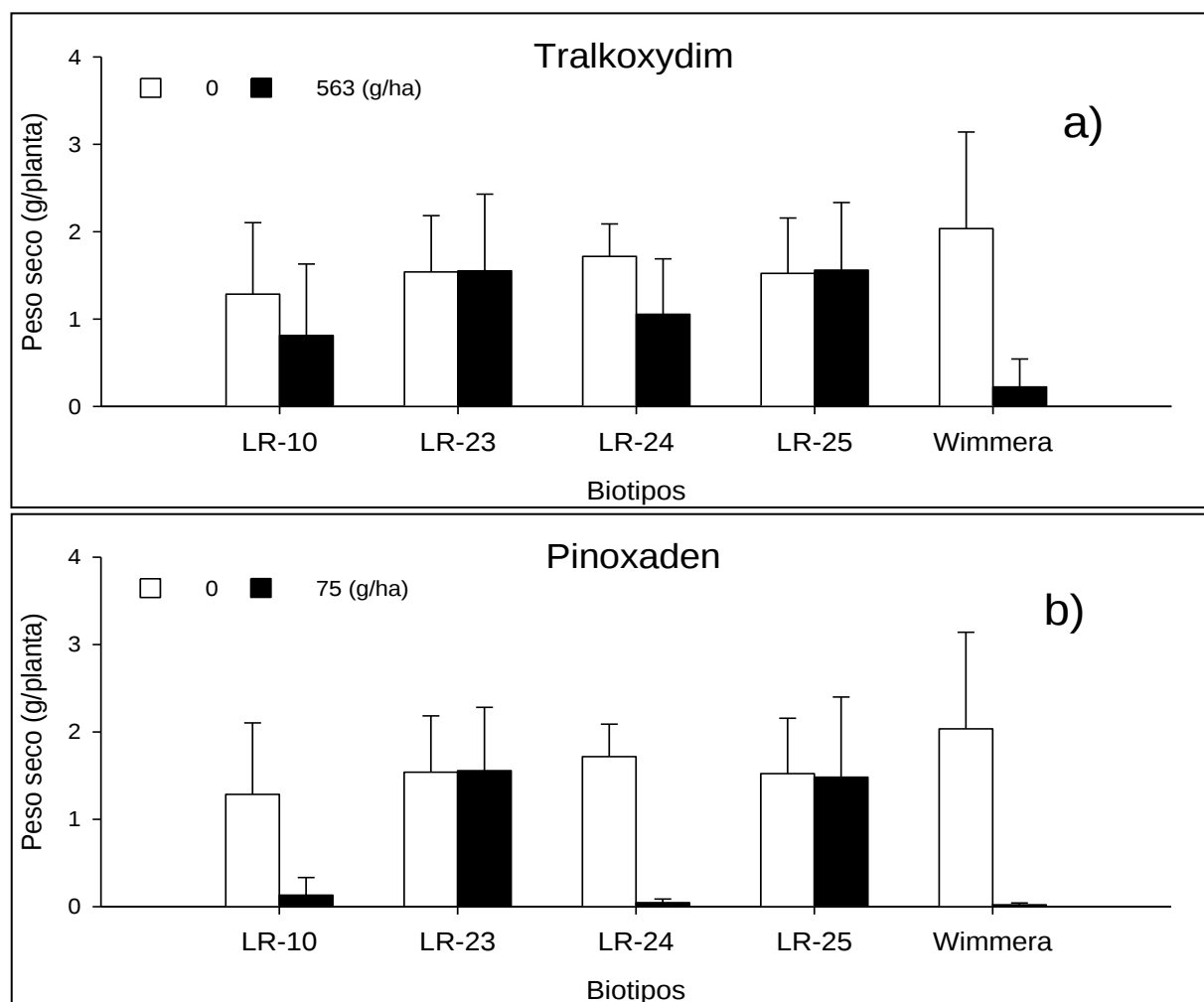


Figura 6. Peso seco del follaje de los biotipos de *L. rigidum* 25 días después de la aplicación de los herbicidas ACCasa (a) tralkoxidim y (b) pinoxaden. Las barras representan el promedio de 10 repeticiones y las líneas representan la desviación estándar de los valores promedios.

4.2.2. Resistencia a herbicidas inhibidores de ALS.

Como era de esperar el peso seco de la parte aérea de las plantas del cv. Wimmera fue reducido significativamente (Tukey $P \geq 0,05$) con los herbicidas inhibidores de ALS en relación al tratamiento testigo en que no se aplicó herbicida (Figura 7 y Anexo 4), debido a que no presenta resistencia.

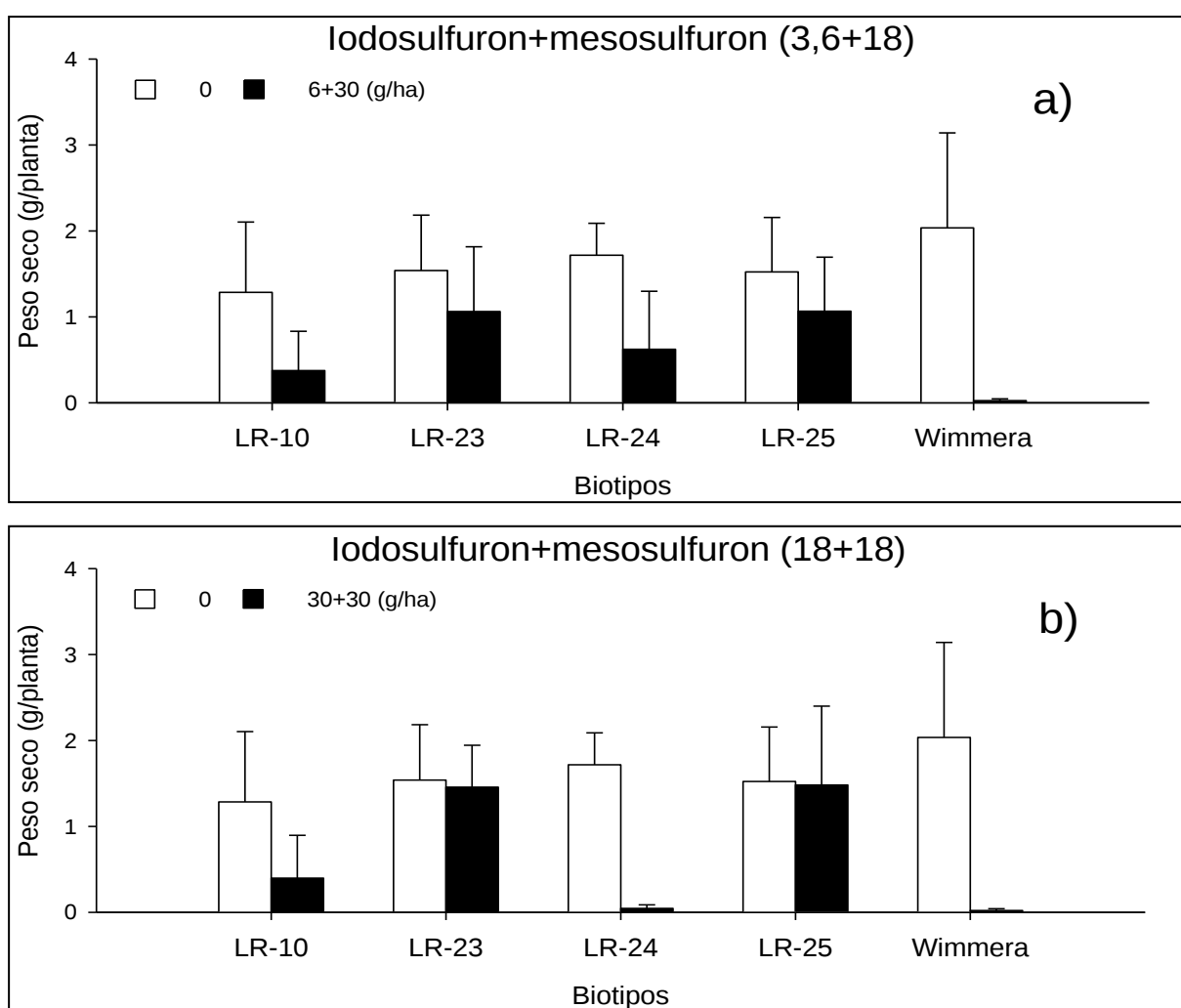


Figura 7. Peso seco del follaje de los biotipos de *L. rigidum* 25 días después de la aplicación de los herbicidas ALS (a) iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil ($6+30 \text{ g kg}^{-1}$) y (b) iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil ($30+30 \text{ g kg}^{-1}$). Las barras representan el promedio de 10 repeticiones y las líneas representan la desviación estándar de los valores promedios.

Los datos de peso seco de la parte aérea de los biotipos de ballica obtenidos con los herbicidas ALS, muestran que en los biotipos LR-23 y LR-25 la disminución del peso seco fue baja con ambas formulaciones de iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil, lo que indica una resistencia alta. En cuanto a los biotipos LR-10 y LR-24 la disminución del peso seco a ambos herbicidas ALS fue mayor, lo que indica que la resistencia parece estar en desarrollo (Figura 7 y Anexo 4).

4.2.3 Resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de ACCasa y ALS.

De los cuatro biotipos de *L. rigidum* que fueron evaluados, los biotipos LR-23 y LR-25 no mostraron disminución del peso seco o la disminución fue mínima, ya sea con los herbicidas ACCasa tralkoxidim y pinoxaden (Figura 7a) y los ALS iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron (6+30 g kg⁻¹) y iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil (30+30 g kg⁻¹) (Figura 7b). Esto indica que ambos biotipos presentaron resistencia cruzada a todos los herbicidas ACCasa y ALS evaluados. Esto hace pensar que de continuar la evolución de resistencia a ACCasa y ALS, las opciones de herbicidas disponibles para controlar estas poblaciones resistentes podrían llegar a ser muy limitadas en el corto plazo en trigo y otros cultivos extensivos (Espinoza *et al.*, 2009). Heap y Knight (1990) señalan que una característica en *L. rigidum*, es la resistencia cruzada a herbicidas con otros modos de acción.

En la Tabla 7, se muestra un resumen de la resistencia a herbicidas inhibidores de ACCasa y ALS en los biotipos de ballica estudiados. El 26% de los biotipos presentaron resistencia cruzada a ACCasa y ALS (las poblaciones que fueron clasificadas con resistencia en desarrollo no fueron incluidos en este cálculo). Resultados similares (27%) fueron encontrados por Rauch *et al.* (2010) en EE.UU. Los mecanismos de resistencia involucrados en estos biotipos resistentes a ACCasa y ALS, deberían ser examinados en futuros estudios. No obstante, la presencia en ellos de resistencia metabólica y sitio de acción, o una combinación de ambas, son posibles explicaciones.

Tabla 7. Resumen de la resistencia a los herbicidas.

		Inhibidor	ACCasa	Inhibidor ALS	
Biotipo de ballicas	Región de procedencia	pinoxaden (75 gha ⁻¹)	tralkoxidim (563 gha ⁻¹)	iodosulfuron + mesosulfuron (3,6+18 gha ⁻¹)	iodosulfuron + mesosulfuron (18+18 gha ⁻¹)
L. multiflorum					
LM-6	La Araucanía	S	RD	S	S
LM-7	La Araucanía	S	R	S	S
LM-16	La Araucanía	S	R	S	S
LM-19	La Araucanía	S	R	R	S
LM-20	La Araucanía	S	R	R	RD
LM-22	La Araucanía	R	R	R	R
LM-26	La Araucanía	RD	R	RD	S
LM-27	La Araucanía	S	R	RD	S
LM-28	La Araucanía	S	R	RD	S
LM-29	La Araucanía	S	R	RD	S
LM-30	Los Lagos	S	R	S	S
LM-31	Los Ríos	S	RD	S	S
LM-32	Los Lagos	S	RD	S	S
LM-33	Los Lagos	S	R	RD	S
LM-34	La Araucanía	S	R	S	S
L. rigidum					
LR-10	Biobío	S	R	RD	RD
LR-23	Biobío	R	R	R	R
LR-24	Biobío	S	R	RD	S
LR-25	Biobío	R	R	R	R
Total biotipos					
Sensible		15	0	7	14
Resistencia en Desarrollo		1	3	7	1
Resistente		3	16	5	3

Fuente: Elaboración propia.

Una de las estrategias recomendadas para controlar malezas resistentes es la rotación de herbicidas con diferentes modos de acción. Lamentablemente, se encontró que un número importante de los biotipos presentaron resistencia cruzada a ACCasa y ALS.

Puesto que iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron (30+30 g kg⁻¹), iodosulfuron metil sodio + mesosulfuron metil (6+30 g kg⁻¹) y pinoxaden, fueron introducidos al país en 2004, 2006 y 2007, respectivamente, y la semilla de los biotipos de ballicas fue colectada en 2006, los

resultados sugieren que la resistencia ya estaba presente en las plantas antes de ser aplicados los herbicidas en el campo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

L. multiflorum:

Todos los biotipos de *L. multiflorum* (15 biotipos) presentaron resistencia al menos a un herbicida.

La resistencia fue más generalizada a los herbicidas ACCasa que a los herbicidas ALS.

Ocho biotipos, presentaron resistencia cruzada a herbicidas ACCasa y ALS.

El nivel de resistencia de los biotipos fue mayor al ACCasa tralkoxidim que al resto de los herbicidas.

L. rigidum:

Todos los biotipos de *L. rigidum* (4 biotipos) presentaron resistencia al menos a un herbicida.

La resistencia fue generalizada a ACCasa y ALS. Sin embargo el nivel de resistencia fue mayor en el ACCasa tralkoxidim que al resto de los herbicidas.

Todos los biotipos presentaron resistencia cruzada a ACCasa y ALS.

CAPÍTULO VI

RESUMEN

6. RESUMEN.

Quince biotipos de *L. multiflorum* (LM-6, LM-7, LM-16, LM-19, LM-20, LM-22, LM-26, LM-27, LM-28, LM-29, LM-30, LM-31, LM-32, LM-33 y LM-34) y cuatro de *L. rigidum* (LR-10, LR-23, LR-24 y LR-25) colectados en la principal zona productora de trigo de Chile (Regiones del Biobío, La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos), sospechosos en desarrollar resistencia a herbicidas inhibidores de ACCasa y/o ALS, se asperjaron con los herbicidas tralkoxydim (563 g ha⁻¹), pinoxaden (75 g ha⁻¹), iodosulfuron + mesosulfuron (3,6+18 g ha⁻¹) y iodosulfuron + mesosulfuron (18+18 g ha⁻¹) para confirmar la existencia o no de resistencia. Cada herbicida se aplicó en una dosis equivalente a la recomendada e incrementada en 50%. En base a la disminución porcentual del peso seco respecto a un tratamiento testigo sin herbicida, se encontró que la mayoría de los biotipos de ballica presentaron resistencia a uno o más herbicidas.

En *L. multiflorum*, un 80% de los biotipos presentaron resistencia al ACCasa tralkoxidim, mientras que un 7% presentó resistencia al ACCasa pinoxaden. En cuanto a la respuesta de los herbicidas ALS, un 20% fueron resistentes al herbicida iodosulfuron + mesosulfuron (6+30 g kg⁻¹) y un 13% a iodosulfuron + mesosulfuron (30+30 g kg⁻¹). Más del 50% de los biotipos presentaron resistencia cruzada a herbicidas ACCasa y ALS

En *L. rigidum*, un 100% de biotipos sospechosos presentaron resistencia al herbicida ACCasa tralkoxidim y un 50% lo fueron al ACCasa pinoxaden. En cuanto a los herbicidas ALS evaluados, un 50% resultaron resistentes en ambas concentraciones de iodosulfuron + mesosulfuron. Todos los biotipos presentaron resistencia cruzada a ACCasa y ALS

CAPÍTULO VII

SUMMARY

7. SUMMARY

Fifteen biotypes of *L. multiflorum* (LM-6, LM-7, LM-16, LM-19, LM-20, LM-22, LM-26, LM-27, LM-28, LM-29, LM-30, LM-31, LM-32, LM-33 y LM-34) and four of *L. rigidum* (LR-10, LR-23, LR-24 y LR-25) collected in the main production area of wheat in Chile (Regions of Biobío, La Araucanía, Los Ríos and Los Lagos), suspects in develop resistance to herbicides ACCase inhibitors and/or ALS, were sprayed with herbicide tralkoxydim (563 g ha^{-1}), pinoxaden (75 g ha^{-1}), iodosulfuron + mesosulfuron ($3.6+18 \text{ g ha}^{-1}$) and iodosulfuron + mesosulfuron ($18+18 \text{ g ha}^{-1}$) to confirm the existence or no resistance. Each herbicide was applied at a dose equivalent to that recommended and increased by 50%. Based on the percentage decrease in dry weight compared to a control treatment without herbicide, found that most ryegrass biotypes were resistant to one or more herbicides.

In *L. multiflorum*, 80% of the biotypes were resistant to ACCase tralkoxydim, while 7% showed resistance to ACCase pinoxaden. As for the response of ALS herbicides, 20% were resistant to the herbicide iodosulfuron + mesosulfuron ($6+30 \text{ g kg}^{-1}$) and 13% to iodosulfuron + mesosulfuron ($30+30 \text{ g kg}^{-1}$). Over 50% of biotypes showed cross-resistance to ACCase and ALS herbicides.

In *L. rigidum*, 100% of suspected biotypes were resistant to the herbicide ACCase tralkoxydim and 50% were to ACCase pinoxaden. As ALS herbicides evaluated, 50% were resistant to both concentrations of iodosulfuron + mesosulfuron. All biotypes showed cross-resistance to ACCase and ALS.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Barrett, M.** 2000. The role of cytochrome P450 enzymes in herbicide metabolism. In: *Herbicides and Their Mechanisms of Action*, eds. Cobbs, A. and Kirkwood, R. Sheffield, Great Britain, Sheffield Academic, 25-37 p.
- Burnet, M., Hart, Q., Holtum, J. and Powles, S.** 1994. Resistance to 9 herbicide Classes in A Population of Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science* 42:369-377.
- Catizone P., Zanin G.** 2001. *Malherbología*. Patron Editore. Bologna (Italia). 925 p.
- Corbett, J., Wright, R. and Bailie, A.** 1994. The biochemical mode of action of pesticides, (eds. Academic Press, London). 382 p.
- Coupland, D.** 1991. The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. In: *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*, eds. Caseley, J., Cussans, G. and Atkin, R., Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, 263-278 pp.
- Cousens, R. and Mortimer, M.** 1995. *Dynamics of weed populations*, Cambridge University Press, Cambridge, England, 332 p.
- Cruz-Hipolito, H., Osuna, M., Heredia, A., Ruiz-Santaella, J. and De Prado, R.** 2009 b. Nontarget mechanisms involved in glyphosate tolerant found in *Canavalia ensiformis* plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:4844-4848.
- Cruz-Hipolito, H., Osuna, M., Vidal, R. and De Prado, R.** 2009 a. Resistance mechanism to bensulfuron-methyl in biotypes of *Scirpus mucronatus* L. collected in Chilean rice fields. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:4273-4278.
- Chaleff, R. and Day, E.** 1984. Herbicide resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science* 223:1148-1151.
- Chaudhry, O.** 2008. *Biology/ Environmental Science* Albert Campbell Collegiate Institute (Con. Ed.) Toronto, Ontario, Canada. 223:1148-1151.
- Christopher, J., Powles, S. and Holtum, J.** 1992. Resistance to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides in Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*) involves at Least Two Mechanisms. *Plant Physiology* 100: 1909-1913.
- Chueca, C., Cirujeda, A., De Prado, R., Díaz, E., Ortas, L., Taberner, A. y Zaragoza.** 2005. Colección de folletos sobre manejo de poblaciones resistentes en *Papaver*, *Lolium*, *Avena* y *Echinochloa*. SEMh Grupo de Trabajo CPRH.

- De Prado, J., De Prado, R. and Shimabukuro, R.** 1999. The effect of diclofop on membrane potential, ethylene induction and herbicide phytotoxicity in resistant and susceptible biotypes of grasses. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 63:1-14.
- De Prado, J., Cruz-Hipolito, H. y De Prado, R.** 2009. Mecanismos de resistencia de las malezas a los herbicidas. Seminario Internacional Diagnostico y Manejo de la Resistencia a Herbicidas. 3-4 noviembre, 2009. INIA Carillanca, Temuco, Chile.
- De Prado, R., Cubero, M. y Osuna, M.** 2001. Biotipos resistentes a herbicidas. Distribución mundial. Uso de herbicidas en la agricultura del siglo XXI. Córdoba, España. 261-273 pp.
- Délye, C. and Boucansaud, K.** 2008. A molecular assay for the proactive detection of target site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. *Weed Research* 48(2):97-101.
- Délye, C., Matějček, A. and Gasquez, J.** 2002 a. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in Black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest Management Science* 58:474-478.
- Délye, C., Wang, T. and Darmency, H.** 2002 b. An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. *Planta* 214:421-427.
- Délye, C., Zhang, X., Chalopin, C., Michel, S., Matějček, A. and Powles, S.** 2005. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in Black-grass. *Plant Physiology* 137:794-806.
- Devine, M. and Preston, C.** 2000. The molecular basis of herbicide resistance. Cobb, A.H. & Kirkwood, R.C., eds. *Herbicides and their mechanisms of action*. Sheffield Academic Press Ltd, Inglaterra: 72-104 p.
- Devine, M. and Shimabukuro, R.** 1994. Resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. En: Powles, S. and Holtum, J. (Eds.), *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Ratón, FL, USA. 14-169 p.
- Devine, M. and Shukla, A.** 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Prot.* 19: 881-889.
- Díaz, J., Espinoza, N., Galdames, R. y De Prado, R.** 2008. Determinación de factores de resistencia en avenilla (*Avena fatua*) y cola de zorro (*Cynosurus echinatus*) con herbicidas. XVIII Congreso de la ALAM. Univ. Federal de Ouro Petro, Ouro Petro, MG, Brasil.
- Díaz, J., Galdames, R., Ruiz-Santaella, J.P., Espinoza, N., Franco, A. and De Prado, R.** 2008. Reduced target-site sensitivity and mutations in resistant biotypes of ryegrass to ACCase-

inhibitors herbicides. 5 th International Weed Science Congress. June 23-24, 2008. Vancouver, British Columbia Canadá.

Diggle, A., Neve, P. and Smith, F. 2003. Herbicides used in combination can reduce the probability of herbicide resistance in finite weed populations. *Weed Research* 43:371-382.

Espinoza, N. 2002. Avances en control de malezas en trigo. Centro Regional de Investigación Carillanca. Boletín INIA N° 83. Temuco, Chile. 49 p.

Espinoza, N. y Díaz, J. 2005. Situación de la resistencia de malezas a herbicidas en cultivos anuales en Chile. Seminario – Taller Iberoamericano. Resistencia a Herbicidas y Cultivos Transgénicos. Colonia del Sacramento. Uruguay. 72-82 p.

Espinoza, N. y Zapata, M. 2000. Resistencia de ballica anual (*Lolium rigidum*) y avenilla (*Avena fatua*) a herbicidas graminicidas en las zonas centro-sur y sur de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 60:3-13.

Espinoza, N., Conejeros, A., Mera, M. y Rouanett, J. 2003. Biotipo de ballica (*Lolium multiflorum* L.) con resistencia cruzada a herbicidas ACCasa. En: XVI Congreso Latinoamericano de Malezas; XXIV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de la Ciencia de la Maleza. Manzanillo, Colima, México.

Espinoza, N., Díaz, J. y De Prado, R. 2005. Ballica (*Lolium multiflorum* Lam.) con resistencia a glifosato, glifosato-trimesium, iodosulfuron y flucarbazone sódico. En: Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (27); Congreso Iberoamericano de Ciencia de las Malezas (1., 2005, Varadero, Matanzas, CU).

Espinoza, N., Díaz, J., Galdames, R. y Rodríguez, C. 2009. Estrategias de manejo de malezas gramíneas resistentes a herbicidas en trigo y otros extensivos en el sur de Chile. Seminario Internacional Diagnostico y Manejo de la Resistencia a Herbicidas. 3-4 noviembre, 2009. INIA Carillanca, Temuco, Chile.

Espinoza, N., Díaz, J., Galdames, R., De Prado, R., Rodríguez, C. y Ruiz, E. 2008. Resistencia múltiple a glifosato, ACCasa y ALS en biotipos de *Lolium* chilenos. En: XVII Congreso Latinoamericano de Malezas; XXVI Congreso Brasileiro da Ciencia das Plantas Daninhas. Ouro Preto, MG, Brasil.

Fischer, A. and Valverde, B. 2005. Evolución de resistencia a herbicidas, diagnostico y manejo en malezas del arroz. Seminario Taller Iberoamericano. Resistencia a Herbicidas y Cultivos Transgénicos. Colonia del Sacramento. Uruguay. 21p.

Fischer, A. 2008. Mecanismos de resistencia: las bases para definir estrategias. En Seminario Internacional “viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables” Noviembre, 2008. Serie de actividades de difusión. 554. 26-43. Colonia, Uruguay.

- Galdames, R., Díaz, J. and Espinoza, N.** 2009. Bases moleculares de la resistencia a herbicidas y test molecular para detectar resistencia a herbicidas en ballicas (*Lolium multiflorum* y *L. rigidum*). Seminario Internacional Diagnostico y Manejo de la Resistencia a Herbicidas. 3-4 noviembre, 2009. INIA Carillanca, Temuco, Chile.
- Galdames, R., Díaz, J., Ruiz-Santaella, J., Espinoza, N., Franco, A. and De Prado, R.** 2008. Nucleotide substitutions at the Acetyl coenzyme A Carboxylase gene associated to resistance herbicide chilean biotypes of *Lolium multiflorum* and *Lolium rigidum*. 5 th International Weed Science Congress. June 23-24, 2008. Vancouver, British Columbia Canadá.
- Gray, J., Balke, N. and Stoltenberg, D.** 1996. Increased Glutathione Conjugation of Atrazine Confers Resistance in a Wisconsin Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype. Pesticide Biochemistry and Physiology 55,157-171.
- Gressel, J.** 1991. Why get resistance? It can be prevented or delayed. En: "Herbicide Resistance in Weeds and Crops", (eds. Caseley, J. C.; Cussans, G. W.; Atkin, R. K.), Butterworth-Heinemann, Oxford, England, 1-26 p.
- Gressel, J. and Segel, L.** 1990. Modelling the effectiveness of herbicide rotations and mixtures as strategies to delay or preclude resistance. Weed Technology 4:186-198.
- Gronwald, J.** 1994. Herbicides inhibiting acetyl CoA carboxylase. Biochemical Society Transactions 22:153-161.
- Gunsolus, J.** 2002. Molecular biology of weeds. North Central Region Extension Publication. 468 p.
- Heap, I.** 2011. International survey of herbicide resistant weeds. Consultado: 13 abril. 2011. Disponible en: <http://www.weedscience.org/in.asp>.
- Heap, I. and Knight, R.** 1990. Variation in herbicide cross-resistance among populations of annual ryegrass (*Lolium rigidum*) resistant to diclofop-methyl. Aust. J. Agric. Res. 41:121-128.
- Hess, F.** 1985. Herbicide absorption and translocation and their relationship to tolerant and susceptibility. In: Weed Physiology: Herbicide Physiology, vol.II, eds. Duke, S., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 192-214.
- Jander, G., Baerson, S., Hudak, J., Gonzalez, K., Grays, K. and Last, R.** 2003. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. Plant Physiology 131:139-146.
- Jasieniuk, M., Brulé-babel, A. and Morrison, I.** 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. Weed Science 44:176-193.

- Kogan, M. y Pérez, A. 2003.** Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Colección en agricultura. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Ediciones Universidad Católica de Chile. 333 p.
- Kuk, Y., Burgos, N. and Scout, R. 2008.** Resistance Profile of Diclofop-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) to ACCase- and ALS- Inhibiting Herbicides in Arkansas, USA. Weed Science 56:614-623.
- Laplanche, J., Rajcan, I. and Tardif, F. 2009.** Multiple Allelic Forms of Acetohydroxyacid Synthase are Responsible for Herbicide Resistance in *Setaria viridis*. Theoretical and Applied Genetics 119:577-585.
- Linton, K. 2007.** Structure and Function of ABC Transporters. Physiology 22, 122-130.
- Liu, W., Harrison, D., Chalupska, D., Gornicki, P., O'Donnell, C., Adkins, S., Haselkorn, R. and Williams, R. 2007.** Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 104: 3627-3632.
- Llewellyn, R. and Powles, S. 2001.** High Levels of Herbicide Resistance in Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) in the Wheat Belt of Western Australia. Weed Technology 15:242-248.
- Mallory-Smith C. and Retzinger E. 2003.** Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. Weed Technology 17:605-619.
- Mallory-Smith C., Thill, D. and Dial, M. 1990.** Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). Weed Technology 4:163
- Matthews, J., Holtum, J., Liljegren, D., Furness, B. and Powles, S. 1990.** Cross-Resistance to Herbicides in Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*). Properties of the Herbicide Target Enzymes Acetyl-Coenzyme A Carboxylase and Acetolactate Synthase. Plant Physiology 94: 1180-1186.
- Maxwell, B. and Mortimer, A. 1994.** Selection for herbicide resistance. pp, 1-25 in S. B. Powles y J.A.M. Holtum, eds. Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry. Lewis Publishers. Boca Raton.
- Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N., Ruiz-Santaella, P. and Gauvrit, C. 2007.** Mechanisms of resistance to glyphosate in a Ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. Weed Science 55:435-440
- Michitte, P., Gauvrit, C., Heredia, A. and De Prado, R. 2004.** Resistance to glyphosate in *Lolium multiflorum*: involvement of epicuticular waxes?. In: XII Colloque International Sur La Biologie Des Mauvaises Herbes, 597-602.

- Morrison, I. and Friesen, L.** 1996. Herbicide resistant weeds: mutation, selection and misconceptions. En: "Proceedings of the Second International Weed Control Congress", Copenhagen, Denmark, 2, 377-386.
- Moss, S.** 2002. Herbicide-resistant weeds. In Naylor, R.E.L. ed. Weed Management handbook. Oxford, Blackwell. 225-252 p.
- Muehlebach, M., Boeger, M. and Cederbaum, F.** 2009. Aryldiones Incorporating a 1,4,5 Oxadiazepane Ring. Part I: Discovery of the Novel Cereal Herbicide Pinoxaden. *Bioorganic and Medical Chemistry* 17:4241-4256.
- Neve, P.** 2007. Challenges for herbicide resistance evolution and management: 50 years after Harper. *Weed Research* 47: 365-369.
- Nikolskaya, T., Zagnitko, O., Tevzadze, G., Haselkorn, R. and Gornicki, P.** 1999. *Proc Natl Academy Science USA* 96:14647-14651
- Olofsdotter, M., Valverde, B. and Madsen, K.** 2000. Herbicide resistant rice (*Oryza sativa* L.): Global implications for weedy rice and weed management. *Annals of Applied Biology* 137:279-295 p.
- Orson J.** 1999. The cost to the farmer of herbicide resistance. *Weed Technology* 13:607-611.
- Owen, M.** 1997. Risks and benefits of weed management technologies. En: *Weed and Crop Resistance to herbicides*. De Prado R., Jorriñ J. y García-Torres L. eds. Kluwer Academic Press Publishers.
- Owen, W.** 1991. Herbicide metabolism as a Basic for selectivity. En: *Target sites for herbicide Action*, ed. Kirkwood, R., Plenum Press, New York. 285-314.
- Park, K. and Mallory-Smith, C.** 2004. Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotypes. *Weed Research* 44(2): 71-77.
- Pedrerros, A.** 2007. Resistencia de malezas a herbicidas. *Malezas en arroz*. Boletín INIA 162 p.
- Pérez, A. y Kogan, M.** 2001. Resistencia de malezas a herbicidas. *Agronomía y Forestal UC (Chile)* 4 (13): 4-9.
- Porcelli, L., Lemos, C., Peters, G., Paradiso, A. and Azzariti, A.** 2009. Intracellular Trafficking of MDR Transporters and Relevance of SNPs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 9, 197-208.
- Powles, S., Preston, I., Bryan, A. and Jutsum, R.** 1997. Herbicide Resistance: Impactant Management. *Adv. Agron* 58: 57-93.

- Preston C., Stewart V., Storrie A. and Walter S.** 2006. CRC for Australian Weed Management. Integrated weed management.
- Preston, C. and Powles, S.** 2002. Evolution of Herbicide Resistance in Weeds: Initial Frequency of Target Site-Based Resistance to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides in *Lolium rigidum*. *Heredity* 88:8-13.
- Rauch, T., Thill, D., Gersdorf, S. and Price W.** 2010. Widespread Occurrence of Herbicide-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Northern Idaho and Eastern Washington. *Weed Technology* 24:281-288.
- Ruiz-Santaella, J., Heredia, A. and De Prado, R.** 2006. Basis of selectivity of cyhalofop-butyl in *Oryza Sativa* L. *Planta* 223: 191-199.
- Ryan, G.** 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science* 18:614-616.
- Sans, X. y Fernández-Quintanilla (Eds.).** 1997. *Biología de las malezas de España*. Phytoma España S.L. Valencia. 117 p.
- Shaner, D., Stidham, M. and Singh, B.** 2007. Imidazolinone Herbicides. In: *Modern Crop Protection Compounds*. Weinheim. 82-92.
- Sherman, T., Vaughn, K. and Duke, S.** 1996. Mechanism of action and resistance to herbicides. *Herbicide resistant crop*, CRC Press, Boca Raton. 14-28.
- Shimabukuro, R. and Hoffer, B.** 1997. Perturbation of the transmembrane proton gradient and resistance to AOPP herbicides. In: *Weed and Crop Resistance to Herbicides*. Eds. De Prado, R., Jorin, J. and García-Torres, L., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 71-79.
- Sibony, M., Michel, A., Haas, H., Rubin, B. and Hurle, K.** 2001. Sulfometuron-resistant *Amaranthus retroflexus*: cross-resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Research* 41:509-522
- Siminszky, B.** 2006. Plant Cytochrome P450- Mediated Herbicide Metabolism. *Phytochemistry Reviews* 5:445-458.
- Stilkowski, G.** 1998. Inheritance of fenoxaprop-p-ethyl and trifluralin resistente, and genetic variability among green foxtail (*Setaria viridis* (L.) Beauv.) populations. Thesis Mg. Sc. University Winnipeg, Manitoba. Canada.
- Storrie A.** 2006. Herbicide resistance mechanisms and common HR misconceptions. 2006 Grains research update for irrigation croppers. En: Taberner, A. y Cirujeda, A. 2007.

- Manejo de poblaciones de malezas resistentes herbicidas. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. FAO. 78 p.
- Taberner, A. y Cirujeda, A.** 2007. Manejo de poblaciones de malezas resistentes herbicidas. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. FAO. 78 p.
- Tan, M., Preston, C. and Wang, G.** 2007. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-inhibiting and ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. *Weed Research* 47(6): 534-541.
- Tharayil-Santhakumar, N.** 2003. Mechanism of Herbicide Resistance in Weeds. On line book "Mechanism of Herbicides Resistance in Weeds". Weed Science Society of America. <http://www.weedscience.org/In.asp>.
- Tranel, P. and Wright, T.** 2002. Resistance of Weeds to ALS-Inhibiting Herbicides: What Have We Lerrned? *Weed Science* 50:700-712.
- Tranel, P., Wright, T. and Heap, I.** 2009. ALS mutation from herbicide-resistant weeds. Online. Disponible en: <http://www.weedscience.com>
- Uchino, A., Ogata, S., Kohara, H., Yoshida, S., Yoshiota, T. and Watanabe, H.** 2007. Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea-resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*. *Weed Biology and Management* 70:89-96.
- Uttley, N.** 2009. Agrochemical Proprietary Off-Patent Products – Whatt Are They? *Outlooks on Pest Management* 20:85-88.
- Valverde, B. y Heap, I.** 2009. El estado actual de la resistencia a herbicidas en el mundo. Seminario Internacional Diagnostico y Manejo de la Resistencia a Herbicidas. 3-4 noviembre, 2009. INIA Carillanca, Temuco, Chile.
- Valverde, B., Riches, Ch. and Caseley, J.** 2001. Prevention and Management of herbicide resistant weeds in rice: Experiences from Central America with *Echinochloa colona*. 135p.
- Venegas, R., Espinoza, N., Mera, M., Jobet, C. y Zapata, M.** 2001a. Resistencia a los herbicidas inhibidores de ACCasa de biotipos de *Avena fatua*. XV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas. X Jornadas Venezolanas Científico Técnicas en Biología y Combate de Malezas. Maracaibo, Venezuela.
- Venegas, R., Espinoza, N., Mera, M., Jobet, C. y Zapata, M.** 2001b. Resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS de un biotipo de *Avena fatua* con antecedentes de resistencia a los herbicidas inhibidores ACCasa. XV Congreso de la Asociación

Latinoamericana de Malezas. X Jornadas Venezolanas Científico Técnicas en Biología y Combate de Malezas. Maracaibo, Venezuela.

- Volenberg, D., and Stoltenberg D.** 2002. Altered acetyl-coenzyme A carboxylase confers resistance to clethodim, fluazifop and sethoxydim in *Setaria fatari* and *Digitaria sanguinalis*. Weed Research 42(5): 342-350
- Whaley, C., Wilson, H. and Westwood, J.** 2007. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. Weed Science, 55: 83-90.
- White, G., Moss, S. and Karp, A.** 2005. Differences in the molecular basis of resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim in *Lolium multiflorum*. Weed Research 45(6):440-448.
- Wrubel, R. and Gressel, J.** 1999. Are herbicide mixtures useful for delaying the rapid evolution of resistance? A case study. Weed Technology 8:635-648.
- WSSA.** 1998. "Herbicide Resistance" and "Herbicide Tolerance" Defined. Weed Technology 12-789.
- Yu, Q., Han, H. and Powles, S.** 2008. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. Pest Management Science 64(12):1229-1236.
- Yu, Q., Nelson, J., Zheng, M., Jackson, M. and Powles, S.** 2007. Molecular Characterization of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes. Pest Management Science 63:918-927.
- Zagnitko, O., Jelenska, J., Tevzadze, G., Haselkorn, R. and Gornicki, P.** 2001. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. Proc Natl. Acad Science. USA. 98: 6617-6622.
- Zhang, X. and Powles, S.** 2006. Six amino acid substitutions in the carboxyltransferase domain of the Plastidic acetyl-CoA carboxylase gene are linked with resistance to herbicides in *Lolium rigidum* population. New Phytologist 172(4): 636-645.

ANEXOS

ANEXO 1. Respuesta de *L. multiflorum* a los herbicidas ACCasa pinoxaden y tralkoxidim transcurridos 25 días desde la aplicación. Peso seco (g/planta).

Peso seco (g/planta)					
Biotipo	Testigo sin herbicida	Pinoxaden (75 g ha ⁻¹)	Reducción ¹ %	Tralkoxidim (563 g ha ⁻¹)	Reducción ¹ %
Tama	3,574a	0,12b	96,6 S	0,42b	98,2 S
LM-6	0,909a	0,022b	97,6 S	0,244b	73,2 RD
LM-7	0,986a	0,066c	93,3 S	0,634ab	35,7 R
LM-16	1,49a	0,196b	86,8 S	0,873ab	41,4 R
LM-19	1,859a	0,234c	87,4 S	1,498ab	19,4 R
LM-20	1,762a	0,269b	84,7 S	1,323a	24,9 R
LM-22	1,742a	1,717a	1,4 R	1,671a	4,1 R
LM-26	1,897a	0,745ab	60,7 RD	1,663ab	12,3 R
LM-27	2,186a	0,071c	96,8 S	1,753a	19,8 R
LM-28	1,312a	0,169c	87,1 S	1,153ab	12,1 R
LM-29	2,026a	0,06b	97 S	1,649a	18,6 R
LM-30	2,05a	0,111b	94,6 S	2,145a	+ 4,6 R
LM-31	2,185a	0,018b	99,2 S	0,855b	60,9 RD
LM-32	2,817a	0,065c	97,7 S	0,864b	69,3 RD
LM-33	2,51a	0,057c	97,7 S	1,515b	39,6 R
LM-34	2,668a	0,027c	99 S	1,614a	39,5 R

En cada fila, medias unidas con una misma letra indica que no difieren estadísticamente entre si (Tukey $P \geq 0,05$). S= sensible, RD= resistencia en desarrollo, R= resistente.

ANEXO 2. Respuesta de *L. multiflorum* a los herbicidas ALS iodosulfuron + mesosulfuron (6+30) y iodosulfuron + mesosulfuron (30+30) transcurridos 25 días desde la aplicación. Peso seco (g/planta).

Herbicidas ALS					
Biotipo	Testigo sin herbicida	Iod+meso 6 +30 (3,6+18 g ha ⁻¹)	Reducción ¹ %	Iod+meso 30+30 (18+18 g ha ⁻¹)	Reducción ¹ %
Tama	3,574a	0,193b	94,6 S	0,218b	93,9 S
LM-6	0,909a	0,052b	94,3 S	0,064b	93 S
LM-7	0,986a	0,204bc	79,3 S	0,051c	94,8 S
LM-16	1,49a	0,205b	90,2 S	0,12b	91,9 S
LM-19	1,859a	1,57ab	15,5 S	0,763bc	59 S
LM-20	1,762a	1,335a	24,2 R	0,488b	15,6 RD
LM-22	1,742a	1,286a	26,2 R	1,566a	10,1 R
LM-26	1,897a	0,586c	69,1 RD	0,228c	88 S
LM-27	2,186a	0,811b	62,9 RD	0,608b	72,2 S
LM-28	1,312a	0,528bc	59,8 RD	0,462c	64,8 S
LM-29	2,026a	0,628b	69 RD	0,158b	92,2 S
LM-30	2,05a	0,242b	88,2 S	0,104b	94,9 S
LM-31	2,185a	0,125b	94,3 S	0,042b	98,1 S

LM-32	2,817a	0,398bc	85,9 S	0,153c	94,6 S
LM-33	2,51a	0,818bc	67,4 RD	0,371c	85,2 S
LM-34	2,668a	0,315c	88,2 S	0,058b	97,8 S

En cada fila, medias unidas con una misma letra indica que no difieren estadísticamente entre si (Tukey $P \geq 0,05$).
S= sensible, RD= resistencia en desarrollo, R= resistente.

ANEXO 3. Respuesta de *L. rigidum* a los herbicidas ACCasa pinoxaden y tralkoxidim transcurridos 25 días desde la aplicación. Peso seco (g/planta).

Herbicidas ACCasa					
Biotipo	Testigo sin herbicida	Pinoxaden (75 g ha ⁻¹)	Reducción ¹ %	Tralkoxidim (562,5 g ha ⁻¹)	Reducción ¹ %
Wimmera	2,035a	0,02b	99	0,222b	99,1 S
LR-10	1,284a	0,131b	89,8 S	0,812ab	36,8 R
LR-23	1,538a	1,556a	+ 1,2 R	1,551a	+ 0,8 R
LR-24	1,717a	0,046d	97,3 S	1,241a	27,7 R
LR-25	1,523a	1,482a	2,7 R	1,56a	+ 2,4 R

En cada fila, medias unidas con una misma letra indica que no difieren estadísticamente entre si (Tukey $P \geq 0,05$).
S= sensible, RD= resistencia en desarrollo, R= resistente.

ANEXO 4. Respuesta de *L. rigidum* a los herbicidas ALS iodosulfuron + mesosulfuron (6+30) y iodosulfuron + mesosulfuron (30+30) transcurridos 25 días desde la aplicación. Peso seco (g/planta).

Herbicidas ALS					
Biotipo	Testigo sin herbicida	Iod+meso 6 +30 (3,6+18 g ha ⁻¹)	Reducción ¹ %	Iod+meso 30 +30 (18+18 g ha ⁻¹)	Reducción ¹ %
Wimmera	2,035a	0,025b	98,7 S	0,032b	98,4 S
LR-10	1,284a	0,375b	70,8 RD	0,32b	75,1 RD
LR-23	1,538a	1,23a	16,9R	1,08a	29,8 R
LR-24	1,717a	0,623bc	63,7 RD	0,237bc	90,2 S
LR-25	1,523a	1,066a	30 R	0,984a	35,4 R

En cada fila, medias unidas con una misma letra indica que no difieren estadísticamente entre si (Tukey $P \geq 0,05$).
S= sensible, RD= resistencia en desarrollo, R= resistente.