

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**RESISTENCIA DE CALABACILLO (*Silene gallica* L.) A HERBICIDAS INHIBIDORES
DE LA ENZIMA 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

MAGDIEL HERNALDO MORA CID

TEMUCO – CHILE

2014

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**RESISTENCIA DE CALABACILLO (*Silene gallica* L.) A HERBICIDAS INHIBIDORES
DE LA ENZIMA 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

MAGDIEL HERNALDO MORA CID
PROFESOR GUÍA: NELSON ESPINOZA NEIRA

TEMUCO – CHILE
2014

**RESISTENCIA DE CALABACILLO (*Silene gallica* L.) A HERBICIDAS INHIBIDORES
DE LA ENZIMA ALS EN EL SUR DE CHILE**

PROFESOR GUÍA:

NELSON ESPINOZA NEIRA

Ingeniero Agrónomo M.Sc.
INIA-Carillanca.

PROFESOR CONSEJERO:

CLAUDIO JOBET FORNAZZARI

Ingeniero Agrónomo Ph.D.
INIA-Carillanca.

CALIFICACIÓN PROMEDIO DE TESIS:

A la memoria de mi abuelita
María Elena Coronado Coronado
Q.E.P.D

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres por confiar en mí y darme la posibilidad de desarrollar una profesión y desenvolverme como persona de bien.

A mi profesor guía Ingeniero Agrónomo M.Sc. Sr. Nelson Espinoza Neira por plantearme el tema de investigación y por sus innumerables consejos para desarrollar de buena manera este trabajo.

A mi profesor consejero Ingeniero Agrónomo Ph.D. Sr. Claudio Jobet Fornazzari.

A las dependencias de INIA-Carillanca por darme la oportunidad de desarrollar esta investigación.

Al ingeniero Agrónomo Cristian Rodríguez Lara por su buena disposición y cooperación en el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio de Malherbología, en especial al Sr. Guillermo Contreras por su ayuda en la parte práctica de esta tesis.

De manera especial a Evelin por brindarme todo su cariño y apoyo de manera incondicional.

A mis amigos, por apoyarme y creer en mí.

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Calabacillo.....	3
2.1.1	Clasificación botánica.....	3
2.1.2	Descripción botánica.....	4
2.1.3	Ecología y ciclo de vida.....	4
2.1.4	Importancia y distribución en Chile y el mundo.....	5
2.2	Resistencia y tolerancia a herbicidas.....	5
2.2.1	Desarrollo de la resistencia a herbicidas en el campo.....	6
2.2.2	Tipos de resistencia.....	8
2.2.2.1	Resistencia cruzada	8
2.2.2.2	Resistencia múltiple.....	10
2.3	Mecanismos de resistencia a herbicidas.....	11
2.3.1	Alteración del punto de acción dentro de una planta.....	11
2.3.2	Metabolismo incrementado.....	11
2.3.3	Compartimentación o aislamiento.....	11
2.4	Evolución de las malezas resistentes.....	12
2.5	Estado actual de la resistencia a herbicidas en el mundo.....	13
2.6	Antecedentes de resistencia a herbicidas en el género <i>Silene</i>	14
2.7	Estado actual de la resistencia a herbicidas en Chile.....	15
2.8	Herbicidas inhibidores de ALS.....	17
2.8.1	Resistencia a herbicidas ALS en el mundo.....	19

2.8.2	Mecanismo de acción de los herbicidas ALS.....	20
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1	Ubicación y número de ensayos.....	22
3.2	Material vegetal.....	22
3.3	Sustrato.....	22
3.4	Herbicidas utilizados.....	23
3.5	Aspersor.....	25
3.6	Establecimiento de los ensayos.....	25
3.7	Riego.....	27
3.8	Cosecha.....	27
3.9	Diseño experimental.....	28
3.10	Análisis de resultados.....	28
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1	Confirmación de la resistencia a herbicidas inhibidores de ALS en el biotipo de calabacillo sospechoso SG-R.....	30
4.2	Indice de resistencia a los herbicidas ALS en el biotipo de calabacillo SG-R....	33
4.3	Respuesta del biotipo de calabacillo SG-R a herbicidas alternativos.....	36
5	CONCLUSIONES.....	39
6	RESUMEN.....	40
7	SUMARY.....	41
8	LITERATURA CITADA.....	42
9	ANEXOS.....	48

1. INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la agricultura, hace miles de años, el hombre tuvo que luchar con las malezas o plantas no deseadas que se desarrollaban en conjunto con los cultivos y que afectaban negativamente el rendimiento y la calidad de los productos cosechados. Actualmente las malezas constituyen unos de los principales factores que limitan la producción en cultivos anuales extensivos en el sur de Chile. Para controlarlas se emplean diversos métodos, incluyendo los herbicidas. Las razones que explican el amplio uso de los herbicidas en la agricultura son su alta eficacia, rapidez de control y costo relativamente bajo.

El calabacillo (*Silene gallica* L.) es una maleza de hoja ancha muy común en los cultivos anuales extensivos en el sur de Chile, tales como cereales, raps y lupino. Para su control después de la emergencia de los cultivos y malezas se utilizan ampliamente los herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS), principalmente en cereales como trigo, avena triticale y cebada. Lamentablemente el uso reiterado de estos herbicidas se está traduciendo cada vez con mayor frecuencia en la aparición o desarrollo de biotipos resistentes en diferentes especies de malezas, tales como manzanillón, rábano, ballica, avenilla y cola de zorro. La resistencia de las malezas pone en jaque la eficacia de los herbicidas y los que quedan disponibles para que los agricultores puedan controlar las malezas resistentes. Por lo anterior, la aparición de una nueva maleza resistente es siempre un tema de interés para poder investigarlo y dar soluciones para los agricultores.

Los Objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

- Confirmar la resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima ALS en un biotipo de calabacillo colectado en la Región de La Araucanía.

- Determinar el índice de resistencia del biotipo de calabacillo a herbicidas ALS.
- Evaluar la respuesta del biotipo de calabacillo a herbicidas alternativos o con otros mecanismos de acción.

Las hipótesis del trabajo para cumplir los objetivos fueron:

H1: “En Chile no existe resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima ALS en calabacillo”.

H2: “Herbicidas alternativos o con distinto mecanismo de acción controlan eficazmente biotipos de calabacillo resistentes a los ALS”.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Calabacillo (*Silene gallica* L.)

Small-flowered catchfly

SIN: *Silene ánglica* L., *Silene quinquevulnera* L.

2.1.1 Clasificación Botánica.

Silene es un género de plantas fanerógamas de la familia Caryophyllaceae. Es sinónimo con el género *Lychnis*. Contiene alrededor de 700 especies y es el género más grande de la familia. El género fue descrito por Carlos Linneo y publicado en Species Plantarum. Muchas especies de *Silene* están ampliamente distribuidas, sobre todo en el Hemisferio Norte (Talavera y Muñoz, 1989).

La especie tipo, representante de este género es *S. gallica*, originaria de Europa y considerada una maleza importante en cultivos anuales. (Figura 1) (Matthei, 1995).



Figura 1. Plántula (a) y planta adulta (b) de calabacillo.

2.1.2 Descripción botánica.

El calabacillo es una planta anual con tallos delgados de 15-45 cm de altura, erectos, simples o ramificados desde la base, pubescente en la parte basal, pero glandulosos en la mitad superior. Las hojas tienen 1-4 cm de largo, pubescentes, opuestas, las inferiores espatuliformes u obovadas, enangostándose hacia la base, las superiores sésiles. Las flores nacen simples con una bráctea basal y rodeada por un cáliz pegajoso y peludo en la parte superior de cada rama del tallo en racimos espiciformes; pedicelos de las flores inferiores más largo que el de las superiores. Cáliz 7-10 mm de largo, cilíndrico-ovoide, hispido, recorrido por 10 nervios oscuros, con dientes triangulares y agudos. Corola con 5 pétalos, blancos o rosados, con el limbo entero o emarginado. Cápsula 6-9 mm de largo, encerrada por el cáliz, con carpóforo pequeño. Semillas arriñonadas de 0,7-1,2 mm de largo, color marrón, estriadas y verrucosas (Matthei, 1995). Hay un promedio de 48 semillas en cada cápsula, cada una con un peso aproximado de 0,4 mg (Salisbury, 1961).

La especie *S. gallica* puede confundirse con ejemplares pequeños de *Silene noctiflora* L. o *Silene alba* L. *S. alba* no tiene un vástago glandular, mientras que las flores de *S. noctiflora* poseen pétalos profundamente dentados, de color rosa en la superficie superior y amarillo en la superficie inferior. De estas dos especies *S. alba* está presente en Chile y es considerada como maleza prohibida, mientras que *S. noctiflora* es considerada una maleza prohibida no existente en el país (SAG, 1991).

2.1.3 Ecología y ciclo de vida.

Las plántulas germinan tanto en primavera como en otoño, en situaciones de cultivo, las plantas tienden a encontrarse principalmente en los cultivos sembrados en primavera, probablemente debido a su incapacidad para competir con el denso follaje. La latencia de las semillas de *S. gallica* es desconocida, pero es probable que sea de larga duración debido principalmente a su pequeño tamaño de forma regular (Thompson *et al.*, 1997). Las semillas de *Silene* son pequeñas, y carecen de proyecciones que ayuden en la dispersión (Salisbury, 1961).

2.1.4 Importancia y distribución en Chile y el mundo.

S. gallica es catalogada como maleza importante en los principales cultivos anuales extensivos del Centro-Sur y Sur de Chile y se encuentra ampliamente distribuida en el país, desde la Región de Coquimbo hasta la Región de Los Lagos. Además está presente en las tres islas del Archipiélago de Juan Fernández. Es especialmente frecuente en cultivos de cereales, papas, arvejas, pero también en sitios eriazos, línea férrea y hortalizas (Matthei, 1995).

Es reportada como especie cosmopolita ya que está presente en casi todos los países del mundo, originaria del Centro Sur de Europa, encontrándose ampliamente distribuida en el continente Europeo, Asia occidental y África del Norte. Una vez distribuida por todo el Reino Unido, se ha reducido drásticamente en las últimas décadas y ahora sólo puede ser encontrada en Gales, Sur y Oeste de Inglaterra, principalmente en las zonas costeras (Preston *et al.*, 2002). En Canadá, *S. gallica* se estableció en la provincia marítima de Ontario y Columbia Británica, como una mala hierba de los cereales y pastos, dispersándose ampliamente a través del transporte de granos. Según Hegi (1979) y Thompson (1970), la mayoría de las especies del género *Silene*, incluyendo *S. gallica* se consideran malezas asociadas al clima templado, relativamente húmedo, y suelos fértiles, facilitando su germinación y amplia distribución en el continente Europeo y Americano.

2.2 Resistencia y tolerancia a herbicidas.

La resistencia a herbicidas se define como la habilidad hereditaria que poseen ciertos biotipos de determinadas poblaciones de malezas para sobrevivir y reproducirse normalmente tras la aplicación de un herbicida que en condiciones normales de empleo controla efectivamente a la mayoría de los individuos de esa especie o población (Powles *et al.*, 1997; De Prado *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2001; Pérez y Kogan, 2001; Gressel, 2002; Espinoza, 2002). Resistencia es una capacidad evolucionada de una maleza anteriormente susceptible a un herbicida para tolerarlo y completar su ciclo de vida cuando el herbicida se emplea en su dosis normal en una situación de

campo (Heap y Lebaron, 2001). Biotipo corresponde a la parte resistente de dicha población y son plantas que suelen presentar leves diferencias genéticas con otras de la misma especie y dentro de la misma población. Estos biotipo aparecen en especies de plantas susceptibles al herbicida y se caracterizan por no presentar características morfológicas que permitan diferenciarlo de las plantas susceptibles (Espinoza, 2002; Kogan y Pérez, 2003). La resistencia a uno o varios herbicidas corresponde a una característica hereditaria cuya transmisión a generaciones sucesivas de plantas depende de la naturaleza del gen o genes involucrados y su aparición está relacionada con la presión de selección impuesta por el uso de los mismos herbicidas (Valverde *et al.*, 2001; Gressel, 2002). La resistencia puede producirse en forma natural o ser inducida por mutagénesis, o por la selección de variedades por cultivo de tejidos, como es el caso de la resistencia a ciertos herbicidas en especies cultivadas (WSSA, 1998; Hatzios, 2001; Kogan y Pérez, 2003; Sabbatini *et al.*, 2004).

Con mucha frecuencia se emplean los términos resistencia y tolerancia indistintamente. Sin embargo, es pertinente hacer la distinción. Tolerancia es la capacidad natural y heredable que tienen todos los individuos de una especie de soportar la dosis de uso de un herbicida (Pérez y Kogan, 2001). Esto implica que no hubo selección o manipulación genética que hiciera a la planta tolerante. La tolerancia puede deberse a causas físicas o más frecuentemente, fisiológicas y/o bioquímicas que le son propias, por lo tanto las poblaciones tolerantes a un herbicida nunca antes fueron susceptibles (Jager, 1983). Así, cuando se utiliza un herbicida, normalmente se aprecia que algunas especies son bien controladas y otras no tanto o nada; estas últimas podrán prosperar con ventaja frente a especies más susceptibles y eventualmente, si se continúa empleando el mismo principio activo con elevada frecuencia y a esa dosis, podrían llegar a dominar dentro de la población.

2.2.1 Desarrollo de la resistencia a herbicidas en el campo.

La evolución de resistencia a herbicidas está asociada al uso frecuente de un mismo herbicida con el mismo mecanismo de acción o ruta de degradación metabólica. El desarrollo de

resistencia a los herbicidas es un proceso de selección. Se asume que cualquier población de maleza puede contener biotipos resistentes en cantidades muy pequeñas (Espinoza, 2002). En las poblaciones de malezas existe variación genética natural, esto es, individuos que portan variaciones genéticas originadas debido a mutaciones espontáneas que ocurren al azar (Espinoza *et al.*, 2012). Las plantas resistentes son evidentes sólo después de varios años de aplicación del mismo herbicida y, por lo general, se caracterizan por sobrevivir a dosis más altas (20 a 100 veces o más) que las normalmente necesitadas para un control de malezas comercialmente aceptable (Ross *et al.*, 1999). Por lo general, estas plantas no presentan características morfológicas que permitan distinguirlas en el campo respecto a las plantas susceptibles (Espinoza 2002; Kogan y Pérez, 2003). Así, el uso repetido del mismo herbicida o de herbicidas con el mismo modo de acción, expondrá a la población a una presión de selección que puede conducir a un aumento del número de individuos resistentes, debido a su capacidad de sobrevivir al herbicida y porque a partir de las semillas producidas se originan nuevos individuos resistentes.

La presión de selección es el efecto de la aplicación de un herbicida sobre el conjunto de malezas infestantes de un campo, por lo que es capaz de seleccionar biotipos resistentes (Taberner y Cirujeda, 2007), cuyo número se incrementa a través del tiempo (Figura 2). Según Reznick y Cameron (2001), la mayor presión de selección se impone cuando se usan altas dosis de herbicidas de compuestos altamente eficaces y/o persistentes y cuando su aplicación es frecuente. Muchos de los herbicidas más usados actualmente, como son los inhibidores de la ALS y ACCasa, se caracterizan porque rápidamente seleccionan plantas resistentes. Con los ACCasa, después de seis a diez años de presión de selección (Devine, 1997) y en ALS, después de un periodo de 3 a 5 años de uso continuado (Ross y Lembi, 1991).

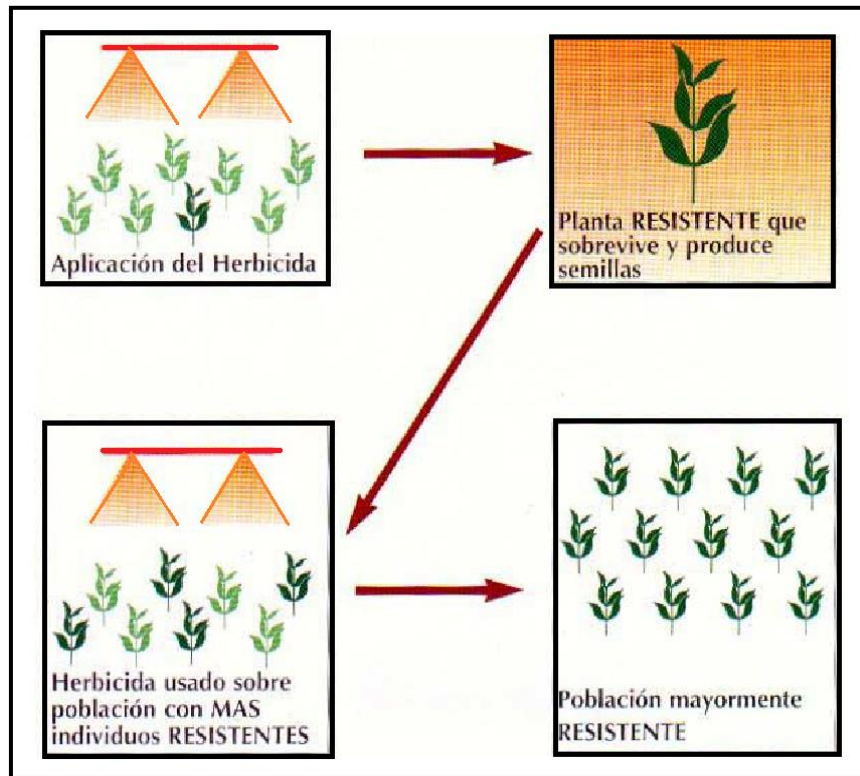


Figura 2. Presión de selección ejercida sobre una población de malezas debido a la aplicación repetida de un mismo herbicida (Adaptado de Gunsolus, 1998).

2.2.2 Tipos de resistencia.

El concepto de resistencia suele ir adjetivado con dos términos que hacen alusión a la posible pluralidad existente tanto en los mecanismos de resistencia que posee un individuo como en los herbicidas a los que éste es resistente. Surgen así los conceptos de resistencia cruzada y resistencia múltiple (De Prado *et al.*, 2001a).

2.2.2.1 Resistencia cruzada.

Resistencia cruzada es un término que hace referencia a la existencia de resistencia individual o poblaciones de malezas que presentan resistencia a dos o más herbicidas que actúan

sobre el mismo sitio de acción debido a un solo mecanismo de resistencia (Rubin, 1991, citado por De Prado *et al.*, 2001; Gressel, 2002). Así, se entiende por resistencia cruzada cuando el biotipo de planta que ha desarrollado un solo mecanismo de resistencia a un herbicida éste también le permite ser resistente a otros herbicidas con el mismo modo de acción (Chueca *et al.*, 2005). Entre las características que confieren a ciertas especies de malezas una capacidad especial para adquirir resistencia cruzada se encuentran:

- Estar presentes en altas densidades en zonas de cultivo.
- Presentar alta capacidad de reproducción.
- Poseer un persistente banco de semillas en el suelo.
- Tener fecundación cruzada, la cual genera mayor variabilidad.
- Presentar plasticidad genética y fenotípica (alta diversidad genética).

Este tipo de resistencia se clasifica en dos categorías: la resistencia cruzada sitio de acción y la resistencia cruzada no-sitio de acción.

- **Resistencia cruzada sitio de acción.** Se presenta cuando un cambio en el sitio de acción bioquímico del herbicida confiere resistencia a dicho herbicida y a otro, ya sea del mismo grupo o de diferentes grupos químicos, pero que inhiben el mismo sitio de acción en la planta (Powles y Preston, 1995). La resistencia cruzada sitio de acción o sitio activo está conferida por una modificación en el sitio de acople común (enzima o proteína específica) a varios herbicidas, como es el caso de los herbicidas pertenecientes a los grupos químicos de las sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas y piridinil benzoatos que inhiben la enzima acetolactato sintasa (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 químico (Laplante *et al.*, 2009).

- **Resistencia cruzada no-sitio de acción.** Ocurre cuando un único mecanismo confiere resistencia a diversos herbicidas con distinto modo de acción. El uso repetido de un herbicida genera resistencia a ese herbicida y a otros herbicidas pertenecientes a diferentes grupos químicos, sin que el mecanismo de resistencia involucre el sitio de acción de los herbicidas (Pérez y Kogan, 2003). Estos mecanismos de resistencia más bien dependen de la capacidad acrecentada de la maleza para metabolizar al herbicida, por ejemplo a través de citocromos P450 o mediante la participación de transferasas de la glutatona (Gray *et al.*, 1996; Siminszky, 2006). Una población de *Digitaria sanguinalis* proveniente de Australia seleccionada por su resistencia al herbicida ACCasa fluazifop-butil, mostró resistencia cruzada a imazethapyr un inhibidor de la acetolactato sintasa (ALS), a pesar de no haber sido nunca tratada con ningún herbicida ALS (Hidayat y Preston, 2001). Es probable que mecanismos que involucren transportadores tipo ABC (Buss y Callaghan, 2008; Cabrito *et al.*, 2009; Ito and Gray, 2006; Yazaki *et al.*, 2009) puedan conferir resistencia cruzada fuera del sitio de acción a diversos herbicidas sistémicos, tal como sucede con la resistencia múltiple a medicamentos (Linton, 2007; Porcelli *et al.*, 2009).

2.2.2.2 Resistencia múltiple.

La resistencia múltiple se presenta cuando una planta o población acumula dos o más mecanismos de resistencia. Corresponde a la resistencia de biotipos de malezas a dos o más herbicidas que actúan en distinto sitio de acción (Rubin, 1991, citado por De Prado *et al.*, 2001). De esta manera aquellos biotipos que presenten resistencia múltiple pueden poseer dos o más mecanismos de resistencia y ser resistentes a uno o varios herbicidas que presenten diferente mecanismo de acción. La resistencia múltiple se presenta cuando la población de malezas se expone reiteradamente a varios herbicidas selectivos aplicados en mezcla o alternadamente (Pérez y Kogan, 2001; Kogan y Pérez, 2003). Esta resistencia es atribuible a mecanismos no asociados con los sitios de acción que operan a nivel de absorción, retención, traslocación y metabolismo diferencial. Cuantos más mecanismos estén presentes, mayor diversidad de grupos

químicos y modos de acción resultarán ineficaces para controlar la maleza. Por ejemplo un biotipo de *Lolium rigidum* de Australia es resistente a glifosato debido al transporte limitado de este herbicida en la planta y resistente a inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa (ACCase) y ALS por metabolismo acelerado de los herbicidas que involucran distintas enzimas del grupo citocromos P450 (Yu *et al.*, 2009).

2.3 Mecanismos de resistencia a herbicidas.

Según lo indicado por el Comité de Prevención de Resistencia a Herbicidas (CPRH, 1998), el mecanismo por el cual una planta resistente supera el efecto de un herbicida determinará el tipo de resistencia, en particular el perfil de la resistencia cruzada y la respuesta a la dosis. A continuación se describen brevemente los mecanismos de resistencia más comunes.

2.3.1 Alteración del punto de acción dentro de una planta. Esto puede significar que un herbicida ya no se fija en el lugar normal de acción debido a un cambio en la estructura del objeto, permitiendo así a la planta sobrevivir al tratamiento herbicida que basa su actividad en este objeto.

2.3.2 Metabolismo incrementado: Significa que la planta resistente puede degradar un herbicida a sustancias no fitotóxicas más rápidamente que una planta sensible normal y, por lo tanto, sobrevivir al tratamiento herbicida de forma parecida a muchos cultivos.

2.3.3 Compartimentación o aislamiento: Significa que el herbicida es aislado de las partes sensibles de la célula vegetal y trasladado a un lugar tolerante, como una vacuola, donde es inocuo para el crecimiento vegetal.

Sherman *et al.*, (1996), señalan otro mecanismo de resistencia relacionado con la reducción de la concentración del herbicida en el sitio de acción, en dosis insuficiente para ser

letal. Estas bajas concentraciones del herbicida pueden deberse a una disminución en la penetración, absorción o traslocación.

2.4 Evolución de las malezas resistentes.

Producto de mutaciones genéticas poco comunes y que ocurren al azar, las poblaciones de malezas contienen individuos resistentes en frecuencias muy bajas. La frecuencia depende de la especie de maleza y del mecanismo de acción del herbicida. Para algunos herbicidas, como los inhibidores de ALS (acetolacatato sintasa) y ACCasa (acetil coenzima-A carboxilasa), la frecuencia de individuos resistentes antes de la utilización del herbicida puede ser tan alta como 1 en 10.000 y 1 en 100.000, respectivamente, por lo que las malezas evolucionan resistencia rápidamente, en un periodo de 2-4 años y 6-8 años, respectivamente (Espinoza *et al.*, 2012).

Las poblaciones de malezas adquieren resistencia por la interacción de algunos elementos clave. Las plantas en general y las malezas en particular, son variables. Los genes que confieren resistencia están presentes naturalmente en las poblaciones silvestres, pero se piensa, sin embargo, que las mutaciones para resistencia no son inducidas por los herbicidas (Jasienuk *et al.*, 1996). Esos genes ocurren en las poblaciones silvestres con una baja frecuencia ya que, en ausencia de los herbicidas, no confieren ninguna ventaja adaptativa a esas plantas (Devine y Preston, 2000). La frecuencia de los genes para resistencia es un elemento importante para determinar cuánto tiempo será necesario para advertir la resistencia una vez que se comienza a usar un determinado herbicida. Por ejemplo, el rápido incremento de la resistencia a los herbicidas ALS es atribuida en parte a la alta frecuencia de mutación sobre el centro de acción de la enzima y a la existencia de varias mutaciones que la confieren (Chaleff y Day, 1984; Devine y Preston, 2000).

2.5 Estado actual de la resistencia a herbicidas en el mundo.

La resistencia de las malezas a los herbicidas comenzó a ser reconocida solamente después que Ryan (1970) informó sobre el primer caso de resistencia a las triazinas en un biotipo de senecio o hierba cana (*Senecio vulgaris L.*) (Espinoza, 2002), una especie anual de la familia Asteraceae, que evolucionó en un vivero en donde atrazina y simazina se habían aplicado por más de diez años, como el único método de control de malezas.

Según Heap (2013), mediante la bases de datos weedscience.com actualmente hay 415 biotipos de malezas resistentes a herbicidas a nivel mundial, pertenecientes a 222 especies, de las cuales 129 son dicotiledóneas y 93 monocotiledóneas. Las malezas han desarrollado resistencia a 21 sitios de acción de los 25 sitios conocidos y a 150 herbicidas distintos. Las malezas resistentes a herbicidas se han reportado en 74 cultivos en 63 países. Del total de biotipos resistentes, un 33% presenta resistencia a inhibidores de la ALS, con un total de 137 casos, un 17% a inhibidores del fotosistema II, un 10% a inhibidores de ACCasa, un 7,4% al grupo de las auxinas sintéticas, un 7% a inhibidores del fotosistema I, un 6% al grupo de las glicinas, un 5,6% al grupo de las ureas y amidas, un 3% a los inhibidores de la unión de microtúbulos y el 10% restante a otros herbicidas (Heap, 2013).

En América Latina, 100 biotipos de malezas han desarrollado resistencia a herbicidas, de los cuales 29 son resistentes a inhibidores de ALS, donde se destaca como uno de los principales grupos a los que las malezas han evolucionado resistencia (Heap, 2013).

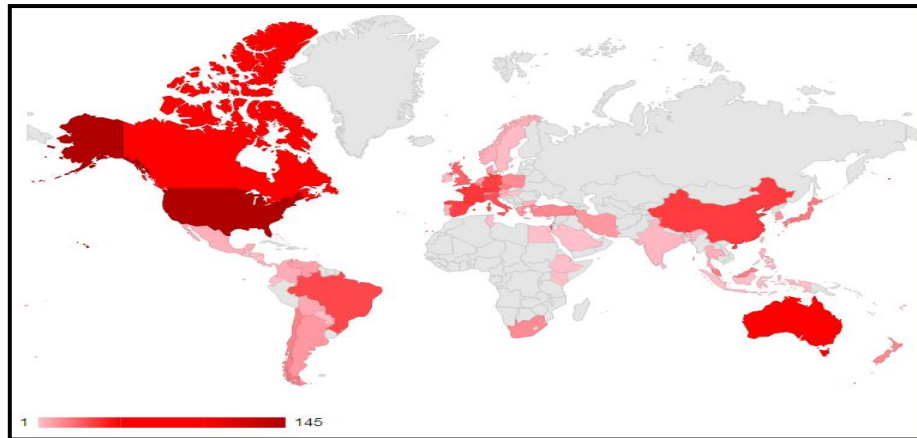


Figura 3. Distribución de las malezas resistentes a herbicidas en el mundo. (Adaptado de Heap, I. 2013)

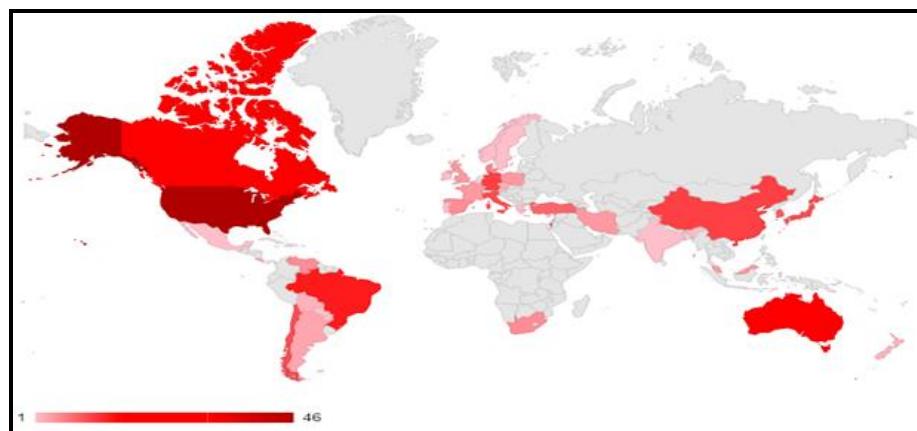


Figura 4. Distribución de las malezas resistentes a ALS en el mundo. (Adaptado de Heap, I. 2013).

2.6 Antecedentes de resistencia a herbicidas en el género *Silene*.

Actualmente no existen registros de resistencia a herbicidas en *S. gallica* ni en otras especies del género *Silene* en el mundo (Heap, 2012). Es importante señalar que con mucha frecuencia se emplean los términos resistencia y tolerancia indistintamente. Sin embargo, es pertinente hacer la distinción. McNeill, (1977, 1980), a través de una revisión completa de la biología de las malezas importantes presentes en Canadá, señala que *Silene alba* sería resistente

a los herbicidas 2,4-D y 2,4,5-T, y *Silene noctiflora*, resistente a 2,4-D, 2,4,5-T, MCPA y mecoprop, cuando en realidad debería emplearse el término tolerancia, ya que como fue señalado, a la fecha no se ha confirmado resistencia a herbicidas en ninguna de las especies del género *Silene* (Heap, 2013).

2.7 Estado actual de la resistencia a herbicidas en Chile.

La resistencia a herbicidas es un problema que abarca 63 países a nivel mundial, entre los cuales Chile se presenta como uno de los principales países con biotipos de malezas resistentes a nivel Latinoamericano (Heap, 2013). Kogan y Pérez, (2003) destacan que la resistencia se ha desarrollado en la zona sur debido al uso repetido de los herbicidas inhibidores de ACCasa y ALS, afectando a la principal zona productora de trigo, avena, cebada, lupino y raps del país.

Los primeros reportes de resistencia a herbicidas en Chile datan de hace más de una década. (Espinoza *et al.*, 2002). Estos autores señalan que a principios de los 90, en la localidad de Mulchén, Región del Bío-Bío, un agricultor informó el deficiente control de un biotipo de ballica (*Lolium rigidum*) en raps canola que había sido tratado con el ACCasa haloxifop metil. En los ensayos realizados con las semillas de este biotipo se pudo confirmar la resistencia no solo a haloxifop metil, sino también a otros ACCasa, es decir, resistencia cruzada a herbicidas con igual modo de acción (Espinoza *et al.*, 2002). Posteriormente en 1997, en las localidades de Quino y Lautaro, Región de La Araucanía, se informó el deficiente control de avenilla (*Avena fatua*) en trigo que había sido tratado con los ACCasa diclofop y clodinafop. En los ensayos para determinar la respuesta de este biotipo a distintos herbicidas ACCasa, se confirmó la resistencia no solo a diclofop y clodinafop, sino también a otros ACCasa, esto es, resistencia cruzada. Ese mismo año en la localidad de Cajón, Región de La Araucanía, se informó el deficiente control de una población de ballica (*Lolium multiflorum*) en trigo que había sido tratado con el ACCasa diclofop metil. En los ensayos para determinar la respuesta de este biotipo de ballica a diferentes

herbicidas, se confirmó la resistencia cruzada a varios ACCasa. No obstante, estos biotipos fueron sensible a los herbicidas ALS iodosulfuron y flucarbazone-Na (Espinoza *et al.*, 2002).

Fue inevitable que la resistencia de ballica (*L. multiflorum*) a glifosato también se originara en Chile, debido a la alta cantidad de semillas en los suelos y uso frecuente de este herbicida. A la fecha se han descrito siete biotipos de ballica resistente a glifosato, todos en *L. multiflorum* (Espinoza *et al.*, 2011). De estos los dos primeros biotipos se detectaron en el año 2001, en viñedos de la zona central (Kogan y Pérez, 2003), y los otros cinco principalmente en trigo en la zona sur. Todos estos biotipos tienen en común que se colectaron desde sitios con historial de aplicaciones reiteradas de glifosato (Espinoza *et al.*, 2011).

A la fecha se han reportado 19 biotipos de malezas resistentes a herbicidas en Chile, pertenecientes a 12 especies distintas, de las cuales 8 son monocotiledóneas y 4 son dicotiledóneas. De estas, 10 especies han adquirido resistencia a herbicidas inhibidores de ALS, entre las que destacan, ballica, cola de zorro, rábano, manzanillón y calabacillo (Cuadro 1) (Heap, 2013). El biotipo de calabacillo resistente a ALS incluido en esta información corresponde al mismo estudiado en este trabajo de tesis.

Cuadro 1. Evolución de la resistencia de las malezas a herbicidas en Chile.

N°	Nombre	Nombre común	Año	Sitio de acción
1	<i>Lolium rigidum</i>	Ballica	1997	Inhibidores de la ACCasa
2	<i>Avena fatua</i>	Avenilla	1998	Inhibidores de la ACCasa
3	<i>Lolium multiflorum</i>	Ballica	1998	Inhibidores de la ACCasa
4	<i>Cynosurus echinatus</i>	Cola de zorro	1999	Inhibidores de la ACCasa
5	<i>Lolium multiflorum</i>	Ballica	2001	Glicinas
6	<i>Lolium perenne</i>	Ballica perenne	2001	Inhibidores de la ACCasa
7	<i>Lolium multiflorum</i>	Ballica	2002	Inhibidores de ALS
				Glicinas
8	<i>Lolium rigidum</i>	Ballica	2003	Inhibidores de la ACCasa
				Inhibidores de ALS
9	<i>Cynosurus echinatus</i>	Cola de zorro	2004	Inhibidores de la ACCasa
				Inhibidores de ALS
10	<i>Alisma plantago-acuatica</i>	Hualtata	2005	Inhibidores de ALS
11	<i>Scirpus mucronatus</i>	Pasto cabezón	2005	Inhibidores de ALS
12	<i>Lolium multiflorum</i>	Ballica	2005	Inhibidores de la ACCasa
				Inhibidores de ALS
13	<i>Lolium multiflorum</i>	Ballica	2006	Inhibidores de la ACCasa
				Glicinas
14	<i>Lolium multiflorum</i>	Ballica	2007	Inhibidores de la ACCasa
				Inhibidores de ALS
				Glicinas
15	<i>Sorghum halepense</i>	Maicillo	2009	Inhibidores de ALS
16	<i>Raphanus sativus</i>	Rábano	2010	Inhibidores de ALS
17	<i>Anthemis cotula</i>	Manzanillón	2010	Inhibidores de ALS
18	<i>Anthemis arvensis</i>	Manzanillón	2010	Inhibidores de ALS
19	<i>Silene gallica</i>	Calabacillo	2012	Inhibidores de ALS

Fuente: Heap (2013).

2.8 Herbicidas inhibidores de ALS.

La acetolactato sintasa (ALS) es la primera enzima común en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina. (Saari y Maxwell, 1997; Saari *et al.*, 1994; Fenton y Jutsom, 1991;) y es el sitio de acción de cinco grupos: sulfonilurea, sulfonil carboniltriazolinona, triazolopirimidina, pirimidinil tiobenzoatos e imidazolinona (Powles y Yu,

2010; HRAC, 2005; Tranel y Wright, 2002; Saari y Maxwell, 1997). En conjunto, estos cinco grupos representan más de 50 ingredientes activos para su uso selectivo en diferentes cultivos. De acuerdo al comité de acción contra la resistencia a herbicidas (HRAC), todos son clasificados en el grupo B.

Desde su introducción en el mundo en 1982 los herbicidas ALS se han utilizado ampliamente para controlar malezas gramíneas y hoja ancha en diferentes cultivos, lo que se explica por su alta eficacia, baja toxicidad en mamíferos, amplio espectro de control y bajas dosis de uso (Park y Mallory-Smith, 2004). Lamentablemente, esto ha tenido como consecuencia la rápida evolución de malezas resistentes, principalmente hoja ancha (Tranel *et al.*, 2009).

Las sulfonilureas, primera familia de herbicidas inhibidores de la ALS, fueron descubiertas por DuPont en 1975 y empezaron a comercializarse en trigo y cebada en 1982, con el herbicida metsulfuron. 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 (Mazur y Falco, 1989; Saari *et al.*, 1994). Muchas compañías desarrollaron herbicidas pertenecientes a esta familia. Más de 20 de ellas lograron patentar herbicidas de este grupo químico. Desde 1995 se han comercializado más de una docena de sulfonilureas y otras están en proceso de desarrollo. En la misma década, American Cyanamid trabajaba en el desarrollo de las Imidazolinonas, un grupo de herbicidas también muy potentes y de amplio espectro, partiendo de una molécula sintetizada en los años 1950s por un químico de su División Médica que trabajaba en productos anticonvulsivos. A través de la exploración y optimización se desarrollaron estos herbicidas que, teniendo una estructura química diferente a las sulfonilureas, también inhiben la ALS (Shaner *et al.*, 2007). Ingresan en el mercado en 1986. Más recientemente (a mediados de los 1990s) se unen las Triazolopirimidinas y pirimidil (oxi/tio) benzoatos a los herbicidas que tienen este mecanismo de acción. El herbicida ALS mas reciente corresponde a pyroxulam, introducido en 2008.

Cuadro 2. Herbicidas ALS utilizados en cultivos anuales en las zonas centro sur y sur de Chile.

Modo de acción	Grupo químico	Herbicida (nombre comercial)	Dosis * (g/ha)
Inhibidor de ALS	Sulfonilurea (SU)	iodosulfuron (Hussar 20 WG, Ovassion 5.26 WP)	16
		iodosulfuron metil + mesosulfuron metil (Cossack 150 WG)	12 + 12
	Sulfonil-aminocarbonil-triazolinona (SCT)	flucarbazone (Vulcano 70 WG)	70 - 84
	Imidazolinona (IMI)	imazamox + imazapyr (Eurolightning)	40 + 18
			50 + 23
Triazolopirimidina (TP)	pyroxulam (Admitt)	24	

*Las dosis indicadas corresponden al ingrediente activo.

Fuente: Espinoza *et al.*, 2012.

2.8.1 Resistencia a herbicidas ALS en el mundo.

La resistencia de malezas a herbicidas inhibidores de ALS se informó por primera vez en lechuga espinosa (*Lactuca serriola* L.) en 1987, sólo 5 años después de la introducción de los herbicidas sulfonilureas (SU) (Mallory-Smith *et al.*, 1990). En los últimos años más malezas han sido identificadas con resistencia a inhibidores de ALS que con resistencia a cualquier otro modo de acción, correspondiendo mayoritariamente a malezas dicotiledóneas (Tranel *et al.*, 2009). Se ha encontrado que la resistencia a este tipo de herbicidas, es ocasionada por mutaciones en el gene nuclear ALS, que resultan de la sustitución de aminoácidos en las siguientes posiciones: alanina 122, prolina 197, alanina 205, triptofano 574, serina 653 y aspartato 376 (Tranel *et al.*, 2009). El nivel de resistencia puede aumentar de 60 a 3.200 veces, dependiendo de la posición del aminoácido afectado y la sustitución específica. En la mayoría de los casos la resistencia es el resultado de una enzima ALS alterada con sensibilidad reducida a los herbicidas (Saari *et al.*, 1994), aunque también puede deberse al aumento del metabolismo de los herbicidas (Christopher *et al.*, 1992; Tranel y Wright, 2002; Veldhuis *et al.*, 2000).

La alta presión impuesta por estos herbicidas tan eficaces y la propensión de su sitio de acción a mutar, hicieron que rápidamente aparecieran malezas resistentes. El crecimiento exponencial del número de casos de resistencia es muy notorio (Figura 5), superando el centenar y abarcando 38 países, entre los que destacan los EE.UU. con 46 casos, Canadá con 24 y Australia con 22 casos de resistencia a este grupo. Actualmente, la resistencia a herbicidas ALS ha sido reportada en 137 especies de malezas, de las cuales 83 corresponden a malezas dicotiledóneas y 54 son monocotiledóneas (Heap, 2013). La resistencia a inhibidores de ALS ha ocurrido en cereales, rotaciones de maíz/soya, arroz, bordes de carretera y plantaciones forestales.

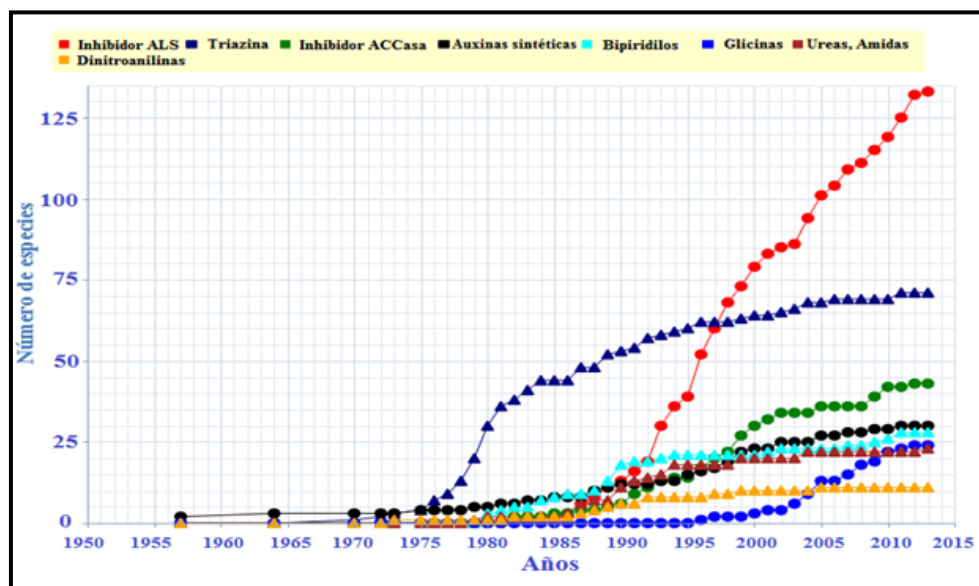


Figura 5. Aumento cronológico del número de especies resistentes a diversos grupos de herbicidas (Heap 2013).

2.8.2 Mecanismo de acción de los herbicidas ALS.

La enzima ALS se codifica en el núcleo y está localizada en el cloroplasto. Dicha enzima es responsable de la síntesis de los aminoácidos alifáticos o de cadena ramificada como valina, leucina e isoleucina, al catalizar dos reacciones en paralelo: a) la condensación de dos moléculas de piruvato para formar acetolactato (precursor de valina y leucina), y b) la

condensación de una molécula de piruvato con una de 2-cetubutirato para formar CO_2 y acetohidroxitirato (precursor de isoleucina). La enzima ALS cataliza la primera reacción en común de la síntesis de aminoácidos ramificados formando ácidos acetohidroxidos (acetohidroxitirato y acetolactato), los cuales experimentan reacciones de oxidación e isomerización, produciendo derivados de ácido valérico, que luego, y por reacciones de deshidratación y transaminación, producen isoleucina y valina. El α -ketoisovalerato reacciona con acetil CoA para formar 2-isopropilmalato, el cual experimenta reacciones de isomerización, reducción y transaminación para producir leucina (Kogan y Pérez, 2003).

Los herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácido alifáticos se unen al complejo enzima sustrato previniendo la adición de la segunda molécula de piruvato y no se produce acetolactato, ni acetohidroxitirato (Figura 6) (Stidham, 1991, citado por Kogan y Pérez, 2003). Esto lleva a una paralización de la síntesis de proteínas y, a pesar de que pequeñas cantidades de los herbicidas inhiben la enzima *in Vitro*, puede requerirse un largo periodo para que ocurra la muerte de las malezas sensibles, a pesar que se ha determinado que el efecto de los herbicidas inhibidores de la ALS se inicia luego de tres horas, por una rápida y potente inhibición en la elongación de raíces jóvenes y hojas. El efecto en las raíces en división ocurre dentro de las primeras 24 horas de la absorción de esos herbicidas (Kogan y Pérez, 2003).

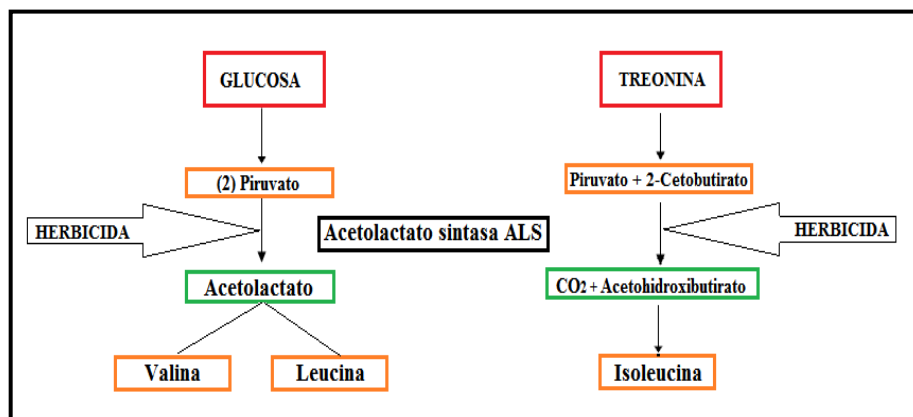


Figura 6. Mecanismo de acción de los herbicidas inhibidores de la enzima ALS (Christoffoleti *et al.*, 2004).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación y número de ensayos.

El trabajo de investigación incluyó tres ensayos (Ensayo 1, 2 y 3), realizados en maceteros y bajo condiciones de invernadero en las dependencias del Centro Regional de Investigación Carillanca, dependiente del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en la comuna de Vilcún, Región de La Araucanía, 38°41´ Lat. S y 72°25´ Long.W.

3.2 Material vegetal.

Se utilizaron dos biotipos de calabacillo, uno sospechoso de ser resistente a herbicidas ALS y otro sensible incluido como referencia, identificados como SG-R y SG-S, respectivamente. Las semillas del biotipo SG-R fueron colectadas en enero de 2012, en un cultivo comercial de trigo en la localidad de Traiguén, Región de La Araucanía, desde plantas que sobrevivieron al herbicida ALS metsulfuron aplicado en la dosis recomendada (4,8 g/ha) en primavera de 2011. Las semillas colectadas fueron depositadas en bolsas de papel y almacenadas en un lugar fresco y seco en el Laboratorio de Malherbología de Carillanca. Las semillas del biotipo SG-S sin antecedentes de resistencia a herbicidas ALS se colectaron en 2010, en un campo sin historial de uso de herbicidas ubicado en la comuna de Vilcún, Región de La Araucanía.

3.3 Sustrato.

Se empleó una mezcla de suelo andisol tipo trumao y arena en la relación 4:1. La fertilización de 1 kg de la mezcla de suelo fue: 595 mg P/kg (Super Fosfato Triple), 926 mg K/kg (Muriato de Potasio) y 1.000 mg N/kg (Can 27).

3.4 Herbicidas utilizados.

En el Ensayo 1, para confirmar la resistencia del biotipo SG-R a los herbicidas ALS, se utilizaron herbicidas de diferentes grupos químicos, específicamente metsulfuron y iodosulfuron (ambos sulfonilureas), flucarbazone (carboniltriazolinona), pyroxulam (triazolopirimidina) e imazamox+imazapir (imidazolinona) (Cuadro 3). Todos estos herbicidas son recomendados en trigo para controlar malezas de hoja ancha, como calabacillo. En ambos biotipos cada herbicida se aplicó en dos dosis, la técnica y otra equivalente al doble (Cuadro 3) el 25 de junio de 2012, cuando el desarrollo de las plantas fluctuaba entre 6 a 8 hojas.

En el Ensayo 2, para determinar el índice de resistencia del biotipo SG-R a los herbicidas ALS, éste y el sensible incluido como referencia, fueron tratados con metsulfuron, iodosulfuron, pyroxulam e imazamox+imazapyr, en dosis de 0-0,125X-0,25X-0,5X-X-2X-4X-8X y 16X (X= dosis técnica del producto) (Cuadro 3), cuando el desarrollo de las plantas fluctuaba entre 6 a 8 hojas.

En el Ensayo 3, para determinar la respuesta del biotipo SG-R a herbicidas alternativos, con distinto mecanismo de acción, fue tratado con bentazone, carfentrazone, pyraflufen, flufenacet+flurtamone+diflufenican, clomazone, flumioxazin y fluroxypir, sólo en la dosis técnica (Cuadro 4), cuando el desarrollo de las plantas fluctuaba entre 5 a 7 hojas.

Cuadro 3. Herbicidas ALS aplicados y dosis utilizadas en los ensayos para confirmar la resistencia del biotipo SG-R. INIA-Carillanca, 2012-2013.

Herbicida	Dosis (g/ha)	Grupo Químico
metsulfuron	4,8 ¹ y 9,6	Sulfonilureas
iodosulfuron	15,8 ¹ y 31,6	
flucarbazone	56,0 ¹ y 112,0	Sulfonil carboniltriazolinona
pyroxulam	22,5 ¹ y 45,0	Triazolopirimidinas
imazamox+imazapyr	49,5+22,5 ¹ y 99,0+45,0	Imidazolinonas

¹ Indica dosis técnica.

Cuadro 4. Herbicidas alternativos aplicados y dosis utilizadas en el ensayo para determinar la sensibilidad del biotipo SG-R. INIA-Carillanca, 2012-2013.

Herbicida (Nombre comercial)	Dosis (g ha)	Modo acción	Clasificación HRAC
bentazone (Basagran 480 SL, Bentax 48 SL)	960	Inhibidor de fotosíntesis en el fotosistema II	C ₃
carfentrazone (Affinity 400 EC)	40	Inhibidor de Protox	E
pyraflufen (Stagger 2,5 EC)	2,6		
flumioxazin (Valor 50 WP, Pledge 50 WP)	50		
flufenacet+flurtamone+diflufenican (Bacara Forte 360 SC)	120+ 120+ 120	Inhibidor división celular + Inhibidor carotenoides + Inhibidor carotenoides	K3 F1 F1
clomazone (Command 4 EC)	127	Inhibidor carotenoides	F4
fluroxypir (Starane Xtra)	348	Regulador del crecimiento	O

3.5 Aspersor.

En los tres ensayos, los herbicidas se aplicaron con un aspersor tipo bicicleta a base de aire comprimido MAT-OSU (figura 7), con barra de aplicación y boquillas de abanico plano Tee-Jeet 8002, en un volumen de agua de 200 l/ha^{-1} a presión constante de 200 kPa y velocidad de $3,2 \text{ km/hr}^{-1}$.



Figura 7. Aspersor utilizado en los ensayos.

3.6 Establecimiento de los ensayos.

Ensayo 1.

Las semillas del biotipo sospechoso SG-R y del biotipo sensible SG-S, fueron sometidas primeramente a una prueba de germinación el 3 de abril de 2012, para determinar su viabilidad bajo condiciones favorables de temperatura y humedad. Se depositaron 50 semillas de cada biotipo en bandejas de plástico, obteniéndose al cabo de 15 días un 100% de germinación. Posteriormente, el 19 de abril de 2012, las semillas de ambos biotipos fueron puestas a germinar en bandejas de metal y en condiciones de invernadero, obteniéndose un óptimo desarrollo al cabo de 36 días. Enseguida las plántulas se trasplantaron a maceteros de plástico de 500 cm^3 y 10 cm

de diámetro, el 25 de mayo de 2012, depositando 4 plántulas por macetero. Los herbicidas ALS fueron aplicados el 25 de junio de 2012, sobre cuando el desarrollo de los biotipos era el indicado en el cuadro 5. Para fines de comparación, se incluyó un tratamiento testigo sin aplicación de herbicida. Durante la aplicación, la temperatura del aire y la humedad relativa promedio fueron 11,4 °C y 47,9 % respectivamente.

Cuadro 5. Desarrollo de las plantas de los biotipos SG-S y SG-R en la fecha de aplicación de los herbicidas.

Biotipo	Desarrollo de las plantas (%) ¹				
	4 hojas	5 hojas	6 hojas	7 hojas	8 hojas
Calabacillo SG-S	20	40	40
Calabacillo SG-R	25	30	45

¹ Corresponde al porcentaje de la población con el desarrollo indicado.

Ensayo 2.

En el ensayo para determinar el índice de resistencia del biotipo SG-R a los herbicidas ALS, las semillas de ambos biotipos fueron puestas a germinar el 25 de mayo de 2012. El trasplante a maceteros se realizó el 28 de junio de 2012, cuando las plantas poseían 4 a 5 hojas. Los herbicidas ALS metsulfuron, iodosulfuron, pyroxsulam e imazamox+imazapyr fueron aplicados el 24 de agosto de 2012, cuando el desarrollo de las plantas era el indicado en el cuadro 6. Durante la aplicación la temperatura del aire y la humedad relativa promedio fueron 11,2 °C y 64,0 %, respectivamente.

Cuadro 6. Desarrollo de las plantas de los biotipos de calabacillo SG-R y SG-S al momento de la aplicación de los herbicidas.

Biotipo	Desarrollo de las plantas (%) ¹				
	4 hojas	5 hojas	6 hojas	7 hojas	8 hojas
Calabacillo SG-R	20	40	40
Calabacillo SG-S	10	50	40

¹ Corresponde al porcentaje de la población con el desarrollo indicado.

Ensayo 3.

En el ensayo para evaluar la respuesta a herbicidas alternativos las semillas del biotipo SG-R fueron puestas a germinar el 19 de abril de 2012 el trasplante a maceteros se llevó a cabo el 25 de mayo de 2012. Los herbicidas alternativos fueron aplicados el 29 de agosto de 2012, cuando el desarrollo de las plantas era el indicado en el cuadro 7. Para fines de comparación, se incluyó un tratamiento testigo sin aplicación de herbicida. Durante la aplicación, la temperatura del aire y la humedad relativa promedio fueron 11,4 °C y 41,0 % respectivamente.

Cuadro 7. Desarrollo de las plantas del biotipo de calabacillo SG-R en la fecha de aplicación de los herbicidas.

Biotipo	Desarrollo de las plantas (%) ¹				
	4 hojas	5 hojas	6 hojas	7 hojas	8 hojas
Calabacillo SG-R	10	50	40

¹ Corresponde al porcentaje de la población con el desarrollo indicado.

3.7 Riego.

Durante la realización de los ensayos se suministraron riegos periódicos según la necesidad de las plantas, basados en la observación visual de la humedad existente en el suelo para permitir el normal desarrollo de las plantas.

3.8 Cosecha.

En los tres ensayos, la cosecha se realizó transcurridos 25 días desde la aplicación de los herbicidas, cortando con tijera y a nivel del suelo el follaje de plantas. Enseguida este material fue pesado en una balanza de precisión electrónica.

3.9 Diseño experimental.

El diseño de experimento correspondió al completamente al azar. Cada biotipo representó un ensayo independiente y cada macetero representó una repetición. En el ensayo 1 el número de repeticiones por tratamiento fueron seis y siete para los biotipos SG-R y SG-S, respectivamente. En el ensayo 2 el número de repeticiones por tratamiento fueron seis para ambos biotipos. En el ensayo 3 el número de repeticiones por tratamiento fueron cinco para ambos biotipos.

3.10 Análisis de resultados.

Los datos de peso fresco 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.

En el ensayo 2, para determinar el índice de resistencia, la dosis de los herbicidas requerida para reducir un 50 % el peso fresco (GR_{50}) se obtuvo de la curva de respuesta, mediante el modelo de regresión log-logística (Seefeldt *et al.*, 1995).

La expresión matemática del modelo es la siguiente:

$$Y = C + \frac{D-C}{1+(X/GR_{50})^b}$$

Donde, Y representa el peso fresco del follaje (% respecto del control), C es el límite inferior (respuesta a dosis altas), D es el límite superior (respuesta promedio del control), b es la pendiente de la curva (próximo a GR_{50}), GR_{50} es la dosis con un 50% de respuesta, y x es la dosis del herbicida. Se utiliza en el eje Y el porcentaje de peso fresco respecto del control o testigo para disminuir la variabilidad del parámetro peso fresco que suele ocurrir entre las plantas de una

población heterogénea o silvestre. Para estimar los parámetros del modelo, los datos se sometieron a un análisis de regresión no lineal en un intervalo de confianza de 95% que incluía al cero y los coeficientes de determinación (R^2) de cada regresión, utilizando el programa estadístico SigmaPlot 10. El índice de resistencia corresponde al cociente de la dosis requerida para lograr una reducción del 50% (GR_{50}) del peso fresco del biotipo SG-R versus la requerida para lograr este mismo efecto en el biotipo sensible SG-S. El criterio para determinar la existencia de resistencia en los biotipos fue un valor igual o superior a 1,5.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Confirmación de la resistencia a herbicidas inhibidores de ALS en el biotipo de calabacillo sospechoso SG-R.

Transcurridos 25 días desde la aplicación de los herbicidas ALS metsulfuron, iodosulfuron, flucarbazone, pyroxulam e imazamox+imazapyr, el peso fresco de la parte aérea de las plantas del biotipo de calabacillo sensible SG-S fue reducido significativamente con todos los herbicidas en ambas dosis en relación al tratamiento testigo sin herbicida (Tukey, $P \leq 0,05$) (Cuadro 8 y Figura 8). Sin embargo, la respuesta de este biotipo era predecible, ya que fue incluido como referencia por no presentar resistencia a los herbicidas ALS. Por el contrario, esto mismo no ocurrió en el biotipo de calabacillo sospechoso SG-R, ya que hubo escasa a nula disminución del peso fresco con todos los herbicidas en ambas dosis (Cuadro 8 y Figura 8), confirmándose de este modo la resistencia a los herbicidas ALS. De estos resultados se infiere que la resistencia a los ALS se caracterizó por estar ampliamente extendida, debido a que se confirmó a todos los herbicidas de los cuatro grupos químicos (sulfonilureas, sulfonil carboniltriazolinonas, triazolopirimidinas e imidazolinonas). Además, se encontró que el nivel de resistencia fue alto, debido a que en el doble de la dosis técnica no hubo disminución del peso verde con flucarbazone, sólo alcanzó a un 18% con metsulfuron, un 33% con iodosulfuron y un 53% con imazamox+imazapyr (Cuadro 8).

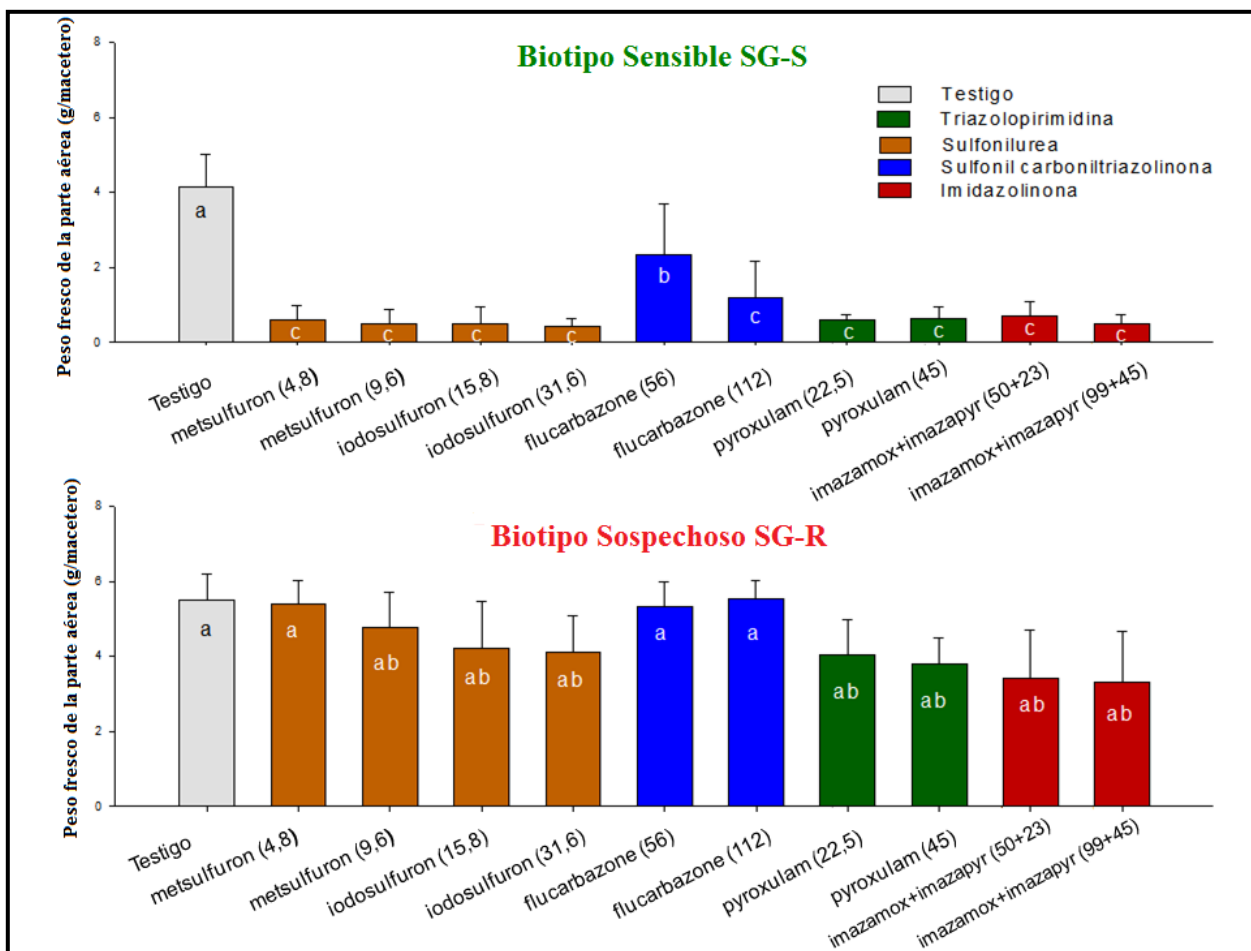
La resistencia a los herbicidas ALS del biotipo de calabacillo SG-R no debería sorprender, ya que en el mundo se ha reportado en 137 especies, la mayoría hoja ancha (Heap, 2013). Sin embargo, específicamente en *S. gallica* no se había reportado (Heap, 2012). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el biotipo SG-R son muy importantes desde el punto de vista científico, por ser el primero en el mundo. Desde un punto de vista práctico, su importancia radica en que se continúa expandiéndose y se reducen significativamente las opciones de control disponibles para ser utilizadas por los agricultores en algunos cultivos, incluido trigo.

Cuadro 8. Reducción porcentual del peso fresco de los biotipos de calabacillo sensible SG-S y sospechoso SG-R transcurridos 25 días desde la aplicación de diversos herbicidas ALS. INIA-Carillanca, 2012-2013.

Herbicida	Dosis (g/ha)	Biotipo SG-S		Biotipo SG-R	
		Peso fresco (g/mac)	Reducción ¹ (%)	Peso fresco (g/mac)	Reducción ¹ (%)
Testigo sin herbicida	---	4,2 a	---	5,5 a	---
metsulfuron	4,8	0,6 c	85	5,4 a	3
metsulfuron	9,6	0,5 c	88	4,8 ab	18
iodosulfuron	15,8	0,5 c	88	4,2 ab	31
iodosulfuron	31,6	0,4 c	89	4,1 ab	33
flucarbazone	56,0	2,3 b	44	5,3 a	5
flucarbazone	112,0	1,2 c	71	5,5 a	0
pyroxsulam	22,5	0,6 c	86	4,0 ab	36
pyroxsulam	45,0	0,7 c	84	3,8 ab	42
imazamox+imazapir	49,5+22,5	0,7 c	83	3,4 ab	51
imazamox+imazapir	99,0+45,0	0,5 c	88	3,3 ab	53

En cada columna de peso fresco, medias unidas con las mismas letras indica que no difieren estadísticamente entre sí (Tukey, $P \leq 0,05$).

¹Indica reducción porcentual del peso fresco respecto al tratamiento testigo sin herbicida; mac: indica macetero.



En cada biotipo, medias unidas con una misma letra indica que no difieren estadísticamente entre sí (Tukey, $P \leq 0,05$).

Figura 8. Peso fresco de la parte aérea del biotipo de calabacillo SG-S y SG-R en respuesta a diversos herbicidas ALS. INIA-Carillanca, 2012-2013.

4.2 Índice de resistencia a los herbicidas ALS en el biotipo de calabacillo SG-R.

Los valores de R^2 (coeficiente de determinación), obtenidos a través del modelo logístico indicaron un buen ajuste del peso fresco en respuesta a las dosis de los herbicidas ALS. Con metsulfuron los valores de R^2 para los biotipos SG-R y SG-S fueron 0,84 y 0,98, respectivamente; con iodosulfuron fueron 0,81 y 0,99, respectivamente; con pyroxulam fueron 0,84 y 0,95, respectivamente; y con imazamox+imazapyr fueron 0,79 y 0,99, respectivamente (Cuadro 9).

Los índices de resistencia (IR) del biotipo de calabacillo SG-R a los diversos herbicidas ALS se presentan en el cuadro 9 y figura 9. Se observa que el índice de resistencia a todos los herbicidas fue alto, aunque variable, dependiendo del producto. El mayor índice de resistencia fue a metsulfuron (IR > 128), enseguida a iodosulfuron (IR 98), imazamox+imazapyr (IR 41) y pyroxulam (IR 30). El índice de resistencia obtenido con metsulfuron indica que en el rango de dosis aplicado no fue posible alcanzar una disminución del 50% del peso fresco en el biotipo SG-R. Respecto al biotipo sensible SG-S, se observa que fue extremadamente sensible a todos los herbicidas, ya que el peso fresco fue disminuido un 50% en dosis muy pequeñas (Cuadro 9 y Figura 9), lo que confirma que estos herbicidas sean recomendados para controlar calabacillo en trigo y otros cultivos.

Dado la naturaleza de este trabajo y porque a la fecha no existen registros de resistencia a herbicidas en calabacillo (*S. gallica*) ni en otras especies del género *Silene* en el mundo (Heap, 2012), resulta difícil determinar con precisión el o los probables mecanismos de resistencia del biotipo SG-R. Sin embargo, se sabe que en la mayoría de los casos de resistencia a ALS, ésta es ocasionada por mutaciones en el gene nuclear ALS, que resultan de la sustitución de aminoácidos en las siguientes posiciones: alanina 122, prolina 197, alanina 205, triptofano 574, serina 653 y aspartato 376 (Tranel *et al.*, 2009). El nivel de resistencia puede aumentar de 60 a 3.200 veces dependiendo de la posición del aminoácido afectado y la sustitución específica. Según Whaley.,

et al (2007) y Saari *et al.*, (1994), los altos índices de resistencia, como los obtenidos en el biotipo SG-R, sugieren que estaría asociada al sitio de acción, como resultado de una enzima ALS alterada con sensibilidad reducida a estos herbicidas, aunque también podría deberse al aumento del metabolismo de los herbicidas (Christopher *et al.*, 1992; Tranel y Wright, 2002; Veldhuis *et al.*, 2000).

El conocimiento del mecanismo de resistencia en una maleza es muy importante por su relación con el desarrollo de las estrategias de manejo de la resistencia en el campo. Al respecto, muchas técnicas de diagnóstico han sido desarrolladas con la finalidad de confirmar la resistencia a herbicidas y ayudar a los productores a adoptar las mejores estrategias de manejo (Corbett y Tardif 2006).

Cuadro 9. Parámetros estimados del modelo no lineal que describen la respuesta de los biotipos de calabacillo SG-S y SG-R a los diversos herbicidas ALS.

Biotipo	Herbicida	D	C	b	GR₅₀	R²
SG-S	metsulfuron	100,0	9,78	2,9	0,6	0,98
	iodosufuron	100,0	1,3	1,4	1,3	0,99
	pyroxulam	100,0	9,7	2,4	3,8	0,95
	imazamox+imazapyr	100,0	1,3	1,5	6,3	0,99
SG-R	metsulfuron	100,4	49,9	2,0	>76,8	0,84
	iodosufuron	100,8	44,7	1,5	127	0,81
	pyroxulam	100,1	-15,1	0,52	114	0,84
	imazamox+imazapyr	100,0	-11	0,64	254	0,79

D es el límite superior (respuesta promedio del control); **C** es el límite inferior (respuesta a dosis altas); **b** es la pendiente de la curva (próximo a GR₅₀); **GR₅₀** es la dosis con un 50% de respuesta, **R²** es el coeficiente de determinación.

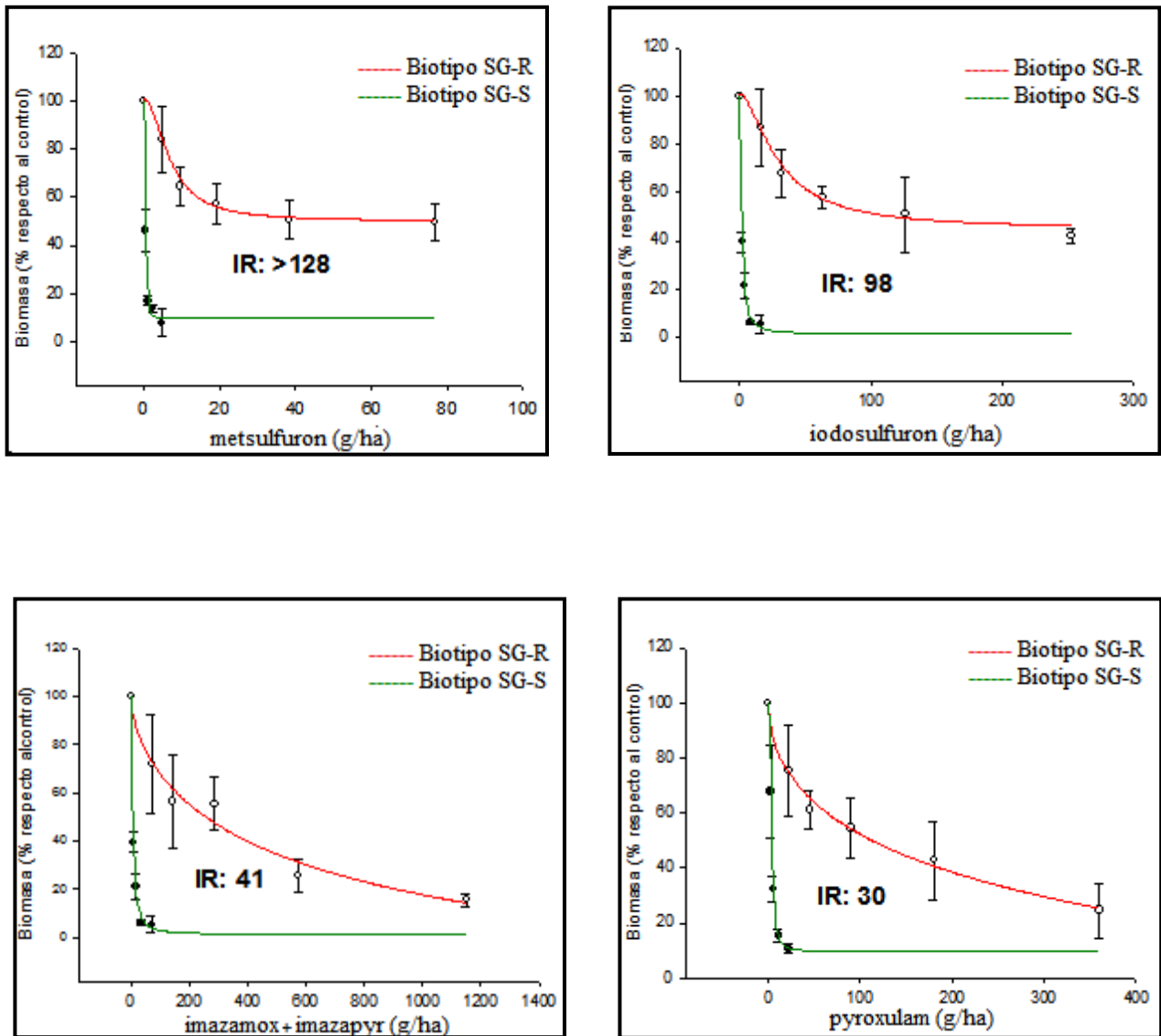


Figura 9. Disminución (%) del peso fresco de los biotipos de calabacillo sensible SG-S (-●-) y sospechoso SG-R (-○-) con los herbicidas ALS metsulfuron, iodosulfuron, pyroxulam e imazamox+imazapyr. Barras verticales representan el error estándar de los valores promedio.

4.3 Respuesta del biotipo de calabacillo SG-R a herbicidas alternativos

Transcurridos 25 días desde la aplicación de los herbicidas alternativos o con diferente mecanismo de acción que los ALS, el peso fresco del biotipo SG-R fue reducido significativamente con bentazone (960 g/ha), carfentrazone (40 g/ha), pyraflufen (2,6 g/ha), flumioxazin (50 g/ha), flufenacet+flurtamone+diflufenican (120+120+120 g/ha) y clomazone (127 g/ha), no así con fluroxipir (348 g/ha) (Cuadro 10 y Figura 10). Los datos de disminución porcentual del peso fresco respecto al testigo sin herbicida indican que los herbicidas más eficaces fueron bentazone, carfentrazone, pyraflufen y flumioxazin, ya que con todos la disminución del peso fresco fue superior a un 80% (Cuadro 10). Un análisis más detallado de los resultados permiten señalar que la menor disminución del peso alcanzada con flufenacet+flurtamone+diflufenican se explica porque se sabe que es más eficaz sobre las malezas cuando se aplica en pre-emergencia que en pos-emergencia como ocurrió en el ensayo; los obtenidos con clomazone porque es más eficaz cuando se aplica con malezas menos desarrolladas que el que tenían en el presente estudio; y los resultados con fluroxipir porque presenta sólo una débil acción en especies de la familia Cariofiláceae como calabacillo, por ser naturalmente una especie tolerante.

Todos estos herbicidas alternativos son ampliamente comercializados y recomendados en diversos cultivos en el mundo, pero no todos son comercializados en Chile, como es el caso del herbicida pyraflufen-ethyl, cuyo uso está prohibido por normas de residualidad en productos cárnicos (Ministerio de Agricultura, 2012). Todos estos herbicidas son recomendados para controlar malezas de hoja ancha, y la mayoría se recomienda en cultivos de trigo, excepto carfentrazone que sólo se recomienda en barbecho químico y frutales debido a su amplio espectro de control y clomazone que sólo es recomendado en cultivos de papa y hortalizas debido a que controla malezas de hoja ancha y gramíneas. Por otra parte, todos estos herbicidas se recomiendan para ser utilizados en otros cultivos (SAG, 2013).

A pesar de la alta eficacia para controlar calabacillo exhibida por la mayoría de los herbicidas alternativos evaluados en este trabajo, algunas especies de malezas ya han evolucionado resistencia a ellos en algún país del mundo, excepto a flufenacet+flurtamone+diflufenican (Cuadro 11) (Heap, 2013). Por lo tanto, en el país su uso en los cultivos para controlar biotipos de calabacillo resistentes a los herbicidas ALS, debería ser con precaución y siempre formando parte de una estrategia de control integrado.

Cuadro 10. Reducción porcentual del peso fresco del biotipo de calabacillo SG-R transcurridos 25 días desde la aplicación de diferentes herbicidas alternativos. INIA-Carillanca, 2012-2013.

Herbicida	Dosis (g/ha)	Biotipo SG-R	
		Peso fresco (g/mac)	Reducción ¹ (%)
Testigo sin herbicida	---	4,5 a	---
bentazone	960	0,6 c	87
carfentrazone	40	0,7 c	84
pyraflufen	2,6	0,5 c	88
flufenacet+flurtamone+diflufenican	120+120+120	2,4 bc	48
clomazone	127	2,3 bc	49
flumioxazin	50	0,6 c	85
fluroxypir	348	3,0 ab	32

En la columna de peso fresco, medias unidas con las mismas letras indica que no difieren estadísticamente entre sí (Tukey, $P \leq 0,05$).

¹Indica reducción porcentual del peso fresco respecto al tratamiento testigo sin herbicida; mac indica macetero.

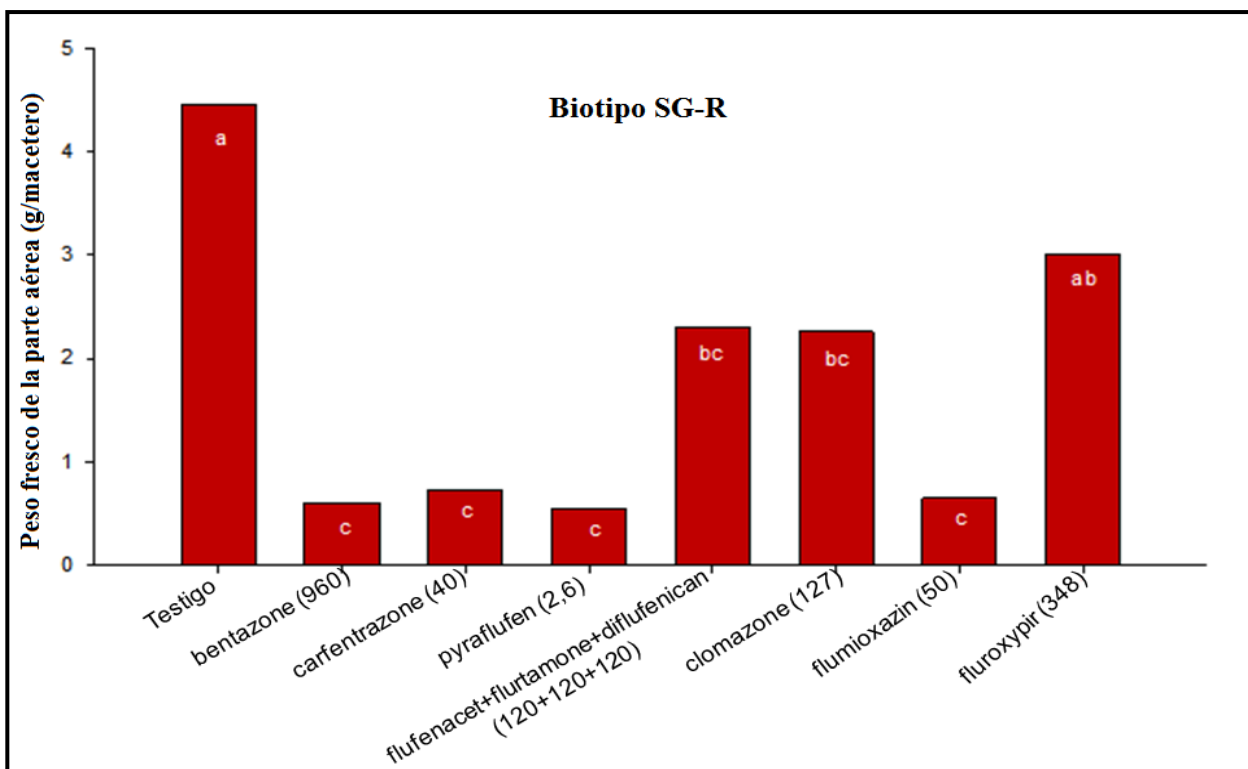


Figura 10. Peso fresco de la parte aérea del biotipo de calabacillo SG-R en respuesta a herbicidas alternativos. INIA-Carillanca, 2012-2013.

Cuadro 11. Resistencia en el mundo a los herbicidas alternativos utilizados en el estudio.

Grupo químico	Herbicida	Año	País	Maleza resistente
Triazoles, ureas, isoxazolidiones (F3/11)	bentazone	2004	Canadá	<i>Amaranthus hybridus</i>
		2005	Canadá	<i>Amaranthus retroflexus</i>
		2009	Brasil	<i>Sagitaria montevidensis</i>
Auxinas sintéticas (O/4)	fluroxypir	1995	EE.UU	<i>Kochia scoparia</i>
		1998	Canadá	<i>Galeopsis tetrahit</i>
		2010	China	<i>Stellaria media</i>
Inhibidor PPO (E/4)	carfentrazone	2005	EE.UU	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>
		2011	China	<i>Descurainia sophia</i>
Triazoles, ureas, isoxazolidiones (F3/11)	clomazone	1982	Australia	<i>Lolium rigidum</i>
		2008	EE.UU	<i>Echinochloa crus-galli</i>
Inhibidor PPO (E/4)	pyraflufen	2005	EE.UU	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>
Inhibidor PPO (E/4)	flumioxazin	2005	EE.UU	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>

Fuente: Heap (2013).

5. CONCLUSIONES

Se confirma por primera vez en Chile y el mundo la resistencia de calabacillo (*Silene gallica*), a los herbicidas ALS.

La resistencia del biotipo de calabacillo SG-R a los herbicidas ALS se caracterizó por estar ampliamente extendida, ya que se confirmó a todos los herbicidas y grupos químicos evaluados.

Los índices de resistencia a los herbicidas ALS fueron altos ya que fue > 128 para metsulfuron, 98 para iodosulfuron, 41 para imazamox+imazapyr, 30 para pyroxulam.

El biotipo de calabacillo SG-R resistente a ALS presentó una alta susceptibilidad a todos los herbicidas alternativos o con distintos mecanismo de acción que se evaluaron.

6. RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron confirmar la resistencia a herbicidas ALS en un biotipo de calabacillo sospechoso identificado como SG-R, determinar eventualmente el índice de resistencia y la susceptibilidad a herbicidas alternativos. El estudio se realizó en el Centro Regional de Investigación INIA Carillanca, Vilcún, Región de La Araucanía.

El biotipo de calabacillo sospechoso SG-R y otro sensible SG-S incluido como referencia, crecieron en maceteros y en condiciones de invernadero. El diseño de experimento correspondió al completamente al azar. En el ensayo para confirmar la resistencia, ambos biotipos se asperjaron con los herbicidas ALS metsulfuron (4,8 y 9,6 g/ha), iodosulfuron (15,8 y 31,6 g/ha), flucarbazone (56 y 112 g/ha), pyroxulam (22,5 y 45 g/ha) e imazamox+imazapyr (49,5+22,5 y 99+45 g/ha) en dos dosis, la técnica y otra equivalente al doble, cuando el desarrollo de las plantas fluctuaba entre 6 a 8 hojas. En el ensayo para determinar el índice de resistencia, ambos biotipos se asperjaron con metsulfuron, iodosulfuron, pyroxulam e imazamox+imazapyr, en dosis de 0-0,125X-0,25X-0,5X-X-2X-4X-8X y 16X (X= dosis técnica del producto), cuando el desarrollo de las plantas fluctuaba entre 6 a 8 hojas. En el ensayo para determinar la respuesta del biotipo SG-R a herbicidas alternativos, éste fue tratado con bentazone (960 g/ha), carfentrazone (40 g/ha), pyraflufen (2,6 g/ha), flumioxazin (50 g/ha), flufenacet+flurtamone+diflufenican (120+120+120 g/ha), clomazone (127 g/ha) y fluroxypir (348 g/ha), sólo en la dosis técnica, cuando el desarrollo de las plantas fluctuaba entre 5 a 7 hojas. Transcurridos 25 días desde la aplicación de los herbicidas se cosechó la biomasa aérea y se determinó el peso fresco.

Se concluye que se confirma por primera vez en Chile y el mundo la resistencia de calabacillo a los herbicidas ALS, los índices de resistencia a los herbicidas ALS fueron altos ya que fue > 128 para metsulfuron, 98 para iodosulfuron, 41 para imazamox+imazapyr, 30 para pyroxulam, el biotipo de calabacillo SG-R resistente a ALS presentó una alta susceptibilidad a todos los herbicidas alternativos o con distintos mecanismo de acción que se evaluaron.

7. SUMMARY

The objectives of this study were to confirm the resistance to ALS herbicides in a biotype of small-flowered catchfly suspect identified as SG-R, eventually determine the rate of resistance and susceptibility to alternative herbicides. The study was conducted at the Regional Research Center INIA Carillanca Vilcún, Araucanía Region.

The suspect biotype of small-flowered catchfly SG-R and other sensitive SG-S incorporated by reference, grown in pots and under greenhouse conditions. The experimental design corresponded to completely random. In the trial to confirm the resistance, both biotypes were sprayed with ALS herbicides metsulfuron (4,8 and 9,6 g/ha), iodosulfuron (15,8 and 31,6 g/ha), flucarbazone (56 and 112 g / ha), pyroxulam (22,5 and 45 g / ha) and imazamox+imazapyr (49,5 +22,5 and 99 +45 g / ha) in two doses, technique and another equivalent to double, when development of the plants fluctuated between 6 to 8 leaves. In the trial for determining the resistance index, both biotypes were sprayed with metsulfuron , iodosulfuron , pyroxulam and imazamox+imazapyr at doses of -0,125X-0,25X-0,5X-X-2X-4X-8X y 16X (X = technique dose product) when the development of the plants ranged from 6 to 8 leaves. In the trial for determining the response of biotype SG- R to alternative herbicides, it was treated with bentazone (960 g/ha), carfentrazone (40 g/ha), pyraflufen (2.6 g/ha), flumioxazin (50 g/ha), flufenacet+flurtamone+diflufenican (120 +120 +120 g/ha) , clomazone (127 g/ha) and fluroxypir (348 g/ha), only technique dose when the development of the plants ranged from 5 to 7 leaves.

According to the results it is concluded that the biotype of small-flowered catchfly SG-R was resistant to all ALS herbicides evaluated, provided a high level of resistance to all herbicides, reaching a (IR)> 128 for metsulfuron, (IR 98) for iodosulfuron, (IR 41) for imazamox+ imazapyr and (IR 30) for pyroxulam, and it was very susceptible to herbicides with different mechanisms of action.

8. LITERATURA CITADA

- Buss, D.S., Callaghan, A.** 2008. Interaction of Pesticides With P-Glycoprotein and Other ABC Proteins: A Survey of the Possible Importance to Insecticide, Herbicide and Fungicide Resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90, 141-153.
- Cabrito, TR., Teixeira, MC., Duarte, A.A., Duque, P. and SA-Correia, I.** 2009. Heterologous Expression of a T po 1 Homolog From *Arabidopsis thaliana* Confers Resistance to the Herbicide 2,4-D and Other Chemical Stresses in Yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 927-936.
- Chaleff, R. S. and E. B. Day.** 1984. Herbicide resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science* 223:1148-1151.
- Christoffoleti, P., López, R. y Carvalho, J.** 2004. Aspectos de resistência de plantas daninhas a Herbicidas. 2ª ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR). Brazil, 100p.
- Christopher, J.T., S.B. Powles, D.R. Liljegren. and J.A. Holtum.** 1992. Resistance to acetolactate synthase inhibitors in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) involves at least two mechanisms. *Plant Physiology*. 100:1909–1913.
- Chueca C., Cirujeda A., De Prado R., Diaz 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.
- Corbett, C. y F. Tardif.** 2006. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. *Pest Management Science* 62: 584-597.
- CPRH,** 1998. Guía para el manejo de la resistencia a herbicidas. Disponible en www.plantprotection.com
- De Prado, R., Cubero, M. y Osuna, M.** 2001a. Resistencia a herbicidas. Detección en campo y laboratorio. *Uso de herbicidas en la Agricultura del siglo XXI*. Córdoba, España: 251-259.
- De Prado, R., Cubero, S y Osuna, M.** 2001. Biotipos resistentes a herbicidas. Distribución mundial. En: De Prado, R. Jorin, J. (ed.) *Uso de herbicidas en la Agricultura del siglo XXI*. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. Pp. 261-273.
- Devine, M.** 1997. Mechanism of resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitor: a review. *Pestic. Sci* 51: 259-264.

- Devine, M. and Preston, C.** 2000. The molecular basis of herbicide resistance. Cobb, A.H. & Kirkwood, R.C., eds. *Herbicides and their mechanism of action*. Sheffield Academic Press Ltd, Inglaterra: 72-104.
- Espinoza, N.** 2002. Avances en control de malezas en trigo. Centro Regional de Investigación Carillanca. Boletín INIA N° 83. Temuco, Chile. 49p.
- Espinoza, N. y Rodríguez, C.** 2011. La resistencia menos pensada. *Mundo Agro*. N° 20 Julio 2011. Pág.82-85.
- Espinoza, N., Rodríguez, C. y Contreras, G.** 2012. Selección y uso adecuado de herbicidas pos emergentes en cultivos de las zonas centro sur y sur de Chile. Informativo INIA N° 51, abril 2012 Temuco.
- Espinoza, N., Rodríguez, C y Mera, M.** 2012. Resistencia a glifosato: Imperativos para un uso sustentable. *Tierra Adentro* 99:17-20, Agosto 2012.
- Espinoza, N., Seitz, K., Mera, M., Jobet, C., Díaz, J. y De Prado, R.** 2002. Respuesta a herbicidas ACCasa y ALS de un biotipo de *L. rigidum* con antecedentes de resistencia a haloxyfop metil. *Simiente* 72(3-4): 133p.
- Fenton, R. and Jutsum, A.** 1991. Resistant weeds to herbicides: developing our defense. *Shell Agriculture* (11): 12-18.
- Gray, J.A, Balke, N.E. and Stoltenberg, D.E.** 1996. Increased Glutathione Conjugation o Atrazine Confers Resistance in a Wisconsin Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Biotype. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 55, 157-171.
- Gressel, J.** 2002. *Molecular biology of weed control*. New York. Taylor & Francis. 504 p.
- Gunsolus, J.** 1998. *Herbicide resistant Weeds*. North Central Region Extension Publication. 468p.
- Hatzios, K.** 2001. Mechanisms of resistance to herbicides. *Uso de herbicidas en la agricultura del siglo XXI*. Córdoba, España: 275-289.
- Heap, I.** 2012. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.com>. Accessed: october 10, 2012.
- Heap, I.** 2013. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Monday, December 30, 2013. Available www.weedscience.org

- Heap, I.M. and Lebaron, H.** 2001. Introduction and Overview of Resistance. In: *Herbicide resistance and world grain* (eds. SB Powles & DL Shaner), 1-22. CRC Press, Boca Raton.
- Hegi, G.** 1979. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Vol. III, parte 2. 2a edic. Parey, Hamburgo, Berlin. pp. 763-772 (Caryophyllaceae en general), pp. 1043-1070 (Silene en general) y pp. 1138-1141 (*Silene noctiflora*).
- Hidayat, I. and Preston, C.** 2001. Cross-resistance to imazethapyr in a fluazifop-P-butyl-resistant population of *Digitaria sanguinalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 71: 190-195.
- Hilton, H.W.** 1957. Herbicide Tolerant strains of Weeds. -69. 1957. Hawaiian Sugar Plant. Assoc. Ann. Rep., p.69.
- HRAC**, 2005. Herbicide Resistance Action Committee. Available www.plantprotection.org
- Ito, H. and Gray, W.M.** 2006. A Grain-of-Function Mutation in the Arabidopsis Pleiotropic Drug Resistance Transporter PDR9 Confers Resistance to Auxinic Herbicides. *Plant Physiology* 142, 63-74.
- Jager, G.** 1983. Herbicides. In: *Chemistry of Pesticides*. John Wiley & Sons, New York:322-392.
- 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. 333p.
- Laplante, J., Rajcan, I. and Tardif, F.J.** 2009. Multiple Allelic Forms of Acetohydroxyacid Synthase are Responsible for Herbicide Resistance in *Setaria viridis*. *Theoretical and Applied Genetics* 119, 577-585.
- Linton, K.J.** 2007. Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology* 22, 122-130.
- Mallory-Smith, C., Thill, D. and Dial, M.** 1990. Identification of sulfonilurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed technology* 4: 163-168.
- Matthei, O.** 1995. *Manual de las malezas que crecen en Chile*. Editorial Alfa Impresores, Santiago. Chile. 545 pp.
- Mazur, B. J. and Falco, S. C.** 1989. The development of herbicide resistant crops. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 40: 441-470.

- McNeill, J.** 1977. The biology of Canadian weeds. 25. *Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause. Can. J. Plant Sci. 57: 1103-1114
- McNeill, J.** 1980. The biology of Canadian weeds. 46. *Silene noctiflora* L. Can. J. Plant Sci. 60: 1243-1253
- Ministerio de Agricultura.** 2012. Norma final referente extensión de tolerancias para residuos de pyraflufen-ethyl. 26 de diciembre de 2012. Visitado el 20 de enero de 2014. Disponible en www.chileagricola.us
- Park, K.W. and C.A. Mallory-Smith.** 2004. Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotypes. Weed Research. 44:71–77.
- Pérez, A and Kogan, M.** 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchard. Weed research 42: 12-19.
- 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.J., 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. and Preston, C.** 1995. Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants. Herbicide Resistant Action Commite. Monograph N° 2.
- Powles, S., Preston, I., Bryan, A. and Justsum, R.** 1997. Herbicide resistance: Impact and management. Adv. Agron 58: 57-93.
- Powles, S.B. and Q. Yu.** 2010. Evolution in Action: Plants resistant to herbicides. Annual Review of Plant Biology, 61, 317-347.
- Preston, C.D., Pearman, D.A. & Dines, T.D.** 2002. *New Atlas of the British & Irish Flora.* University Press, Oxford.
- Reznick, D. and Cameron, K.** 2001. The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. Genetica 112-113.

- Ross, M. and Lembi, C.** 1999. Applied weed Science. Segunda edición. ed. Prentice hall, New Jersey, USA. 452 p.
- Ryan, G.F.** 1970. Resistance of Common Groundsel to Simazine and Atrazine. Weed Science 18, 614-&.
- Saari, L. and Maxwell, C. D.** 1997. Target-site resistance for acetolactate synthase inhibitor herbicides. En: De Prado, R., Jorrín, J and García-Torres, L. (ed.) Weed and crop resistance to herbicides. Kluwer Academic Publishers/ Dor Dreht/ Boston/ London. Pp 81-88.
- Saari, L.L., J.C. Cotterman, and D.C. Thill.** 1994. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. Pages 83–139 in S. B. Powles and J.A.M. Holtum, eds. Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Sabbatini, M., Irigoyen, J. y Vernavá, M.** 2004. Estrategias para el manejo integrado de malezas: problemática, resistencia a herbicidas y aportes de la biotecnología Biotecnología y mejoramiento vegetal. 12p.
- SAG.** 1991. Resolución N° 481: Establece listado de malezas prohibidas para la internación y comercio de semillas (Publicada en el Diario Oficial del 26 de abril de 1991).Revisado 18 de Enero 2014. Disponible en www.cpf.cl
- SAG.** 2013. Lista de plaguicidas con autorización vigente en Chile. 30 de diciembre de 2013. Revisado 20 de enero de 2014. Disponible en www.sag.cl
- Salisbury E.** 1961. *Weeds & Aliens*. The New Naturalist series vol. 43. Collins, London. 1961
- Seefeldt, S. S., Jensen, J. E. and Fuerst, E. P.** 1995. Loglogistic analysis of herbicide dose-response relationships. Weed Technol. 9: 218_225.
- Shaner, D.L., Stidham, M. and Singh, B.** 2007. Imidazolinone Herbicides. In: *Modern Crop Protection Compound* (eds. W Krämer & U Schirmer), 82-92. Wiley-VCH, Weinheim.
- Sherman, T.D., Vaughn, K.C y Duke, S.O.** 1996. Mechanism of action and resistance to herbicides. En: Duke, S.O. (ed.) Herbicide Resistant Crop. CRC Press, Boca Raton. Pp: 14-28.
- Siminszky, B.** 2006. Plant Cytochrome P450-Mediated herbicide Metabolism. Phytochemistry Reviews 5, 445-458.

- Taberner, A y Cirujeda, A.** 2007. Manejo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. FAO. 78p.
- Talavera, S. & F. Muñoz Garmendia.** 1989. Sinopsis del género *Silene* L. (Caryophyllaceae) en la Península Ibérica y Baleares. *Anales Jord. Bot. Madrid* 45 (2): 407-460
- Thompson, P. A.** 1970. Germination of species of Caryophyllaceae in relation to their geographical distribution in Europe. *Ann. Bot.* 34: 427-449.
- Thompson, K., Bakker, J.P. and Bekker, R.M.** 1997. *The soil seed banks of north west Europe*. Cambridge.
- Tranel, P, and T. Wright.** 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned *Weed Sci.*, 50: 700-712.
- Tranel, P., T. Wright, and I. Heap.** 2009. ALS mutations from herbicide-resistant weeds. Online. Internet. Sunday, October 10, 2012. Available [http://www. weedscience.com](http://www.weedscience.com).
- 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.
- Veldhuis, L.J., L.M. Hall, J.T. O'Donovan., W. Dyer, and J.C.Hall.** 2000. Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48:2986–2990.
- Whaley, C.M; Henry P. Wilson, C.M; and Westwood, J.H.** (2007) A New Mutation in Plant ALS Confers Resistance to Five Classes of Als-inhibiting Herbicides. *Weed Science*: March 2007, Vol. 55, No. 2, pp. 83-90
- WSSA,** 1998. “Herbicide Resistance” and “Herbicide Tolerance” Defined. *Weed Technology* 12, -789.
- Yasaky, K., Shitan, N., Suiyama, A. and Takanashi, K.** 2009. Cell and Molecular Biology of ATP-Binding Cassette Proteins in Plants. Elsevier Academic Press Inc. San Diego.
- Yu, Q., Abdallah, I., Han, HP., Owen, M. and Powles, S.** 2009. Distinct Non-Target Site Mechanism Endow Resistance to Glyphosate, ACCase and ALS-Inhibiting Herbicides in Multiple Herbicide-Resistant *Lolium rigidum*. *Planta* 230, 713-723.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para peso fresco del biotipo de calabacillo SG-R en respuesta a cinco herbicidas ALS aplicados en dos dosis cada uno.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
peso verde	Inter-grupos	34,696	10	3,470	1,188	,323
	Intra-grupos	161,545	55	2,937		
	Total	196,241	65			
repetición	Inter-grupos	,000	10	,000	,000	1,000
	Intra-grupos	192,500	55	3,500		
	Total	192,500	65			

Anexo 2. Análisis de varianza para peso fresco del biotipo de calabacillo SG-S en respuesta a cinco herbicidas ALS aplicados en dos dosis cada uno.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
peso verde	Inter-grupos	112,067	10	11,207	6,422	,000
	Intra-grupos	115,173	66	1,745		
	Total	227,241	76			
repetición	Inter-grupos	,000	10	,000	,000	1,000
	Intra-grupos	308,000	66	4,667		
	Total	308,000	76			

Anexo 3. Análisis de varianza para peso fresco del biotipo de calabacillo SG-R en respuesta a siete herbicidas alternativos.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
repetición	Inter-grupos	,000	7	,000	,000	1,000
	Intra-grupos	80,000	32	2,500		
	Total	80,000	39			
peso verde	Inter-grupos	73,238	7	10,463	9,449	,000
	Intra-grupos	35,433	32	1,107		
	Total	108,672	39			