

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS y FORESTALES



Ing. Agr. JOSÉ ANDRÉS DOEYO

“Consociación intraespecífica de Lolium perenne diploide resistente a glifosato y cultivares tetraploides: variación de la habilidad competitiva de la maleza resistente y efecto sobre la sensibilidad al herbicida de la descendencia”

Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata

2020

Director

Dr., M. Sc., Ing. Agr. Horacio Acciaresi

Codirector

Dr., Ing. Agr. Marcos Yanniccari

Miembros del jurado evaluador

Dra., Ing. Agr. Betina C. Kruk

M. Sc., Ing. Agr. Mario R. Vigna

Dr., M. Sc., Ing. Agr. Julio A. Scursoni

Fecha de defensa de la tesis

.....

DEDICATORIA

A mi familia, porque siempre me incentivaron y me apoyaron a seguir aprendiendo. Papá, Mamá, Mariana, Pia, Manuel, Josefina y Carmela (en camino).

A la gran Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de La Plata (UNLP), por hacerme crecer como persona y forjarme como profesional, a sus autoridades, profesores y compañeros.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Marcos Yannicari y Sr. Horacio Acciaresi por darme su apoyo, tiempo y conocimientos para la realización de este trabajo.

A todos los profesores de la maestría de Protección Vegetal de la UNLP.

A mis compañeros de cohorte.

A la Cooperativa Agraria de Tres Arroyos (CATA) y la Chacra Experimental Integrada Barrow (INTA), por permitirme capacitarme a la par del trabajo.

A la ciudad de La Plata, por los hermosos años vividos allí.

INDICE GENERAL

<i>RESUMEN</i>	1
<i>INTRODUCCIÓN</i>	3
Las malezas y su evolución en los agroecosistemas	3
Las malezas y la resistencia a herbicidas en agroecosistemas de Argentina	5
Lolium spp. resistente a herbicidas en el mundo	7
Flujo de genes de resistencia	7
¿Flujo de genes para el manejo de la resistencia?	10
La interacción y el costo biológico de la resistencia	11
Lolium spp resistente a herbicidas y el manejo en el SE Bonaerense	12
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	14
Material vegetal	14
Estudio del crecimiento y la descendencia de la población resistente a glifosato y cultivar susceptible	14
Registro de datos climáticos	19
Análisis estadístico	19
Medidas de seguridad para evitar la diseminación de la resistencia a glifosato	20
<i>RESULTADOS</i>	21
Producción de Materia Seca Aérea	22
Altura de plantas	27
Producción de semillas	28
Habilidad competitiva	29
Sensibilidad a glifosato de la descendencia	32
<i>DISCUSIÓN</i>	35
<i>CONCLUSIONES</i>	42
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	30
Tabla 2	32
Tabla 3	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	16
Figura 2	22
Figura 3	24
Figura 4	25
Figura 5	26
Figura 6	27
Figura 7	28
Figura 8	29
Figura 9	31
Figura 10	34

ABREVIATURAS

A: Agresividad.

ALS: Acetolactato sintetasa.

ANOVA: Análisis de la varianza.

CEI BARROW: Chacra Experimental Integrada Barrow (MDA-INTA).

D: Diploide.

e.a.: equivalente ácido.

MSA: Materia seca aérea.

R: Resistente.

RYT: Rendimiento relativo total.

S: Susceptible.

T: Tetraploide.

TCR: Tasa de crecimiento relativo.

WSSA: Weed science society of America.

Z: Zadoks.

RESUMEN

En la actualidad, los casos de malezas resistentes a herbicidas se han convertido en un fenómeno ecológico y evolutivo de amplio impacto en los sistemas de producción agrícola. Particularmente, el género *Lolium* ha sido descrito como uno de los más propensos a desarrollar resistencias a herbicidas a nivel mundial.

Desde hace más de diez años, en el sur de la provincia de Buenos Aires se han detectado poblaciones de *Lolium spp.* resistentes a glifosato, interfiriendo con cultivos de trigo y cebada. Aunque un determinado mecanismo de resistencia le otorga a la maleza la capacidad de sobrevivir a un herbicida, a menudo trae aparejado una penalidad o costo biológico para la planta. La posibilidad de explotar estas penalidades genera nuevas alternativas de manejo.

En este contexto, el objetivo general del trabajo fue establecer cómo la consociación intraespecífica de *Lolium perenne* diploide resistente a glifosato y tetraploide susceptible incide en la habilidad competitiva de la maleza resistente. Asimismo, determinar cómo dicha interacción afecta la sensibilidad al herbicida de la descendencia de ambos componentes.

Se evaluaron parámetros de crecimiento y producción de semillas de *Lolium perenne* resistente sembrado en surcos intercalados en diferentes relaciones de consociación con un cultivar comercial tetraploide de la misma especie. A los efectos de simular distintos niveles de enmalezamiento, se evaluaron tres densidades de individuos diploides resistentes (100, 250 y 500 pl m⁻²) respecto a una única densidad del *Lolium perenne* tetraploide susceptible (500 pl m⁻²).

La producción de materia seca aérea en la etapa reproductiva, la producción de semillas y la agresividad de las plantas susceptibles fueron mayores a la de las resistentes cuando la relación de consociación favoreció al genotipo de mayor ploidía. A igual proporción de plantas diploides y tetraploides ninguno de los dos componentes mostró diferencias significativas entre sí respecto a esas variables. La población diploide presentó una frecuencia inicial de plantas resistentes a glifosato superior al 65% y en respuesta al tratamiento de monocultura su frecuencia se mantuvo, sin embargo bajo aquella consociación que propició la agresividad del cultivar tetraploide

frente al diploide (500 versus 100 pl m⁻², respectivamente), la frecuencia de plantas resistentes disminuyó significativamente en al menos 10 puntos porcentuales.

Los resultados de este trabajo son valorados bajo un contexto de manejo integrado de malezas, donde el problema de resistencia a herbicidas no puede ser abordado desde una estrategia fundamentada en un único método de control.

INTRODUCCIÓN

La historia de la agricultura está asociada a la interferencia provocada por las malezas (Dekker, 1997). En ese sentido, el término “maleza” no tiene hasta hoy una acepción única o aceptada mundialmente. Así, desde un punto de vista antropocéntrico y biológico, las malezas pueden entenderse como plantas que interfieren con los cultivos y otras actividades humanas que se han originado en respuesta a condiciones impuestas por la acción humana a partir de ambientes naturales (Aldrich, 1984).

La presencia de malezas puede conllevar dos tipos de interferencias: una a nivel de la productividad del cultivo y otra a nivel de la calidad del mismo. Esto hace a las pérdidas cuantitativas y cualitativas desde un punto de vista económico (Cousens y Mortimer, 1995).

Las malezas y su evolución en los agroecosistemas

Las malezas han evolucionado respondiendo al sistema de cultivo, adaptándose y ocupando nichos disponibles en los agroecosistemas (Dekker, 1997). La interferencia, sucesión y evolución son procesos que afectan a la población de malezas; que tienen relación con las prácticas agronómicas asociadas al cultivo y producen variaciones en las respuestas fenológicas. Todos estos procesos ocurren en diferentes escalas de complejidad (Martínez-Ghersa et al., 2000).

La interferencia maleza-cultivo es un proceso que ocurre durante las distintas etapas ontogénicas del ciclo de vida del vegetal. Vandermeer (1989), describe la interferencia como un problema de doble transformación, en el que una planta y el medio ambiente en el que existe, se afectan o transforman, entre sí. Las relaciones competitivas entre especies están influenciadas por distintos factores como la tasa de crecimiento relativa (TCR mg/g/día) (Poorter 1989), la plasticidad en el crecimiento aéreo y radical, y esto podría definir las ventajas de una u otra especie (Vigna y López, 2004).

Las modificaciones en los sistemas de labranza, en la rotación de cultivos, en el patrón de herbicidas empleados y otras prácticas de manejo pueden afectar la diversidad de especies y la demografía de las poblaciones de la comunidad de malezas (Johnson et al., 2009). Ya a comienzos de la adopción masiva de los sistemas de labranza cero, la comunidad de malezas del cultivo de soja respondió a los efectos del uso de suelo y las prácticas de labranza en la región Pampeana Argentina (de la Fuente et al., 1999). Posteriormente, se encontró que unas pocas especies que dominaban la comunidad de malezas en el pasado, mantenían su constancia resultando estar adaptadas al “nuevo” ambiente. No obstante, otras especies que eran dominante, disminuyeron su constancia en tanto hubo especies que aparecieron en el nuevo escenario productivo (de la Fuente et al., 2006).

Asimismo, Puricelli y Tiesca (2005) evaluaron el efecto del uso exclusivo y continuo de glifosato sobre la composición, constancia y diversidad de malezas en nuestro país. Dichos autores concluyeron que se redujo la riqueza y densidad de las malezas de dicotiledóneas y gramíneas anuales más competitivas y aumentaron las malezas de dicotiledóneas menos competitivas de emergencia tardía en sistemas de siembra directa, principalmente, por el empleo continuo de glifosato.

Las malezas de la agricultura han evolucionado principalmente a partir de especies silvestres capaces de invadir aquellos hábitats disturbados por el hombre (Martínez-Ghersa et al., 2000). En la actualidad, los casos de biotipos de malezas resistentes a herbicidas se han convertido en un fenómeno ecológico y evolutivo relativamente reciente (Neve et al., 2009; Powles y Yu, 2010).

De este modo, la introducción y la intensa adopción de nuevas alternativas de manejo de malezas resultan frecuentemente en cambios en las especies que forman parte de las distintas comunidades de malezas (Culpepper, 2006). Estos cambios suelen modificar la reacción de los vegetales a estas tecnologías y desde luego la composición de la comunidad. Así, en ambientes con uso constante de herbicidas puede existir un cambio desde especies susceptibles a especies tolerantes a herbicidas. Este comportamiento se observa tanto bajo la acción del control químico como de otras alternativas de manejo (Aldrich y Kremer 1997; Marshall et al. 2000; Tiesca et al. 2001; Culpepper et al. 2004).

La amplia adopción de los cultivos resistentes a herbicidas y el consecuente uso

de glifosato, en las distintas zonas agrícolas nacionales, ha significado una importante presión de selección, incrementando el número y densidad de biotipos de distintas especies que logran sobrevivir a los tratamientos con glifosato (Webster y Sosnoskie, 2010).

Las malezas y la resistencia a herbicidas en agroecosistemas de Argentina

Se ha definido la resistencia a herbicidas como la capacidad hereditaria de una planta para sobrevivir y reproducirse luego de recibir una dosis de herbicida normalmente letal para el biotipo silvestre (WSSA, 1998).

Una población de malezas puede contener individuos resistentes en baja frecuencia y el uso repetido de un mismo herbicida expondrá a la población a una presión de selección que conduce a un aumento en el número de individuos resistentes (Gressel y Segel, 1978; Hakansson, 2003). Existen tres requisitos previos para la evolución de la resistencia a los herbicidas en una población de malezas. El primero de ellos es la ocurrencia de variabilidad genética respecto a la sensibilidad a cierto herbicida, el segundo es la selección para aumentar la resistencia por la aplicación de determinado herbicida al cual determinados individuos de la población son resistentes, y el tercero es que la resistencia no implique costos adaptativos (en ausencia del herbicida), superiores al beneficio de la resistencia, de forma tal que el “ fitness ” de los individuos resistentes sea superior al de los susceptibles (Cousens y Mortimer, 1995).

En los sistemas de cultivo extensivo de Sudamérica, el glifosato es un herbicida de uso recurrente en los programas de control de malezas, especialmente a partir de la adopción generalizada del sistema de siembra directa y la utilización de cultivos resistentes a este principio activo (Vila-Aiub et al., 2008). En consecuencia, desde hace más de una década, el glifosato ha sido el herbicida más usado en Argentina y en el mundo (Baylis, 2000; Kleffmann y Partner, 2008). Esto ha provocado una fuerte presión de selección sobre la comunidad de malezas que ha conducido a cambios florísticos intra-específicos (Puricelli y Tuesca, 2005; Heap, 2019) y la aparición de poblaciones resistentes al ingrediente activo.

En el NOA, se detectó el primer caso de resistencia a glifosato en un genotipo de *Sorghum halepense* de la provincia de Salta (Vila-Aiub et al., 2007). Posteriormente, se denunciaron poblaciones resistentes en provincias vecinas hasta alcanzar una importante distribución regional (Olea, 2013).

Desde 2007, en el sur de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) los problemas de poblaciones de baja sensibilidad de ryegrass (*Lolium perenne*) a glifosato han despertado el interés de productores agropecuarios y profesionales del área. Vigna et al., (2008) comunicaron la resistencia a glifosato de poblaciones espontáneas de *Lolium perenne subsp. multiflorum*. En la misma región se identificó resistencia a glifosato en *Lolium perenne subsp. perenne* (Yannicari et al. 2012).

En 2015, se denunciaron tres casos de poblaciones de malezas resistentes: *Sorghum halepense* (sorgo de Alepo) con resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS y con resistencia múltiple. Ese mismo año, se comunicó la presencia de *Amaranthus palmerii* (yuyo colorado) con resistencia a glifosato (Morichetti et al. 2013; Heap, 2019). Posteriormente, se encontraron dos casos de *Amaranthus hybridus* (yuyo colorado) con resistencia a glifosato y resistencia a múltiples herbicidas (Larrán et al., 2017; Perotti et al., 2019)

Entre malezas de la familia de las Crucíferas, en el sur de la provincia de Buenos Aires, se hallaron poblaciones de *Brassica napus* resistentes a glifosato y *Raphanus sativus* e *Hirsfeldia incana* con resistencia a otros herbicidas (Pandolfo Et. Al., 2016; Vigna y Mendoza, 2015). Estas especies, junto a *Lolium perenne* resultan ser las malezas resistentes más problemáticas de esa región.

Particularmente, el género *Lolium* ha sido descrito como uno de los más propensos a desarrollar resistencias a herbicidas a nivel mundial (Preston et al., 2009). El alto grado de alogamia y la elevada producción de semillas contribuyen a la gran variabilidad genética de las poblaciones de *Lolium spp.* (Polok, 2007). Sobre la diversidad genética, la selección con herbicidas puede favorecer a aquellos individuos con cierto grado de insensibilidad al mismo (Cobb y Reade, 2010). Posteriormente, la semilla proveniente del resistente puede dispersarse como “contaminante” de los granos producidos por el cultivo y/o transportada por diversos vectores tales como la maquinaria agrícola, el agua, los animales y el viento (Cousens y Mortimer, 1995).

Lolium spp. resistente a herbicidas en el mundo

Los primeros casos de malezas resistentes a glifosato en el mundo fueron documentados en poblaciones australianas de *Lolium rigidum* Gaud. (Preston *et al.*, 2009) y posteriormente otras poblaciones resistentes del género *Lolium* se hallaron en Chile (Perez y Kogan, 2001), Sudáfrica (Heap, 2004) y en USA (Simarmata *et al.*, 2003). Actualmente, la problemática de *Lolium* con resistencia a herbicidas se presenta en diferentes países de cinco continentes (Heap, 2019).

Preston *et al.*, 1996, en condiciones de laboratorio mostraron que una población de *Lolium rigidum* poseía mecanismos bioquímicos como para generar resistencia múltiple a por lo menos nueve sitios de acción diferentes.

Actualmente, hay registrados al menos sesenta poblaciones resistentes de *L. perenne var. multiflorum* en todo el mundo (Heap, 2019). Los sitios de acción en los que se ha evidenciado resistencia involucran un gran espectro asociados a la inhibidores de la EPSP sintasa, ACCasa, ALS, biosíntesis de carotenoides, de la glutamina sintetasa, del fotosistema II, de la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga, disruptores de cadena de electrones del fotosistema I, del ordenamiento de microtúbulos, de la mitosis, de la síntesis de lípidos y de la DOXP sintasa, estos distribuidos en biotipos con resistencia simple y múltiple (Powles y Yu, 2010; Cobb y Reade 2010).

Recientemente, estudios realizados en Australia determinaron la resistencia de *Lolium rigidum* a pyroxasulfone (inhibidor de la síntesis de ácidos grasos de cadenas muy largas) y determinaron los mecanismos básicos involucrados en este tipo de resistencia (Busi *et al.*, 2018). Con lo cual, es posible visualizar que la problemática de resistencia continúa evolucionando de manera sostenida, ya sea apareciendo nuevos casos ó dispersándose aquellos primeros focos de poblaciones resistentes.

Flujo de genes de resistencia

Una vez detectado un caso de resistencia, se sabe que el intercambio que conlleva el flujo de genes mediado por el polen y propágulos promueve la variabilidad genética,

previene el aislamiento genético y puede permitir una dinámica evolutiva más rápida al incrementar la frecuencia inicial de individuos resistentes (Ehrlich y Raven, 1969; Jasieniuk et al., 1996). Una de las principales consecuencias asociadas al flujo génico es el movimiento de genes de resistencia entre y dentro de las poblaciones y la posterior selección de la resistencia a herbicidas (Busi et al., 2008).

Trabajando con *Lolium rigidum*, Lourerio y col. (2016) ajustaron un modelo para predecir el flujo de genes entre plantas aisladas cada vez a mayores distancias. Este modelo predijo un flujo de genes promedio de 7,1% cuando el donante de polen y las plantas receptoras estaban a una distancia de 0 m entre sí. El flujo de genes mediado por el polen disminuyó un 50% a 16,7 m de distancia de la fuente de polen, pero en condiciones a favor del viento se pronosticó un flujo genético de 5,2% a 25 m, la distancia más lejana estudiada.

En Argentina, en condiciones de campo se evaluó y cuantificó el flujo de genes de resistencia al glifosato mediado por polen en *Lolium perenne*. Yanniccari et al. (2018), usando un diseño de donante-receptor, determinaron que el flujo eficaz de genes alcanzó a las plantas distanciadas a 35 m o menos, a favor del viento desde la fuente de polen. En tanto la progenie de plantas receptoras que creció junto (0 m) a la progenie de las plantas donantes de polen, mostró un 13% de individuos con baja sensibilidad a glifosato. Esto representa un aumento de siete veces la frecuencia de individuos resistentes al glifosato encontrados en la progenie de plantas aisladas durante el período de floración (control negativo). De manera similar, las progenies de plantas cultivadas a 15 y 25 m de la fuente de resistencia a glifosato, mostraron un aumento en la frecuencia de plantas resistentes en aproximadamente cuatro y dos veces, respectivamente (Yanniccari et al., 2018).

Por lo expuesto, el flujo génico resulta un factor trascendental para la dispersión de la resistencia favoreciendo la difusión más allá de la zona problema original. Así, la propagación de la resistencia a herbicidas puede ser ayudada por el flujo de genes mediado por el polen, entre plantas resistentes y susceptibles, que pueden resultar en un intercambio y acumulación progresiva de distintos alelos de resistencia presente en las poblaciones (Darmency, 1996).

Si bien los estudios de dispersión de semillas son importantes para mejorar el conocimiento de la dinámica de las malezas, se estima que en *L. perenne* el flujo de

genes a través del polen es tres veces y media mayor que el flujo a través de semillas (Balfourier, et al, 2000).

Yannicari et al. 2015, utilizaron la autopolinización y cruzamientos para evaluar diferentes modelos de herencia de la resistencia a glifosato. Los autores determinaron que las plantas moderadamente resistentes autofertilizadas produjeron tres clases de fenotipos: plantas susceptibles, moderadamente resistentes y altamente resistentes en proporciones 1: 2: 1, respectivamente. Estos resultados sugieren que la resistencia a glifosato podría controlarse mediante un sólo locus con dominancia incompleta. Las plantas susceptibles y altamente resistentes autofertilizadas produjeron descendientes homogéneos, que consistieron en individuos susceptibles y altamente resistentes, respectivamente. Por lo tanto, estos fenotipos serían determinados por un locus en el estado homocigota. Resulta interesante destacar que pese a hallar diferencias en el nivel de sensibilidad al herbicida, tanto las plantas homocigotas resistentes como heterocigotas, resultaron capaces de sobrevivir a dosis recomendadas de marbete de glifosato.

Estos resultados son consistentes con las evidencias encontradas por Lorraine-Colwill et al. (2001) en una población australiana de *Lolium rigidum* resistente al glifosato. Los autores encontraron que la resistencia a glifosato es conferida por un sólo gen nuclear que se hereda de una manera semi-dominante, pero no obstante, otros genes también pueden contribuir a la supervivencia de la planta a dosis bajas de glifosato (Lorraine-Colwill et al., 2001).

En especies con polinización cruzada mediada por el viento, como es el caso de *L. rigidum*, *L. multiflorum* y *L. perenne*, el flujo de genes por el polen es de suma importancia. En esta especie, la resistencia conferida por los genes nucleares dominantes se propagará rápidamente ya que los alelos de resistencia no se pierden en la progenie heterocigota bajo la presión del herbicida, reduciendo considerablemente el número de años necesarios para desarrollar resistencia (Jasienuk, et al. 1996).

¿Flujo de genes para el manejo de la resistencia?

Lolium perenne se considera una especie con un elevado grado de alogamia y anemófila, donde un sistema gametofítico de autoincompatibilidad basado en dos loci multialélicos e independientes, llamados *S* y *Z*, opera para prevenir la endogamia. Teniendo en cuenta el alto nivel de alogamia en *L. perenne* y la importancia del viento como agente de dispersión de polen, el flujo de genes a través del polen ha sido considerado como la principal causa de intercambio genético entre poblaciones susceptibles y resistentes (Yannicari et al., 2018).

Algunos autores han propuesto la posibilidad de explotar el intercambio genético entre poblaciones resistentes y cultivares susceptibles con la finalidad de reducir la evolución de la resistencia a herbicidas en poblaciones de *Lolium perenne* (Ghersa et al., 1994). El nivel de ploidía de *Lolium perenne* ha sido una barrera para limitar el intercambio genético entre plantas diploides y tetraploides. El cruzamiento entre plantas de *Lolium perenne* diploide y sus correspondientes autotetraploides puede ocurrir frecuentemente, pero las semillas obtenidas de tales cruzamientos han mostrado esterilidad casi completa (Griffiths, et al. 1970). Esto hace que el polen de *Lolium* tetraploide constituya poco o ningún peligro para la pureza genética de las poblaciones de semillas diploides, aunque se hayan sembrado en estrecha proximidad. Del mismo modo, el polen diploide no pone en peligro la pureza de los cultivares tetraploides (Griffiths, et al. 1970).

Existen antecedentes que indican que poblaciones de *Lolium perenne* tetraploide tienden a dominar sobre poblaciones diploides de la misma especie cuando éstas se cultivan consociadas (Harries y Norrington-Davies, 1974). Más recientemente, se han evidenciado diferencias en la habilidad competitiva de cultivares de ryegrass perenne dependiendo del nivel de ploidía. Así, Sugiyama (1998) y Smith et al. (2003), por medio de estudios en campo en experimentos sin restricciones nutricionales determinaron una mayor agresividad y tasa de crecimiento de los genotipos tetraploides que los diploides creciendo en una proporción 1:1.

De este modo, considerando que las poblaciones de *Lolium perenne* resistente a glifosato del sur bonaerense son diploides ($2n=14$) (Yannicari et al., 2012) y en función de los antecedentes antes citados, el empleo de cultivares de *Lolium perenne*

autotetraploides, susceptibles a glifosato, podrían constituir una importante alternativa para limitar la evolución y dispersión de la resistencia a glifosato de las poblaciones diploides.

Es importante destacar que la adaptación de una población a un nuevo ambiente a menudo tiene efectos pleiotrópicos negativos sobre la capacidad reproductiva neta llamado "costo biológico (*fitness*)" (Purrington, 2000; Strauss et al., 2002).

Aunque los costos biológicos asociados a genes de resistencia a herbicidas son evidentes, pero no universales entre las especies vegetales (Vila-Aiub et al., 2009), es esperable que las poblaciones resistentes tengan menor capacidad reproductiva neta en relación con las poblaciones susceptibles en ausencia de presión de selección con el herbicida (Purrington, 2000).

Existen evidencias que el costo adaptativo de los individuos se modifica con relación a la densidad y proporción y de esta manera varía la intensidad de este costo según el nivel de competencia (Bergelson y Purrington, 1996).

La interacción y el costo biológico de la resistencia

Aunque un determinado mecanismo de resistencia le otorga a la maleza la capacidad de sobrevivir a un herbicida, frecuentemente trae aparejado una penalidad o costo biológico para la planta. Así, la tasa de crecimiento, la tasa fotosintética, la habilidad competitiva y la producción de semillas pueden resultar menores en plantas resistentes respecto de las susceptibles (Vila-Aiub et al., 2009; Keshtkar et al., 2019). Yannicari et al. (2016), hallaron que los individuos resistentes a glifosato producían alrededor de la mitad de la biomasa aérea generada por los individuos susceptibles. Esto repercutiría en una menor altura de los individuos resistentes (14%), un menor número de espigas por planta (25%), una menor área foliar de la hoja bandera (24%) y un menor número de semillas producidas por planta (40%). El número de semillas por individuo es un factor crucial de la capacidad reproductiva neta de las plantas de una población e influencia la supervivencia de los individuos resistentes y susceptibles (Maynard, 1998; Vila-Aiub et al., 2009). Ante esto, es esperable que la frecuencia de individuos

resistentes decline, una vez que la presión de selección con glifosato se suspenda. En este sentido, ha sido observada una reducción en el porcentaje de individuos de *L. rigidum* resistentes a glifosato cuando no se realizaron aplicaciones del herbicida durante tres años (Preston et al., 2009).

Lolium spp resistente a herbicidas y el manejo en el SE Bonaerense

Como se ha indicado previamente, rye grass (*Lolium perenne*) es considerado una importante maleza en los sistemas agrícolas pampeanos destinados a la producción de trigo, cebada y avena, donde el control químico es la principal estrategia empleada (Istilart y Yanniccari, 2012; Scursioni et al., 2012).

En el sur de la provincia de Buenos Aires (Argentina), se han estudiado las pérdidas de rendimiento en trigo y cebada (principales cultivos invernales en superficie), asociadas a la interferencia de *L. perenne* en una densidad de 50 pl.m⁻². En tales condiciones, la maleza provocó una merma de 25 % y 50% del rendimiento en trigo y cebada, respectivamente (Yanniccari et al., 2016b).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la interacción intraespecífica entre poblaciones susceptibles tetraploides (S) de *Lolium perenne* y una población diploide (R) de *Lolium perenne* resistente a glifosato.

A su vez se pretende generar conocimiento que brinde opciones de manejo de la resistencia a nivel de campo. Es esperable que de existir un costo biológico en la población diploide resistentes respecto a la tetraploide susceptible, la interacción intraespecífica con tetraploides exacerbe la capacidad reproductiva de la misma población en detrimento de aquellos diploides resistentes, constituyéndose en una alternativa para limitar la evolución y dispersión de la resistencia a glifosato de la población diploide en la Región.

En este contexto, el **objetivo general** de este trabajo fue establecer cómo la consociación intraespecífica de *Lolium perenne* diploide resistente a glifosato y tetraploide susceptible incide en la habilidad competitiva de la maleza resistente y

determinar cómo dicha interacción afecta la sensibilidad al herbicida de la descendencia.

Los **objetivos** específicos del presente estudio fueron:

- 1- Evaluar la capacidad competitiva de la población diploide de *Lolium perenne* resistente a glifosato a través de la altura y la producción de biomasa aérea cuando crece en consociación con un cultivar comercial de *Lolium perenne* tetraploide susceptible a dicho herbicida.
- 2- Determinar la producción total de semillas de la población y el cultivar, y la proporción de semillas resistentes producidas por la población diploide resistente luego de crecer en consociación con el cultivar tetraploide susceptible.
- 3- Estudiar la variación en el nivel de sensibilidad a glifosato de la progenie del cultivar tetraploide susceptible cuando crece en consociación con una población diploide resistente.

Teniendo en cuenta las posibles variaciones en la producción de biomasa aérea y la frecuencia de semillas resistentes, las **hipótesis** a probar son las siguientes:

- 1- La producción de semillas y materia seca aérea total de la población diploide resistente a glifosato es menor que la del cultivar tetraploide susceptible cuando se cultivan en menor o igual proporción.
- 2- La proporción de semillas resistentes producidas por la población diploide resistente es menor cuando se cultiva en una consociación con un cultivar tetraploide susceptible (en relación 1:5), respecto al porcentaje obtenido en la monocultura respectiva.
- 3- La proporción de semillas susceptibles producidas por el cultivar tetraploide susceptible no se modifica cuando se cultiva en consociación con una población diploide resistente a glifosato, respecto al porcentaje obtenido en la monocultura respectiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon semillas de *Lolium perenne* ($2n=14$) resistente a glifosato cosechadas a partir de una población del sur de la provincia de Buenos Aires, en la región de incumbencia de la Chacra Experimental Integrada de la localidad de Barrow (CEI Barrow). En la población resistente, se cosechó la progenie de cien individuos, tomados al azar, que habían sobrevivido al control con glifosato llegando a cumplir su ciclo.

Luego de cuatro meses de realizada la cosecha, período estimado para minimizar el porcentaje de semillas en dormición, se evaluó la sensibilidad a glifosato de los individuos realizando pruebas de dosis-respuesta de semillas en germinación y en planta (Yanniccari et al. 2012).

Además, se utilizó un cultivar comercial tetraploide ($2n (4x)= 28$) de *Lolium perenne*. Previamente, se corroboró la susceptibilidad a glifosato mediante curvas de dosis-respuesta de semillas en germinación y en planta de acuerdo con Yanniccari et al. (2012).

Estudio del crecimiento y la descendencia de la población resistente a glifosato y cultivar susceptible

Se evaluaron parámetros de crecimiento y producción de los individuos de *Lolium perenne* resistente sembradas en consociación con un cultivar comercial tetraploide de la misma especie. A los efectos de simular diferentes niveles de enmalezamiento, se evaluaron diferentes densidades de individuos diploides resistentes respecto a una única densidad del *Lolium perenne* tetraploide susceptible.

Los estudios se realizaron en un lote de la región problema. Cuarenta días antes de la fecha de siembra estimada se efectuó el laboreo de los primeros 10 cm de suelo empleando dos pasadas de una rastra de disco. Cinco días previos a la siembra se realizó

una aplicación de glifosato a la dosis recomendada según el estado y composición de la comunidad de malezas que emergió.

Se sembraron veinte parcelas de 1,5 m x 6 m empleando una sembradora experimental de surcos espaciados a 20 cm. La siembra fue realizada el 5 de abril de 2015 y el 28 de junio de 2018. La densidad de siembra de *Lolium perenne* tetraploide susceptible se ajustó a fin de obtener 500 plantas m⁻², considerando la densidad por metro lineal. En tanto en forma intercalada, con una distancia de 20 cm entre hileras, se sembró la población diploide resistente en diferentes densidades (0 plantas.m⁻², 100 plantas.m⁻², 250 plantas.m⁻² y 500 plantas.m⁻²). Asimismo, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente se sembró *Lolium perenne* diploide resistente en monocultura en una densidad de 500 plantas.m⁻².

El estudio siguió un diseño aditivo en bloques al azar con cuatro repeticiones donde la densidad del cultivo tetraploide susceptible se mantuvo constante y se estudiaron distintas densidades de la población diploide resistente.

Cada línea de siembra fue individualizada. Así, tanto durante el cultivo como al momento de la cosecha, cada componente de la consociación fue debidamente identificado. A fin de minimizar el cruzamiento de las poblaciones entre parcelas vecinas, cada unidad experimental estuvo distanciada una de otra a 10 m.

	1,5 m	10 m		10 m		10 m		10 m	
			Diploide		Diploide		Diploide		Diploide
	Tetraploide		100 pl m ⁻²		250 pl m ⁻²		500 pl m ⁻²		500 pl m ⁻²
	500 pl m ⁻²		Tetraploide		Tetraploide		Tetraploide		Tetraploide
			500 pl m ⁻²						
10 m									
					Diploide		Diploide		Diploide
	Diploide		Tetraploide		100 pl m ⁻²		250 pl m ⁻²		500 pl m ⁻²
	500 pl m ⁻²		500 pl m ⁻²		Tetraploide		Tetraploide		Tetraploide
					500 pl m ⁻²		500 pl m ⁻²		500 pl m ⁻²
10 m									
	Diploide		Diploide				Diploide		Diploide
	100 pl m ⁻²		250 pl m ⁻²		Tetraploide		500 pl m ⁻²		500 pl m ⁻²
	Tetraploide		Tetraploide		500 pl m ⁻²		Tetraploide		Tetraploide
	500 pl m ⁻²		500 pl m ⁻²				500 pl m ⁻²		500 pl m ⁻²
10 m									
	Diploide				Diploide				Diploide
	500 pl m ⁻²		Diploide		250 pl m ⁻²		Tetraploide		100 pl m ⁻²
	Tetraploide		500 pl m ⁻²		Tetraploide		500 pl m ⁻²		Tetraploide
	500 pl m ⁻²				500 pl m ⁻²				500 pl m ⁻²

Figura 1. Esquema del diseño experimental. Disposición de las parcelas en el campo de la Chacra Experimental Integrada de Barrow (Tres Arroyos, provincia de Buenos Aires). Ensayos realizados durante los años 2015 y 2018.

Materia seca aérea (M.S.A (g pl⁻¹; g m⁻²)): Para cada tratamiento, se determinó la materia seca aérea producida por cada población, según escala Zadoks et al. (1974) al llegar a Z2.1, Z4.3 y Z9. A tal fin, se muestrearon al azar las plantas de cada componente en un metro lineal de surco de cada parcela, sin considerar las borduras. Se llevaron a una estufa a 60°C hasta llegar a peso constante. Posteriormente, se pesó cada muestra y se determinó la materia seca aérea producida por planta y por unidad de superficie. Se tomaron cuatro muestras al azar de 0,25 m lineal de surco, a partir de la sumatoria de estos datos, se obtuvo el valor correspondiente a cada surco y material por cada unidad experimental.

Producción de semillas (g m⁻²): A partir de las muestras de la determinación precedente, se determinó la producción de semillas de cada componente.

A partir de las evaluaciones de los parámetros de crecimiento descriptos, se determinó la agresividad de las plantas del cultivar tetraploide sobre la población diploide resistente a glifosato como se detalla posteriormente. En este sentido, se relacionaron los valores de parámetros obtenidos (en las parcelas consociadas) respecto a aquellos registrados en parcelas con monocultura (Miller, 1996).

La complementariedad de recursos es una medida del grado en que los componentes de una mezcla comparten recursos limitados comunes (Satorre y Snaydon, 1992; Acciaresi et al., 2001). Esta medida fue determinada por medio del rendimiento relativo total (RYT) (De Wit y van den Bergh, 1965):

$$\text{RYT} = \frac{Y_{ab}}{Y_{aa}} + \frac{Y_{ba}}{Y_{bb}}$$

Donde Y_{ab} e Y_{ba} representan el rendimiento en semilla ó producción de materia seca aérea del S y del R a glifosato cuando crecen en mezcla, mientras que Y_{aa} e Y_{bb} son la producción de semilla ó materia seca aérea en las monoculturas. Los rendimientos relativos de cada componente, ajustados a la proporción de cada situación de consociación, fueron empleados para la construcción de diagramas bivariados como Satorre y Snaydon (1992).

Además, considerando la producción de semillas por planta, se estimó la agresividad (A) para cada bloque, siguiendo a Radosevich et al. (1997). Teniendo en cuenta que la proporción en la densidad de siembra entre R y S fue variable, 5:1; 2:1; 1:1, se adaptó la fórmula de agresividad a un diseño aditivo, surge la siguiente ecuación (Snaydon, 1991; Satorre y Snaydon, 1992; Acciaresi, et al, 2003).

$$A = 0,5 \cdot \left[\left(\frac{Y_{ab}}{Y_{aa}} \right) / P_a - \left(\frac{Y_{ba}}{Y_{bb}} \right) / P_b \right] \cdot \text{RYT}^{-1}$$

Donde a los términos definidos en la expresión del *RYT*, se incorpora P_a indicando la proporción del cultivar a (S) cuando crece consociado con la población R(b) y P_b es la proporción de la población b (R) cuando crece consociado con el cultivar S (a).

Sensibilidad a glifosato de la descendencia: Luego de realizada la cosecha de los S y R a glifosato, cultivados en monocultura y en consociación, las semillas se colocaron en sobres de papel, se identificaron correspondientemente y se almacenaron a 20°C durante cinco meses con el objetivo de reducir el porcentaje de semillas en dormición. Después de este tiempo, se evaluó la descendencia del cultivar tetraploide S y de la población diploides R a glifosato respecto a la sensibilidad al herbicida.

Para ello, empleando semillas obtenidas a partir de cada población en cada parcela, se realizó una prueba de sensibilidad a glifosato. Asimismo, en esas condiciones también se evaluaron semillas de la población diploide resistente y del cultivar tetraploide susceptible empleado en cada experimento de campo. Las semillas cosechadas del R y del S de cada unidad experimental, fueron sembradas en mayo de 2019 en contenedores de 2 L de capacidad, rellenos con tierra proveniente de un suelo similar al del lugar del experimento. La densidad de siembra se ajustó a fin de lograr diez plantas por contenedor. Este experimento se desarrolló al aire libre y se suministraron riegos periódicos.

Por cada parcela del experimento de campo se sembraron cinco contenedores de cada resistente (R) y/o susceptible (S) (dependiendo del tratamiento de monocultura ó consociación). Siguiendo el mismo procedimiento se sembró el R a glifosato y S, empleando las mismas muestras de semillas utilizadas para la instalación de los experimentos de campo.

En total se utilizaron doscientos contenedores con diez plantas cada una. Cuando las plantas llegaron a presentar 1-2 macollos (Zadok 2.1-2.2) se realizó una aplicación de glifosato (sal potásica de glifosato al 62% p/v, Sulfosato Touchdown®, Syngenta) en una dosis de 1012 g e.a. ha⁻¹. Para ello se empleó un equipo pulverizador de precisión, con presión constante de 35 lb mediante CO₂, calibrado para erogar un volumen de aplicación de 150 L ha⁻¹.

Luego de 40 días de aplicado el tratamiento con glifosato, se realizó un recuento del número de plantas vivas respecto al número total de plantas de cada contenedor a fin de determinar el porcentaje de supervivencia en cada caso.

Registro de datos climáticos

A partir de los registros de la estación agrometeorológica de la Chacra Experimental Integrada Barrow, se obtuvieron los datos de temperatura y precipitaciones durante los dos años de experimentos (Borda 2016; Borda, 2019).

Análisis estadístico

Los datos de producción de materia seca aérea, altura y producción de semillas se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) donde la principal fuente de variación fue la relación de cada componente (monocultura, 5:1 (500 y 100 plantas del genotipo tetraploide y diploide por m^{-2} , respectivamente), 2:1 (500 y 250 plantas del genotipo tetraploide y diploide por m^{-2} , respectivamente) y 1:1 (500 plantas de cada genotipo por m^{-2}).

Empleando los datos de las estimaciones de agresividad, se realizó un ANOVA multifactorial donde la fuente de variación fue la densidad del R (100, 250 y 500 plantas genotipo resistente m^{-2}) y el momento de evaluación. En los casos donde se detectó interacción entre componentes, se efectuaron los ANOVA correspondientes a cada parámetro medido a fin de detectar efectos de la consociación sobre plantas por la producción de materia seca aérea en $g m^{-2}$.

Los datos registrados a partir de la prueba de sensibilidad a glifosato fueron evaluados mediante un ANOVA multifactorial. En este sentido, se analizó cada población contrastando la sensibilidad de la descendencia de cada tratamiento respecto a las semillas originales empleadas en la siembra del estudio, considerando además los distintos tratamientos de consociación.

En cada caso, a partir de pruebas de diferencias mínimas significativas de Fisher ($P < 0,05$) se compararon las medias para detectar efectos significativos de la fuente de variación. Se comprobó el cumplimiento de los supuestos de los análisis mediante el estudio de los residuales. En todos los análisis se utilizó el programa estadístico Statistica® v7.1 (Stat Soft, Inc.).

Medidas de seguridad para evitar la diseminación de la resistencia a glifosato

El experimento se realizó en el Campo Experimental de la Chacra Experimental de Barrow (MAA-INTA, Partido de Tres Arroyos; 38° 20' S; 60° 13' W).

Los estudios del presente trabajo se realizaron en un área libre de *Lolium perenne* dentro de la zona problema. Si bien no se introdujo esta maleza resistente en una región libre de poblaciones resistentes a glifosato, se tomaron los recaudos necesarios para minimizar el riesgo de generación de nuevos focos de resistencia. Cuando fue necesario, se erradicó mediante medidas de control químico sin emplear glifosato. Durante el período de floración y al finalizar el experimento se repitió el mismo procedimiento. Finalmente, durante las siguientes campañas se previó el control de emergencias de *Lolium perenne* en la zona del experimento y se realizaron los controles pertinentes.

RESULTADOS

Las condiciones climáticas que incidieron sobre los experimentos realizados no presentaron contrastes respecto a los valores históricos. La disponibilidad hídrica en el año 2015 fue levemente inferior al promedio histórico y el experimento del 2018 se desarrolló bajo mayor registro de precipitaciones, sin embargo, para todas las variables analizadas no se detectaron efectos del año de experimento (2015 versus 2018).

Durante el año 2015, primer año de experimento, las precipitaciones acumuladas durante el ciclo del cultivo (desde la siembra a madurez fisiológica) presentaron un déficit de 12% respecto a los valores registrados en el promedio histórico de la Chacra Experimental Integrada Barrow (1938-2017). La distribución de las lluvias mostró que los meses de precipitaciones acumuladas inferiores al promedio histórico fueron mayo (-22%), junio (-66%), julio (-12%), septiembre (-58%) y noviembre (-45%), mientras las lluvias de los meses de abril (+19%), agosto (+73%) y octubre (+19%) superaron al registro de precipitaciones acumuladas (Borda, 2016) (Figura 2a).

Las temperaturas máximas y mínimas de 2015 fueron superiores a las del promedio histórico (1938-2017) para todos los meses del ciclo del cultivo a excepción de septiembre y octubre que resultaron ser inferiores a lo normal (Figura 2b y Figura 2d). En el mismo sentido, durante todo el período analizado, las temperaturas medias mensuales fueron superiores al promedio histórico salvo en el mes de octubre (Figura 2c). En esos dos meses se registraron 18 días con heladas cuando el promedio histórico fue de 8. En tanto, en el resto de los meses del ciclo del cultivo el número de heladas fue similar o inferior a lo normal (Borda, 2016).

En el experimento del año 2018, las precipitaciones acumuladas durante el ciclo del cultivo (desde la siembra a madurez fisiológica) superaron en 76 mm a los valores registrados en el promedio histórico de la Chacra Experimental Integrada Barrow (1938-2017). Asimismo, la distribución de las lluvias mostró que sólo durante el mes de agosto y octubre el registro de precipitaciones acumuladas fue inferior (-30 %) al promedio histórico mensual, mientras que en el resto de los meses superaron los valores históricos (Borda, 2019) (Figura 2a). En cuanto a las temperaturas, tanto las máximas como las mínimas fueron superiores a lo normal (promedio histórico 1938-2017) en casi todos los meses de experimento de 2018 (Figura 2b y Figura 2d). Las temperaturas

medias mensuales resultaron superiores al promedio histórico en cuatro meses de los ocho analizados (Figura 2c). Se registraron 26 días con heladas durante el ciclo del cultivo, coincidente con el promedio histórico (Borda, 2019).

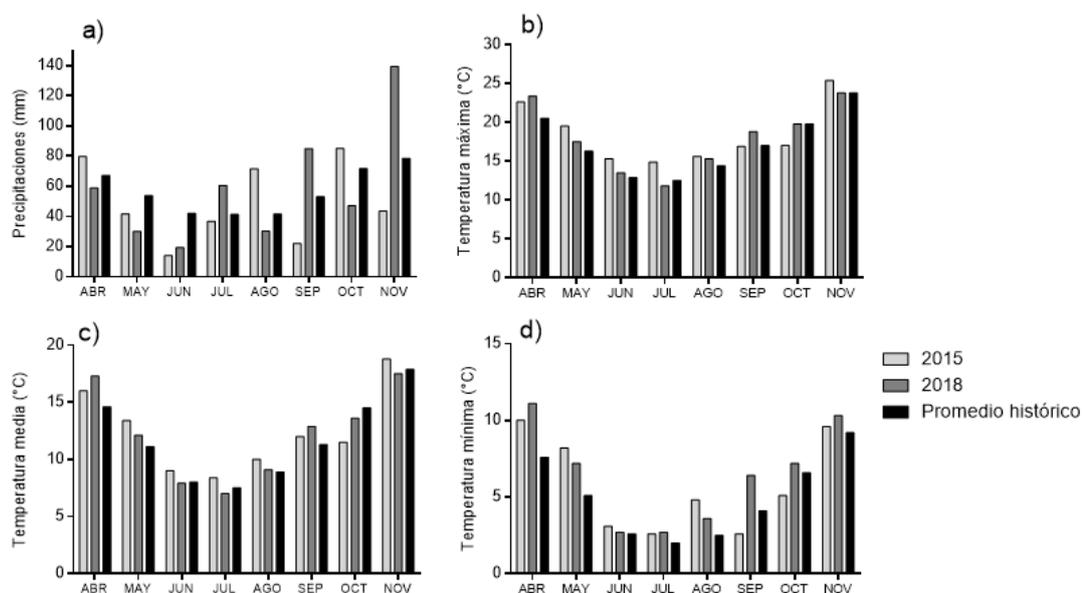


Figura 2. Comparaciones de datos meteorológicos mensuales registrados por la estación agrometeorológica de la Chacra Experimental Integrada Barrow en los años 2015 y 2018 respecto al promedio histórico (1938-2017): Precipitaciones acumuladas (a), temperaturas máximas (b), medias (c) y mínimas (d).

Producción de Materia Seca Aérea

El análisis de la varianza indicó que la interacción genotipo (diploide-tetraploide) x *Tratamiento* (pl m^{-2} de cada componente) x *Momento* (Z2.1, Z4.3, Z9) tuvo un efecto significativo sobre la producción de materia seca aérea por unidad de superficie ($p < 0,05$).

Cuando las plantas se encontraron en Z2.1, no se hallaron diferencias entre diploide y tetraploide (Figura 3). Tanto en monocultura como en los diferentes tratamientos de consociación, los R y S mostraron similares niveles de producción de materia seca aérea (Figura 3).

Esto se evidenció incluso en aquellos tratamientos donde se favorecería al cultivar susceptible (S) en la consociación: 100 ó 250 plantas del resistente (R) por metro cuadrado junto a 500 plantas del S por metro cuadrado (Figura 3).

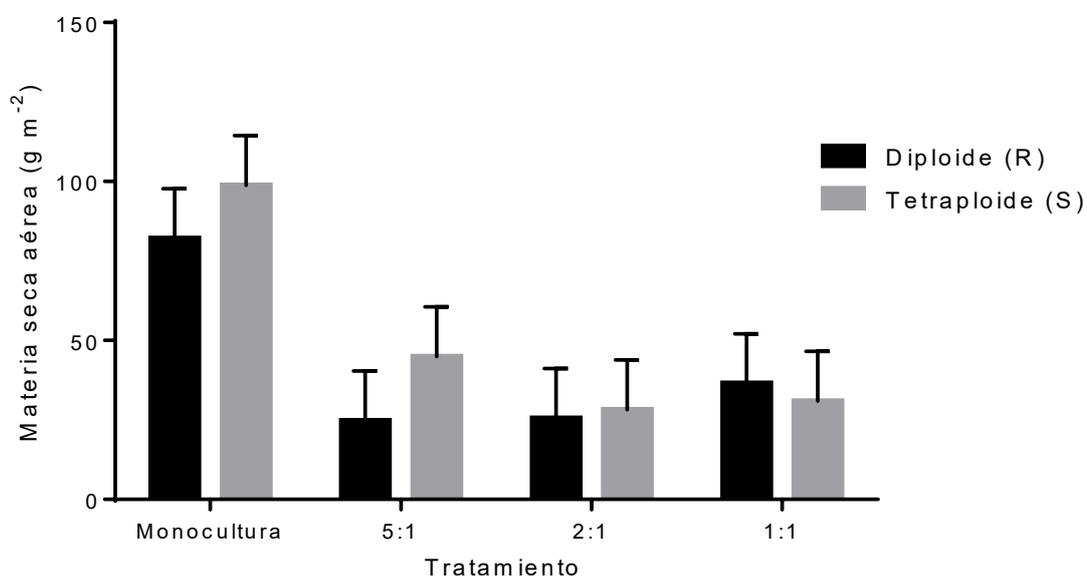


Figura 3. *Materia seca aérea de diploide (R) y tetraploide (S) de Lolium perenne en Z2.1, cultivados en monocultura y en consociaciones de 100, 250 y 500 pl de (R) m⁻² cada 500 pl de (S) m⁻². Se muestran los valores promedio y el error estándar. Barrow, 2015.*

Al estado reproductivo, la producción de materia seca aérea de los susceptibles y resistentes no mostró diferencias significativas cuando se cultivaron en monocultura (Figura 4). En consociación, cuando la relación entre plantas de diferentes poblaciones fue 1:1 y 1:2 (500 pl m⁻² de cada componente y 250 pl R m⁻² cada 500 pl m⁻² S, respectivamente), no se encontraron diferencias entre la materia seca aérea producida de cada componente, incluso pese a la modificación de la relación a favor de una mayor proporción de plantas del S (Figura 4).

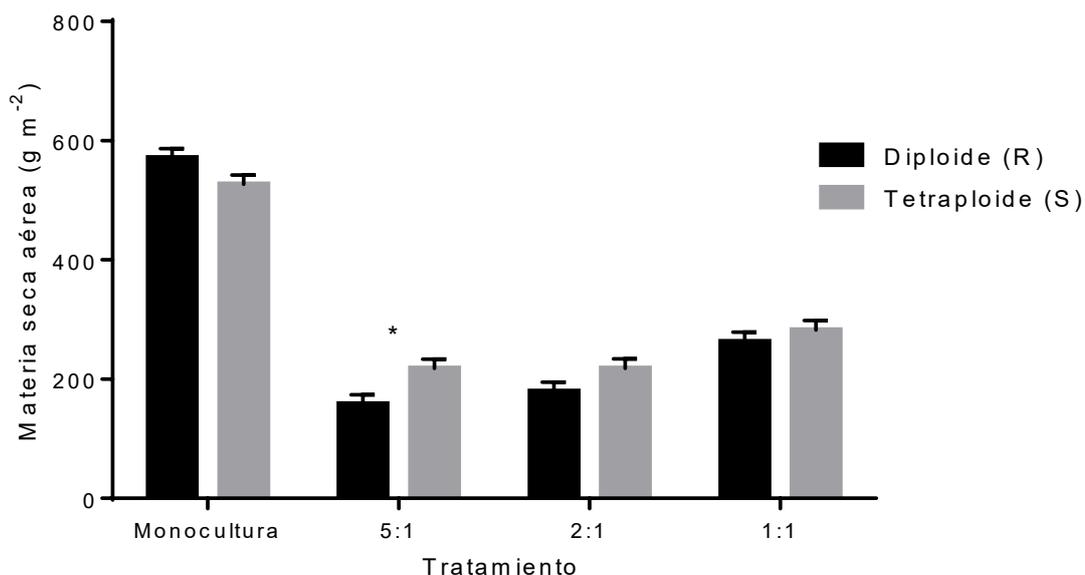


Figura 4. Producción de materia seca aérea de diploide (R) y tetraploide (S) de *Lolium perenne* en Z4.3, cultivados en monocultura y en consociaciones de 100, 250 y 500 pl R m⁻² cada 500 pl S m⁻². Se muestran los valores promedio y el error estándar. Diferencias significativas entre componentes se indican con asterisco ($p < 0,05$). Barrow, 2015.

Sin embargo, en la consociación con la mayor densidad del susceptible (relación 5:1) se evidenció una mayor producción de materia seca aérea del mismo (Figura 3, 4 y 5).



Figura 5. Consociación de 100 pl m^{-2} del R (surcos señalados con letra “D”) con 500 pl m^{-2} del S (surcos señalados con letra “T”) en Z2.3 (izquierda) y en Z4.3 (derecha). Barrow, 2015.

Hacia el final del ciclo, la materia seca generada por el susceptible superó significativamente a la producción del resistente cuando la relación de consociación fue de 5:1 y 2:1 (Figura 6). Sólo bajo tales relaciones entre ambos componentes, se hallaron diferencias significativas en la producción de materia seca aérea. Las variaciones en la densidad de plantas del resistente no modificó la producción de materia seca aérea del susceptible que mostró un promedio de 525 g m^{-2} para las tres relaciones de consociación (Figura 6).

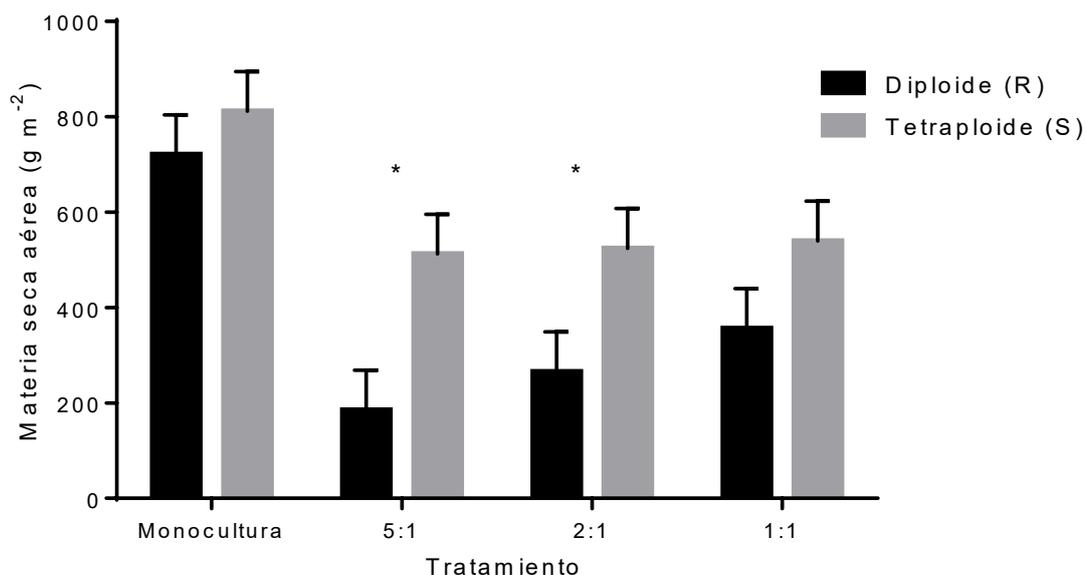


Figura 6. Producción de materia seca aérea de *Lolium perenne* resistente y susceptible en Z9. Se hace referencia a tratamientos de monocultura y consociaciones de 100, 250 y 500 pl R m² cada 500 pl S m². Se muestran los valores promedio y el error estándar. Diferencias significativas entre componentes se indican con asterisco ($p < 0,05$). Barrow, 2015.

Altura de plantas

Al analizar la altura de plantas (distancia del suelo a la última hoja expandida), las poblaciones difirieron de forma altamente significativa ($p < 0,01$) sin mostrar interacción con el tratamiento de consociación ($p = 0,243$). En este sentido, la consociación tampoco afectó la altura cuando se consideró como fuente de variación principal ($p = 0,629$). Por lo hallado, las diferencias en la altura de plantas R y S habrían favorecido al genotipo S. Bajo las condiciones del experimento, el cultivar susceptible resultó ser un 20% más alto que la población resistente (Figura 7).

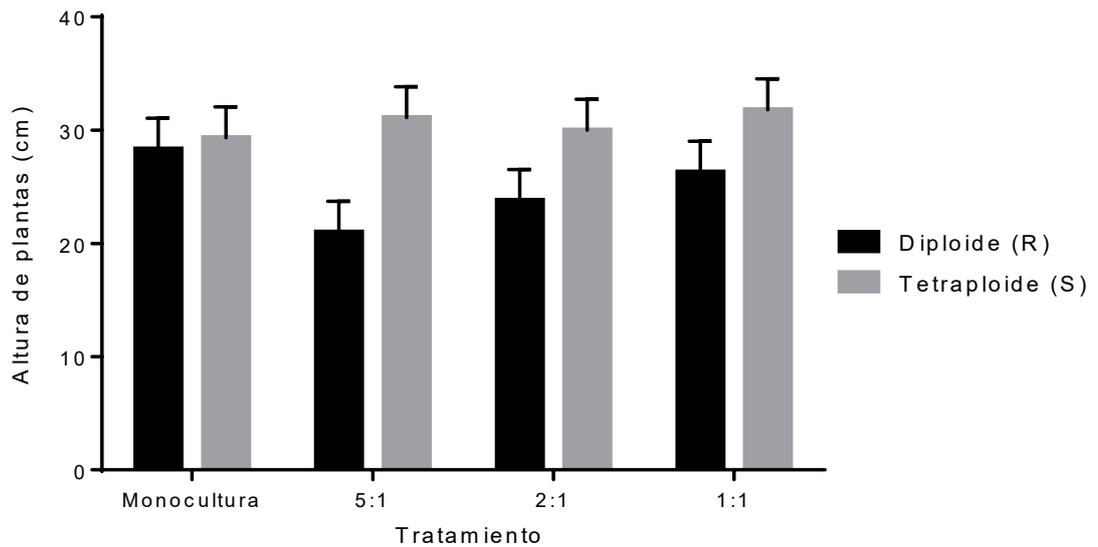


Figura 7. Altura de plantas (cm) de las poblaciones de *Lolium perenne* R y S en Z4.3, cultivados en monocultura y en consociaciones de 100, 250 y 500 pl R m⁻² cada 500 pl S m⁻². Se muestran los valores promedio y el error estándar. Barrow, 2018.

Producción de semillas

Los resultados del ANOVA para el tratamiento de monocultura la producción de semillas de *L. perenne* R y S no mostró diferencias significativas (Figura 8). Asimismo, se advierte que la producción de semillas del S fue de 44 g m⁻² y no presentó variaciones estadísticamente significativas entre tratamientos (monocultura ó consociaciones) pese a las distintas relaciones de consociación (Figura 8).

Por su parte, la producción de semillas de *L. perenne* R fue afectada significativamente por efecto de las relaciones de consociación. En las parcelas donde la relación fue de 2:1 y 5:1, *L. perenne* S produjo 74 y 76% más semillas que *L. perenne* R, respectivamente (Figura 8). La interacción genotipo (diploide-tetraploide) x *Tratamiento* (pl m⁻² de cada componente) tuvo un efecto significativo sobre esa variable (p<0,05).

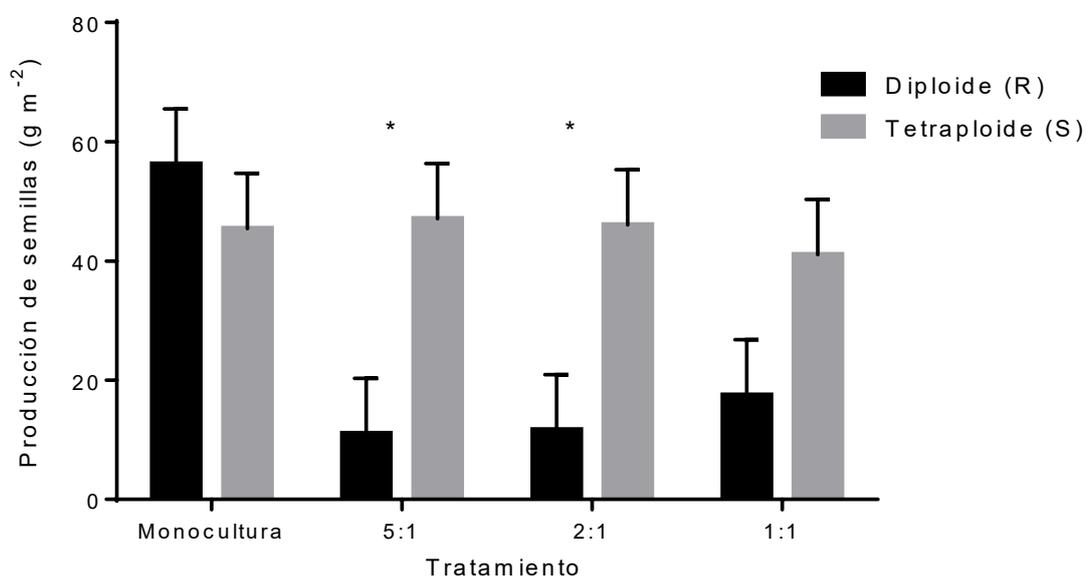


Figura 8. Producción de semillas ($g\ m^{-2}$) de *Lolium perenne* R y S, cultivados en monocultura y en consociaciones de 100, 250 y 500 pl R m^{-2} cada 500 pl S m^{-2} . Se muestran los valores promedio y el error estándar. Diferencias significativas entre componentes se indican con asterisco ($p < 0,05$). Barrow, 2018.

Habilidad competitiva

El análisis de la varianza mostró que los tratamientos de consociación tuvieron efecto altamente significativo sobre la agresividad ($p < 0,01$) y que el momento de evaluación a lo largo del ciclo del cultivo también afectó la agresividad del susceptible versus el resistente ($p < 0,01$), sin embargo no se halló interacción entre el tratamiento de consociación y el momento del ciclo considerado ($p = 0,12$). Por ello, se analizan las diferencias de agresividad en función de las consociaciones y los momentos de evaluación, pero los datos se presentan desagrupados en la Tabla 1 para observar los valores promedio en cada momento del ciclo del cultivo y tratamiento.

Los índices de agresividad calculados demuestran que la habilidad competitiva del resistente supera levemente al susceptible a igual densidad entre ambos

componentes de la consociación (relación 1:1, i.e. 500 pl m⁻² de cada componente) (Tabla 1). Esto se refleja en valores negativos de agresividad que indican que el susceptible no ejerció competencia sobre el otro componente. Asimismo, este efecto se advierte en los diagramas bivariados que muestran el rendimiento relativo de materia seca de plantas resistentes versus las susceptibles (Figura 9).

Sin embargo, cuando la relación se incrementó favoreciendo al susceptible (250 y 100 pl diploide m⁻² cada 500 pl tetraploide m⁻²), la agresividad de este material aumentó (Tabla 1). Así, a medida que aumentó la densidad del susceptible en la consociación (desde 100 pl m⁻² a 500 pl m⁻²) el valor de agresividad obtenido fue mayor, siendo significativas las diferencias para la relación 5:1 y 2:1 (Tabla 1). En tal sentido, en los diagramas bivariados los puntos correspondientes a las consociaciones 5:1 fueron los que se detectaron más distantes de la diagonal de A=0 (Figura 9).

Al considerar el momento a lo largo del ciclo del cultivo, los mayores índices de agresividad (0,12) fueron evidenciados en el estadio de Z9. Hasta entonces, en Z2.1 y Z4.3, los valores de agresividad tendieron a cero (Tabla 1; Figura 9).

Tabla 1. Índices de agresividad para producción de materia seca aérea de *Lolium perenne* S versus R en diferentes consociaciones 5:1, 2:1 y 1:1 (respectivamente 100, 250 y 500 pl R m⁻² cada 500 pl S m⁻²) y en tres momentos del ciclo: Z2.1, Z4.3 y Z9. Se presentan los valores promedio. Letras iguales indican diferencias no significativas entre promedios de consociaciones ó entre promedios de momentos ($p < 0,05$).

Momento	Consociación			Promedio
	5:1	2:1	1:1	
Z2.1	0,18	-0,04	-0,13	0,01 a
Z4.3	0,13	<0,01	-0,12	<0,01 a
Z9	0,19	0,15	0,02	0,12 b
Promedio	0,17 c	0,05 b	-0,06 a	

Cuando la agresividad se determinó considerando la producción de semillas de cada componente, se encontró que bajo la situación de 100 plantas resistentes por metro cuadrado cada 500 plantas susceptibles por metro cuadrado (5:1), la habilidad competitiva del susceptible fue la mayor detectada. En tanto, cuando la relación entre componentes fue 1:1 (para cada población 500 pl m⁻²) el índice de agresividad tendió a cero (Tabla 2; Figura 9).

Para el caso de la relación de consociación 2:1, el índice de agresividad mostró un valor intermedio respecto a las relaciones 5:1 y 1:1, sin diferenciarse significativamente de ninguna de las dos (Tabla 2).

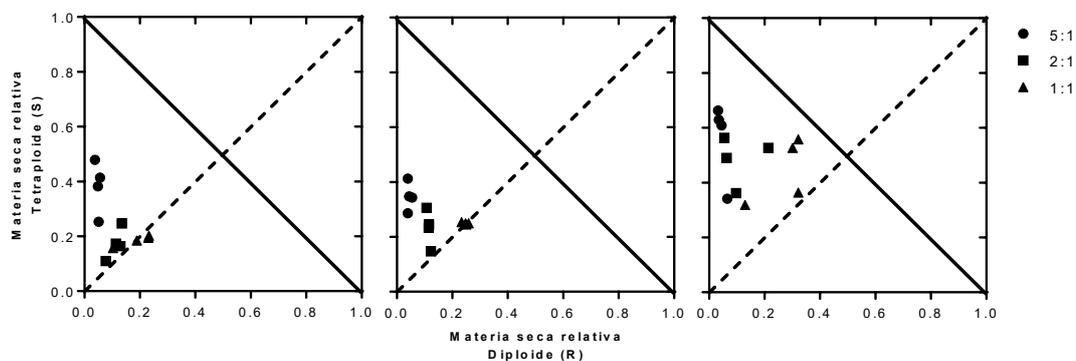


Figura 9. Diagramas bivariados basados en la producción de materia seca aérea de plantas diploides y tetraploides de *Lolium perenne* cultivadas en consociación de 100, 250 ó 500 pl diploide resistente m⁻² cada 500 pl tetraploide susceptible m⁻² (5:1, 2:1 y 1:1, respectivamente) en Z2.1 (a), Z4.3 (b) y Z9 (c). Se presentan los valores obtenidos en cada unidad experimental, relativos a la producción de materia seca de tratamientos de monocultura de igual bloque. La línea diagonal continua indica la condición de RYT = 1 y la línea diagonal discontinua la condición de agresividad (A) = 0. Barrow, 2018.

Tabla 2. Índices de agresividad para producción de semillas de *Lolium perenne* S versus R en diferentes consociaciones 5:1, 2:1 y 1:1 (respectivamente 100, 250 y 500 pl diploide m⁻² cada 500 pl tetraploide m⁻²). Se presentan los valores promedio. Letras iguales indican diferencias no significativas entre consociaciones (p<0,05).

Consociación		
<i>5:1</i>	<i>2:1</i>	<i>1:1</i>
0,41 b	0,28 ab	0,07 a

Sensibilidad a glifosato de la descendencia

Al analizar la supervivencia de los individuos de la población resistente y susceptible obtenidas de cada parcela de cultivo, luego de la aplicación de la dosis recomendada de glifosato (1012 g e. a. ha⁻¹), el análisis de la varianza indicó para el caso del susceptible que los tratamientos de consociación con el resistente no condujeron a un incremento significativo en el porcentaje de individuos resistentes de su progenie respecto a la frecuencia inicial (Tabla 3).

La interacción entre las fuentes de variación *Genotipo* (diploide-tetraploide) x *Tratamiento* (monocultura ó consociación en relaciones 1:1, 2:1 ó 5:1) fue altamente significativa (p<0,01). El resistente mostró un porcentaje de plantas resistentes superior al 65%, pero la progenie de plantas cultivadas en consociación con una relación 5:1 (tetraploides:diploides) presentaron una reducción significativa de la frecuencia de individuos resistentes en 19,7% respecto al tratamiento de monocultura (Tabla 3).

Tabla 3. Supervivencia de los susceptibles y resistentes (%) luego de la aplicación de una dosis recomendada de glifosato. Los individuos evaluados fueron obtenidas a partir de la descendencia de individuos cultivados en monocultura ó en consociación 1:1, 2:1 y 5:1 (individuos tetraploides:plantas diploides) y contrastado con aquellas generadas de semillas de la misma muestra que dio origen a sus parentales empleados en el experimento de campo (inicial). Letras iguales indican diferencias no significativas.

Material	Tratamiento	Supervivencia (%)
Tetraploide	Inicial	1,00 a
	Monocultura	4,92 a
	1:1	2,17 a
	2:1	2,15 a
	5:1	2,35 a
Diploide	Inicial	65,80 c
	Monocultura	68,96 c
	1:1	65,29 c
	2:1	68,75 c
	5:1	55,31 b



Figura 10. Sensibilidad a glifosato de la descendencia de individuos de *Lolium perenne* resistente y susceptible. A la derecha una unidad experimental del susceptible y a la izquierda del resistente, ambas procedentes de individuos cultivados en una parcela de consociación (relación 1:1).

DISCUSIÓN

Durante la primera etapa del ciclo (período Z2-Z3), en la consociación de resistente y susceptible no se advirtieron diferencias significativas en la producción de materia seca aérea de cada componente, incluso cuando la relación entre componentes fue a favor de una mayor proporción de individuos del susceptible (Figura 3). Al estado reproductivo, la producción de materia seca aérea del susceptible y del resistente, cultivados en monocultura ó bajo consociaciones 1:1 y 2:1 (500 pl m⁻² de cada componente y 500 pl resistente m⁻² cada 250 pl m⁻² susceptible, respectivamente), tampoco se diferenciaron significativamente (Figura 4). No obstante, cuando la relación de consociación fue 5:1, favoreciendo la densidad de individuos susceptibles versus resistentes, el componente susceptible superó significativamente en producción de materia seca aérea al resistente (Figura 4).

En consistencia a lo expuesto, recientemente se ha demostrado que variedades susceptibles de *L. perenne* se han asociado a una mayor producción de biomasa que las poblaciones resistentes, principalmente cuando son cultivadas bajo déficit hídrico (Lee et al., 2019).

En el mismo sentido, analizando la producción de materia seca al final del ciclo, en el presente trabajo el susceptible superó en producción al resistente cuando la relación de consociación fue de 5:1 y 2:1 (100 y 250 pl m⁻² del componente resistente m⁻² cada 500 pl m⁻² susceptible, respectivamente) (Figura 6). Interesantemente, las variaciones en la densidad de individuos del resistente no modificaron la producción de materia seca aérea del susceptible para las tres relaciones de consociación (Figura 6). Sin embargo, el resistente respondió en una menor producción de materia seca aérea al disminuir su densidad en la consociación (Figura 6).

Se ha demostrado que la capacidad de macollaje es uno de los principales factores que explican la producción de materia seca aérea en *Lolium perenne* y *L. multiflorum* (Gautier et al., 1999; Simic et al., 2009). La calidad de la luz que alcanza la base de las plantas, condicionada por la densidad de plantas, resultaría ser el factor que modula la extensión del período de macollaje y, por ende, que impacta en el crecimiento (Deregibus et al., 1983; Gautier et al., 1999). Teniendo en cuenta el diseño experimental, donde surco por medio se intercalaron ambos componentes, la materia

seca aérea producida por el susceptible no se afectó ante las variantes de densidad del resistente en los surcos linderos. Sólo la producción de materia seca del resistente fue afectada ante las variantes en su densidad, y la respuesta a la reducción de densidad no se habría compensado con un incremento en el macollaje que llegue a mantener la producción de materia seca aérea respecto a la mayor densidad evaluada. Bajo este contexto, la agresividad del susceptible frente al resistente fue condicionada por la relación de consociación como se discutirá posteriormente.

Rios (2019) comparó *Lolium perenne* diploide y tetraploide encontrando diferencias significativas entre rasgos morfológicos y agronómicos de ambos genotipos. La capacidad de macollaje, la biomasa aérea producida, la altura de la planta y la longitud de la espiga fue mayor para el genotipo de mayor ploidía. En el presente trabajo, se obtuvieron resultados consistentes a estos antecedentes al comparar la altura de plantas de la población diploide y tetraploide y tal carácter resultó estar asociado al genotipo sin ser condicionado por el tratamiento de consociación (Figura 7).

Considerando que la producción de materia seca aérea del resistente fue condicionada por el tratamiento de consociación, sin embargo esto no repercutió en la altura de las plantas, la relación tetraploide-diploide que deprimió la producción de esa población (5:1 y 2:1) habría impactado en la arquitectura de las plantas. En esas condiciones el resistente mostró similar altura entre consociaciones pero con una menor producción de materia seca de -25 a -48% (para la relación 5:1 y 2:1, respectivamente) respecto a la consociación 1:1 (Figura 6 y Figura 7).

Es sabido que aquellos individuos que alcanzan la mayor área foliar en el estrato más alto del canopeo presentan ventajas competitivas respecto a la captación de recursos bajo competencia por radiación solar (Falster y Westoby, 2003). Esta diferencia habría contribuido a favorecer al susceptible frente al resistente, resultando ser un factor capaz de ser explotado agronómicamente.

Entre los factores que influyen en la competencia por radiación solar se destaca el hábito de crecimiento, con esto, las plantas que crecen más erectas tienen una ventaja competitiva por la radiación solar, con respecto a plantas más rastreras (Falster y Westoby, 2003). Con lo cual, teniendo en cuenta que el susceptible mostró mayor crecimiento en altura, tal arquitectura habría favorecido la mayor captación de radiación

solar y por ende explicaría el mantenimiento del nivel de producción de materia seca aérea independientemente del tratamiento de consociación (Figura 7).

Se han determinado dos mecanismos generales por los cuales se establece el proceso de competencia vegetal. El primero de ellos involucra a la competencia por explotación de recursos, es decir que las plantas interactúan unas con otras en relación con el consumo de recursos (Booth et al., 2003). En tanto, la competencia por interferencia involucra una interacción directa entre los individuos que impide el acceso a los recursos a uno de los competidores (Reynolds, 1999). En este caso, la competencia por radiación solar, se daría en los estadios más avanzados del cultivo. Como demuestran los resultados arribados, el susceptible mostró una altura 25% superior al resistente y esto habría impactado en la mayor producción de materia seca aérea del susceptible (Figura 7).

En consistencia al impacto en la producción de materia seca aérea total, la masa de semillas producidas por *L. perenne* diploide resultó afectada significativamente por efecto de las relaciones de consociación. En las parcelas donde la relación fue de 2:1 y 5:1, el susceptible produjo 74 y 76% más semillas que el resistente, respectivamente (Figura 8).

Estas evidencias sugieren que la consociación podría tener un impacto en la perpetuación de los individuos resistentes a glifosato al considerar que ambos componentes, diploide resistente y tetraploide susceptible, pasarían a integrar el banco de semillas del suelo. Bajo las condiciones de los experimentos, el susceptible habría aportado mayor proporción de descendientes al banco de semillas. Considerando que el banco de semillas contribuye al proceso de enmalezamiento del/de los próximos ciclos (Chauhan y Gill, 2014), se esperaría que bajo similar dinámica de emergencia entre poblaciones, entre otros factores, se podría favorecer el incremento de la frecuencia de individuos susceptibles en detrimento de los resistentes. Sin duda, futuros experimentos deberían diseñarse para dilucidar estos efectos.

La producción de semillas es un rasgo de fecundidad clave que contribuye a la aptitud a nivel del genotipo (Maynard Smith 1998; Vila-Aiub et al. 2009, 2015). Yannicari et al. (2012), estudiando penalidades biológicas en poblaciones de *Lolium* resistentes a glifosato observaron que la reducida producción de semillas de individuos resistentes a glifosato se debía principalmente a la reducción de macollos reproductivos,

las espiguillas por planta y las semillas por espiguilla. Asimismo, Pedersen et al. (2007) informaron que en *L. perenne* resistente y susceptible a glifosato bajo interferencia con trigo, el peso de mil semillas de las plantas resistentes a glifosato fue menor (10% en promedio) que el de semillas de plantas susceptibles.

Considerando que la viabilidad de las semillas de *Lolium* spp. en el banco de semillas del suelo es baja, de alrededor de dos años, en particular si permanecen en superficie (Lewis 1973; Jensen 2010), los efectos de una gran contribución relativa de semillas susceptibles que tiendan a “diluir” la frecuencia de plantas resistentes podría impactar rápidamente en los años posteriores, siempre que se acompañe de otras prácticas de manejo integrado que reduzcan la presión de selección con el herbicida (Cousens y Mortimer, 1995; Steadman et al., 2006).

Teniendo en cuenta el impacto del tratamiento de consociación sobre la producción de materia seca aérea, la habilidad competitiva de ambas poblaciones fue contrastada. El índice de agresividad ha sido propuesto como una de las formas de cuantificar la habilidad competitiva de un cultivo frente a la maleza y viceversa (Mc Gilchrist, 1965; Snaydon, 1991; Satorre y Snaydon, 1992). En este trabajo se ha determinado la agresividad de *L. perenne* tetraploide frente a *L. perenne* diploide en tres momentos: Z2.1, Z4.3 y Z9.

Cuando la relación entre genotipos se incrementó favoreciendo al susceptible (250 y 100 pl diploide m⁻² cada 500 pl tetraploide m⁻²), la agresividad de este genotipo aumentó (Tabla 1). Consistentemente, cuando se consociaron 100 pl resistentes m⁻² con 500 pl susceptibles m⁻², el susceptible mostró mayor habilidad competitiva difiriendo significativamente del resto de los tratamientos (Tabla 1).

Esto explicaría la menor producción relativa de materia seca aérea del resistente bajo la consociación de 5:1 y 2:1 como se discutió antes. Del mismo modo, la mayor altura de las plantas susceptibles habría contribuido a la mayor agresividad de ese componente cuando las plantas resistentes se hallaban en menor proporción. Estos resultados contrastan con Sugiyama (1998) y Smith et al. (2003), quienes en experimentos sin restricciones nutricionales determinaron una mayor agresividad de genotipos tetraploides de *L. perenne* respecto a diploides incluso en una proporción 1:1.

En el presente trabajo, la mayor agresividad del susceptible se generó cuando se favoreció su proporción en la consociación. En relación a esto se ha demostrado que la

habilidad competitiva de ryegrass aumenta en relación con la densidad de la maleza. Scursioni y colaboradores (2012), hallaron en *L. multiflorum* versus trigo una tendencia a una superior competencia de la maleza cuando se incrementa su densidad. Y si bien la agresividad del cultivo resultó ser inferior bajo un ambiente de menor disponibilidad de nitrógeno, la respuesta de la habilidad competitiva de la maleza ante variaciones en su densidad se detectó en ambientes de alta y baja disponibilidad de nitrógeno (Scursioni et al., 2012). En consistencia a esto, los resultados del presente trabajo muestran que la disminución en la densidad del resistente (reflejada en las relaciones que favorecen la proporción de individuos susceptibles), condujo a incrementar la habilidad competitiva del componente susceptible (Tabla 1).

Cuando la densidad de plantas del resistente resultó ser la mitad respecto a aquella del susceptible (tratamiento de 250 pl diploides m⁻²), la agresividad de ambos componentes se habría igualado (agresividad = 0,05) (Tabla 1). En concordancia, cuando se consociaron 100 pl diploides m⁻² con 500 pl tetraploides m⁻², el susceptible mostró mayor habilidad competitiva difiriendo significativamente del resto de los tratamientos (Tabla 1).

No obstante esto, es destacable la evolución del índice de agresividad en los tres momentos de evaluación a lo largo del ciclo. Si bien, inicialmente la agresividad del susceptible frente al resistente rondó en valores cercanos a cero, hacia el final del ciclo (Z9) la habilidad competitiva se incrementó significativamente llegando a un promedio de agresividad de 0,12 (Tabla 1). Justamente, en la etapa del ciclo donde el contraste de crecimiento en altura y en producción de materia seca aérea habría favorecido al susceptible.

Acciaresi et al, (2003) encontraron que en un sistema *L. multiflorum*-trigo la principal competencia ocurre por recursos edáficos, sin embargo los autores demuestran que la interferencia por radiación fotosintéticamente activa parece tener lugar hacia el final del ciclo y se refleja en un bajo peso de mil de granos. Si bien la altura de las plantas explicaría la habilidad competitiva de gramíneas de invierno por el recurso aéreo, otras características que definen la estructura del canopeo como la orientación de tallos y hojas serían trascendentes (Satorre y Ghera, 1987; Falster y Westoby, 2003).

Cuando la habilidad competitiva del susceptible se evaluó considerando la producción de semillas en cada relación de consociación se encontró que la mayor

agresividad frente al resistente se generó bajo una relación 5:1 (Figura 9), en consistencia a lo hallado sobre producción de materia seca aérea (Tabla 2). Esta evidencia confirma que la densidad a la cual se encontró el resistente en relación de consociación condiciona la habilidad competitiva del susceptible. En concordancia, se ha demostrado que cuando *L. multiflorum* interfiere con trigo, la densidad a la que se encuentra la maleza condiciona la habilidad competitiva del cultivo, conduciendo a índices de agresividad ampliamente variables entre 0,2 y -0,3 (Acciaresi et al., 2001).

El impacto de la producción de semillas de cada componente y cómo se modificó ante las diferentes relaciones de consociación cobra importancia al considerar la sensibilidad a glifosato de la descendencia de individuos tetraploides y diploides. Como se indicó antes, bajo la relación de 2:1 y 5:1 (tetraploide:diploide), el susceptible produjo alrededor de 75% más semillas que el resistente, sin embargo resultó trascendente determinar variaciones en la sensibilidad de cada componente, ya sea para considerar el flujo de resistencia al susceptible como la variación de sensibilidad en el resistente..

Teniendo en cuenta las características de *L. perenne* como especie con elevado grado de alogamia (Yannicari et al., 2015), la consociación podría impactar en un incremento en la frecuencia de plantas resistentes asociado al “aislamiento” de la población diploide creciendo junto al tetraploide y considerando las barreras que limitarían su cruzamiento entre los diferentes niveles de ploidía (Griffiths, et al. 1970), podría contribuir a disminuir la frecuencia de individuos resistentes por el costo biológico asociado a la resistencia a glifosato en tal población (Yannicari et al., 2016) ó podría incrementar la frecuencia de plantas resistentes a glifosato en el material tetraploide.

Al tener en cuenta ese último punto, los tratamientos de consociación no impactaron en la frecuencia de plantas resistentes detectadas en la población susceptible (Tabla 3). Sin embargo, es destacable que entre el 1 y casi el 5% de la población tetraploide fueron capaces de sobrevivir a la dosis recomendada de glifosato (Tabla 3), evidenciando la baja sensibilidad de algunos individuos pese a tratarse de un material tetraploide comercial.

En tanto, la población diploide mostró una frecuencia de plantas resistentes a glifosato superior al 65% y por efecto del tratamiento de monocultura su frecuencia se

mantuvo sin mostrar diferencias significativas con el valor promedio inicial (Tabla 3). Sin embargo, bajo aquella consociación que propició la agresividad del susceptible frente al resistente, la frecuencia de plantas resistentes disminuyó significativamente en al menos 10 puntos porcentuales (Tabla 3). Interesantemente, el efecto de la población tetraploide sobre la frecuencia de individuos resistentes en la descendencia de la población diploide, se detectó sólo cuando se maximizó la habilidad competitiva del componente de mayor ploidía sin hallarse en las relaciones 1:1 ó 2:1.

Estos resultados se pueden explicar al considerar el impacto de la resistencia a glifosato en la capacidad reproductiva neta de la población diploide de *L. perenne* (Yannicari et al., 2016). Pese a que determinado mecanismo de resistencia le otorga a la maleza la capacidad de sobrevivir a un herbicida, frecuentemente aparece una penalidad ó costo biológico para la planta. La tasa de crecimiento, la tasa fotosintética, la habilidad competitiva ó en última instancia, la producción de semillas, pueden resultar ser menores en plantas resistentes respecto de la contraparte susceptible (Lodovichi y Yannicari, 2018). En el presente trabajo, la menor producción de semillas de individuos diploides resistentes respecto a aquellos diploides susceptibles podría ser la responsable de los cambios en la frecuencia de plantas resistentes como comunicaron Yannicari et al. (2016) trabajando con la misma población resistente. Experimentos específicos deberían llevarse a cabo para dilucidar las causas particulares de los cambios en la frecuencia de plantas resistentes bajo la consociación 5:1.

Sin dudas, como se discutió a lo largo del trabajo, la capacidad de *L. perenne* tetraploide de interferir con la población diploide dependió de la relación de consociación ajustada. Aquella que incluyó 500 plantas tetraploides por metro cuadrado cada 100 plantas diploides por metro cuadrado (5:1), condujo a la mayor agresividad del susceptible, a la menor producción de materia seca aérea y semillas del resistente y a la caída en la frecuencia de individuos resistentes de la descendencia del resistente.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis soportan la aceptación de la primera hipótesis planteada:

“La producción de semillas y materia seca aérea total de la población diploide resistente a glifosato es menor que la de la población tetraploide susceptible cuando se cultivan en menor o igual proporción”

La producción de materia seca aérea en la etapa reproductiva y la producción de semillas del resistente fue inferior al del susceptible cuando la relación de consociación favoreció al genotipo de mayor ploidía. A igual proporción de plantas diploides y tetraploides ninguno de los dos componentes mostró diferencias significativas entre sí respecto a esas variables. Sin embargo, la altura de planta de la población tetraploide fue superior a la de su contraparte diploide. Esta variable no fue afectada por la relación de consociación y se discutió su rol en la definición de la agresividad del susceptible frente al resistente a glifosato.

La habilidad competitiva de la población susceptible sólo tendió a cero cuando la relación frente al resistente fue de 500 plantas por metro cuadrado de cada componente. Siempre que la relación de densidad de plantas favoreció al susceptible la habilidad competitiva se incrementó mostrando valores positivos que advirtieron la mayor agresividad de ese componente frente al resistente. Asimismo, conforme progresó el ciclo, el susceptible incrementó su agresividad tanto determinada por la producción de materia seca aérea total como a partir de la producción de semillas.

Los resultados arribados permiten aceptar la segunda hipótesis de trabajo:

“La proporción de semillas resistentes producidas por la población diploide resistente es menor cuando se cultiva en una consociación con un cultivar tetraploide susceptible (en relación 1:5), respecto al porcentaje obtenido en la monocultura respectiva”

Como se indicó, la población diploide presentó una frecuencia inicial de plantas resistentes a glifosato superior al 65% y en respuesta al tratamiento de monocultura su frecuencia se mantuvo, sin embargo bajo aquella consociación que propició la agresividad del cultivar tetraploide frente al diploide (5:1, respectivamente), la

frecuencia de plantas resistentes disminuyó significativamente en al menos 10 puntos porcentuales.

La tercera hipótesis planteada sostiene:

“La proporción de semillas susceptibles producidas por el cultivar tetraploide susceptible no se modifica cuando se cultiva en consociación con una población diploide resistente a glifosato, respecto al porcentaje obtenido en la monocultura respectiva”.

Los resultados mostraron que los tratamientos de consociación no afectaron la frecuencia inicial de plantas resistentes del material comercial tetraploide. En función de esto se acepta la tercera hipótesis.

El presente trabajo se desarrolló con la idea de determinar cómo la consociación intraespecífica de *L. perenne* diploide resistente a glifosato y tetraploide susceptible incide en la habilidad competitiva de la maleza resistente y determinar cómo dicha interacción afecta la sensibilidad al herbicida de la descendencia. Los resultados de este trabajo son valorados bajo un contexto de manejo integrado de malezas, donde el problema de resistencia a herbicidas no puede ser abordado desde una estrategia fundamentada en un único método de control. Por el contrario, las evidencias presentadas indican que la habilidad competitiva de *L. perenne* tetraploide, bajo ciertas relaciones de consociación, puede impactar en la capacidad reproductiva neta de la población resistente y, además, aportar mayor proporción de semillas al banco de semillas del suelo. Incluso, se demostró que el impacto del cultivar de mayor ploidía podría afectar la frecuencia de individuos resistentes de la descendencia de la población diploide.

En gran medida, los casos de malezas resistentes a herbicidas han conducido a incrementar el interés por cultivos de cobertura que condicionen la dinámica de emergencia de malezas y afecten los procesos de enmalezamiento. Bajo este contexto, *L. perenne* presenta ventajas frente a otras gramíneas de invierno: muestra un crecimiento de mayor vigor relativo, parece adaptarse a siembras aéreas y, debido a su bajo peso de mil semillas, permite sembrar mayor número de plantas con igual volumen de semillas (comparado a avena, centeno u otro cereal de invierno). Ante esto, los resultados del presente trabajo de tesis cobran importancia para el diseño de nuevos experimentos que permitan dilucidar el impacto del empleo de *L. perenne* tetraploide

como cultivo de cobertura para el manejo de *Lolium spp.* resistente a herbicidas. Sin dudas, la posibilidad de explotar agronómicamente los resultados de esta tesis sólo sería posible bajo un contexto de manejo integrado de malezas que tienda a disminuir la presión de selección con herbicidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acciaresi, H. A., Chidichimo, H. O., y Sarandon, S. J. 2001. Wheat-*Lolium multiflorum* competence: effect of nitrogen application onto Argentinean varieties aggressivity. Cereal Research Communications: 451-458.
- Acciaresi H.A., Chichidimo H.O., y Sarandón S. 2003. Shoot and root competition in a *lolium multiflorum*-wheat association. Biological Agriculture and Horticulture 21: 15-33.
- Aldrich, R. J. 1984. Weed Crop Ecology: Principles in Weed Management. Massachusetts. Breton Publishers.
- Aldrich, R. J., & Kremer, R. J. (1997). *Principles in weed management* (No. Ed. 2). Iowa State University Press.
- Balfourier, F.; Imbert, C.; y Charmet, G. 2000. Evidence for phylogeographic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe: A cpDNA study. Theoretical and Applied Genetics 101: 131–138.
- Baylis, A. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: Strengths, weaknesses and prospects. Pest Management Science 56: 299–308.
- Bergelson, J., y Purrington, C. B. 1996. Surveying patterns in the costs of resistance in plants. American Naturalist 148: 536–558.
- Busi R., Porri A., Gaines T.A., y Powles S. B., 2018. Pyroxyasulfone resistance in *lolium rigidum* is metabolism-based. Pesticide Biochemistry and Physiology 148: 74-80.
- Booth B. D., Murphy S.D. y Swanton C.J. 2003. Interaction between population. I: competition and allelopathy. Weed ecology in natural and agricultural systems. CABI publishing, Oxon: 119-139.
- Borda M. R., 2016. Las condiciones meteorológicas de 2015. Actualización técnica en cultivos de cosecha fina 2015/16: 9-10.
- Borda M. R., 2019. Las condiciones meteorológicas de 2018. Actualización técnica en cultivos de cosecha fina 2018/19: 9-10.
- Busi R., Yu Q., Barrett-Lennard R., y Powles S., 2008. Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. Theoretical and Applied Genetics 117: 1281-1290.
- Chauhan, B., Gill, G. 2014. Ecologically based weed management strategies. En: Recent Advances in Weed Management. Chauhan, B. y Mahajan, G (Eds.), Springer: 411.

- Cobb, A. y Reade, J. 2010. Herbicides and plant physiology. Wiley-Blackwell, Shropshire.
- Cousens, R. y Mortimer, A.M. 1995. Dynamics of weeds populations. Cambridge, UK. Cambridge University Press.
- Culpepper, A. S., Flanders, J. T., York, A. C., & Webster, T. M. (2004). Tropical spiderwort (*Commelina benghalensis*) control in glyphosate-resistant cotton. *Weed Technology*, 18(2), 432-436.
- Culpepper, A. S. (2006). Glyphosate-induced weed shifts. *Weed Technology*, 20(2), 277-281.
- Darmency H. 1996. Movement of resistance genes among plants. En: Brown TM, editor. Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 209–220.
- De la Fuente, E.; Suárez, S. y Ghera, C. 2006. Soybean weed community composition and richness between 1995 and 2003 in the Rolling Pampas Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 115: 229-236.
- De la Fuente, E.; Suárez, S.; Ghera, C.; León, R. 1999. Soybean weed communities: relationships with cultural history and crop yield. *Agronomy Journal* 91: 234-241.
- Dekker, J. 1997. Weed diversity and weed management. *Weed Science* 45: 357-363.
- Deregibus, V.A., Sánchez, R.A. y Casal, J.J. 1983. Effects of light quality on tiller production in *Lolium spp.* *Plant Physiology* 72: 900-902.
- De Wit, C. D., y Van den Bergh, J. P. 1965. Competition between herbage plants. *Journal of Agricultural Science*, 13: 212-221.
- Ehrlich PR, Raven PH., 1969. Differentiation in populations. *Science* 165: 1228-1232.
- Falster, D. S., & Westoby, M. (2003). Leaf size and angle vary widely across species: what consequences for light interception?. *New Phytologist*, 158(3), 509-525.
- Gautier, H., Varler-Grancher, C. y Hazard, L. 1999. Tillering Responses to the light environment and to defoliation in populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) selected for contrasting leaf length. *Annals of Botany* 83: 423–429.
- Ghera, C.M., Martinez-Ghera, M.A., Brewer, T.G., Roush, M.L. 1994. Use of gene flow to control diclofop-methyl resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Weed Technology* 8: 15-24.
- Gressel, J. y Segel, L.A. 1978. The paucity of genetic adaptative resistance of plants to herbicides: possible biological reasons and implications. *Journal of Theoretical Biology* 75: 349-371.

- Griffiths D.J., Pegler R.A.D. y Thongchai Tonguthaisri. 1970. Cross compatibility between diploid and tetraploid perennial rye grass (*Lolium perenne* L.) Welsh Plant Breeding Station, Aberystwyth, Wales.
- Hakansson, S. 2003. Weeds and weed management on arable land: An ecological approach. CABI publishing, Cambridge.
- Harries, J.H. y Norrington-Davies, J. 1974. Competition for phosphate between a diploid and a tetraploid perennial ryegrass. *Journal of the British Grassland Society* 29: 9-16.
- Heap, I. 2004. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en: <http://www.weedscience.org>. Acceso: 18/03/2015.
- Heap, I. 2019. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en: <http://www.weedscience.org>. Acceso: 18/02/2019.
- Istilart, C.; Yanniccari, M. 2012. Análisis de la evolución de malezas en cereales de invierno durante 27 años en la zona sur de la pampa húmeda argentina. *Revista Técnica Especial: Malezas problema (Aapresid)*: 47-50.
- Jasieniuk M, Brûlé-Babel AL, Morrison IN. 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science* 44: 176–193.
- Jensen P. 2010. Longevity of seeds of *Poa pratensis* and *Lolium perenne* as affected by simulated soil tillage practices and its implications for contamination of herbage seed crops. *Grass and Forage Science* 65: 85-91.
- Johnson, W.; Davis, V.; Kruger, G.; Weller, S. 2009. Influence of glyphosate-resistant cropping systems on weed species shifts and glyphosate-resistant weed populations. *European Journal of Agronomy* 31: 162-172.
- Keshtkar, E., Abdolshahi, R., Sasanfar, H., Zand, E., Beffa, R., Dayan, F. E., & Kudsk, P. (2019). Assessing fitness costs from a herbicide-resistance management perspective: A review and insight. *Weed Science*, 67(2), 137-148.
- Kleffmann, Partner, S.R.L. 2008. Mercado argentino de productos fitosanitarios 2008. Reporte de Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), Buenos Aires.
- Larran A., Palmieri V. E., Perotti V. E., Lieber L., Tuesca D. y Permingeat H. Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina. 2017. *Pest Management Science* 73: 2578-2584.

- Lee, M., Howard-Andrews, V., Chester, M. 2019. Resistance of multiple diploid and tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties to three projected drought scenarios for the UK in 2080. *Agronomy* 9: 159.
- Lewis J. 1973. Longevity of crops and weed seeds: survival after 20 years in soil. *Weed Research* 13: 179-191.
- Lodovichi M. V. y Yannicari M. 2018. *Lolium Perenne* L. En Malezas e Invasoras de la Argentina. Tomo III: Historia y biología: 511-523.
- Lorraine-Colwill, D., Powles, S., Hawkes, T., Preston, C., 2001. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum* Gaud. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 545-550.
- Loureiro I., Escorial M.C., Chueca M.C. 2016. Pollen-mediated movement of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. *Plos One* 11:6.
- Marshall, M. W., Al-Khatib, K., & Maddux, L. (2000). Weed community shifts associated with continuous glyphosate applications in corn and soybean rotation. In *Proceedings of the Western Society of Weed Science* (Vol. 53, pp. 22-25).
- Martinez-Ghersa, Ghersa C.M., Satorre E. H. 2000. Coevolution of agricultural systems and their weed companions: implications for research. *Field Crops Research* 67: 181-190.
- Maynard S. J. 1998. *Evolutionary genetics*. Oxford University Press.
- McGilchrist, C. A. 1965. Analysis of competition experiments. *Biometrics*: 975-985.
- Miller, T.E. 1996. On quantifying the intensity of competition across gradients. *Ecology* 77: 978-981.
- Morichetti S., Cantero J.J., Núñez C., Barboza G. E., Espinar L., Amuchastegui A., Ferrell J. 2013. Sobre la presencia de *Amaranthus palmeri* (Amaranthaceae) en Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 48: 347-353.
- Neve P., Vila Aiub M., Roux F., 2009. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytologist* 107: 239-52.
- Olea, I. 2013. *Sorghum halepense*, *Echinochloa colona* y otras posibles malezas resistentes a glifosato en el Noroeste Argentino. I Seminario Internacional: Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. INIA, Uruguay.
- Pandolfo, C. E., Presotto, A., Carbonell, F. T., Ureta, S., Poverene, M., y Cantamutto, M. 2016. Transgenic glyphosate-resistant oilseed rape (*Brassica napus*) as an invasive weed in Argentina: detection, characterization, and control alternatives. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 24081-24091.

- Pedersen P. Bolette, Neve Paul, Andreasen Christian, Powless Stephen B. 2007. Ecological fitness of a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population: Growth and seed production along a competition gradient. *Basic and applied Ecology* 8: 258-268.
- Perez, A., Kogan, M. 2001. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Research* 43: 12-19.
- Perotti, V. E., Larran, A. S., Palmieri, V. E., Martinatto, A. K., Alvarez, C. E., Tuesca, D., Permingeat, H. R. 2019. A novel triple amino acid substitution in the EPSPS found in a high-level glyphosate-resistant *Amaranthus hybridus* population from Argentina. *Pest Management Science* 75: 1242-1251.
- Polok, K. 2007. Molecular evolution of the genus *Lolium* L. Olsztyn. Studio Poligrafii Komputerowej.
- Poorter, H. 1989. Interspecific variation in relative growth rate: on ecological causes and physiological consequences. En: Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants. Lambers, H. Cambridge, M. L., Konings, H. y Pons, T. L. SPB Academic Publishing, 45-68.
- Powles, S.; Yu, Q. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61: 317-347.
- Preston, C., Tardif, F. J., & Powles, S. B. 1996. Multiple mechanisms and multiple herbicide resistance in *Lolium rigidum*.
- Preston, C.; Wakelin, A.; Dolman, F.; Bostamam, Y.; Boutsalis, P. 2009. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. *Weed Science* 57: 435-441.
- Puricelli, E., Tuesca, D., 2005. Weed density and diversity under glyphosate-resistant crop sequences. *Crop Protection* 24: 533-542.
- Purrington CB. 2000. Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 305–308.
- Radosevich S., Holt J., Ghersa C. 1997. *Weed ecology: implications for Management*. Second edition.
- Reynolds, H. L. 1999. Plant interactions: competition. En: Pugnaire F.I. y F. Valladares (editores). *Handbook of Funcional Plant Ecology* Marcel Dekker Inc., New York (EEUU). 649-676.
- Rios, E. F., Kenworthy, K. E., Gezan, S. A., y Munoz, P. R. 2019. Genetic parameters for phenotypic traits in annual ryegrass. *Crop Science* 59: 1-13.

- Simarmata, M., Kaufmann, J. E., y Penner, D. 2003. Potential basis of glyphosate resistance in California rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science* 51: 678 – 682.
- Simić, A., Vučković, S., Maletić, R., Sokolović, D., Djordjević, N. 2009. The impact of seeding rate and inter-row spacing on Italian ryegrass for seed in the first harvest year. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 33: 425-433.
- Satorre, E.H. y Ghera, C.M. 1987. Relationship between canopy structure and weed biomass in different winter crops. *Fields Crops Research* 17: 37-43.
- Satorre E.H. y Snaydon R.W. 1992. A comparison of root and shoot competition between spring cereals and *Avena fatua* L. *Weed Research* 32: 45-55.
- Scursoni, J. A., Palmano, M., De Notta, A., y Delfino, D. 2012. Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) density and N fertilization on wheat (*Triticum aestivum* L.) yield in Argentina. *Crop Protection* 32: 36-40.
- Smith K.N., McFarlane M., Croft V., Trigg P., Kearney, G. 2003. The effects of ploidy and seed mass on the emergence and early vigour of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 43: 481-483.
- Snaydon R.W. 1991. Replacement or additive designs for competition studies. *Journal of Applied Ecology*. 28: 930-946.
- Steadman, K.J., Eaton, D.M., Plummer, J., Ferris, D.G., Powles, S. 2006. Late-season non-selective herbicide application reduces *Lolium rigidum* seed numbers, seed viability, and seedling fitness. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 133–141.
- Strauss S.Y., Rudgers J.A., Lau J.A., Irwin R.E. 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 278–285.
- Sugiyama, S. 1998. Differentiation in competitive ability and cold tolerance between diploid and tetraploid cultivars in *Lolium perenne*. *Euphytica* 103: 55-59.
- Tuesca, D., Puricelli, E., & Papa, J. C. 2001. A long-term study of weed flora shifts in different tillage systems. *Weed Research*, 41(4), 369-382.
- Vandermeer, J., 1989. *Ecology of Intercropping*. Cambridge. University Press, Cambridge.
- Vigna, M. R.; López, R.L. 2004. Habilidad competitiva de verdeos de invierno frente a *lolium multiflorum*. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Estación experimental INTA Bordenave.

- Vigna, M. R. et al. 2008. Estudios de curvas dosis-respuesta de poblaciones de *Lolium multiflorum* a glifosato en el SO de Buenos Aires, Argentina. Congresso brasileiro da ciencia das plantas daninhas, 26.; Congreso de la asociación latinoamericana de malezas, 18. Ouro Preto. Anales, Ouro Preto. 13 .
- Vigna, M. y Mendoza, J. 2015. Presencia de poblaciones de *Hirschfeldia incana* (L.) resistentes metsulfuron-metil en el SO de Buenos Aires, Argentina. En XXII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM). I Congreso de la Asociación Argentina de Ciencia de las Malezas (ASACIM). Buenos Aires-Argentina (9-10).
- Vila-Aiub M. M., Neve P. and Powles S.B. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New phytologist* 184: 751-767.
- Vila-Aiub, M.; Balbi, M.; Gundel, P.; Ghersa, C.; Powles, S. 2007. Evolution of glyphosate-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean. *Weed Science* 55: 566-571.
- Vila-Aiub, M.M. Ribas A Vidal, Balbi M.C., Gundel P.E., Trucco F. y Ghersa C.M., 2008. Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Management Science* 64: 366-371.
- Vila-Aiub M.M., Yu Q., Han H., Powles S. B. 2015. Effect of herbicide resistance endowing Ile-1781-Leu and Asp-2078-Gly ACCase gene mutations on ACCase kinetics and growth traits in *Lolium rigidum*. *Journal of Experimental Botany* 66: 4711-4718.
- Webster, T. M., & Sosnoskie, L. M. 2010. Loss of glyphosate efficacy: a changing weed spectrum in Georgia cotton. *Weed Science*, 58(1), 73-79.
- Weed Science Society of America. 1998. Herbicide resistance and herbicide tolerance defined. *Weed technology*. 12: 789.
- Yanniccari M., Istilart C., Giménez D.O., Castro A.M., 2012. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. *Crop Protection* 32: 12-16.
- Yanniccari, M., Istilart, C., Giménez, D. O., & Castro, A. M. 2015. Inheritance of glyphosate resistance in *Lolium perenne* and hybrids with *Lolium multiflorum*. *Crop Protection*, 71, 72-78.
- Yanniccari M., Vila-Aiub M., Istilart C., Acciaresi H., y Castro A.M., 2016. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is associated with a fitness penalty. *Weed Science* 64: 71-19.

- Yanniccari M., Gigón R., Molfese E., Istilart C., Astiz V. 2016b. Pérdidas de rendimiento en trigo y cebada asociadas a la interacción con *Lolium perenne*. Actualización técnica en cultivos de cosecha fina 2015/16: 146-157.
- Yanniccari M., Istilart C., Giménez D.O., Castro A.M., 2018. Dynamics of Glyphosate resistance in *Lolium perenne* L.: pollen-mediated gene flow under field conditions in Argentina. *Agronomy* 8: 286.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, 14(6), 415-421.