

Universidad Nacional de La Plata

“Control de *Lolium multiflorum* (raigrás) Presumiblemente Resistente a Glifosato.”

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

Ing. Agr. Luciana Gismano



Director: Dr. Juan José Guiamet.

Evaluadores: Dr. Eduardo Puricelli

Ing. Agr. Mario Vigna

Dr. Julio Scursoni

Fecha de Defensa 27 de Noviembre 2020

Dedicatoria:

Dedicado a quienes día a día, con sus palabras, sus ideas, sus pensamientos dejaron una huella en mi vida. A quienes me alentaron y me alientan a seguir descubriendo nuevos caminos, desde su lugar de colegas, amigos o “guías”, queriendo o sin querer, me animaron a seguir creciendo en mi carrera. A aquellos que sin saberlo me mostraron y me enseñaron sobre una nueva y apasionante área desconocida por mí, de esta profesión.

Agradecimientos:

En primer lugar, quisiera agradecer al Ing. Agr. Luis “Colo” Allieri quien confió en mí, me guió desde el principio aportando su tiempo e invaluable experiencia para colaborar con este trabajo, pero más aun siendo parte de mi formación profesional.

Agradezco a mi director Dr. Ing. Agr. Juan José Guiamet, por su apoyo, por sus aportes y su confianza y por compartir sus conocimientos en mi trabajo.

Al Dr. Ing. Agr. Marcos Yannicari por su colaboración y soporte en este trabajo.

A mis padres por su esfuerzo, por ser mi soporte, por darme la mejor educación y por incentivar me a seguir poniéndome nuevos objetivos. A mis hermanas por su ayuda constante.

A mis amigos y compañeros de trabajo, quienes desde su lugar aportaron su granito de arena para que pueda realizar esta Maestría.

A Ricardo Quevedo, de Picaso semillas por su buena predisposición ante mis llamados y por cederme semillas para las pruebas.

A Armando “Tito” López, mi compañero de vida y mi sostén, quien con su amor y su apoyo incondicional me incentivó a seguir, y colaboró directamente en las tareas prácticas de esta tesis.

A mi hija Martina, que es la luz de mi vida, por permitirme tomar tiempos para concretar esta tarea que fue muy importante para mí. Y mi nueva bebé Olivia.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

Índice de Tablas	5
Índice de Figuras	6
Abreviaturas	7
Resumen	9
Abstract	9
CAPÍTULO 1	11
1. Introducción	12
1.1. El género <i>Lolium</i> (Raigrás)	13
1.2. Caracteres biológicos y comportamiento de <i>Lolium multiflorum</i>	14
1.3. Tolerancia o resistencia	17
1.3.1. Evolución de la resistencia a herbicidas	17
1.3.2. <i>Fitness</i>	19
1.3.3. Mecanismos de resistencia	21
1.4. Hormesis	25
1.5. . Glifosato	26
1.6. . Mercado de fitosanitarios	28
1.7. . Graminicidas, características y evolución de resistencia	29
1.8. Resistencia a herbicidas de <i>Lolium</i> spp.	30
1.9. <i>Lolium</i> sp. en Argentina	32
1.10. Objetivo.....	36
1.11. Hipótesis.....	36
Capítulo 2.....	37
2 Materiales y Métodos	38
CAPÍTULO 3.....	42
3. Resultados	43
CAPÍTULO 4.....	58
Discusión y conclusiones	59
Bibliografía	61
ANEXO	74

Índice de Tablas

Tabla 1: Tratamientos con diferentes dosis de glifosato 60% p/v.....	39
Tabla 2: Tratamientos con cletodim (“Select” de Bayer) y haloxyfop (“Galant HL” de Dow Agrosiences)	40
Tabla 3: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con glifosato 14DDA.	44
Tabla 4: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con glifosato 40DDA	44
Tabla 5: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con glifosato 60DDA	44
Tabla 6: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con glifosato 90 DDA.....	45
Tabla 7 a: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con haloxyfop 14DDA.....	46
Tabla 7 b: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con cletodim14DDA.....	47
Tabla 8 a: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con haloxyfop 40DDA.....	47
Tabla 8b: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con cletodim 40DDA	48
Tabla 9 a: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con haloxyfop 60DDA.....	48
Tabla9 b: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con cletodim 60DDA.....	49
Tabla 10 a: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con haloxyfop 90DDA.....	49
Tabla 10 b: Análisis estadístico de control de <i>L. multiflorum</i> con cletodim 90DDA	50
Tabla 11: Comparación de medias de MS (g/m^2) de parcelas tratadas con glifosato	51
Tabla 12: Análisis estadístico de MS en parcelas tratadas con haloxyfop.....	52
Tabla 13: Análisis estadístico de MS en parcelas tratadas concletodim.....	52
Tabla 14: Altura en la población supuestamente resistente.....	53
Tabla 15: Altura en la población susceptible a glifosato.....	54
Tabla 16: MS por planta sobre la población de <i>Lolium</i> supuestamente resistente a glifosato.	55
Tabla 17: MS por planta en la población de <i>Lolium</i> susceptible a glifosato	57

Índice de Figuras

Figura 1: <i>Lolium multiflorum</i>	16
Figura 2: Ubicación geográfica del lote donde se desarrolló el ensayo de <i>L. multiflorum</i>	39
Figura 3: Control de <i>L. multiflorum</i> con distintas dosis de glifosato en diferentes momentos (DDA) luego de la aplicación	43
Figura 4a: Control de <i>L. multiflorum</i> con diferentes dosis de haloxyfop (gia/ha) en distintos momentos después de la aplicación. (DDA)	45
Figura 4 b: Control de <i>L. multiflorum</i> con distintas dosis (g i.a./ha) de cletodim en diferentes momentos DDA	46
Figura 5: MS de <i>L. multiflorum</i> presuntamente resistente a glifosato.....	50
Figura 6 a: MS (g de MS/m ²) obtenidas en las parcelas tratadas con haloxyfop.....	51
Figura 6 b: MS (g de MS/m ²) obtenidas en las parcelas tratadas con cletodim	52
Figura 7: Altura de plantas de la población supuestamente resistente a glifosato.....	53
Figura 8: MS en g/planta de <i>Lolium</i> posiblemente resistente a glifosato 40DDA.....	54
Figura 9: Peso seco medio por planta de <i>Lolium</i> susceptible a glifosato 40DDA.....	56
Figura 10: Curva dosis respuesta	58

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4- diclorofenoacético.
°C	Grados centígrados.
ACCasa	Acetil CoA Carboxilasa
ALS	Acetolactato sintasa.
cm ³	Centímetros cúbicos.
cm	Centímetros.
CO ₂	Dióxido de carbono.
DDA	Días después de la aplicación.
DMA	Dimetilamina
DL ₅₀	Dosis letal media.
e.a.	Equivalente ácido.
E.E.	Error estándar.
EPSPs	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa.
ESP	Enolpiruvilsiquimato 3 fosfato.
FSII	Fotosistema II.
gl.	Grados de libertad.
GR50	Dosis de inhibición del crecimiento al 50 %.
g	gramos
gi.a.	gramos de ingrediente activo
ha	Hectárea.
h	Horas.
I ₅₀	Concentración o dosis de inhibición media.
ISTA	International Seed Testing Association
IR	Índice de resistencia.
kg	Kilogramos.
km	Kilómetro
L	Litro

log	Logaritmo.
m	Metros
MCPA	Ácido 2-metil-4-cloro-fenoxiacético
mm	Milímetros.
m ²	Metros cuadrados.
MS	Materia seca
PEP	Fosfoenolpiruvato.
ppm	partes por millón.
RR	Resistente a RoundUp.
Rubisco	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa.
RuBP	Ribulosa-1,5-bifosfato.
s.	siglo.
SC	Siembra convencional
SD	Siembra directa.
spp.	Varias especies dentro del género.
T	Tonelada
Trt.	Tratamientos
v.g.	<i>verbi gracia</i>
v/v	Volumen en volumen.
WSSA	Weed Science Society of America.

Resumen

Se realizó un estudio de dosis-respuesta con distintos herbicidas en una población de *Lolium multiflorum* de Solís (provincia de Buenos Aires) presente en barbechos y cultivos de invierno y difícil de controlar con glifosato. En el campo se aplicó glifosato 60 % solo a las dosis de 60, 120, 240, 480, 960, 1920, 3840 y 7680 gi.a./ha y glifosato 60% (960gi.a./ha) en mezcla con haloxyfop (15, 30, 45, 60, 75, 90, 115gi.a./ha) y a su vez se aplicó glifosato en mezcla con cletodim (15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 gi.a./ha). Se evaluó el porcentaje de control, porcentaje de supervivencia y materia seca (MS). En una segunda etapa, en invernáculo, se comparó la población resistente con una susceptible aplicando solo distintas dosis de glifosato. Se evaluó MS, altura, y porcentaje de supervivencia de las plantas.

La población problema es resistente a glifosato, con un índice de resistencia (IR) = 2,27. De las pruebas se obtuvo una supervivencia en el campo de 20% de los individuos con la dosis máxima de glifosato (7680gi.a./ha). En el campo, a los 60DDA, en las tres dosis superiores de glifosato no hubo diferencias en la tasa de supervivencia de las plantas de la población resistente que alcanzaron el menor peso seco diferenciándose del testigo. Las plantas fueron severamente afectadas, pero no se logró control total. Las dosis menores a 480gi.a./ha generaron un efecto de hormesis, evidenciando una mayor acumulación de materia verde y seca de las plantas.

La evaluación de MS de la población susceptible también mostró un efecto de hormesis. En el campo, dosis iguales o superiores a 60gi.a./ha de haloxyfop y 90gi.a./ha de cletodim realizaron un buen control sin necesidad de realizar nuevas aplicaciones.

Palabras clave: *Lolium multiflorum*, raigrás, glifosato, resistencia a herbicidas.

Abstract

A dose-response study was carried out in a population of *Lolium multiflorum* from Solís (Buenos Aires) present in fallow and winter crops, difficult to control with glyphosate. In the field, glyphosate (60% w/v) was applied at doses of 60, 120, 240, 480, 960, 1920, 3840 and 7680 g a.i. / ha) alone and additionally glyphosate 60% (960 g a.i. / ha) was applied in mixtures with haloxyfop (15, 30, 45, 60, 75, 90, 115 g a.i. / ha) and cletodim (15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 g a.i. / ha). Control percentage, survival percentage and dry matter (MS) were evaluated. In a second stage, in a greenhouse experiment, the resistant population was compared with a susceptible population applying only different doses of glyphosate alone. MS, height, and % of plants survival was evaluated.

The population from Solís was found to be resistant to glyphosate, with a resistance index (RI) of 2.27. In the field, 20% of the individuals survived the maximum dose of glyphosate (7680 g a.i./ha). At 60 days after application, the 3 higher doses of glyphosate did not show differences between them, reaching the lowest dry weight, which was statistically different from the non-treated control. The plants treated with the 3 highest doses of glyphosate were severely affected but total control was not achieved. Hormesis was observed with doses lower than 480 ga.i. /ha, evidenced by a greater amount of green and dry matter.

MS of the susceptible population also showed a hormesis effect. In the field, the percentage of visual control with doses equal to or greater than 60 g i.a./ha of haloxyfop and 90 g i.a./ha of cletodim confirmed a good control without the need for further applications.

Palabras clave: *Lolium multiflorum*, raigrás, glifosato, resistencia a herbicidas.

CAPÍTULO 1

1. Introducción

En Argentina, con el desplazamiento de la ganadería a zonas marginales, la superficie que antes era ocupada por praderas y pastizales naturales en la llanura pampeana se fue destinando a otros cultivos, fundamentalmente agrícolas. El paisaje florístico fue cambiando a lo largo de las décadas, al punto tal que *Lolium multiflorum* y otras especies naturalizadas fueron quedando restringidas a los márgenes de los lotes agrícolas. Posteriormente, *L. multiflorum* ingresó al interior de los lotes y actualmente es considerada una maleza de importancia.

Con el incremento de la población mundial, la demanda de alimentos va en crecimiento constante (FAO, 2009) y las exigencias en los rindes son cada vez mayores. Los cultivos genéticamente modificados y la siembra directa, requieren de una mayor aplicación de herbicidas. El principal herbicida utilizado es glifosato, además de este herbicida se dispone de una acotada gama de principios activos dentro de una reducida cantidad de modos de acción.

Al comienzo del uso de glifosato el control de malezas no era un problema, ya que este herbicida era eficaz para controlar prácticamente todas las malezas. Al aumentar la frecuencia de uso del herbicida se han seleccionado muchas poblaciones de especies resistentes a glifosato (Papa, 2009).

La presión de selección ejercida por el conjunto de componentes del modelo agrícola basado en insumos, favoreció la manifestación de los problemas actuales de malezas caracterizados como a) malezas “duras” o de difícil control o tolerantes a los herbicidas disponibles, en especial a glifosato y b) malezas resistentes a herbicidas, en especial a glifosato (Papa, 2011). En coincidencia con esto Scursoni *et al.* (2006) determinaron que el uso repetitivo de este herbicida generó escapes de malezas y pérdida de diversidad florística, en un estudio realizado durante 2 años consecutivos sobre suelo estadounidense, desde Minnesota hasta Luisiana. Mientras que, en Argentina, Puricelli y Tuesca (2005) determinaron también un cambio en la comunidad florística luego de 5 años de estudio.

Esto ha obligado a los productores y asesores a generar un “cambio” en el manejo de las aplicaciones de herbicidas en los cultivos. Hasta hace unos años con las aplicaciones de glifosato los problemas se resolvían fácilmente, en la actualidad los lotes reciben

mayor número de aplicaciones y los técnicos están más pendientes de las malezas que deben controlar, como así también de los herbicidas que seleccionan para cada situación.

1.1. El género *Lolium* (Raigrás)

El género *Lolium* (familia: Poaceae o Gramineae, subfamilia: Pooideae, Tribu: Poeae) está formado por ocho especies (Terrel, 1968) nativas de Europa, norte de África y Asia occidental, que se han distribuido en áreas templadas de todo el planeta. Tres de estas especies tienen importancia económica: *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* y *Lolium rigidum* (Inda Aramendía, 2005), tanto por sus características forrajeras como por ser componentes de céspedes. Sin embargo, esas mismas especies se constituyen en malezas cuando crecen en áreas cultivadas (Polok, 2007).

Lolium perenne L. y *Lolium temulentum* fueron originalmente descritas por Linneo en *Species plantarum* (1753). Linneo diferenció las dos en base a la presencia de aristas. *L. perenne* no tiene aristas, mientras que *L. temulentum* sí las posee. En 1778 Lamark describió una tercera especie de *Lolium*, *L. multiflorum*. La especie posee aristas, pero se diferencia de las otras dos especies por el elevado número de flores en cada espiguilla. Es nativa de Europa, se comenzó a cultivar en Lombardía (Italia) en los siglos XIII–XIV, aunque en ocasiones se la considera maleza. Se encuentra en toda Europa, norte de África y Asia (Inda Aramendía, 2005; Vibrans, 2009).

Los bancos de semillas transitorios de especies estivales, incluyen un gran número de gramíneas, cuyas semillas se dispersan hacia el final de la primavera y durante el verano, para luego germinar de manera sincronizada en las condiciones frescas y húmedas del otoño. Entre las especies encontradas en los estudios realizados por Thompson y Grime (1979) en diez ambientes diferentes de Inglaterra se encuentra *L. multiflorum* (De Souza *et al.*, 2006).

Lolium perenne, *L. multiflorum* Lam., *L. rigidum* Gaud. y *L. canariense* Steud. Son polinizados por el viento y tienen reproducción cruzada (alógamia) (Inda Aramendía, 2005). Esto favorece la dispersión del polen en áreas mayores que las que corresponden a especies autóгамas. En la mayoría de las Poaceas el polen permanece viable por menos de 3 horas (Feiy Nelson, 2003; Luna *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). Sin embargo, un

modelo de simulación ha sugerido que la deriva de polen en *L. perenne* puede ocurrir a distancias mayores a 1000m (Giddings, 2000).

Han sido descritos híbridos naturales entre las especies con reproducción cruzada, y experimentalmente se ha mostrado que los cruzamientos son fáciles de hacer (Jenkin, 1954; Inda Aramendia, 2005), generando semillas que germinan sin dificultad.

Las especies alógamas de *Lolium* spp. son muy similares. Se pueden diferenciar en base al tamaño de la planta, por ejemplo la altura a los 30 días de emerger la espiga: *L. rigidum* $81,0 \pm 17,3$ cm; *L. multiflorum* $104,8 \pm 17,2$ cm; *L. perenne* $73,7 \pm 12,4$ cm; longitud de la espiga: *L. rigidum* $28,4 \pm 7,4$ cm; *L. multiflorum* $37,8 \pm 8,0$ cm; *L. perenne* $28,0 \pm 7,8$ cm), el número de flores por espiguilla *L. rigidum* $10,7 \pm 1,8$; *L. multiflorum* $14,0 \pm 3,1$; *L. perenne* $12,9 \pm 2,2$ y la presencia o ausencia de aristas en la flor $\pm 9,8$; *L. multiflorum* $55,2 \pm 33$; *L. perenne* $0,1 \pm 1,1$ (Inda Aramendia, 2005).

Para discernir, al estado vegetativo, entre las especies de raigrás perenne y anual (*L. perenne* y *L. multiflorum*), el ISTA (International Seed Testing Association) recomienda el análisis de la prefoliación (disposición de cada hoja al desplegarse de la yema). Así, el raigrás anual presenta prefoliación convoluta (hoja arrollada sobre sí misma) y el raigrás perenne, prefoliación conduplicada (hoja plegada en dos a lo largo de la nervadura) (Colabelli *et al.*, 2001; Yannicari *et al.*, 2011). Según la caracterización de USDA, *Lolium multiflorum* se clasifica como una subespecie, denominándose *Lolium perenne ssp multiflorum*. En este caso principalmente diferencian ambos biotipos por la duración de su ciclo (anual/bianual o perenne). (USDA, 2018)

Lolium multiflorum (raigrás anual), fue ingresada en nuestro país como una especie forrajera por su alto valor nutricional, y se ha naturalizado en toda la región pampeana argentina (Marzocca, 1976).

1.2. Caracteres biológicos y comportamiento de *Lolium multiflorum*

Descripción botánica

Lolium multiflorum es una planta herbácea, glabra, de cañas erguidas, puede variar entre 30 cm a 1m de altura dependiendo del ambiente y forma matas de tamaño variable.

(Gigón *et al.* 2017). La tasa de crecimiento de las plántulas es inicialmente baja, pero cuando la planta expande su cuarta hoja, se inicia el período de macollaje y la tasa de crecimiento se incrementa (Yanniccari, M. y Acciaresi, H. 2013). Sus hojas tienen una lígula de hasta 2mm y aurículas (Figura 1). La prefoliación es convolutada y posee láminas de 4 a 8mm de ancho por 10 a 20cm de largo, glabras de color verde brillante en el envés. Esta especie posee espigas dísticas de hasta 35cm de largo, con espiguillas solitarias, aristadas, sésiles, alternas, colocadas en el mismo plano del raquis flexuoso en cada uno de los nudos. Las semillas son cariopses oblongo-lanceolados de 6 a 8mm color castaño.

Figura 1: *Lolium multiflorum*- a: vista parcial de la inflorescencia en espiga; b: detalle de las espiguillas; c: detalle de la base del tallo, donde se ven las bases de las vainas de color morado; d: detalle de la lígula membranácea; e: detalle de las aurículas; f: base abaxial de la lámina mostrando la superficie brillante de la misma. (<http://www.fagro.edu.uy/>)



Biología y dinámica poblacional

Lolium multiflorum es una especie anual, que emerge desde febrero hasta junio aproximadamente en la zona central de nuestro país manifestando flujos de emergencia muy marcados y aparentemente asociados a las precipitaciones. Generalmente su período de emergencia coincide con la siembra y establecimiento de cereales forrajeros afectando el crecimiento y desarrollo de estos cultivos. Las plántulas emergen desde los estratos superficiales del suelo. La floración ocurre en primavera y fructifica hasta principios de verano.

El género *Lolium* se propaga por semillas que poseen una alta tasa de germinación que generalmente son liberadas cerca de la planta madre en estado de latencia. Las máquinas agrícolas, así como el agua colaboran con su diseminación. En muchos casos también soportan el paso por el tracto digestivo del ganado vacuno, siendo esta otra vía de diseminación de la especie.

El periodo de post-maduración, con exposición a sequía y las altas temperaturas del verano, generalmente rompe la latencia (Eichelberger et al., 2001; Steadman et al., 2003, Lodovichi, 2018) en las semillas de plantas anuales de invierno, incluido *Lolium*, permitiendo la germinación. (Baskin, y Baskin, 1998; Steadman *et al.*, 2003).

La dormición fisiológica es causada por mecanismos que imposibilitan al crecimiento del embrión (Baskin y Baskin, 1998). Los mecanismos involucrados en la dormición, podrían estar relacionados con la restricción impuesta por las cubiertas al intercambio gaseoso o a la presencia de inhibidores químicos de la germinación (Supiciche, *et al.*, 2015).

Por otro lado, hay efectos de la temperatura en la liberación de la latencia luego de la maduración del raigrás (Steadman *et al.*, 2003). Diferentes modelos caracterizan la germinación con una temperatura base o mínima (por encima de la cual la germinación es favorable), una temperatura óptima y una máxima. Por otra parte, la temperatura óptima es la temperatura de mayor velocidad de germinación (Bradford, 2002).

Según Glenn-Lewin *et al.* (1992), el éxito en la dispersión depende de cinco factores estrictamente vinculados a las semillas: cantidad producida, forma de transporte, periodo y distancia de dispersión e índice de semillas dispersas. Se ha sugerido también que la composición química de las semillas puede influenciar tanto la dispersión como la persistencia (Lokesha *et al.*, 1992). La acumulación de lípidos parece favorecer la dispersión anemocórica, debido a una reducción gravimétrica y menor densidad por unidad de peso, respecto al aporte de las proteínas y carbohidratos (De Souza *et al.*, 2006).

El conocimiento de los bancos de semillas permite prevenir o mitigar la aparición de resistencias por el uso reiterado de un herbicida. Las semillas almacenadas en el suelo cumplen una función amortiguadora por cuanto antes de la aplicación recurrente del herbicida corresponden predominantemente a plantas susceptibles. Las plántulas susceptibles que emerjan del banco de semillas después de aplicado el herbicida y perdido

su efecto (ausencia de persistencia) “diluyen” la frecuencia de individuos resistentes en la población (Valverde y Heap, 2009).

1.3. Tolerancia o resistencia

Una especie vegetal difícil de controlar con un herbicida puede ser tolerante o resistente al herbicida. Debemos definir cada uno de estos conceptos.

La *Weed Science Society of America (WSSA)* **define resistencia** como “la capacidad heredable de una planta de sobrevivir y reproducirse después de ser expuesta a una dosis de herbicida que normalmente es letal para el tipo silvestre. En una planta, la resistencia puede ocurrir de forma natural o inducida por técnicas como la ingeniería genética o la selección de variantes producidas por cultivo de tejidos o mutagénesis” (WSSA, 1998). Por otro lado, **define tolerancia** como “la capacidad de una especie de sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con un herbicida. Esto implica que no hubo selección o manipulación genética para hacer la planta tolerante; la planta es naturalmente tolerante” (WSSA, 1998).

Por ejemplo, las gramíneas son tolerantes a los herbicidas auxínicos como el 2,4-D, dicamba, picloram, MCPA, entre otros.

Además de la resistencia a un solo herbicida, encontramos la resistencia cruzada, la resistencia múltiple y la resistencia cruzada negativa. La resistencia cruzada se define como aquella por la que un individuo es resistente a dos o más herbicidas debido a un sólo mecanismo de resistencia. La resistencia múltiple se refiere a que algún individuo puede tener más de un mecanismo de resistencia ya sea a uno o más herbicidas; finalmente, la resistencia cruzada negativa se interpreta como aquella donde una especie resistente a cierta molécula experimenta un aumento en la sensibilidad a otras moléculas con diferente modo de acción (De Prado *et al.*, 1992).

1.3.1. Evolución de la resistencia a herbicidas

En la actualidad, según la organización *Weed Science Society of America (WSSA)*, existen 495 casos de resistencia a herbicida (cada caso corresponde a una especie por sitio de acción) a nivel mundial, con 255 especies (de las cuales 148 son dicotiledóneas y 107

monocotiledóneas), 42 especies son resistentes a glifosato. Las malezas generaron resistencia a 23 de las 26 clases de herbicidas clasificados según sus sitios de acción y a 163 herbicidas diferentes.

En Argentina se han registrado 24 casos de resistencia a sitio de acción y algunas de ellas con resistencia múltiple a dos sitios de acción. (www.weedscience.org, agosto, 2018).

Dentro de una especie, en cada población existe variabilidad genética que incluye una mínima proporción de individuos resistentes a herbicidas con un determinado modo de acción, o a determinados principios activos de los herbicidas. La aplicación repetida de herbicidas con un mismo modo de acción, o del mismo herbicida, resulta en un aumento de la frecuencia de individuos resistentes en la población. Normalmente la resistencia evoluciona más rápido frente a herbicidas muy residuales (Diggle y Neve, 2001; Fisher, 2008). Estos herbicidas proveen control por mucho tiempo, matando una alta proporción de las camadas de las malezas susceptibles a medida que germinan.

A lo largo de 3-5 ciclos de selección los individuos resistentes comenzarán a formar manchones detectables de plantas no controladas. Cuando dichos individuos se presentan en una alta proporción se hace notoria la falta de eficacia del herbicida; se estima que cuando alrededor de 30% de la población presenta resistencia, la misma se hace evidente a campo (Diez y Leadon, 2010)

La variabilidad existe porque los genotipos resistentes resultan de mutaciones al azar que están presentes en una población aún antes de que esta haya sido expuesta a la acción herbicida.

Las mutaciones ocurren continuamente en las poblaciones naturales pero su frecuencia es baja, por consiguiente, el porcentaje de individuos originalmente resistentes en una población es bajo y se calcula que está entre 10^{-4} y 10^{-6} (Jasieniuk *et al.*, 1996; Jander *et al.*, 2003). La relación proporcional (porcentaje) de individuos resistentes refleja el equilibrio que existe entre la continua generación de alelos resistentes por mutación recurrente y la sobrevivencia de los individuos que lo portan. Cuando se alcanza este equilibrio, la frecuencia de individuos resistentes es superior a la tasa absoluta de mutación (Jasieniuk *et al.*, 1996).

En Australia se determinó, que la frecuencia de genes de resistencia a glifosato en *L. multiflorum* era de 1 planta en 100.000.000 de plantas susceptibles (Neve *et al.*, 2003). Esto significa que la proporción de individuos resistentes a glifosato en *L. multiflorum* es mucho menor que la de individuos resistentes a herbicidas inhibidores de la enzima ALS, que para esta especie es de 1 entre 460.000 plantas (Preston y Powles, 2002).

Inicialmente, se hipotetizó que era prácticamente imposible que ocurriera la resistencia a glifosato (Bradshaw *et al.*, 1997). Sin embargo, este argumento fue controvertido (Gressel, 1996), y hoy hay muchos casos de malezas resistentes a glifosato (Heap, 2006).

Es un hecho que la resistencia a glifosato es mucho más rara que la resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) o a inhibidores de la Acetil-CoA Carboxilasa (ACCase). Según Ian Heap (2019), existen 165 especies resistentes a inhibidores de ALS, 48 a inhibidores de ACCase, y 47 a inhibidores de EPSPS a nivel mundial. En los casos en que ha sido posible hacer determinaciones genéticas o fisiológicas, la resistencia a glifosato se debe al menos a dos genes que tienen una función aditiva diferente y hasta sinérgica (algunos mecanismos de la resistencia al glifosato en malezas han sido examinados por Gressel, 2002, Pline-Srnic, 2006, Powles y Preston, 2006).

Se ha confirmado en varias especies que variaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos que codifican para la EPSPS confieren resistencia al glifosato.

1.3.2. *Fitness*

La adaptabilidad o *fitness* es la capacidad que tiene un genotipo de establecerse, sobrevivir y reproducirse exitosamente en competencia con el biotipo normal o silvestre en un ambiente particular (Menchari *et al.*, 2008; Gressel, 2002). Esta adaptabilidad está determinada, en parte, por la distribución de recursos a la supervivencia *versus* la reproducción a través del ciclo de vida de la planta (Valverde y Heap, 2009). Cualquier aspecto de la biología de la especie contribuye al *fitness*: por ejemplo, capacidad y velocidad de germinación o rebrote, vigor en el desarrollo, fecundidad, etc. En cada uno de ellos, un biotipo puede adquirir, o perder, ventajas frente a otros biotipos de la misma especie (Taberner Palau, 2007).

Es un principio básico de la genética evolutiva que la adaptación a un nuevo ambiente a menudo tiene efectos pleiotrópicos negativos sobre la aptitud en el entorno original, los llamados “Costos de la adaptación” (Purrington, 2000; Strauss *et al.*, 2002).

Estos costos de adaptación pueden impedir la fijación de nuevos alelos de adaptación (Tian, *et al.*, 2003) y contribuir al mantenimiento de polimorfismos genéticos dentro de las poblaciones (Antonovics y Thrall, 1994).

Para realizar un estudio de *fitness* de un genotipo resistente a un herbicida, en comparación con los individuos susceptibles de la población, Vila-Aiub *et al.* (2009) recomiendan considerar 5 aspectos que podrían distorsionar los resultados del estudio. Estos son el control del *background* genético de la población con la que se trabaja, el conocimiento de las bases bioquímicas de la resistencia a herbicida, la historia de las características de la especie, la competencia por los recursos, y el gradiente ambiental, es decir la relación del individuo con diferentes condiciones ambientales.

La fórmula utilizada por Vila Aiub, *et al.* (2009) para calcular el porcentaje de *fitness*, naturalmente en ausencia de aplicaciones del herbicida en cuestión es:

$$1 - (\text{descriptor de planta resistente} / \text{descriptor de planta susceptible}) \times 100 = \%,$$

Donde el descriptor es algún parámetro (v.g., biomasa, producción de semillas, etc) vinculado al *fitness*

La expresión del carácter resistencia a los herbicidas puede suponer, en ausencia del herbicida, un *fitness* superior, inferior o igual a 1. Cuando es superior a 1 los individuos resistentes poseen una ventaja con respecto a los sensibles, por el contrario, cuando es inferior a 1 los individuos resistentes están en desventaja, también se dice que están penalizados o que la resistencia supone un costo, respecto a los individuos sensibles.

Con un valor de “*fitness*” inferior a 1, una vez que se detecta la resistencia, si se suspenden las aplicaciones del herbicida que la causa, la proporción de individuos sensibles en la población aumenta y, con el tiempo, la población vuelve a estar formada mayoritariamente por individuos sensibles. (Taberner Palau, 2007)

Es importante saber medir el *fitness* adecuadamente. La medición del *fitness* en ausencia de interacciones competitivas intraespecíficas o interespecíficas puede subestimar la magnitud de cualquier costo de *fitness* (Vila-Aiub *et al.*, 2005).

Los primeros estudios comparativos sobre *fitness*, se realizaron con malezas resistentes y susceptibles a las triazinas. Puesto que la mutación que confiere resistencia a estos herbicidas reduce la tasa de transferencia de electrones en el Fotosistema II, los biotipos resistentes a triazinas poseen tasas fotosintéticas reducidas que los ponen en desventaja competitiva en ausencia del herbicida. Aunque la idea de que las mutaciones que confieren resistencia causan pérdida de adaptabilidad en las malezas se generalizó, diversos estudios han demostrado que en muchos otros casos los efectos pleiotrópicos asociados con la resistencia tienen poco significado práctico en el campo y que deben estudiarse por separado en cada caso (Holt y Thill, 1994). Genes o mutaciones diferentes pueden asociarse con costos de adaptabilidad diferentes, y el nivel de dominancia de la resistencia como atributo no está necesariamente relacionado con el nivel de dominancia de la posible penalización en *fitness* (Roux *et al.*, 2004). Un modelo predice que el tiempo requerido para que una población evolucione resistencia depende del tipo de reproducción y de la dominancia del alelo de resistencia en presencia del herbicida, así como del costo en adaptabilidad al medio y la dominancia de este costo (Roux *et al.*, 2008).

En muchas poblaciones de malezas, la resistencia a glifosato se correlaciona con la reducción de las tasas de translocación de glifosato a la raíz y tejidos meristemáticos activos (Powles y Preston, 2006; Preston y Wakelin, 2008; Shaner, 2009). Un estudio indicó que los individuos de *L. rigidum* con este mecanismo de resistencia no mostraron reducción en el crecimiento vegetativo en condiciones de competencia de recursos con el trigo, en comparación con el genotipo susceptible (Pedersen *et al.*, 2007). El mismo estudio indicó que las plantas resistentes a glifosato producen menos semillas, pero más grandes en el marco de muy baja competencia del trigo (Pedersen *et al.*, 2007). La reducción observada en el número de progenie, a la hora de competir con el trigo, puede explicar la drástica disminución de la frecuencia de la resistencia fenotípica del 45% a 11% después de 3 años sin aplicaciones de glifosato (Preston y Wakelin, 2008).

1.3.3 Mecanismos de resistencia

La selectividad de los herbicidas puede deberse a causas físicas o más frecuentemente bioquímicas (Jaguer, 1983). El conocimiento de los procesos biológicos responsables de la resistencia a herbicidas en una determinada maleza es fundamental para el diseño de una estrategia de control (Fisher, 2008; Powles, 2009).

Existen al menos cinco mecanismos generales, no necesariamente excluyentes que podrían justificar la resistencia a herbicidas (Sherman, *et al.*, 1996). A continuación, se explican brevemente y se dividen en aquellos que ocurren en el sitio de acción del herbicida y los que ocurren fuera del mismo, utilizando ejemplos de resistencia a glifosato en la medida de lo posible.

1.3.3.a. Resistencia debida al sitio de acción

i. Pérdida de afinidad por el sitio de acción.

a. Mutación en el gen EPSPS:

La resistencia de sitio activo a glifosato resulta de mutaciones puntuales en el gen EPSPS. El primer caso de resistencia por modificación del sitio activo de la EPSPS fue descrito en biotipos de *Eleusine indica* de Malasia, en los cuales mutaciones en el gen EPSPS causaron la sustitución del aminoácido prolina por serina en la posición 106 (Pro-106 Ser) (Baerson *et al.*, 2002), mientras que otros investigadores han encontrado en otras gramíneas la misma sustitución en la posición 182 (Carvalho *et al.*, 2012; González-Torralva *et al.*, 2012). También se han descrito sustituciones por treonina y alanina en dicha posición en biotipos resistentes de *E. indica* y *Lolium spp.* (Ng *et al.*, 2003; Wakelin y Preston, 2006; Pérez-Jones *et al.*, 2007; Jasieniuk *et al.*, 2008).

En todos los casos estudiados, la resistencia conferida por la mutación en Pro106 de la EPSPS se hereda como un gen nuclear con dominancia incompleta. Los niveles moderados de resistencia son suficientes para permitir la supervivencia de las plantas a las dosis de campo y, por lo tanto, para que estos biotipos resistentes sean pasibles de selección por uso repetido de glifosato.

b. Amplificación del gen EPSPS:

La resistencia de sitio activo también puede involucrar elevados niveles de expresión o de actividad de la enzima sobre la cual se ejerce el efecto del herbicida, como fue recientemente descrito en un biotipo de *Amaranthus palmeri* resistente a glifosato (Gaines *et al.*, 2010). El número de copias del gen EPSPS en la población susceptible estuvo en el rango entre 1 a 1.3, mientras que en el biotipo resistente el número de copias varió entre 5 y 160, estando el número de copias estrechamente correlacionado con la expresión de la enzima. El control genético de esta sobreexpresión no está claro en el caso de glifosato, pero la participación de herencia poligénica es una posibilidad, especialmente en aquellos casos en que

se observa considerable variabilidad intraespecífica en los niveles de esta enzima (Gressel, 2002).

En biotipos de *Conyza canadensis* y *C. bonariensis* la resistencia a glifosato se asocia con un transporte alterado del herbicida y un incremento en los niveles de transcripción de la EPSPS (Dinelli *et al.*, 2008; Dinelli *et al.*, 2006).

1.3.3. b. Resistencia fuera del sitio de acción

ii. Reducción de la concentración del herbicida en el sitio de acción.

Este mecanismo consiste en la inmovilidad de un herbicida, posibilitando reducir la concentración del mismo en el sitio de acción, permitiendo que la función fisiológica respectiva se mantenga funcional. Esta reducción de las concentraciones en el sitio de acción puede lograrse ya sea mediante una reducción en la penetración, absorción o translocación o por la existencia de fenómenos de secuestro en orgánulos celulares. La falta de absorción/penetración/translocación de herbicidas es básicamente un mecanismo de tolerancia existente en numerosos cultivos y algunas malas hierbas. (Hess, 1985; De Prado *et al.*, 2001; Michitte *et al.*, 2004; Ruiz-Santaella *et al.*, 2006; Cruz Hipolito *et al.*, 2009).

Uno de los aspectos clave en la eficacia del glifosato es su capacidad de transportarse en la planta. El transporte es principalmente vía floema, pero también existe cierto derrame del herbicida hacia el apoplasto con el subsiguiente arrastre por la corriente transpiratoria hacia las hojas. La elevación de la concentración del herbicida en las hojas resultante de esta acumulación en tejidos transpiratorios promueve nuevamente su absorción al simplasto desde donde es nuevamente reexportado por el floema. Así, el herbicida posee propiedades de ambimovilidad y es capaz de circular por la planta (Dewey y Appleby, 1983). Esto permite que el herbicida pueda ser exhaustivamente transportado dentro de las plantas sin perder su toxicidad y logre acumularse gradualmente a concentraciones tóxicas en puntos de crecimiento o áreas de depósito distantes del punto de absorción inicial. Dada la importancia del transporte para la efectividad del glifosato, es concebible pues que alteraciones en su transporte puedan causar resistencia (González- Torralva *et al.*, 2013).

Entre todos los mecanismos de resistencia a glifosato identificados hasta ahora, los más importantes son la absorción y translocación del herbicida. En el primer caso de resistencia a glifosato reportado, *L. rigidum* procedente de Australia (Powles *et al.*, 1998; Pratley *et al.*, 1999), los estudios mostraron que la resistencia no fue debida a una EPSPS insensible, ni a diferencias en metabolismo (Lorraine-Colwill *et al.*, 2003). Se observó una acumulación de glifosato en el extremo de la hoja en el biotipo resistente y una acumulación en los meristemas de las plantas susceptibles. Este mismo patrón de resistencia ha sido encontrado en otros cuatro biotipos diferentes de *L. rigidum* procedentes de Australia (Wakelin *et al.*, 2004).

La reducción de absorción y translocación de glifosato ha sido también encontrada en *L. multiflorum* en Chile (Pérez y Kogan, 2003), en *L. multiflorum* de USA (Nandula *et al.*, 2008), y en biotipos resistentes de *C. canadensis* (USA) y *C. bonariensis* en España y Brasil (Feng *et al.*, 2004; Koger y Reddy, 2005; Dinelli *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2008).

iii. Metabolización a compuestos no tóxicos

Los procesos de detoxificación metabólica de herbicidas en tejidos vegetales pueden dividirse en tres fases (Shimabukuro, 1985; Hatzios, 1991). En la fase I, conversión, las propiedades iniciales del plaguicida de partida son transformadas a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis para producir un compuesto más soluble en agua y menos tóxico a través de los citocromos P450. La segunda fase implica la conjugación del herbicida o sus metabolitos con un azúcar, aminoácido o glutatión, incrementando su solubilidad en agua y reduciendo la toxicidad del compuesto. Generalmente los metabolitos formados en la fase II tienen poca o nula fitotoxicidad y pueden ser almacenados en orgánulos celulares, por ejemplo, en la vacuola central. La fase III implica la transformación de los metabolitos de la fase anterior a conjugados secundarios con nula fitotoxicidad y en ciertos casos la acumulación en la pared celular (Hatzios, 1991)

iv. Resistencia asociada a procesos de secuestro.

El aislamiento o secuestro consiste en retirar el herbicida o sus metabolitos de las regiones metabólicamente activas y llevarlos a sitios menos activos, donde son inocuos para el crecimiento, como es el caso de las vacuolas (Villalba, 2009; Ge *et al.*, 2010; Carbone, 2015), estos son mecanismos de resistencia o tolerancia poco conocidos debido

a que las evidencias que los apoyan son en muchos casos circunstanciales (Coupland, 1991; Owen, 1991).

Las últimas investigaciones han mostrado que el secuestro en la vacuola es el mecanismo de resistencia a glifosato en *C. canadensis* (Ge *et al.*, 2010), lo anterior sugiere que en aquellos biotipos resistentes a glifosato en los cuales se ha descrito reducida translocación, el herbicida puede ser secuestrado en la vacuola.

v. Reparaciones de efectos fitotóxicos.

Por último, la reparación de efectos fitotóxicos cobra importancia en el caso de algunos herbicidas como los arilfenoxipropionatos, (inhibidores de la enzima ACCasa). Tanto el diclofop-metil como el haloxyfop, pueden despolarizar la membrana plasmática en células parenquimáticas de *Avena sativa*, *Triticum aestivum*, *L. rigidum*, etc. La capacidad despolarizadora de diclofop-metil se atribuye al flujo específico de protones que este compuesto produce hacia el interior de la célula (Shimabukuroy Hoffer, 1997). Actualmente se han encontrado biotipos de malezas cuyo mecanismo de resistencia frente al diclofop- metil parece ser debido a la capacidad de recobrar el potencial de membrana una vez que se ha retirado el herbicida causante de la despolarización (De Prado *et al.*, 1999).

1.4. Hormesis

La hormesis es un fenómeno caracterizado por estimulación a bajas dosis e inhibición con altas dosis de un principio activo (Bukouski y Lewis, 2000; Calabrese y Baldwin, 2000; Calabrese y Baldwin, 2001; Turturro *et al.*, 2001).

Calabrese y Baldwin (2002), definieron la hormesis como una respuesta adaptativa que se refleja en una curva dosis-respuesta bifásica resultante de efectos estimulantes a bajas dosis, ya sea por inducción directa o resultado de procesos biológicos compensatorios, seguido de una ruptura en la homeostasis del organismo a dosis mayores. Los efectos estimulatorios o inhibitorios pueden ser en determinados momentos beneficiosos o perjudiciales. Según Calabrese y Baldwin (2001), cuando la hormesis es considerada una respuesta adaptativa, las palabras beneficioso/perjudicial no deben aparecer en la definición de hormesis, sino reservarse para el momento de la evaluación del efecto biológico y el contexto ecológico de la respuesta.

El glifosato aplicado en dosis bajas puede aumentar el crecimiento de las plantas. Este efecto estimulador (hormesis) se ha informado en las dosis bajas de varios herbicidas, incluyendo el glifosato (Schabenberger *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 2003; Duke *et al.*, 2006; Cedergreen *et al.*, 2007; Velini *et al.*, 2008).

En el caso del glifosato sabemos que interactúa con las plantas inhibiendo el ciclo del ácido shikímico, y por ende la fuente de precursores de la síntesis de aminoácidos aromáticos, lignina, etc. Esto puede inhibir la síntesis de lignina preferentemente en dosis bajas, tornando las paredes celulares más elásticas para un período más largo durante el desarrollo, dando como resultado un mayor crecimiento longitudinal (Duke *et al.*, 2006).

El efecto de la hormesis de glifosato se ha observado en plantas como *Abutilon thophrasti*, *Commelina benghalensis*, *Echinochloa crus-galli*, *Eucalyptus grandis*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Pinus caribea*, *Stellaria media*, *Tripleurospermum inodorum*, *Saccharum spp.* y *Zea mays* (Schabenberger *et al.* 2007; Velini *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Cedergreen y Olesen, 2010; Bott *et al.*, 2011)

Las dosis sub-letales de glifosato estimulan el crecimiento de una variedad de especies de plantas y la hormesis está probablemente asociada con el sitio de acción del glifosato, ya que el efecto no se observó en las plantas resistentes a glifosato (Velini *et al.*, 2008)

Aún se necesita estudiar mucho sobre las bases fisiológicas y moleculares de esta respuesta, pero sí está claro que la respuesta es rápida, consecuencia de pequeños estímulos estresantes y de naturaleza anticipada, que necesita ser renovada para mantenerse en el tiempo (Pérez Davinson *et al.* 2009).

1.5. Glifosato

El nombre de glifosato proviene de la contracción de glicina, fosfo- (fosfonometil) y -ato (corresponde a la valencia de la Sal), el principio activo es N-fosfonometil glicina. Fue descubierta su actividad herbicida en 1970 por John E. Franz, quien trabajaba en Monsanto y recibió la National Medal of Technology en 1987, y la Medalla Perkin en Química Aplicada en 1990 por su hallazgo (Civeira, 2012).

En 1974 se introdujo en el mercado el herbicida Roundup® cuyo ingrediente activo es el glifosato, y 22 años después, en 1996, se informó el primer caso de resistencia a glifosato en *Lolium rigidum* (Villalba, 2009) en Australia.

El glifosato es el principal herbicida utilizado en siembra directa en post-emergencia en la soja y maíz RR “*Roundup Ready*” o resistentes a glifosato (Valverde y Gressel, 2006). Este herbicida ha sido utilizado extensivamente en el mundo por más de 20 años en aplicaciones de pre-siembra, post-emergencia, pre y post cosecha (Grossbardy Atkinson, 1985). Actúa como herbicida post-emergente de amplio espectro, no selectivo y “seguro” desde el punto de vista ambiental (baja toxicidad para organismos no blanco, escaso movimiento en el agua subterránea y persistencia limitada) (Villalba, 2009).

Desde el punto de vista químico, el principio activo del glifosato (N-fosfonometilglicina) es un derivado de la glicina, el aminoácido más pequeño hallado en las proteínas. En comparación con otros ingredientes activos en los herbicidas, el glifosato es una molécula pequeña con un peso molecular de 169 gramos.

Es un herbicida de alta solubilidad en agua (10.500 ppm, medido a pH 7), y por ello de una muy baja lipofilidad ($\log k_{ow} = -3,2$) lo que indica una baja tendencia a ser bioacumulado y presenta baja presión de vapor (3×10^{-7} mm Hg a 25 °C). Con relación a su estabilidad frente a reacciones de hidrólisis y fotólisis, se le considera como un producto estable, en un rango de pH de 4 y 9. Sin embargo, en medios acuosos su vida media (TD50) se ubica en torno a 1,3 – 4,8 días (Degenhardt *et al.*, 2012; PPDB 2013, Kogan y Alister, 2013).

El modo de acción de glifosato es a través de la inhibición competitiva de la enzima cloroplástica la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfosintasa (EPSPS), impidiendo la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano (Perez Jones *et al.*, 2007, Gressell, 2002), los cuales son precursores de importantes metabolitos secundarios como lignina, flavonoides, alcaloides, ácidos benzoicos y fitohormonas que conducen a la biosíntesis de proteínas y compuestos del metabolismo secundario (Amrhein *et al.*, 1980; Steinrücken y Amrhein, 1980).

Este herbicida inhibe la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfosintasa (EPSPS), que se encuentra dentro de los cloroplastos, donde cataliza la reacción de shikimato-3-fosfato (S3P) y fosfenolpiruvato para formar 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (ESP). La inhibición de la EPSPS por el glifosato resulta en la acumulación de shikimato y disminuye la producción de aminoácidos aromáticos (Steinrücken y Amrhein, 1980; Schönburn *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2006). La EPSP sintasa participa en la ruta metabólica del shikimato, por la que fluye un 20-30% del carbono fijado por la fotosíntesis y produce

aminoácidos que están relacionados con la síntesis de compuestos aromáticos como ligninas, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos y hormonas vegetales (Pérez-Jones *et al.*, 2007).

Numerosos estudios de los efectos del glifosato sobre la EPSPS han demostrado que el glifosato es un potente inhibidor de esta enzima en todas las plantas, los hongos y la mayoría de las bacterias examinadas (Franz *et al.*, 1993). Además, el glifosato es el único herbicida reportado como inhibidor de la EPSPS (Amrhein *et al.*, 1980; Anderson y Johnson, 1990; Bently, 1990; Boocock y Coggins, 1983; Kishore y Shah, 1988; Bradshaw *et al.*, 1997).

A partir de las 72h de la aplicación del glifosato en las plantas de *Lolium spp*, la fotosíntesis neta de las plantas susceptibles se reduce levemente. Esta disminución en la fijación de CO₂ es de 25% a los 5 días post-aplicación de glifosato y de 81% a los 10 días post-aplicación. (Yannicari *et al.*, 2010).

1.6. Mercado de fitosanitarios

El mercado de fitosanitarios en Argentina ha mostrado una evolución creciente y sostenida a lo largo del tiempo. Si se toma como base el año 1991, donde se utilizaban cerca de 100 millones de litros/kg/unidad de productos fitosanitarios, en el año 2014 se aplicaron cerca de 305 millones de litros (CASAFE, 2016), se pone en evidencia un claro incremento en el uso de agroquímicos (excluyendo fertilizantes).

Según CASAFE (2016), el principal segmento de agroquímicos sigue siendo el de herbicidas con un 71% de la facturación, este vuelve a tomar la dimensión histórica que supo tener por encima del 60% (1997-2009). El principal activo sigue siendo el Glifosato (más de 187 millones de L/año), el cual tuvo un aumento del 19% en facturación respecto del año anterior. Este incremento se ve reflejado también, en el consumo mundial de glifosato. Charles Benbrook (2016), aportó datos sobre el consumo de glifosato en el mundo, que se incrementa año tras año, alcanzando en 2014 unos 747 millones de kg/año en aplicaciones agrícolas y 826 millones de kg incluidas las aplicaciones no agrícolas.

A pesar de seguir siendo el Glifosato, el principio activo más importante, la tendencia indica que en los últimos 9 años perdió 7 puntos de participación dentro de los

herbicidas, esto quizás se deba a la aparición de malezas resistentes y el manejo más responsable por parte del productor, mezclando diferentes ingredientes activos.

No hay que dejar de observar la evolución del Cletodim, activo que se encuentra entre los 10 más vendidos. Este principio activo creció un 124% en facturación y un 111% en volumen, estos números se vieron en la mayoría de las empresas que lo comercializan.

1.7. Graminidas, características y evolución de resistencia

Los graminidas son inhibidores de la enzima Acetil CoA Carboxilasa (ACCase), y pertenecen a las familias químicas denominadas ariloxifenoxipropionatos (“fops”), ciclohexanodionas (“dms”) y fenilpirazolininas (“dens”, representada por el pinoxaden). Los dos primeros grupos ingresaron al mercado a finales de la década de 1970. Estos herbicidas se emplean en el control de malezas gramíneas en cultivos de dicotiledóneas y cereales. En algunos casos, cuando se destinan a cereales, se les agregan antidotos o *safeners* en la formulación para mejorar su selectividad (inocuidad para el cultivo). Tal es el caso del pinoxaden, introducido al mercado en 2006, que incluye al cloquintocet-mexilo para mejorar su selectividad en trigo y cebada (Hofer *et al.*, 2006; Muehlebach *et al.*, 2009).

Sin embargo, a pesar de sus beneficios y de constituir una opción eficaz a la hora de controlar gramíneas resistentes a glifosato, treinta y seis gramíneas en el mundo han evolucionado resistencia a inhibidores de la ACCase; los primeros casos se asociaron con el uso del diclofop-metil en trigo (Valverde y Heap, 2009, Vigna *et al.*, 2011a). La resistencia a estos herbicidas tiene gran importancia económica por las limitaciones para controlar las gramíneas resistentes con herbicidas alternativos. *Lolium* spp. ha evolucionado resistencia a diclofop-metil u otros inhibidores de ACCase en más de 15 países, entre ellos: Alemania, Argentina, Arabia Saudita, Australia, Canadá, Chile, EE.UU., España, Francia, Grecia, Irán, Israel, Italia, Reino Unido, Sudáfrica, y Túnez. En varios de estos países, notablemente en Australia, hay biotipos de *Lolium* spp. con resistencia múltiple. En Australia el primer caso de resistencia que se confirmó fue el de *L. rigidum* resistente a diclofop (Heap y Knight, 1982). Actualmente, la resistencia de *L. rigidum* a estos herbicidas es generalizada. Una evaluación basada en más de 3000 muestras representativas de la zona triguera del sur de Australia que cubre 40 millones de has determinó que el 77% del *L. rigidum* era resistente a fops y el 22% a dms. Hubo poca

correlación de resistencia cruzada entre ambos grupos a pesar de que comparten el mismo mecanismo de acción. Sin embargo, el 95% de los biotipos resistentes a dims también lo fueron a fops. En el grupo de los dims el 78% de los biotipos probados con tralkoxidim (160 análisis) fueron resistentes, mientras que sólo el 50% (de 117 pruebas) y 17% (de 2670 pruebas) de los biotipos probados con setoxidim y cletodim resultaron resistentes (Brostery Pratley, 2006). En Latinoamérica, se han confirmado 16 malezas gramíneas resistentes a inhibidores de ACCasa, la mayoría en cultivos de cereales (Valverde, 2007). En Chile, se estima que un 25% de las 400.000 ha sembradas de trigo tienen malezas resistentes a inhibidores de ACCasa, incluyendo *L. rigidum* y *L. multiflorum* (75.000 ha).

1.8. Resistencia a herbicidas de *Lolium* spp.

La cantidad de malezas resistentes a herbicidas está aumentando año a año. Muchos son los países que presentan biotipos de *Lolium* resistentes a herbicidas. En Australia se han detectado poblaciones resistentes a glifosato, paraquat y herbicidas inhibidores de la ACCasa (Yu *et al.*, 2006). Otras poblaciones presentan también resistencia múltiple a nueve grupos de herbicidas como los inhibidores del fotosistema II, ALS y ACCasa (Preston *et al.*, 1996). En Chile se registraron cinco biotipos de gramíneas de *L. multiflorum* y *Avena fatua* con resistencia a herbicidas. Estos biotipos presentaron resistencia a inhibidores de la ACCasa, ALS y EPSPS. La mayoría de estos biotipos se originaron en campos de agricultores con uso intensivo con cultivos anuales, tendencia al monocultivo de trigo y uso masivo de la labranza cero y de herbicidas con igual modo de acción. Los herbicidas más empleados fueron glifosato (EPSPS), diclofop metil y clodinafop propargil (ACCasa). En algunos biotipos de raigrás (*L. perenne*) se encontró resistencia cruzada a los inhibidores de la ACCasa, con mayor resistencia a los ariloxifenoxipropionatos que a los ciclohexanodionas (Espinoza y Díaz, 2005).

En otro estudio realizado por Preston y Powles (2002) en Australia, se evaluó la frecuencia de individuos resistentes a dos herbicidas inhibidores de ALS en tres poblaciones de *L. rigidum* que nunca habían sido expuestas al herbicida. La frecuencia de individuos resistentes a sulfonilureas variaba entre $2,2 \times 10^{-5}$ y $1,2 \times 10^{-4}$, y la frecuencia de individuos resistentes a imidazolinonas variaba entre 1×10^{-5} y $5,8 \times 10^{-5}$ según la población. El elevado nivel inicial de individuos resistentes a ALS, en una población que nunca había sido expuesta al herbicida, explica la rápida evolución de la resistencia a este grupo de herbicidas.

En Chile (Perez y Kogan, 2003), Estados Unidos (Perez-Jones *et al.*, 2005), España, Francia, Brasil y Argentina (Heap, 2011) se han hallado diferentes biotipos de *L. multiflorum* resistentes a glifosato. En las poblaciones de *Lolium* spp. han sido reportados casos de resistencia a glifosato debidos a la sustitución de prolina por alanina en el sitio Pro-106 de la EPSPS (Yu *et al.*, 2006) y a la restricción en los mecanismos de translocación del glifosato (Preston *et al.*, 2009). Sin embargo, otros mecanismos de resistencia aún no han sido comprendidos, a pesar de los muchos esfuerzos que han realizado diversos grupos de investigación (Pérez *et al.*, 2004; Owen y Zelaya, 2005, Yannicari *et al.*, 2011).

Según Heap (2011), la especie más problemática en todo el mundo es *L. rigidum*, que ha sido identificada como resistente a algún herbicida en 12 países y ha desarrollado resistencia a herbicidas con 11 sitios de acción diferentes. Las primeras apariciones de malezas resistentes al glifosato no fueron una consecuencia de la introducción de cultivos tolerantes al glifosato. *Lolium rigidum* en Australia (Pratly *et al.*, 1999) y *Eleusine indica* en Malasia (Lee y Ngim, 2000) fueron los primeros casos de malezas resistentes al glifosato registrados a campo, y ambos tuvieron lugar en huertas. No obstante, debido a la introducción de cultivos resistentes al glifosato, se ha producido un aumento regular en la cantidad y el área de malezas resistentes al glifosato como consecuencia directa del aumento masivo en el uso de glifosato.

En el caso de *L. perenne* ssp. *multiflorum* se ha registrado resistencia a herbicidas en 12 países, y frente a 20 ingredientes activos diferentes, y con resistencia múltiple frente a herbicidas con 3 mecanismos de acción diferentes.

En Brasil, un estudio realizado por Galván *et al.* (2012) intentó establecer si existen o no diferencias anatómicas entre los biotipos susceptibles y resistentes a glifosato. Ferreira *et al.* (2006) constataron que no hay diferencias significativas entre las plantas de raigrás resistentes y sensibles en cuanto a la absorción de este herbicida. Sin embargo, Galván *et al.* (2012) mencionan que puede ocurrir una mayor retención del herbicida en las hojas en los biotipos resistentes, cosa que no pasa en el biotipo sensible donde gran parte del herbicida se traslada a las raíces. Esto también está avalado por un trabajo de Wakelin *et al.* (2003), donde se demuestra que los patrones de translocación de glifosato están alterados en una población resistente respecto de la susceptible. Las

plantas resistentes mostraron una elevada tendencia a acumular glifosato en el ápice de las hojas en comparación con las susceptibles.

La principal diferencia morfológica encontrada entre los biotipos sensibles y resistentes parece haber sido un menor índice estomático en los biotipos sensibles en comparación con los resistentes (Galván *et al.*, 2012). El biotipo sensible también presenta una disposición más compacta de las células del mesófilo (figuras en Anexo), reduciendo consecuentemente la cantidad de espacios intercelulares en relación con el biotipo resistente; a causa de esto podría disminuir la cantidad de CO₂ circulante para ser utilizado en la fotosíntesis. Los biotipos sensibles presentaron mayor proporción de floema en relación al xilema. El glifosato como ya se dijo sigue la ruta de los fotoasimilados por el floema, esto nos permite inferir que cuanto mayor proporción de floema mayor translocación del herbicida de las hojas a las demás partes de la planta.

En Australia, donde como ya dijimos se presentan severos problemas para el control de *Lolium*, la técnica del doble golpe ha sido citada como una herramienta para incrementar la eficiencia de control (Walsh y Powles, 2007). El método en general consiste en la aplicación de dos herbicidas separados por hasta 14 días en lugar de aplicarlos una sola vez en mezcla de tanque (Vigna *et al.*, 2011). Esta técnica surge de los intentos reiterados de lograr el control de las malezas con uno o varios herbicidas sin tener éxito en los intentos. Al parecer se recurre a esta técnica cuando las malezas adquieren estrategias más complejas para resistir el control que les ejercen los herbicidas y se vuelven más difíciles de controlar que otras.

1.9. *Lolium* sp. en Argentina

En los cultivos de cereales del sur de la provincia de Buenos Aires, se registraron cambios en la comunidad de malezas (aparición de malezas resistentes a glifosato), como resultado de una menor diversificación productiva, y de la adopción de nuevas tecnologías en la siembra y control de malezas de los cultivos (Istilart y Yanniccari, 2012). La presencia de *Lolium spp.*, frecuente en barbechos y cultivos de gramíneas de invierno del Sud Oeste de Buenos Aires (trigo y cebada principalmente) la ha transformado en una de las principales malezas (Catullo, 1982, Istilart, 1991, Scursoni, 1994) de esa zona, pero actualmente pareciera que esta situación se repite en otras zonas de la provincia.

Las reducciones significativas en biomasa aérea y rendimiento en grano del trigo provocadas por la interferencia con raigrás, se han explicado debido a fenómenos de competencia y aleopatía. Acciaresi *et al.* (2003) han distinguido la competencia radical y aérea, donde encuentran que la competencia generada a nivel subterráneo provoca mayores pérdidas en la producción de trigo comparado a la competencia aérea. El crecimiento radical se ha asociado positivamente a la capacidad competitiva del *L. perenne* (Baan Hofman y Ennik, 1980; Yanniccari, 2014). El efecto inhibitorio del raigrás sobre el trigo es atribuido a efectos alelopáticos provocados por exudados radicales que afectan el crecimiento de raíces y biomasa aérea (Amini *et al.*, 2009).

En INTA Bordenave se relevaron las malezas en soja durante cinco años (2007, 2008, 2010, 2011 y 2012). De las 105 especies identificadas, 30 especies resultaron de la familia Asteráceas y 17 Poáceas, ambas familias bien adaptadas a la siembra directa (SD). En los últimos años algunas especies tolerantes a glifosato aumentaron su presencia (Gigón *et al.*, 2014).

También en 2011 en Bordenave, se relevaron malezas en lotes de trigo donde hallaron predominio de *Avena fatua* y *L. multiflorum*. Durante ese estudio se determinó que el 71% de los lotes se trabajaba con siembra convencional (SC) y solo el 29% con SD. La severidad de infestación de *A. fatua* y *L. multiflorum* siempre fue mayor con SC que con SD (Scursoni *et al.*, 2014). Probablemente esto pueda deberse al mayor uso de agroquímicos en la SD y a la adaptación biológica de las especies en cada sistema, viéndose favorecidas en SC por la remoción del suelo y la mayor temperatura del mismo. Las especies que sustancialmente disminuyeron en siembra directa fueron *L. multiflorum*, *Diploaxis tenuifolia*, *Centaurea solstitialis*, *Heliantus annuus* y *Fumaria officinalis* (Gigón *et al.*, 2011).

Otro experimento consistió en evaluar diferentes principios activos en lotes con distinta historia de uso de herbicidas, donde se obtuvieron resultados positivos de resistencia a diclofop-metil y clodinafop en algunas de las poblaciones evaluadas. Al comparar las poblaciones y plantas obtenidas de las semillas de los diferentes lotes evaluados se manifestaron claras respuestas diferenciales, como por ejemplo la comparación del GR50 (reducción del crecimiento al 50%) en uno de los experimentos de dosis respuesta para Diclofop-metil, de una población sospechosa y otra sin historia o

muy baja presión de herbicidas, mostró una relación resistente/susceptible de 6.6. (Vigna *et al.*, 2011 a).

López *et al.* (2008 a), evaluaron el control de diferentes poblaciones de *L. multiflorum* en el sur de la provincia de Buenos Aires con sal potásica de glifosato 66.2% p/v (Roundup Full II). Estos resultados mostraron evidencias de una tolerancia diferencial a glifosato por parte de las poblaciones evaluadas. Años anteriores esas poblaciones eran controladas con 392 gi.a. /ha, sin embargo, en este experimento se requirieron entre 600 y 1200 gi.a/ha en los estadios desde 10 cm hasta floración. (Monsanto Argentina SAIC). Evaluaciones realizadas con graminicidas indicaron que las dosis de haloxifop-R-metil necesarias para un control eficiente de *L. multiflorum* parecieron similares a las recomendadas comercialmente (CASAFE, 2003) para el control de gramíneas anuales estivales en los primeros estadios (2 a 3 hojas hasta 1 macollo), esto es de 43 a 62 gi.a/ha).

En las campañas agrícolas 2010-2013, especialistas de INTA y universidades, recibieron numerosas consultas referidas a la falta de control de *L. multiflorum* tratadas con glifosato a dosis normales de uso, del orden de 720 a 1080 gi.a/ha. Este hecho, sumado a la detección de biotipos de esa maleza resistentes a glifosato en el Sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Vigna *et al.*, 2008), así como los antecedentes en países limítrofes como Chile (Pérez y Kogan, 2003; Espinoza y Diaz., 2005) y Brasil (Galli *et al.*, 2005) motivaron la realización de diversos trabajos que permitieron corroborar la existencia de este problema en la región sojera núcleo de Argentina midiéndose en un biotipo de Rojas (Provincia de Buenos Aires) un índice de resistencia del orden de 10,0 (Papa *et al.*, 2012, Vigna *et al.*, 2013).

Según Yanniccari *et al.* (2009), para igualar la eficiencia de control del glifosato en plantas resistentes de *L. perenne*, del sur de la Provincia de Buenos Aires, respecto a susceptibles se requiere incrementar la dosis 2,7 veces durante germinación, 3,4 veces para crecimiento de coleóptilo y primera hoja y 7,4 veces en la supervivencia a los 15 días. En la población problema estudiada, existieron biotipos resistentes a dosis normalmente letales de glifosato cuyo mecanismo de resistencia está en evaluación. Las pruebas realizadas en distintas etapas ontogénicas mostraron un incremento del índice de resistencia (IR) a medida que avanzaba el ciclo de la planta.

La pérdida de efectividad de control de glifosato promueve necesariamente cambios en los tratamientos tradicionales con la modificación de dosis y/o incorporación de

nuevos principios activos solos o en mezclas. Según López *et al.* (2008) los mejores controles de *L. multiflorum* en el sudoeste bonaerense se obtuvieron con los tratamientos a base de Cletodim y Haloxypop en mezclas con dosis de 500g/ha de glifosato. La mezcla claramente incrementó el control de los herbicidas por separado, hecho confirmado por Lindon *et al.* (2009). Este sinergismo sobre el control de la población estaría dado por la variabilidad en la sensibilidad relativa a los diferentes herbicidas de los individuos integrantes de la misma (Vigna *et al.*, 2013).

En la localidad de Solís, partido de San Andrés de Giles, provincia de Buenos Aires, varios productores han encontrado dificultades para controlar *L. multiflorum* en barbechos y cultivos de invierno. Estas poblaciones presumiblemente sean resistentes a glifosato, es por esto que se comenzaron a utilizar graminicidas (ariloxifenoxipropionatos y ciclohexidimas) para disminuir la infestación por *Lolium* en los lotes.

1.10. Objetivo

El objetivo general de esta tesis es determinar las causas por las cuales una población de *L. multiflorum* (Solís, provincia de Buenos Aires) presenta fallas de control con glifosato, así como estudiar su control con graminicidas en el barbecho.

Objetivos particulares:

-1“Determinar si la población en estudio de *L. multiflorum* tiene algún grado de resistencia a glifosato comparada con una variedad comercial que nunca estuvo expuesta a este herbicida.”

-2 “Determinar la dosis adecuada para el control de la población en estudio de *L. multiflorum*” con graminicidas.

1.11. Hipótesis

- a- La población de *L. multiflorum* en estudio es resistente al glifosato.
- b- Esta población de *L. multiflorum* puede ser controlada efectivamente con graminicidas.

Capítulo 2

2 Materiales y Métodos

En Solís, partido de San Andrés de Giles (Buenos Aires) en los meses de julio a septiembre de 2012, se realizó un experimento sobre una población de *L. multiflorum* sospechosa de presentar resistencia a glifosato (Figura N° 2). El tamaño de las parcelas fue de 3m de frente x 6 m. de largo, con 4 repeticiones en un diseño en bloques completos al azar. En el campo se realizaron dos experimentos, uno correspondiente a la evaluación de dosis crecientes de glifosato, y otro con dosis crecientes de graminicidas donde se utilizaron haloxyfop y cletodim, por ser los más vendidos en la región. Los tratamientos de ambos ensayos se indican en las Tablas N°1 y N°2.

En el primer experimento se utilizó la sal dimetilamina de N-fosfometilglicina 60,8 g. (eq.a. 48g/100cc, Panzer Gold). En el segundo experimento se aplicó cletodim 24% p/v (Select) y haloxyfop54% p/v (eq.a. 52gr/100cc, Galant HL), ambos en mezcla con 960g/ha (2lt/ha) de glifosato 60% Panzer Gold y el aceite metilado recomendado por cada una de las empresas de los graminicidas (aceite metilado Uptake y aceite agrícola Bayer), con el fin de hallar cuál sería la dosis recomendada para el correcto control de esta especie. Varios trabajos demuestran un mejor control de las parcelas cuando los graminicidas son acompañados por glifosato. López *et al.* (2008), en su trabajo observaron que las mezclas de glifosato con cletodim produjo respuestas más rápidas que cada uno de los herbicidas por separados. En otros experimentos los mismos autores observaron controles de *L. multiflorum* superiores al 97% al aplicar estas mezclas en cualquier etapa del ciclo de la maleza.

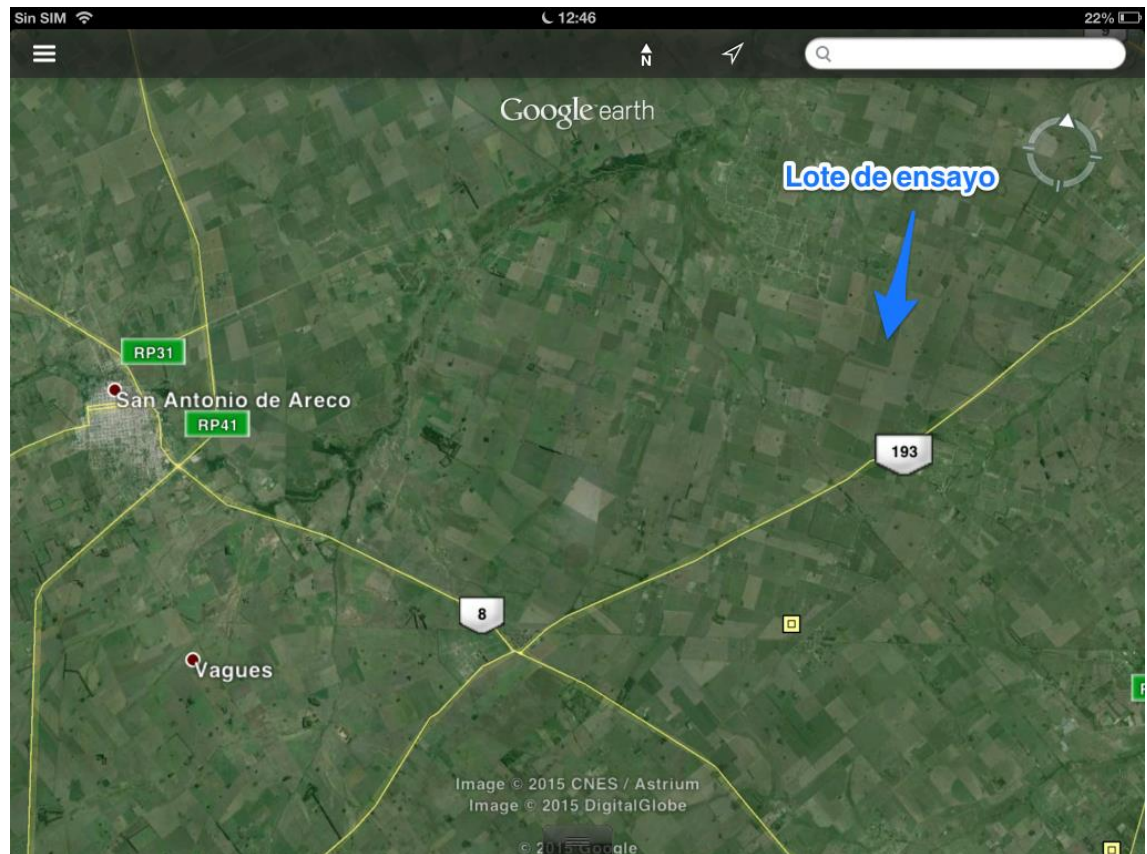
Figura 2: Ubicación geográfica del lote donde se desarrolló el ensayo de *L. multiflorum*

Tabla 1: Tratamientos con diferentes dosis de glifosato 60% p/v.

Tratamientos	Dosis gi.a./ha	Dosis formulada (cc/ha)
1- Glifosato DMA	60	125
2- Glifosato DMA	120	250
3- Glifosato DMA	240	500
4- Glifosato DMA	480	1000
5- Glifosato DMA	960	2000
6- Glifosato DMA	1920	4000
7- Glifosato DMA	3840	8000
8- Glifosato DMA	7680	16000
9- Control		

Tabla 2: Tratamientos con cletodim (“Select” de Bayer) y haloxyfop (“Galant HL” de Dow Agrosiences).

Tratamientos	Dosis gi.a./ha	Dosis formulado - cc/ha
1- Haloxyfop	15	29
2- Cletodim	15	62
3- Haloxyfop	30	58
4- Cletodim	30	125
5- Haloxyfop	45	86
6- Cletodim	60	250
7- Haloxyfop	60	115
8- Cletodim	90	375
9- Haloxyfop	75	144
10- Cletodim	120	500
11- Haloxyfop	90	173
12- Cletodim	150	625
13- Haloxyfop	120	231
14- Cletodim	180	750
15- Control		

Las aplicaciones se efectuaron con mochila de CO₂, de volumen constante. Se utilizó un volumen de aplicación de 90lts/ha, con pastillas abanico plano 110015, y una presión de 40PSI. Al momento de la aplicación las plantas se encontraban con 5-6 macollos y la maleza presentaba una cobertura homogénea mayor al 95%. La humedad en el suelo fue adecuada. Las condiciones ambientales promedio en el momento de la aplicación (12-7-2012) fueron de 15.7°C de temperatura, 43% de humedad relativa y viento de 3km/h.

Las evaluaciones se realizaron a los 14, 41,60 y 91 días después de la aplicación (DDA), mediante evaluación visual, en comparación contra el testigo sin aplicar, estimando el porcentaje de control.

A los 60 días de la aplicación se tomaron muestras de materia seca (MS) de las parcelas para cuantificar de manera más objetiva el control. Las muestras se tomaron con un cuadro de 25 x 25cm, se pesaron y se llevaron a estufa hasta peso constante. Luego los datos se extrapolaron a kg de MS/m².

Por otra parte, ese mismo año se dejó un sector de *L. multiflorum* sin aplicar herbicida para cosechar plantas en madurez fisiológica. Se guardaron las semillas a temperatura ambiente y luego se colocaron 15 días a 4°C para romper la dormición y permitir la germinación.

En invernáculo, se cultivaron y se hicieron germinar en bandejas con sustrato estéril y abundante humedad semillas recolectadas de la población de *L. multiflorum* presumiblemente resistente, y de una población susceptible (variedad Estanzuela de la compañía Picaso). Las plántulas obtenidas se trasplantaron hasta llegar al tamaño adecuado para la aplicación (5-6 macollos, ver fotos en apéndice). Las bandejas se mantuvieron en invernáculo con condiciones adecuadas para su crecimiento.

En contenedores de 3000 cm³ rellenos con tierra se ubicó una planta (presuntamente resistente o susceptible) por cada contenedor. En ambos tratamientos se realizaron 8 repeticiones. Luego se aplicaron las dosis correspondientes de glifosato.

A los 40 DDA se consideraron las plantas vivas (con hojas verdes) y muertas (completamente secas) en cada una de las repeticiones. Se determinó la altura de las plantas desde la base de la planta al ras del suelo hasta el ápice de la última hoja desplegada. Se evaluó además el peso de materia verde y MS.

El análisis estadístico de los datos se realizó con InfoStat, versión 2016e. Los datos fueron sometidos a un Análisis de la varianza, y las medias se compararon utilizando el test de Tukey con un alfa=0,05.

Se construyó la curva de dosis- respuesta por medio del modelo de regresión no lineal log-logístico descrito por Streibig *et al.* (1993).

$$y = C + (D - C)/(1 + X / I_{50})^b$$

donde:

y: porcentaje de supervivencia.

C y D: límite inferior y superior, respectivamente (respuesta a una dosis muy baja y muy alta de herbicida).

b: pendiente de la curva.

x: dosis del herbicida

I₅₀: dosis que causa el 50% de disminución de la respuesta.

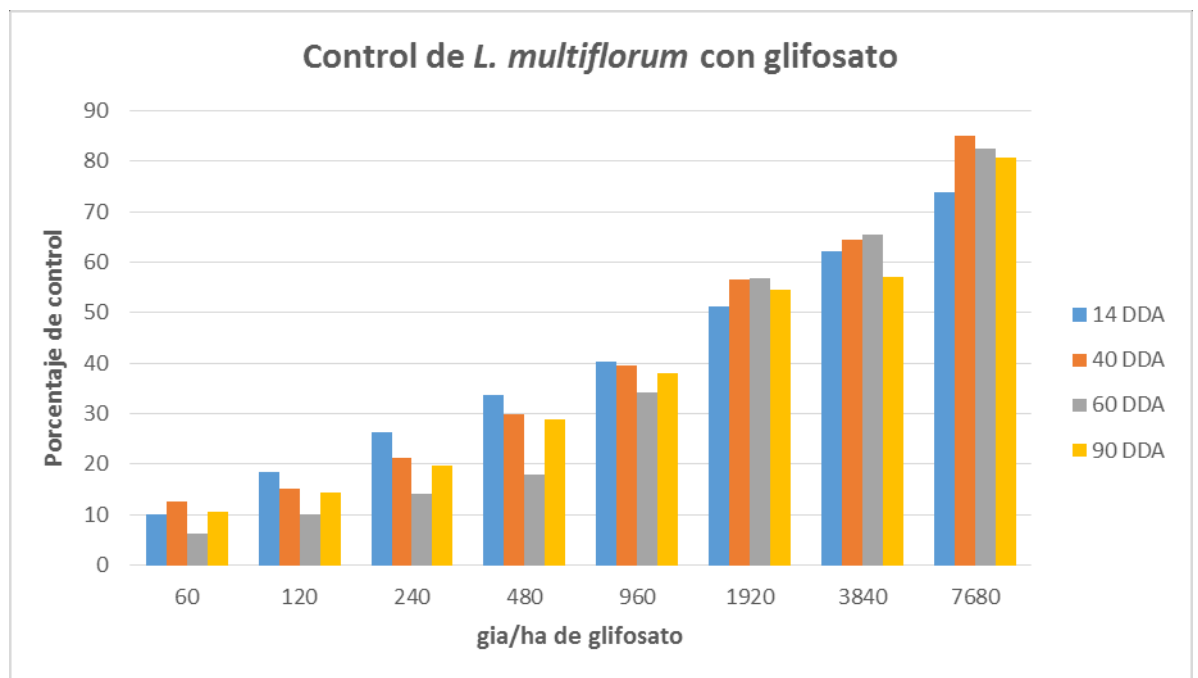
CAPÍTULO 3

3. Resultados

Experimento de campo

La población presuntamente resistente a glifosato fue sólo parcialmente controlada por la aplicación de glifosato. En la figura 3 se muestran los resultados de control para los 14DDA, 40DDA, 60 DDA y 90DDA. Incluso con dosis de 7680 gi.a./ha, un 20% de la población original sobrevivió luego de 90 días desde la aplicación.

Figura3: Control de *L. multiflorum* con distintas dosis de glifosato en diferentes momentos (DDA) luego de la aplicación.



La pequeña disminución del control a los 90DDA es atribuida a los rebrotes de las plantas aplicadas. En las tablas de análisis estadístico se encuentran diferencias significativas de control entre los tratamientos a medida que aumentan las dosis. Sin embargo, como se muestra en la figura 3 la dosis máxima no alcanza para obtener un control eficaz.

Tabla 3: Análisis estadístico de control de *L. multiflorum* con glifosato 14DDA.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,48065 Error: 12,7857 gl: 21			
Tratamiento	Medias	E.E.	
Glifosato DMA 60 gi.a./ha	10	1,79	A
Glifosato DMA 120gi.a./ha	18,5	1,79	B
Glifosato DMA 240gi.a./ha	26,25	1,79	B C
Glifosato DMA 480gi.a./ha	33,75	1,79	C D
Glifosato DMA 960gi.a./ha	40,25	1,79	D
Glifosato DMA 1920gi.a./ha	51,25	1,79	E
Glifosato DMA 3840gi.a./ha	62,25	1,79	F
Glifosato DMA 7680gi.a./ha	73,75	1,79	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

Tabla 4: Análisis estadístico de control de *L. multiflorum* con glifosato 40DDA.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,63552 Error: 7,8274 gl: 21			
Tratamientos	Medias	E.E.	
Glifosato DMA 60gi.a./ha	12,50	1,4	A
Glifosato DMA 120gi.a./ha	15,25	1,4	A B
Glifosato DMA 240gi.a./ha	21,25	1,4	B
Glifosato DMA 480gi.a./ha	30,00	1,4	C
Glifosato DMA 960gi.a./ha	39,50	1,4	D
Glifosato DMA 1920gi.a./ha	56,50	1,4	E
Glifosato DMA 3840gi.a./ha	64,50	1,4	F
Glifosato DMA 7680gi.a./ha	85,00	1,4	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

Tabla5: Análisis estadístico de control de *L. multiflorum* con glifosato 60DDA.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,14842 Error: 11,8036 gl: 21			
Tratamientos	Medias	E.E.	
Glifosato DMA 60gi.a./ha	6,25	4	1,7 A
Glifosato DMA 120gi.a./ha	10	4	1,7 A B
Glifosato DMA 240gi.a./ha	14,25	4	1,7 A B
Glifosato DMA 480gi.a./ha	18	4	1,7 B
Glifosato DMA 960gi.a./ha	34,25	4	1,7 C
Glifosato DMA 1920gi.a./ha	56,75	4	1,7 D
Glifosato DMA 3840gi.a./ha	65,5	4	1,7 E
Glifosato DMA 7680gi.a./ha	82,5	4	1,7 F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

Tabla 6: Análisis estadístico de control de *L. multiflorum* con glifosato 90DDA.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,72417			
Error: 24,4360 gl: 21			
Tratamientos	Medias	E.E.	
Glifosato DMA 60gi.a./ha	10,50	2,47	A
Glifosato DMA 120gi.a./ha	14,50	2,47	A
Glifosato DMA 240gi.a./ha	19,75	2,47	A B
Glifosato DMA 480gi.a./ha	28,75	2,47	B C
Glifosato DMA 960gi.a./ha	38,00	2,47	C
Glifosato DMA 1920gi.a./ha	54,50	2,47	D
Glifosato DMA 3840gi.a./ha	57,00	2,47	D
Glifosato DMA 7680gi.a./ha	80,75	2,47	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

Los controles con herbicidas gramínicidas fueron muy buenos, si bien debido a la acción inicial más lenta de estos productos, el control comienza a ser importante desde los 40 DDA. Estos controles se mantienen hasta el final del ensayo. A partir de las dosis de 75gi.a./ha de haloxyfop y 90 gi.a./ha de cletodim se obtuvieron porcentajes de control por encima de 90%, lo que se considera un control comercialmente aceptable.

A continuación, se presentan las figuras 4a y 4b de control de *L. multiflorum* en campo con haloxyfop y cletodim. Las evaluaciones se realizaron 14, 40, 60 y 90DDA.

Figura4a: Control de *L. multiflorum* con diferentes dosis de haloxyfop (gia/ha) en distintos momentos después de la aplicación. (DDA)

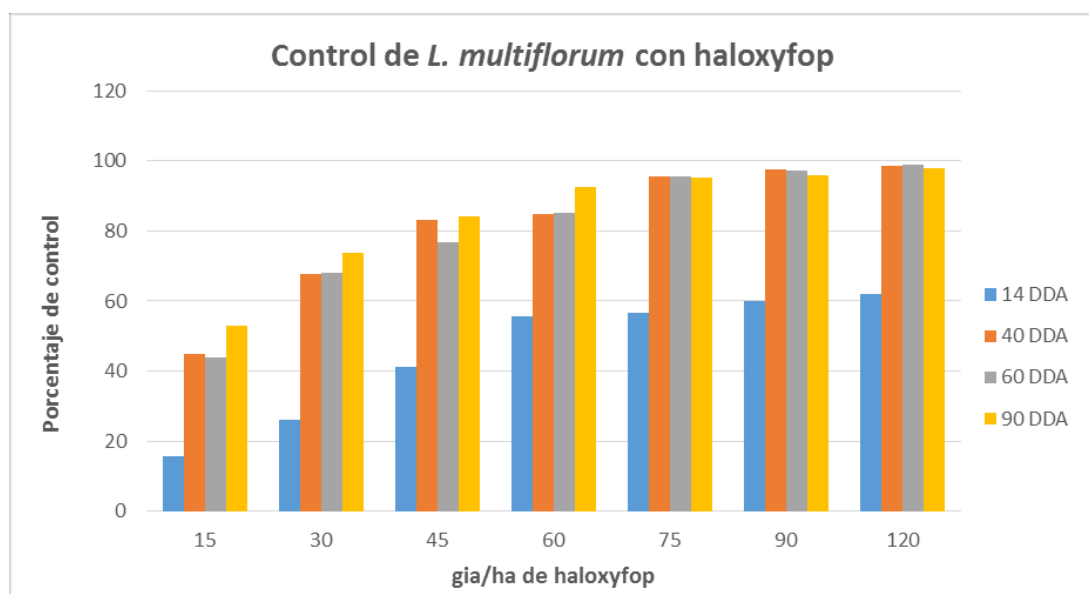
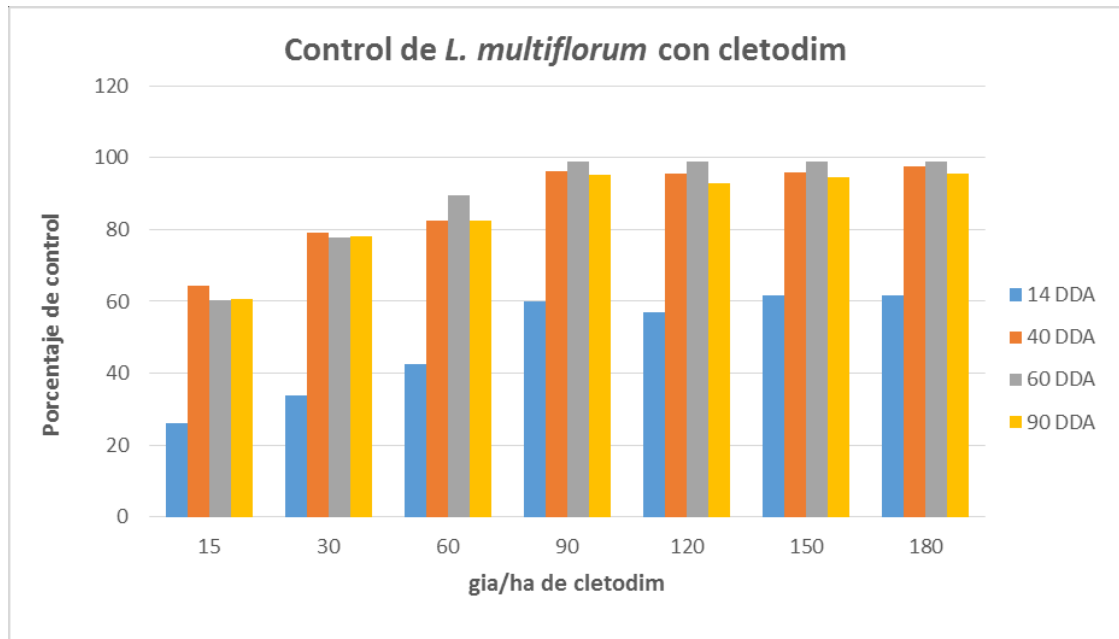


Figura 4b: Control de *L. multiflorum* con distintas dosis (g i.a./ha) de cletodim en diferentes momentos DDA.



En las tablas 7, 8, 9 y 10 se observan mayores porcentajes de control a medida que aumenta la dosis de aplicación. Sin embargo, las dosis por encima de 60 gi.a./ha de haloxyfop y 90 gi.a./ha de cletodim a los 14DDA no difieren estadísticamente.

Tablas 7a y 7b: Análisis estadístico de control de *L. multiflorum* con graminicidas a los 14DDA (haloxyfop y cletodim respectivamente).

a-HALOXYFOP

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,11928			
Error: 27,7976 gl: 21			
Tratamiento	Medias	E.E.	
Haloxyfop 15	15,75	2,64	A
Haloxyfop 30	26,25	2,64	A
Haloxyfop 45	41,25	2,64	B
Haloxyfop 60	55,75	2,64	C
Haloxyfop 90	56,75	2,64	C
Haloxyfop 75	60	2,64	C
Haloxyfop 120	62	2,64	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

E.E. error estándar de la media

b-CLETODIM

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,37221			
Error: 24,4762 gl: 21			
Tratamiento	Medias	E.E.	
Cletodim 15	26,25	2,47	A
Cletodim 30	33,75	2,47	A B
Cletodim 60	42,5	2,47	B
Cletodim 120	57	2,47	C
Cletodim 90	60	2,47	C
Cletodim 150	61,75	2,47	C
Cletodim 180	61,75	2,47	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

A los 40DDA se observaron mayores diferencias entre los tratamientos (tablas 8a y b). En esa evaluación las dosis por encima de 75 gi.a./ha de haloxyfop y 90 gi.a./ha de cletodim no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Tablas 8a y b: Análisis estadístico de control de *L. multiflorum* con graminicidas 40DDA.

a-HALOXYFOP

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=10,36822			
Error: 20,3452 gl: 21			
Tratamiento	Medias	E.E.	
Haloxyfop 15	45	2,26	A
Haloxyfop 30	67,75	2,26	B
Haloxyfop 45	83,25	2,26	C
Haloxyfop 60	84,75	2,26	C
Haloxyfop 75	95,5	2,26	D
Haloxyfop 90	97,5	2,26	D
Haloxyfop 120	98,5	2,26	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

b-CLETODIM

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=10,22158			
Error: 19,7738 gl: 21			
Tratamiento	Medias	E.E.	
Cletodim 15	64,25	2,22	A
Cletodim 30	79,25	2,22	B
Cletodim 60	82,5	2,22	B
Cletodim 120	95,5	2,22	C
Cletodim 150	96	2,22	C
Cletodim 90	96,25	2,22	C
Cletodim 180	97,5	2,22	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

A los 60DDA las diferencias de control entre tratamientos, siguieron las mismas tendencias (tablas 9 a y b).

Tabla 9a y b: Análisis estadístico de control de *L. multiflorum* con graminicidas 60DDA.

a-HALOXYFOP

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=13,62673			
Error: 35,1429 gl: 21			
Tratamiento	Medias	E.E.	
Haloxyfop 15	43,75	2,96	A
Haloxyfop 30	68	2,96	B
Haloxyfop 45	76,75	2,96	B C
Haloxyfop 60	85,25	2,96	C D
Haloxyfop 75	95,5	2,96	D E
Haloxyfop 90	97,25	2,96	D E
Haloxyfop 120	99	2,96	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

b-CLETODIM

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,65907			
Error: 14,1905 gl: 21			
Tratamiento	Medias	E.E.	
Cletodim 15	60,25	1,88	A
Cletodim 30	77,75	1,88	B
Cletodim 60	89,5	1,88	C
Cletodim 90	98,75	1,88	D
Cletodim 120	98,75	1,88	D
Cletodim 150	99	1,88	D
Cletodim 180	99	1,88	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).
E.E. error estándar de la media.

Luego de 90 DDA (tablas 10 a y b) el porcentaje de control disminuye levemente; debido a nuevos nacimientos, sin embargo, las tendencias de control se mantuvieron, a mayores dosis de aplicación mayor control de las malezas. Los porcentajes de control con dosis mayores o iguales de 60 gi.a./ha de cletodim y 45 gi.a./ha de haloxyfop no difirieron. Los controles con dosis tan bajas no serían recomendables teniendo en cuenta que las subdosis pueden generar resistencias al herbicida en un futuro.

Tabla 10a y b: Análisis estadístico de control de *L. multiflorum* con graminicidas 90DDA.

a- HALOXYFOP

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=16,41373			
Error: 50,9881 gl: 21			
Tratamiento	Medias	E.E.	
Haloxyfop 15	53	3,57	A
Haloxyfop 30	73,75	3,57	B
Haloxyfop 45	84,25	3,57	B C
Haloxyfop 60	92,5	3,57	C
Haloxyfop 75	95,25	3,57	C
Haloxyfop 90	95,75	3,57	C
Haloxyfop 120	97,75	3,57	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).
E.E. error estándar de la media.

b- CLETODIM

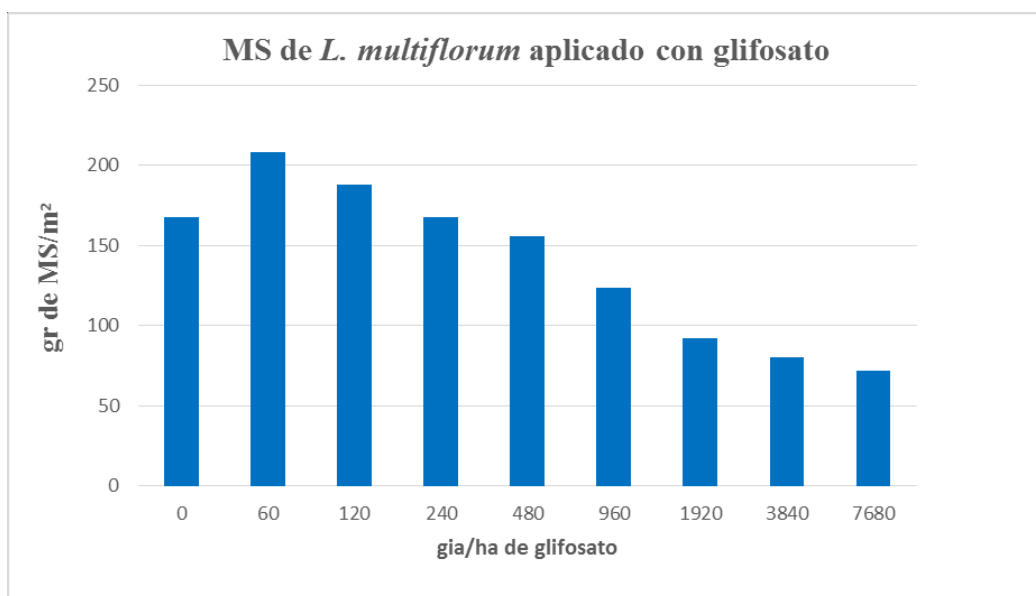
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=17,47183 Error: 57,7738 gl: 21		
Tratamiento	Medias	E.E.
Cletodim 15	60,75	3,8 A
Cletodim 30	78	3,8 A B
Cletodim 60	82,5	3,8 B C
Cletodim 120	92,75	3,8 B C
Cletodim 150	94,5	3,8 B C
Cletodim 90	95,25	3,8 B C
Cletodim 180	95,5	3,8 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).
E.E. error estándar de la media.

Materia Seca

El análisis de la MS de *L. multiflorum* presuntamente resistente obtenido 60DDA en el campo en función a la dosis de glifosato (figura5) muestra una curva similar a una J o una U invertida ya que con las dosis menores a la recomendada para controlar las malezas se observó hormesis promoción de crecimiento y acumulación de biomasa.

Figura5: MS de *L. multiflorum* presuntamente resistente a glifosato



El análisis estadístico correspondiente a la figura 5 se detalla en la tabla 11. Las tres dosis más altas (1920, 3840 y 7680 gi.a./ha) no presentan diferencias estadísticas

entre sí, indicando una mayor eficacia de control del glifosato, donde las plantas interrumpieron el efecto detrimental de su crecimiento, aunque no fue suficiente para desecarlas.

Tabla 11: Comparación de medias de MS (g/m^2) de parcelas tratadas con glifosato.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=23,24368			
Error: 93,5278 gl: 24			
Tratamiento	Medias	E.E.	
Glifosato DMA 60gia/ha	208	4,84	A
Glifosato DMA 120gia/ha	188	4,84	A B
Glifosato DMA 240gia/ha	168	4,84	B C
Control	168	4,84	B C
Glifosato DMA 480gia/ha	156	4,84	C
Glifosato DMA 960gia/ha	124	4,84	D
Glifosato DMA 1920gia/ha	92	4,84	E
Glifosato DMA 3840gia/ha	80	4,84	E
Glifosato DMA 7680gia/ha	72	4,84	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

A los 60DDA la MS de *L. multiforum* tratada con graminicidas disminuye progresivamente con el aumento de la dosis aplicada (figuras 6 a y b). Al igual que en la evaluación visual el control que efectúa el cletodim es más rápido que el haloxyfop, sin embargo, en las dosis superiores a 45gia/ha de haloxyfop y 30gia de cletodim no se encuentran diferencias significativas.

Figura 6a: MS (g de MS/ m^2) obtenidas en las parcelas tratadas con haloxyfop.

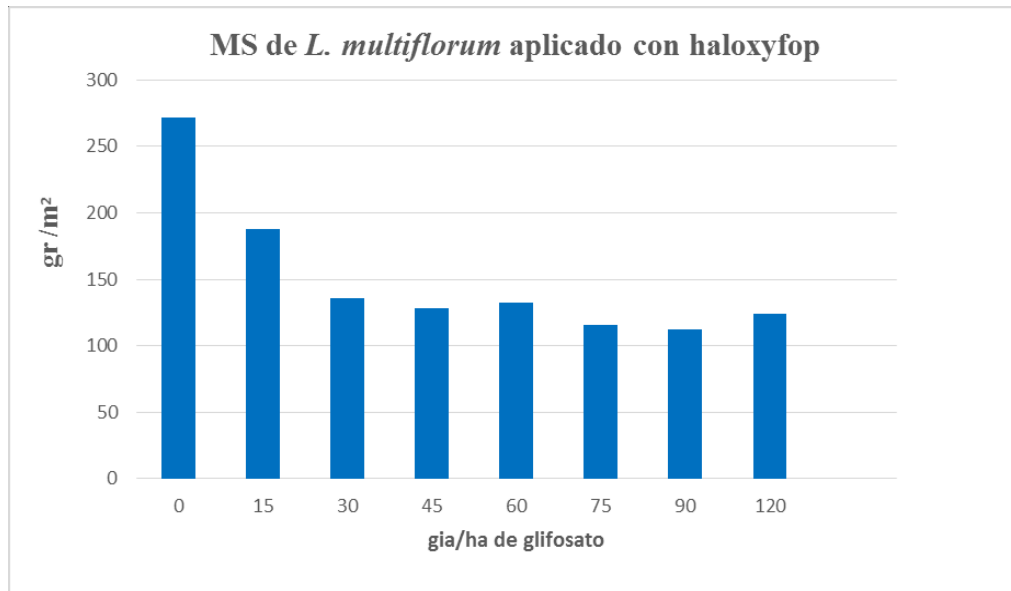


Figura 6b: MS (g de MS/m²) obtenidas en las parcelas tratadas con cletodim.

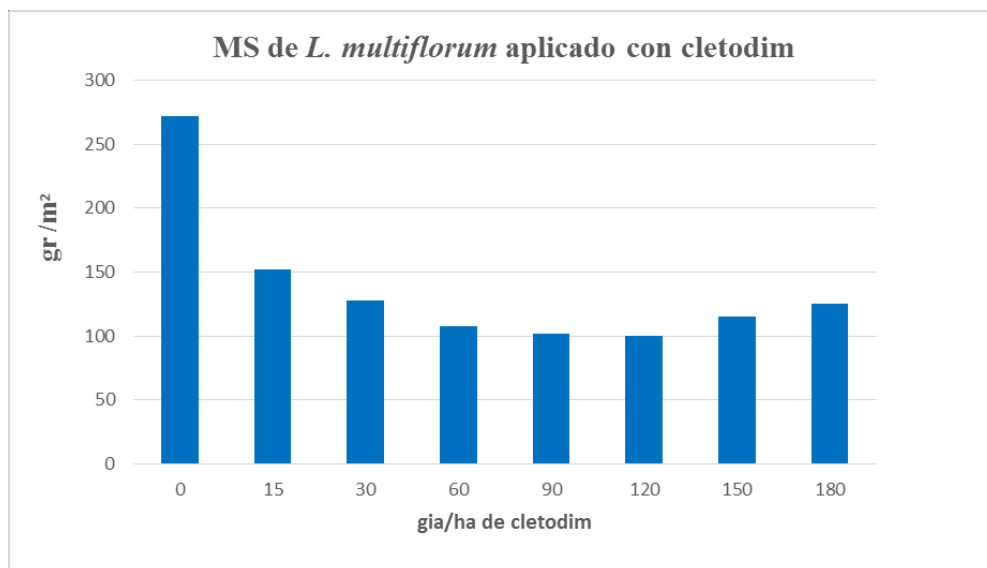


Tabla 12: Análisis estadístico de MS en parcelas tratadas con haloxyfop.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=27,34418			
Error: 136,3333 gl: 24			
Tratamientos	Medias	E.E.	
Haloxyfop 90	112	5,84	A
Haloxyfop 75	116	5,84	A
Haloxyfop 120	124	5,84	A
Haloxyfop 45	128	5,84	A
Haloxyfop 60	132	5,84	A
Haloxyfop 30	136	5,84	A
Haloxyfop 15	188	5,84	B
Control	272	5,84	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

Tabla 13: Análisis estadístico de MS en parcelas tratadas con cletodim.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=31,68752			
Error: 183,0833 gl: 24			
trt gram	Medias	E.E.	
Cletodim 120	100	6,77	A
Cletodim 90	102	6,77	A
Cletodim 60	108	6,77	A
Cletodim 150	115	6,77	A
Cletodim 180	125	6,77	A B
Cletodim 30	128	6,77	A B
Cletodim 15	152	6,77	B
Control	272	6,77	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

Resultados de los experimentos en invernáculos.

1. Altura

Los estudios en invernadero permitieron realizar otras comparaciones entre la población susceptible y la presuntamente resistente (foto en anexo). La altura de las plantas de *L. multiflorum* presumiblemente resistentes a glifosato a los 40 DDA confirman la hormesis observada a campo. (Figura7). Esto se da tanto para biotipos susceptibles como resistentes. En las tablas 14 y 15 se muestra el análisis de comparación de medias a través del test de Tukey para cada biotipo. En estos análisis se diferencian estadísticamente la mayor parte de los tratamientos entre sí. Se puede destacar que las dosis entre 120 y 960gia/ha presentan una altura mayor que el testigo en el caso de las resistentes, y para las susceptibles esto se observa entre las dosis de 60 y 240gia/ha.

Figura7: Altura de plantas de la población supuestamente resistente a glifosato.

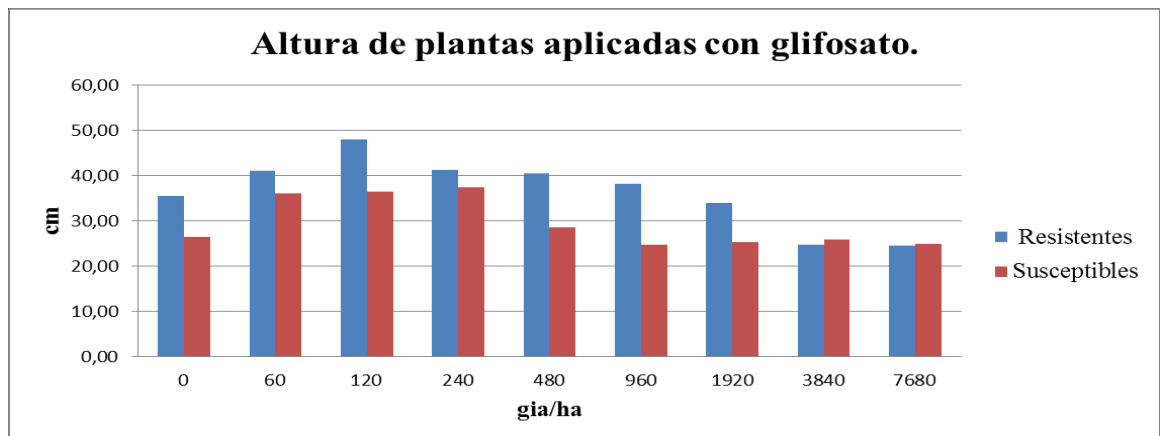


Tabla 14: Altura en la población supuestamente resistente

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,63290 Error: 3,0269 gl: 64			
Tratamientos	Medias	E.E.	
Glifosato DMA 120gia/ha	48,01	0,58	A
Glifosato DMA 240gia/ha	41,22	0,58	B
Glifosato DMA 60gia/ha	41,01	0,58	B
Glifosato DMA 480gia/ha	40,43	0,58	B C
Glifosato DMA 960gia/ha	38,2	0,58	C
Control	35,57	0,58	D
Glifosato DMA 1920gia/ha	33,79	0,58	D
Glifosato DMA 3840gia/ha	24,63	0,58	E
Glifosato DMA 7680gia/ha	24,57	0,58	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

Tabla 15: Altura en la población susceptible a glifosato.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,27700 Error: 4,6890 gl: 64		
Tratamientos	Medias	E.E.
Glifosato DMA 240gia/ha	37,48	A
Glifosato DMA 120gia/ha	36,46	A
Glifosato DMA 60gia/ha	36,01	A
Glifosato DMA 480gia/ha	28,57	B
Control	26,56	B C
Glifosato DMA 3840gia/ha	25,82	B C
Glifosato DMA 1920gia/ha	25,81	B C
Glifosato DMA 7680gia/ha	25,82	B C
Glifosato DMA 960gia/ha	24,77	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

2. Materia Seca (MS)

A partir de los datos de MS es posible observar la hormesis que genera el glifosato en *L. multiflorum*. En la tabla 16 se muestran los datos. La parcela control es similar a las parcelas con dosis de 480, 960, 1920 y 3840g i.a/ha, mientras que los tratamientos de 60 a 240g i.a/ha generaron hormesis. Únicamente el tratamiento con la dosis más alta resultó con menor MS que el testigo.

Figura8: MS en g/planta de *Lolium* posiblemente resistente a glifosato 40DDA.

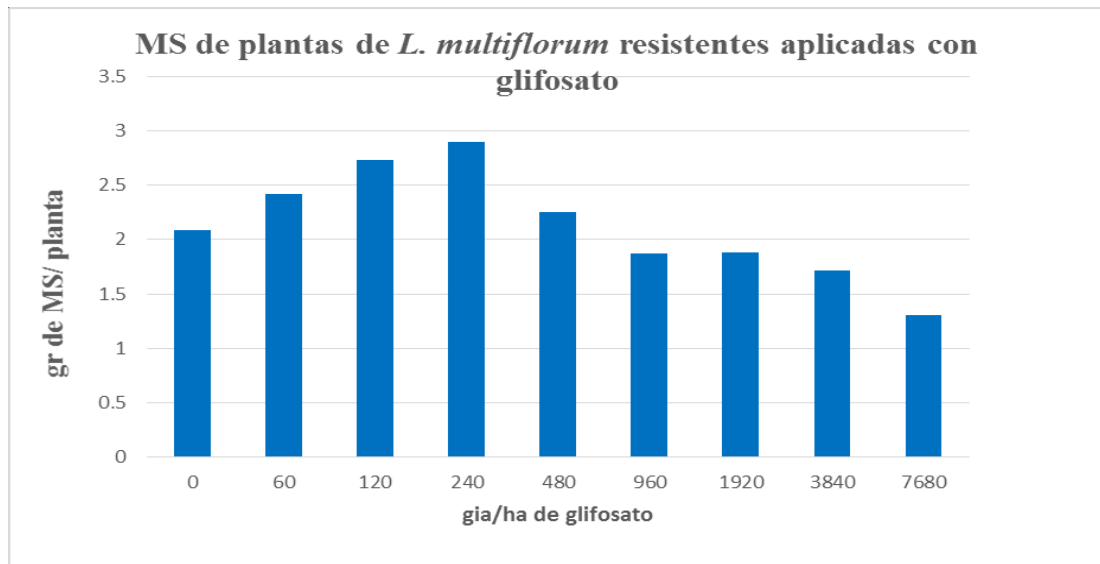


Tabla 16: MS por planta sobre la población de *Lolium* supuestamente resistente a Glifosato.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,61077			
Error: 0,1629 gl: 64			
Tratamientos	Medias	E.E.	
Glifosato DMA 240gia/ha	2,9	0,13	A
Glifosato DMA 120gia/ha	2,73	0,13	B
Glifosato DMA 60gia/ha	2,42	0,13	B C
Glifosato DMA 480gia/ha	2,25	0,13	B C D
Control	2,09	0,13	C D
Glifosato DMA 1920gia/ha	1,88	0,13	C D E
Glifosato DMA 960gia/ha	1,87	0,13	C D E
Glifosato DMA 3840gia/ha	1,72	0,13	D E
Glifosato DMA 7680gia/ha	1,3	0,13	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

E.E. error estándar de la media.

La MS promedio por planta de *L. multiflorum* susceptible se muestra en la figura 9 y en la tabla 17, donde al igual que en la variedad presuntamente resistente se genera el efecto de hormesis. En este caso, el tratamiento control fue similar estadísticamente a las parcelas aplicadas con 240 y 480g i.a./ha de glifosato, mientras que las dosis mayores a 960gi.a/ha detuvieron el crecimiento de *Lolium* y la MS resultante fue menor al control y similares entre sí.

Figura9: Peso seco medio por planta de *Lolium* susceptible a glifosato 40DDA.

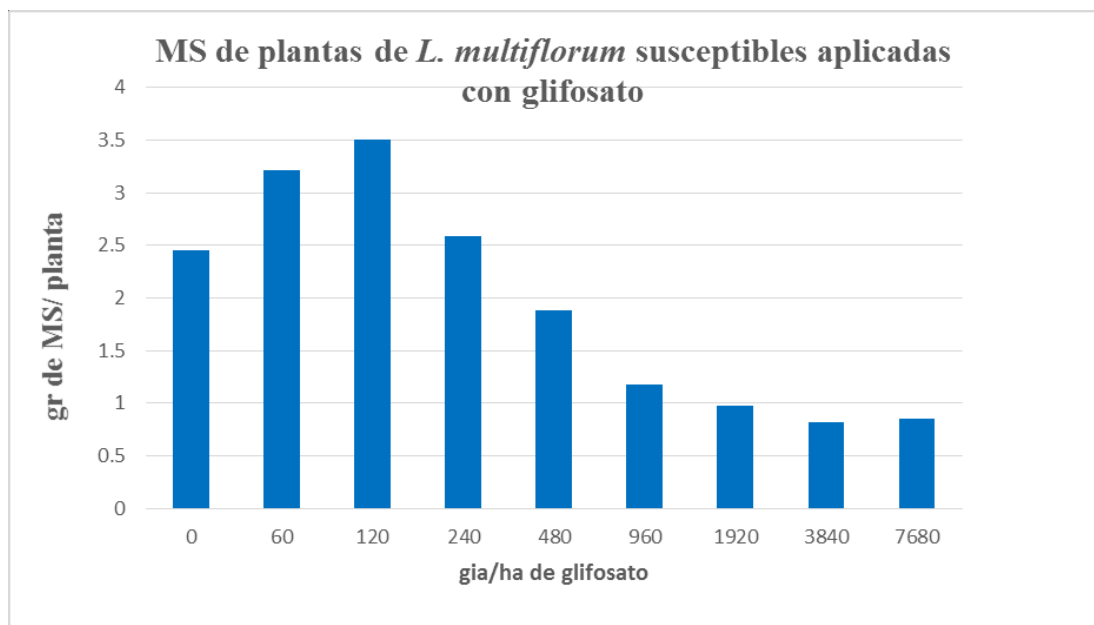


Tabla 17: MS por planta en la población de *Lolium* susceptible a Glifosato.

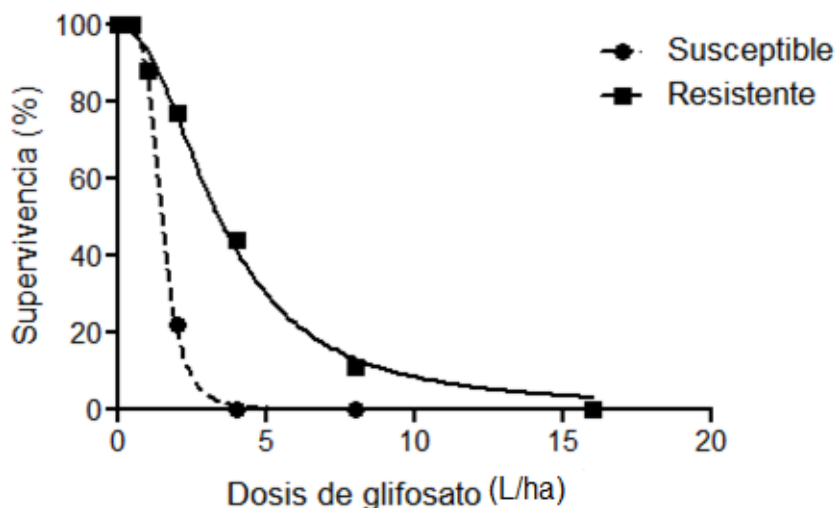
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,57679			
Error: 0,1453 gl: 64			
Tratamientos	Medias	E.E.	
Glifosato DMA 120gia/ha	3,5	0,13	A
Glifosato DMA 60gia/ha	3,21	0,13	A
Glifosato DMA 240gia/ha	2,59	0,13	B
Control	2,45	0,13	B C
Glifosato DMA 480gia/ha	1,88	0,13	C
Glifosato DMA 960gia/ha	1,18	0,13	D
Glifosato DMA 1920gia/ha	0,98	0,13	D
Glifosato DMA 7680gia/ha	0,85	0,13	D
Glifosato DMA 3840gia/ha	0,82	0,13	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). E.E. error estándar de la media.

Curvas de dosis-Respuesta

La curva de la relación dosis-respuesta para la población susceptible se encuentra por debajo de la curva de la población supuestamente resistente (figura 10). La población susceptible fue controlada completamente solo con 1920 gi.a. /ha (4l/ha de producto formulado,p.f.), dosis mayor que la recomendada en los marbetes. En cambio, en *L. multiflorum* supuestamente resistente, la dosis de 7680g i.a./ha (16 l.p.f./ha) no fue suficiente para controlar completamente las plantas testeadas. La dosis para controlar el 50 % de la población susceptible fue de 720g i.a./ha (1,5lp.f./ha), mientras que para la población supuestamente resistente fue de 1656g i.a./ha (3,4l.p.f./ha). Con los datos obtenidos se calculó un IR de 2,27. Ese coeficiente indica que para controlar la variedad resistente se precisan 2,27 veces más cantidad de herbicidas para ese momento de aplicación (4-5 macollos).

Figura 10: curva dosis respuesta.



Parámetros de los modelos de regresión no-lineal y bondad de ajuste

	D (%)	C (%)	I_{50} (L/ha)	B	P-valor	R^2
Susceptible	100,1 (\pm 0,2)	-0,3 (\pm 0,2)	1,52 (\pm 0,01)	4,72 (\pm 0,08)	<0,001	0,99
Resistente	99 ,3 (\pm 1,5)	-7,2 (\pm 4,2)	3,45 (\pm 0,16)	2,22 (\pm 0,20)	<0,001	0,99

CAPÍTULO 4

Discusión y conclusiones

En función de los resultados obtenidos, puede concluirse que la población de *L. multiflorum* de Solís, es resistente a glifosato, con un IR de 2,27, confirmando de esta forma la primera hipótesis planteada.

Según Vigna *et al.* 2011, en general en la región de la experimental de INTA Bordenave, los IR hallados en determinaciones preliminares para algunas poblaciones no parecerían ser altos pero no habría que descartarlos ya que el género *Lolium* ha manifestado diferentes mecanismos de resistencia y capacidad de hibridación entre especies (Inda Aramendia, 2005) que estarían generando cambios continuos en los individuos de las poblaciones espontáneas. Sería importante tomar este concepto para extrapolarlo a otras zonas, donde tanto el *Lolium* como otras malezas presumiblemente resistentes afecten los cultivos, para comenzar a hacer un manejo razonable de herbicidas y prácticas culturales según sea conveniente.

Este resultado coincide con otros estudios (López *et al.* 2008; Yanniccari *et al.* 2009) que demostraron la presencia de *Lolium* resistente en Argentina.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en el campo indican una sobrevivencia de un 20% de los individuos con la dosis máxima testeada (7680g i.a/ha) de glifosato. Si bien no es objetivo de esta tesis estudiar la causa de la resistencia estos individuos probablemente estén presentes debido a la aplicación reiterada de subdosis en el lote (comunicación personal del administrador del campo).

López *et al.* (2008) también confirmaron la presencia de una población de *L. multiflorum* resistente a glifosato en el sur de la provincia de Buenos Aires. En su estudio obtuvieron excelentes controles en mezclas de glifosato con graminicidas. De manera similar a lo que se obtuvo en el presente estudio, López *et al.* (2008) lograron controles de la maleza mayores al 95% en mezcla de 500g i.a./ha de glifosato con 96g i.a./ha de cletodim. Con la mezcla de 500g i.a/ha de glifosato más 62,5g i.a./ha de haloxyfop los resultados fueron levemente inferiores, aunque no dejaron de ser efectivos.

Este experimento también concuerda con un trabajo realizado por Yanniccari *et al.*, (2009) donde se logró un control más lento pero efectivo con haloxyfop (Galant LPU) a

una dosis de 100g/ha en poblaciones de *L. perenne* del sur de la provincia de Buenos Aires resistentes a glifosato.

En nuestro país los controles con graminicidas han tenido éxito por el momento, siendo los herbicidas más utilizados haloxyfop y cletodim. Sin embargo, debería tenerse en cuenta un uso apropiado de los mismos para postergar la aparición de futuras resistencias. Como se vio anteriormente, la presencia de *L. multiflorum* resistente a herbicidas en la región ya ha sido declarada. Sin ir más lejos, Vigna *et al.*, 2011 hallaron una población de *L. multiflorum* resistente a diclofop-metil en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires. En Chile, país vecino, Galdamez *et al.* (2009), confirmaron la resistencia de *L. multiflorum* a varios graminicidas fop y dim, como así también sucede en otros países de América.

Los resultados obtenidos de la evaluación de MS fueron consistentes y se asemejan a los realizados por Román *et al.* (2004) quienes obtuvieron niveles de MS menores en las plantas del biotipo sensible aplicadas con glifosato, inferiores al testigo. En cambio, en el biotipo resistente se observaron resultados variables en función de la dosis: dosis crecientes de glifosato hasta 1440g i.a./ha resultaron en valores de MS semejantes al testigo y por encima de esa dosis produjeron menor MS.

A su vez tanto las pruebas en invernáculos como en campo mostraron un efecto de hormesis, sin importar si el biotipo fuera sensible o resistente a glifosato. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Yannicari (2014) en su tesis doctoral con la especie *L. perenne*. Varios autores (Velini *et al.*, 2008; Cedergreen *et al.*, 2006; Dellaferrera, 2013) han descrito experimentos donde se presentó hormesis por la aplicación de glifosato. En esos casos se experimentó sobre soja no transgénica, maíz, *Commelina benghalensis*, *Eucaliptus grandis*, *Pinus caribea* y *Parietaria debilis*. También existen trabajos que describen este efecto sobre caña de azúcar, donde se busca aumentar la concentración de azúcar.

Confirmada la resistencia de esta especie es recomendable tener en cuenta el uso y manejo de los herbicidas graminicidas para su control, evitar la aplicación reiterada de los mismos y realizar los controles en el momento adecuado. Tanto para esta maleza como para otras, debe realizarse un manejo racional evitando generar nuevas resistencias y preservando las herramientas químicas de las que se dispone.

Bibliografía

- Acciaresi, H.; Chidichimo, H.; Sarandón, S. 2003. Shoot and root competition in a *Lolium multiflorum*-wheat association. *Biological Agriculture and Horticulture* 21: 15-33.
- Amini, R.; An, M.; Pratley, J.; Azimi, S. 2009. Allelopathic assessment of annual ryegrass (*Lolium rigidum*): bioassays. *Allelopathy Journal* 24: 67-76.
- Antonovics, J. y Thrall, P.H. 1994. Cost of resistance and the maintenance of genetic-polymorphism in host-pathogen systems. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 257: 105–110.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P. and Steinricken, H.C. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol.* 65:830- 834.
- Anderson, K. S. y Johnson, K.A. 1990. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: lessons from EPSP synthase. *Chem. Rev.* 90:1131- 1149
- Baan Hofman, T.; Ennik, G. 1980. Investigation into plant characters affecting the competitive ability of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Netherland Journal of Agricultural Science* 28: 97-109.
- Baerson, S.R.; Rodríguez, D.; Tran, M.; Feng, Y.; Biest, N.A.; Dill, G.M. 2002. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol.*, v. 129, p. 1265–1275.
- Baskin, C.C. y Baskin, J.M. 1998. Seeds, ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. 667p. San Diego: Academic Press.
- Benbrook, C.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* 28, 3 (2016) doi:10.1186/s12302-016-0070-0
- Bently, R. 1990. The shikimate pathway-A metabolic tree with many branches. p. 307-384 in G. D. Fasman, ed. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*.
- Boocock, M. R. and Coggins, J.R., 1983. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. Department of Biochemistry, University of Glasgow, Glasgow, G12 8QQ, Scotland. Volume 154, Issue 1, 5 April 1983, Pages 127-133

- Bott, S.; Tesfamariam, T.; Kania, A.; Eman, B.; Aslan, N.; Romheld, V.; Neumann, G. 2011. Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilized by phosphate fertilization. *Plant and Soil*, v.342, p.249-263.
- Bradshaw, L.D., Padgett, S.R., Kimball, S.L., Walls, B.H. 1997. Perspectives of glyphosate resistance. *Weed Technology*. 11:189-198.
- Bradford, K.J. 2002. Applications of hydrothermal time to quantifying and modeling seed germination and dormancy. *Weed Science* 50: 248-260
- Broster, J.C. y Pratley, J.E. 2006. A Decade of Monitoring Herbicide Resistance in *Lolium rigidum* in Australia. Citation: *Aust. J. Exp. Agr.* (2006) 46(9): 1151-1160.
- Bukouski, J.A. y Lewis, R.J. 2000. Hormesis and health: A little of what you fancy may be good for you. *Southern Medical Journal*, v. 93, p. 371-374.
- Calabrese, E.J.; Baldwin, L.A. 2000. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in Pharmacological Science*, v.22, p.285-291.
- Calabrese, E.J.; Baldwin, L.A. 2001. Hormesis: a generalizable and unifying hypothesis. *Critical Reviews in Toxicology*, v.31, p.353-424.
- Calabrese, E.J y Baldwin L.A. (2002). Defining hormesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 21: 91-7
- Carbone, A. 2015. Caracterización morfo-anatómica de dos poblaciones de *Gomphrena perennis* L. y su posible relación con la sensibilidad al herbicida glifosato. Tesis de maestría.
- Carvalho, L.B.; Alves, P.L.; González Torralva, F.; Cruz-Hipólito, H.E.; Rojano-Delgado, A.M.; De Prado, R.; Gil-Humanes, J.; Barro, F.; Luque De Castro, M.D. 2012. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 60, p. 615-622.
- CASAFE. <https://www.casafe.org/pdf/2018/ESTADISTICAS/Informe-Mercado-Fitosanitarios-2016.pdf>
- Catullo, J.C., Valetti, O.E., Rodríguez, M.L. y Sosa, C.A. 1982. Relevamiento de malezas en cultivos comerciales de trigo y girasol en el centro sur bonaerense. IX Reunión Argentina sobre la Maleza y su Control. *Revista Malezas (ASAM)* Vol. 11:204-235.
- Cedergreen, N.; Streibig, J.C.; Kudsk, P.; Mathiassen, S.K.; Duke, S.O. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-Response*, v.5, p.150-162.
- Cedergreen y N.; Olesen, C.F. 2010. Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, n.96, p.140-148.

Civeira, Gabriela. 2012. Recopilación sobre los efectos del Glifosato en agroecosistemas. INTA Castelar.

Collabelli, M., Peretti, A., San Martino, S. y Cendoya, G. 2001. Calidad de semillas en partidas comerciales de raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) en la Argentina comparadas por los test de fluorescencia y prefoliación. *Revista Brasileira de Sementes*. 23(2):268-274

Coupland, D. 1991. The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanism. En: *Herbicide resistance in Weeds and Crops*. Editado por J.C. Caseley, G. W. Cussans y R. T. Atkins.

Cruz- Hipólito, H.; Osuna, M. D.; Heredia, A.; Ruiz – Santaella, J. P.; De Prado, R. 2009. Nontarget mechanism involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4273-4278

De Prado, R.; Sánchez, M.; Jorrín, J.; Domínguez, C. 1992. Negative cross resistance to bentazone and pyridate in atrazine-resistant *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus hybridus* biotypes. *Pesticide Sci.*, v. 35, p. 131-136.

De Prado, J. L.; De Prado, R.; Shimabukuro, R. H. 1999. The effect of diclofop on membrane potential, ethylene induction and herbicide phytotoxicity and herbicide resistant and susceptible biotypes of grasses. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 63:1-14

De Prado, R.; De Prado, J.L.; Osuna, M.D.; Taberner, A.; Heredia, A. 2001. Is diclofop-methyl resistance in *Lolium rigidum* associated with a lack of penetration? En: "Proceeding of the Brighton Crop Protection Conference".

De Souza Maia, M.; Maia, F.C. y Pérez, M. A. 2006. Soil seed banks. *Agriscientia* XXIII.33-44.

Degenhardt, D.; Humphries, D.; Cessna, A.J.; Messing, P.; Badiou, P.H.; Raina, R.; Farenhorst, A.; Pennock, D.J. 2012. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediment in two Canadian prairie wetlands. *J. of Envir. Sci. and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Waste*, 7,631- 639.

Dewey, S.A. y Appleby, A.P. 1983. A comparison between glyphosate and assimilate translocation patterns in tall morning glory (*Ipomoea purpurea*). *Weed Sci.*, v. 31, p. 308-314.

Diez de Ulzurún, P. Y Leaden, M.I. 2010. Situación actual de la resistencia a herbicidas en Argentina y el mundo. *Vision Rural* N° 82 p. 23-26

- Diggle, A.J., y P. Neve. 2001. The population dynamics and genetics of herbicide resistance—a modeling approach. in S.B. Powles and D.L. Shaner (Eds.) *Herbicide Resistance and World Grains*:61-99
- Dinelli, G.; Marotti, I.; Bonetti, A. 2006. Physiological and Molecular Insight on the Mechanisms of Resistance to Glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86: 30-41.
- Dinelli, G.; Marotti, I.; Bonetti, A. 2008. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. *Weed Research* 48: 257-265
- Duke, S.O.; Cedergreen, N.; Velini, E.D.; Belz, R.G. 2006. Hormesis: Is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks Pest. Manag*, v. 17, p. 29-33.
- Eichelberger, L; De Souza Maia, M y Brião Camacho, JC. 2001. Períodos de présequecimento na superação da dormência de sementes de azevém-anual (*Lolium multiflorum* Lam). *Revista Brasileira de Sementes* 23: 212-218
- Espinoza, N. y Díaz, J. 2005. Situación de la resistencia de malezas a herbicidas en cultivos anuales en Chile. Seminario Taller Iberoamericano Resistencia a herbicidas y cultivos transgénicos. INIA Uruguay. p. 74-82.
- FAO 2009. La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. Foro de expertos de alto nivel. Rome 12-13 octubre 2009.
- Fei, S. y Nelson, E. 2003 Estimation of pollen viability, shedding pattern, and longevity of creeping bent grass on artificial media. *Crop Sci*: 43
- Feng, P.; Tran, M.; Chiu, T.; Sammons, R.; Heck, G.; Jacob, C. 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science* 52: 498-505.
- Ferreira, E. A.; Santos, J.B.; Silva, A.A., Oliveira, J.A. y Vargas, L. 2006 Translocação do glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). *Planta Daninha*, v. 24, n. 2, p. 365-370.
- Ferreira, E.A.; Galon, L.; Aspiazú, I.; Silva, A.A.; Concenco, G.; Silva, A.F.; Oliveira, J.A.; Vargas, L. 2008. Glyphosate translocation in Hairy Fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes. *Planta Daninha*, v. 26, p. 637-643.
- Fischer, A.J. 2008. Mecanismos de Resistencia. Las bases para estrategias. Seminario internacional “Viabilidad del Glifosato en sistemas productivos sustentables”. INIA serie de actividades de difusión 554. 26-43. Colonia, Uruguay.
- Franz, J. E.; Mao, J.K. y Sikorski, J.A. 1993. Glyphosate's molecular mode of action: A review of glyphosate and EPSPS biochemistry. *Am. Chem. Soc. Monogr.* 13:1-87
- Gaines, T.A.; Zhang, W.; Wang, D.; Bukun, B.; Chisholm, S.T.; Shaner, D.L.; Nissen, S.J.; Patzoldt, W.L.; Tranel, P.J.; Culpepper, A.S.; Grey, T.L.; Webster, T.M.; Vencill, W.K.; Sammons, R.D.; Jiang, J.; Preston, C.; Leach, J.E.; Westra, P. 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 107, p. 1029–1034.

- Galli, A.J.B.; Marochi, A.I.; Christoffoleti, P.J.; Trentin, R.; Tochetto, S. 2005. Ocorrência de *Lolium multiflorum* Lam resistente a glyphosate no Brasil. Seminario Taller Iberoamericano Resistencia a Herbicidas y cultivos Transgénicos. INIA.
- Galvan, J., Rizzardi, M.A.; Carneiro, C.M. y Bianchi, M.A. 2012 Anatomía Foliar De *Lolium multiflorum* Sensível e Resistente ao glyphosate Planta daninha. vol.30, n.2, pp.407-413. ISSN 0100-8358.
- Ge, X.; D'Avignon, D.A.; Ackerman, J.J.H.; Sammons, R.D. 2010. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. Pest Manag. Sci., v. 66, p. 345–348.
- Giddings, G.D. 2000. Modelling the spread of pollen from *Lolium perenne*. The implications for the release of wind-pollinated transgenics. Theoretical and Applied Genetics. 100 (6), 971-974.
- Gigón, R.; Labarthe, F.; Lageyre, L.E.; Vigna, M.R.; López, R.; Vergara, M.F. y Varela, P.E. 2011. Comunidades de malezas en cultivos de trigo en el Sur y Sudoeste de la provincia de Buenos Aires
- Gigón, R. Vigna, M., López, R., Istilart, C. 2014. Relevamiento de malezas en cultivos de soja en el sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina. CHACRA EXPERIMENTAL INTEGRADA BARROW CONVENIO MAA (Bs.As.) - INTA
- Gigón, R.; Vigna, M. y Yannicari, M. 2017. Manejo de malezas problema. Raigrás. *Lolium* spp. REM AAPRESID. <http://www.aapresid.org.ar/rem>
- Glenn-Lewin, R.K.; Peet, R.K., Veblen, T.T. 1992. Plant Succession: Theory and Prediction. Ed. Springer Netherlands. Serie 11
- González-Torralva, F.; Gil-Humanes, J.; Barro, F.; Brants, I.; De Prado, R. 2012. Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. Plant Physiol. Biochem., v. 58, p. 16–22.
- González-Torralva, F.; Pérez-López, M.; De Prado, R. 2013. Resistencia a Glifosato: Aspectos biológicos y Agronómicos. Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. INIA. P 1-13.
- Gressel, J. 1996. Fewer constraints than proclaimed to the evolution of glyphosate-resistant weeds. Resistant Pest Management. 8: 2-5.
- Gressel, J. 2002. Molecular Biology of weed control. Taylor & Francis, London, 520p.
- Grossbard, E. and Atkinson, D. 1985. The Herbicide Glyphosate. Butterworth and Company, Ltd., London. 490 p.
- Gussin, E.; Lynch, J. 1981. Microbial fermentation of grass residues to organic acids as a factor in the establishment of new grass swards. New Phytologist 89: 449-457.
- Hatzios, K.K. 1991. Biotransformations of herbicides in higher plants. En: "Environmental chemistry of herbicides". Boca Raton, FL, CRC Press pp141-185.

- Heap, J.; Knight, R. 1982. A Population of ryegrass tolerant to the herbicide diclofop-methyl. *Journal of Australian Institute of Agricultural Science* 48, 156–157.
- Heap, I.M. 2006. International Survey of Herbicide-resistant weeds. <http://www.weedscience.org>
- Heap, Ian M. 2011. Las peores malezas mundiales resistentes a herbicidas. *WeedScience*. Aapresid.
- Hess, F.D. 1985. Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerance and susceptibility. En: *Weed physiology*.
- Hofer, U.; Muehlebach, M.; Hole, S.; Zoschke, A. 2006. Pinoxaden - for Broad Spectrum Grass Weed Management in Cereal Crops. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113:989-995.
- Holt, J.S.; Thill, D.C. 1994. Growth and Productivity of Resistant Plants. En: *Herbicide resistance in plants: Biology and biochemistry*.
- Inda Aramendía, Luis A. 2005. El género *Lolium*. Claves dicotómicas. *Rev. Real Academia de Ciencias*. Zaragoza. 60: 143–155.
- Istilart, C. 1991. Relevamiento de malezas en cultivos de trigo en los partidos de Tres Arroyos, G. Chaves y Necochea. *XII Reunión ASAM* 2: 87-96.
- Istilart, Carolina; Yannicari, Marcos 2012. Raigrás perenne resistente a herbicidas.
- Jaguer, G. 1983. Herbicides. In K.H Buchel (ed) *Chemistry of herbicides*. New York: Wiley pp 322-93.
- Jander, G.; Baerson S.R., Hudak, J.A.; Gonzalez, K.A.; Gruys, K.J.; Last, R.L. 2003. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determinate frequency of herbicide resistance. *Plant Physiology*. 131: 139-146.
- Jasieniuk, M.; Brule-Bale, A.L.; Morrison, I.N. 1996. The evolution and genetics of herbicides resistance in weed. *WeedScience* 44:176-193.
- Jasieniuk, M.; Ahmad, R.; Sherwood, A.M.; Firestone, J.L.; Perez-Jones, A.; Lanini, W.T; Mallory-Smith, C.; Stednick, Z. 2008. Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: Distribution, Response to Glyphosate, and Molecular Evidence for an Altered Target Enzyme. *Weed Sci.*, v. 56, p. 496–502.
- Jenkin T.J. 1954. Interspecific and intergeneric hybrids in herbage grasses IV-VIII. *Journal of genetics* 52: 239-331
- Kishore, G. M. y Shah, D.M. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57
- Kogan, M y Alister, C. 2013. Dinámica del glifosato en el Suelo y su potencial actividad vía absorción radicular. Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. INIA. P 41-49

- Koger, C.H.; Reddy, K.N. 2005. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci.*, v. 53, p. 84–89.
- Lee, L. J. y Ngim, J. 2000. A first report of glyphosate-resistant goose grass (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) in Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 56:336-339.
- Lindon, M.B; Irigoyen, J.H.; Sabbatini, M.R.; Cragnez, A. 2009. Efecto sinérgico de la mezcla entre glifosato y cletodim para el control de un biotipo de *Lolium multiflorum* resistente a glifosato. En Jornadas Fitosanitarias Argentinas (13., 2009, Termas de Río Hondo, AR).
- Lodovichi, M.V. 2018. Modelado poblacional del raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) en cultivos de trigo de la región semiárida. Tesis doctoral en Agronomía.
- Lokesha, R.; Hedge, S.G.; Uma Shaanker, R. y Ganeshiah, K.N. 1992. Dispersal mode as a selective force in shaping the chemical composition of seeds. *American Naturalist*, 140: 520–525.
- López, Ricardo L.; Vigna, Mario R.; y Gigón, Ramón. 2008. Evaluación de herbicidas para el control de *Lolium multiflorum* Lam. En barbecho para cereales de invierno. XXVI Congreso Brasileiro de Plantas Daninhas XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas. 4 a 8 de mayo 2008. Ouro Preto: MG: BRASIL. ISBN: 978-85-98410-04-
- López, Ricardo L.; Vigna, Mario R.; y Gigón, Ramón. 2008a. Estudios de curvas dosis-respuesta de poblaciones de *Lolium multiflorum* a glifosato en el SO de Buenos Aires, Argentina. XVII Congreso latinoamericano malezas. 4 al 8 de mayo de 2008. Ouro Preto - MG- Brasil
- Lorraine-Colwill, D.F., Powles, S.B., Hawkes, T.R.; Hollinshead, P.H.; Warner, S.A.J. y Preston, C. 2003. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 74, p. 62–72.
- Luna, S.V.; Figueroa, J.M.; Baltazar, B.M.; Gomez, R.L.; Townsend, R.; Shchoper, J.B. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Sci* 2001; 41:1551-7
- Marzoca, A. 1976 Manual de malezas. p. 564. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Menchari, Y.; Chauvel, B.; Darmency, H.; Delye, C. 2008. Fitness costs associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. *Journal of Applied Ecology* 45: 939-947.
- Michitte, P.; Gauvrit, C.; Heredia, A.; De Prado, R. 2004. Resistance to glyphosate in *Lolium multiflorum*: involvement of epicuticular waxes En: “XII colloque International Sur la Biologie des Mauvaises Herbes”. Pp. 597-602.
- MONSANTO ARGENTINA SAIC. Manual de Uso. Roundup Full II. Monsanto Argentina SAIC 21 pp.

- Muehlebach, M.; Boeger, M, Cederbaum, F. 2009. Aryldiones Incorporating a [1, 4, 5] Oxadiazepane Ring. Parte I: Discovery of the Novel Cereal Herbicide Pinoxaden.
- Nandula, V.K.; Reddy, K.N.; Poston, D.H.; Rimando, A.M.; Duke, S.O. 2008. Glyphosate tolerance mechanism in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. *Weed Sci.*, v. 56, p. 344- 349.
- Neve, P., Diggle, A.J., Smith, F.P., Powles, S.B., 2003. Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* I: population genetics of a rare resistance trait. *Weed Res.* 43, 404–417.
- Ng, C.H.; Wickneswari, R.; Salmijah. S.; Teng, Y.T.; Ismail, B.S. 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Res.*, v. 43, p. 108–115.
- Owen, W. J. 1991. Herbicide metabolism as a basis for selectivity. In: “Target sites for Herbicide Action” (ed. Kirkwood RC) Pleum Press, New York pp. 285-314.
- Owen, M.D.K., Zelaya, I.A., 2005. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag. Sci.* 61, 301e311.
- Papa, J. C. 2009. Problemas actuales de malezas que pueden afectar al cultivo de soja. INTA Oliveros.
- Papa, J.C. 2011. Malezas: para manejarlas racionalmente, ¡la propuesta es integrar! Introducción al manejo integrado de malezas. INTA Oliveros.
- Papa, J.C.; Tuesca, D.; Ponsa, J.C.; Picapietra, G. 2012. Confirmación de la Resistencia a Glifosato en un Biotipo de Raigrás Anual (*Lolium multiflorum* Lam.) del Noreste de la Provincia de Buenos Aires. In Jornadas Fitosanitarias Argentinas (14., 2012, San Luis, AR). Actas. 1 disco compacto. Código M-53, Resumen número 227: 9
- Pedersen, B.P., Neve, P., Andresen, C., Powles, S.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.
- Pérez, A., Alister, C., Kogan, M., 2004. Absorption, translocation and allocation of glyphosate in resistant and susceptible Chilean biotypes of *Lolium multiflorum*. *Weed Biol. Manag.* 4, 56e58
- Pérez, A. y Kogan, M., 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Res.* 43, 12e19.
- Pérez Davison Gema, Ricardo Restrepo Manrique Ricardo y Martínez Sánchez Gregorio. 2009. Hormesis: Antecedentes e Implicaciones en los Sistemas Biológicos. *Lat. Am. J. Pharm.* 28 (6): 954-60 (2009)
- Perez-Jones, A., Park, K.W., Colquhoun, J., Mallory-Smith, C.A., Shaner, D., 2005. Identification of glyphosate-resistant ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Sci.* 53, 775-779.

- Perez Jones, A.; Polge, Park, K. W.N.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C. A. 2007. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*, pag.395-404.
- Pline-Srnic, W. 2006, Physiological mechanisms of glyphosate resistance. *Weed technol.* 20: 290-300.
- Polok, K. 2007. Molecular evolution of the genus *Lolium* L. Olsztyn. Studio Poligrafii Komputerowej. 318pp.
- Powles, S.B.; Lorraine-Colwill, D.F.; Dellow, J.J.; Preston, C. 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Sci.*, v. 46, p. 604–607.
- Powles, S.B. y Preston, C. 2006. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technology* 20: 282– 289.
- Powles, S.B. 2009. Evolution in action: plants resistant to herbicides. AFPP-XIIIth International Conference on Weed biology. Dijon, France.
- PPDB. 2013. Pesticide Properties Database. Consultado 14 ene 2013. Disponible en <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>.
- Pratley, J.E.; Urwin, N.A.R.; Stanton, R.A.; Baines, P.R.; Broster, J.C.; Cullis, K.; Schafer, D.E.; Bohn, J.A. y Krueger, R.W. 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*: I. Bioevaluation. *Weed Science* 47:405–11.
- Preston, C.; Tardif, F.J.; Christopher, J.T.; y Powles S.B. 1996. Multiple Resistance to Dissimilar Herbicide Chemistries in a Biotype of *Lolium rigidum* Due to Enhanced Activity of Several Herbicide Degrading Enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 54,123–134 (1996) ARTICLE N^o 0016.
- Preston, C., Wakelin, A.M. 2008. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. *Pest Management Science* 64: 372–376.
- Preston, C., Wakelin, A., Dolman, F., Botamam, Y., Boutsalis, P., 2009. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness and agronomic management. *Weed Science* 57: 435-441.
- Preston, C. y Powles S. 2002. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. *Heredity* (Edinb). 2002 Jan;88(1):8-13.
- Purrington, C.B. 2000. Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 305–308.
- Puricelli, E. y Tuesca, D. 2005. Weed density and diversity under glyphosate-resistant crop sequences. *Crop Protection* 24(6):533-542
- Roux, F.; Gasquez, J.; Reboud, X. 2004. The dominance of the herbicide resistance cost in several *Arabidopsis thaliana* mutant lines. *Genetics* 166: 449-460

- Roux, F.; Paris, M.; Reboud, X. 2008. Delaying weed adaptation to herbicide by environmental heterogeneity: a simulation approach. *Pest Manag Sci* 64:16–29
- Ruiz- Santaella, J. P.; Heredia, A.; De Prado, R. 2006. Basis of selectivity of cyhalofop butil on *Oryza sativa* L. *Planta*, 223: 191-199.
- Schabenberger, O.; Kells, J.J.; Penner, D. 1999. Statistical tests for hormesis and effectivedosage in herbicide dose-response. *Agronomy Journal*, v.91, p.713-721.
- Schönburnn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W.A., Schloss, J.V., Amrhein, N., Evans, J.N.S., Kabsch, W. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase in atomic detail. *PNAS* 98:1376–1380.
- Scursoni, J.A. 1994. Las malezas y el cultivo de cebada cervecera en Argentina. Primera Jornadade actualización técnico económica del cultivo de cebada cervecera. SAGYP.Bolsa deCereales 10/5/94 .Buenos Aires.
- Scursoni, J., Forcella, F., Gunsolus, J., Owen, M., Oliver, R., Smeda, R., Vidrine, R. 2006. Weed diversity and soybean yield with glyphosate management along a north–south transect in the United States. *Weed Science* 54:713–719
- Scursoni, J., Gigón, R., Martín, A., Vigna, M., Leguizamón, E., Istilart, C., López, R. 2014. Changes in weed communities of spring wheat crops of Buenos Aires province of Argentina. *Weed Science*, 62(1), 51-62.
- Shaner, D.L. 2009. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Science* 57: 118–123.
- Sherman, T. D.; Vaughn, K.C.; Duke, S. O. 1996. Mechanism of action and resistance to herbicides. In: “Herbicide Resistant Crop”.
- Shimabukuro, R. H. 1985. Detoxification of herbicides. In: “weed physiology”.
- Shimabukuro, R. H.; Hoffer, B.L. 1997. Perturbation of transmembrane proton gradient and resistance to AOPP herbicides. In “Weed and Crop Resistance to Herbicides”. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p 71-79.
- Silva, M.A.; Aragao, N.C.; Barbosa, M.A.; Jerónimo, E.M.; Carlin, S.D. 2009. Efeito hormótico de glyphosate no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar. *Bragantia*, v.68, p.973-978.
- Steinrücken, H.C.; Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980 Jun 30;94(4):1207-12.
- Steadman, K.J.; Crawford, A.D.; Gallagher, R.S. 2003. Dormancy release in *Lolium rigidum* seeds is a function of thermal after-ripening time and seed water content. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, No. 398, pp. 929±937,
- 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

- Streibig J.; Rudemo, M.; Jensen, J. 1993. Dose-response curves and statistical models. In: "Herbicide Bioassays" Streibig, J.; Kudsk, P. (Eds.). Boca Raton. CRC Press. 270pp
- Supiciche, M.L.; Chantrel, G.R.; Sabbatini, M.R.; Castro, A.M. 2015. Rol de las cubiertas como posibles mecanismo de imposición de la dormición en semillas de *Lolium perenne* L. ASACIM.
- Taberner Palou, A.; Cirujeda Ranzenberger, A. y Zaragoza Larios, C. FAO, 2007. Manejo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas. 100 preguntas sobre resistencias.
- Terrel, E.E. (1968). A Taxonomic Revision of the Genus *Lolium*. Crops Research Division, Agricultural research services. U.S.D.A. Tech. Bull. 1392. 65 pp
- Thompson, K. y Grime, J.P. 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *Journal of Ecology*, 67, 893-921.
- Tian, D., Traw, M.B., Chen, J.Q., Kreitman, M., Bergelson, J. 2003. Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 423: 74–77.
- Turturro, A.; Hass, B.; Hart, R.W. 2001 Does caloric restriction induce hormesis? *Nutrition*, v. 17, p. 78-82.
- USDA, 2018. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=lopem2>
- Valverde, B. E. y Gressel, J. 2006. El problema de la Evolución y diseminación de la resistencia del *Sorghum halepense* al glifosato en Argentina. Informe para SENASA.
- Valverde, B.E. 2007. Status and management of grass-weed herbicide resistance in Latin America. *Weed Technology* 21:310–332
- Valverde, B. E. y Heap, I. 2009. El estado actual de la resistencia a herbicidas en el mundo. www.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR36351
- Velini, E.D.; Alves, E.; Godoy, M.C.; Meschede, D.K.; Souza, R.T.; Duke, S.O. 2008. Glyphosate at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science*, v.64, p.489-496.
- Vibrans, H. 2009. Consultada 26 de noviembre 2019 <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/lolium-multiflorum/fichas/ficha.htm>
- Vigna, M.R.; López, R.L.; Gigón, R.; Mendoza, J. 2008. Estudios de curvas dosis respuesta de poblaciones de *Lolium multiflorum* a glifosato en el SO de Buenos Aires, Argentina. En Congreso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas (26.); Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (18., 2008, Ouro Preto, MG, BR). p 50-53.
- Vigna, M.; López, R.L.; Gigón, R. 2011. Evaluación de la técnica del doble golpe para el control de poblaciones de *Lolium multiflorum* en el SO de Buenos Aires. XX Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM). Viña del Mar – Chile, 4 -9 Diciembre de 2011. Actas del Congreso en CD

Vigna, M.; López, R.L.; Gigón, R. 2011a. Resistencia de *Lolium multiflorum* L. a Diclofop-metil en el Sudoeste de Buenos Aires, Argentina. XX Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM). Viña del Mar. Chile

Vigna, M.; López, R.L.; Gigón, R. 2013. Situación de la problemática y propuesta de manejo de *Lolium* y *Avena fatua* resistentes a herbicidas en el sur de Buenos Aires. Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. INIA. P 75-82.

Vila-Aiub, M.M.; Neve, P.; Powles, S.B. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist*. 184: 751–767

Vila-Aiub, M.; Neve, P.; Steadman, K.; Powles, S. 2005. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. *Journal of Applied Ecology* 42: 288-298.

Villalba, Andrea. 2009. Resistencia a herbicidas. Glifosato. Ciencia, Docencia y Tecnología N° 39, Año XX. Comunicaciones Ciencias Exactas y naturales (169-186)

Wagner, R.; Kogan, M.; Parada, A.M. 2003. Phytotoxic activity or root absorbed glyphosate on corn seedlings (*Zea mays*L.). *Weed Biology and Management*, v.3, p.223-232.

Wakelin, A.M.; Lorraine-Colwill, D.F.; Preston, C. 2004. Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Res.*, v. 44, p. 453-459.

Wakelin, A.M.; Preston, C.A. 2006. Target site mutation is present in a glyphosateresistant *Lolium rigidum* population. *Weed Res.*, v. 46, p. 432-440.

Walsh, M.J. y Powles, S.B. 2007. Management Strategies for Herbicide-resistant Weed Populations in Australian Dryland Crop Production Systems. *Weed Technology* 21(2):332-338. doi: <http://dx.doi.org/10.1614/WT-06-086.1>

Wang, Z.Y.; Ge, Y.; Scott, M.; Spangenberg, G.C. 2004 Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. *Am. J. Bot.* 91:523–530

WSSA 1998 "HerbicideResistance" and "HerbicideTolerance" Defined.

www.casafe.org

www.conabio.gob.mx . Ficha informativa *Lolium multiflorum* Lam. URL, Heike Vibrans, 2009.

www.fagro.edu.uy

www.passel.unl.edu

www.glifosato.es

Yannicari, M. Istilart, C. y Gimenez, D. 2009. Evaluación de la resistencia a glifosato de una población de *Lolium perenne* del sur de la provincia de Buenos Aires. XII congreso de SEMh. XIX Congreso de ALAM, II congreso Iberoamericano de Ciencias de la Maleza.

Yannicari, M.; Tambussi, E.; Gimenez, D.; Guiamet, J. y Castro, A. 2010. Efectos del glifosato sobre la asimilación neta de carbono y otros parámetros fisiológicos en biotipos de *Lolium perenne* L. resistentes y susceptibles. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, 97.

Yannicari, M., Istilart, C., Castro, A.M. 2011. Hacia el Manejo de *Lolium* spp (Ryegrass perenne) Resistente a glifosato. Revista especial de Malezas, Aapresid. 51-55.

Yannicari, M., Istilart, C., Giménez, D. O., Castro, A.M. 2012. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. Crop Protec., v. 32, n. 1, p. 12-16.

Yannicari, M.; Acciaresi, A. 2013. Perennial weeds in Argentinean crop systems: biological and ecological characteristics and basis for a rational weed management. En: "Agricultural Research Updates Vol. 5." Gorawala, P.; Mandhatri, S. (Eds.). Nueva York. Nova Science Publishers. 176pp

Yannicari, M. 2014. Estudio fisiológico y genético de biotipos de *Lolium perenne* L. resistentes a glifosato. Tesis doctoral.

Yu, Qin; Cairns, Andrew; Powles, Stephen; 2006. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidumbiotype*. Planta (2007) 225:499–513.

ANEXO

Figuras N° 11, 12,13 y 14: Sección transversal de la hoja de *L. multiflorum*. (11) B1S; (12) B2R; (13) B3R; (14) B4R. Ab = epidermis abaxial; Ad = epidermis adaxial; Cb = células buliformes; Es = estómas; Pcl = parénquima clorofiliano; Tr = tricoma; X = xilema; F = floema.

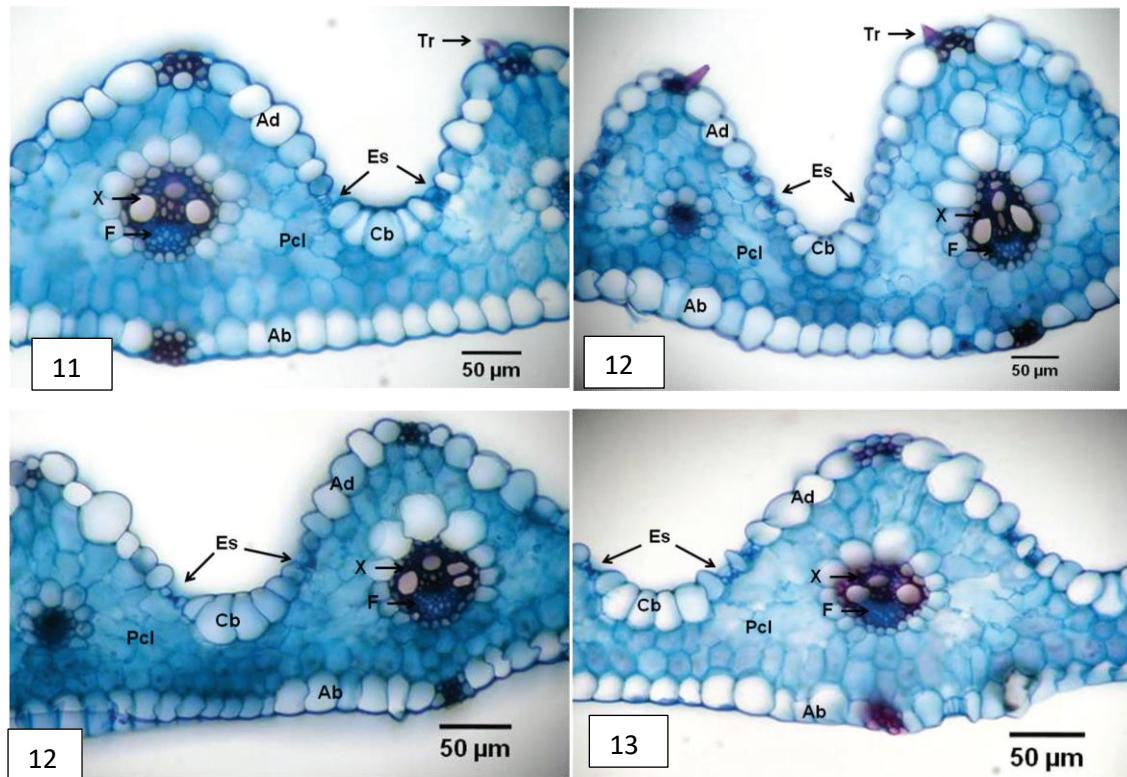
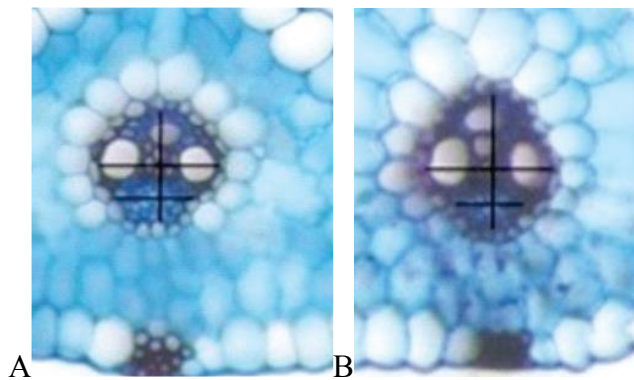


Figura N° 14: Sección transversal de la hoja de *L. multiflorum*. Detalle de relación xilema/floema de las hojas entre los biotipos: (A) sensible; (B) resistente.



Fotoprevia a la marcación del experimento en el campo. Tratamientos con glifosato.



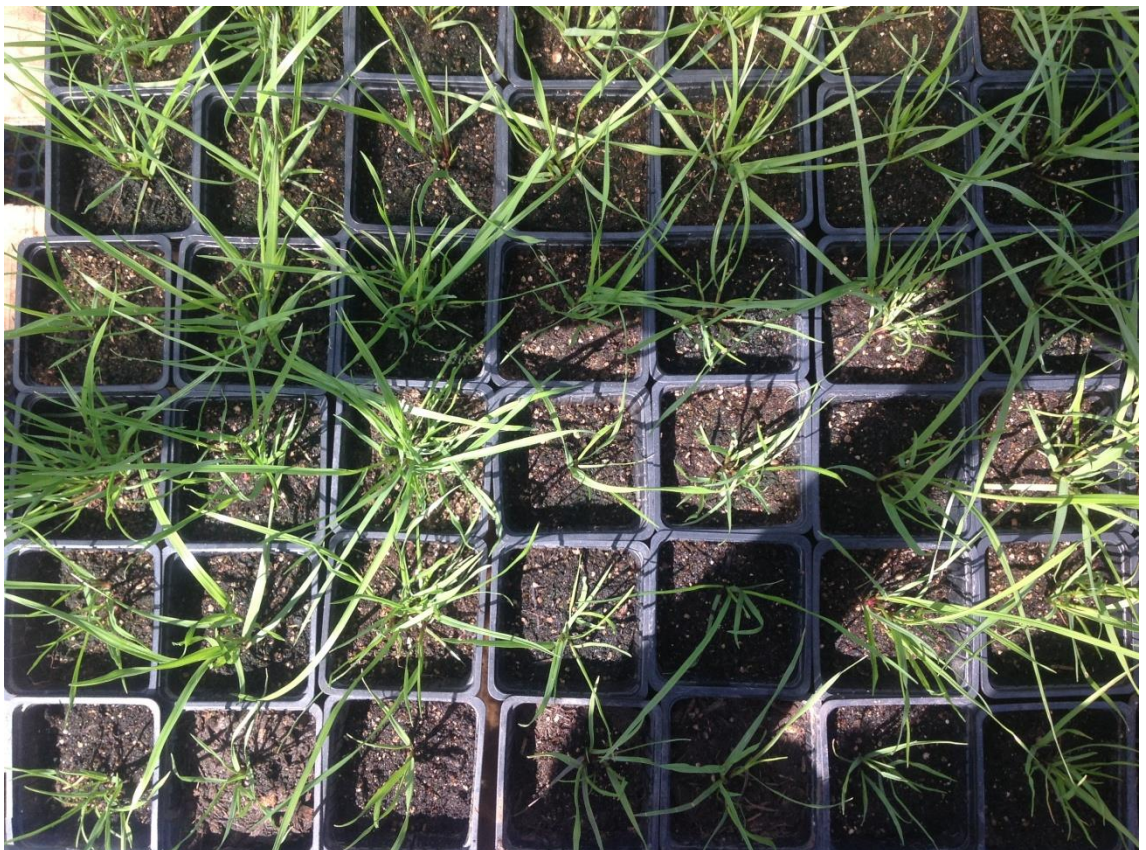
40DDA. Se observa el tratamiento 8 de mayor dosis en el frente. El 9 testigo.



Diferencia en la germinación. Izquierda *Lolium* susceptible, derecha *Lolium* resistente.



Plantitas de *Lolium* resistente previo a la aplicación.



Lolium multiflorum susceptible



Se observa claramente la diferencia de crecimiento.

