



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA



Estudio de poblaciones de *Echinochloa crus-galli* putativamente resistentes  
a bispyribac-sodium de la provincia del Guayas, Ecuador.

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

Ing. Agr. Pedro Fuentes Vásquez

**Director**

Dr. M.Sc. Ing. Agr. Luis Peñaherrera

**Codirector**

Dr. Ing. Agr. Marcos Yannicari

**Tutor**

Prof. Ing. Agr. Daniel Giménez

**Miembros del Jurado Evaluador**

Dr. Eduardo Puricelli

Ing. Agr. M.Sc. Mario Vigna

Lic. Daniel Tuesca

**Fecha de defensa de tesis**

**17 de diciembre 2021**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a mi familia. Mi esposa Johanna, mis hijas Valeska, Amira y los que vendrán. Además, con un sentimiento muy especial a mi Sr. Padre Lcdo. Nelson Fuentes (+) y Mi querida madre Lcda. María Vásquez quienes con su esfuerzo, dedicación y cariño han impulsado en mí el constante deseo de superación.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de la Plata, por permitirme desarrollar mi formación de posgrado en la Maestría de Protección de Cultivos. En el Ecuador, al Departamento de Protección Vegetal, Estación Litoral Sur, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), por la apertura brindada en sus instalaciones y equipos para el desarrollo de esta investigación.

El presente trabajo fue realizado gracias a la colaboración y el apoyo de varias personas a las cuales les guardo las más altas consideración de gratitud y estima:

- A mis directores, Dr. Luis Peñaherrera y Dr. Marcos Yannicari quienes, desde el inicio, al proponerles el tema, mostraron confianza en mí para la realización de este proyecto la que me permitió trabajar y discutir libremente en todo el proceso. Además, por siempre haber mostrado su compromiso incondicional, su apoyo formativo en una temática no tratada en el país y por su amistad creando un ambiente agradable en todo tiempo.
- A mi Tutor Ing. Agr. Daniel O. Giménez por su valioso aporte y guía en este trabajo y con el cual tuve el agrado de compartir la pasantía en el INFIVE en el tiempo que estuve en Argentina.
- Al Departamento de Malezas, Estación Experimental del Litoral Sur, INIAP, por la apertura brindada en sus invernáculos, sus equipos, que permitió obtener con éxito los objetivos planteados en esta tesis.
- A mi esposa y compañera Ing. Johanna Bonilla por estar siempre colaborando en cada uno de los ensayos realizados, por perdonar mi larga ausencia en otro país, por todo el amor brindado que ha permitiendo hacer más amena la jornada diaria.

A mis amigos Ing. José Baux y mi padre Nelson Fuentes (+) con quienes tuve el agrado de compartir en varias jornadas y muy especialmente en los meses de la recolección de las poblaciones de la maleza en las que recorrimos gran parte de la zona arroceras del país.

## PRESENTACIÓN A CONGRESO

- 1- Fuentes, P.; Peñaherrera, L.; Yannicari, M., “Estudio de poblaciones de *Echinochloa crus-galli* presumiblemente resistentes a bispyribac-sodium de la Provincia del Guayas, Ecuador”. VII Congreso de la Red Ecuatoriana de Universidades para la Investigación y Posgrados. (REDU). (Campus Yachay-Tech). Urcuquí, Ecuador. 11-15 noviembre 2019.  
<https://issuu.com/yyachaytech/docs/memoriasredu>
- 2- Fuentes, P.; Peñaherrera, L.; Yannicari, M., “Caracterización de seis poblaciones de *Echinochloa crus-galli* a bispyribac-sodium en el Ecuador” V Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad ESPOL-CIBB 2020 y XVII International banana Convention 2020. Guayaquil, Ecuador. 5-08 octubre 2020.  
<http://www.cibb.espol.edu.ec/carteles>

## COMUNICACIÓN EN JORNADA NACIONAL

- 1- Fuentes, P.; Peñaherrera, L.; Yannicari, M., “Determinación del índice de resistencia de poblaciones de *Echinochloa crus-galli* resistentes a bispyribac-sodium de la Provincia del Guayas, Ecuador”. Jornada por los 60 aniversarios del INIAP. (Estación Litoral Sur). Yaguachi, Ecuador. 10 diciembre del 2019.

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>xv</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xix</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Problemática.....	2
1.2 Antecedentes.....	3
1.3 Interferencia de <i>Echinochloa crus-galli</i> en los cultivos y su impacto en el entorno global.....	4
1.4 Herbicidas inhibidores de ALS/AHAS y su importancia en el desarrollo de la resistencia.....	6
1.5 Factores y mecanismos de resistencia a herbicidas conocidos.....	8
1.6 Poblaciones de <i>E. crus-galli</i> presumiblemente resistentes en zonas arroceras ecuatorianas.....	10
1.7 Objetivo general.....	12
1.7.1 Objetivos específicos.....	12
1.8 Hipótesis .....	12
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 Localización.....	14
2.2 Material vegetal .....	15
2.3 Xenobióticos .....	17
2.4 Experimentos .....	17
2.4.1 Determinación de poblaciones resistentes y susceptibles al herbicida Bispyribac-sodium (Screening).....	18
2.4.2 Dosis-respuesta de bispyribac-sodium sobre poblaciones de <i>Echinochloa crus-galli</i> presumiblemente resistentes.....	20
2.4.2.1 Determinación del Índice de Resistencia (IR).....	22

2.4.2.2	Efecto sobre el fitness en poblaciones resistentes a herbicidas inhibidores del ALS:.....	23
2.4.3	Experimento evaluación de resistencia cruzada y/o múltiple en poblaciones resistentes. ....	24
2.4.4	Estudio de sinergismo de bispyribac-sodium con malation. ....	25
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
3.1	Bioensayo <i>screening</i> para el análisis de sensibilidad de poblaciones de <i>Echinochloa crus-galli</i> al herbicida bispyribac-sodium inhibidor de la ALS. ....	27
3.1.1	Efectos del herbicida Bs en la sobrevivencia de poblaciones de <i>E. crus-galli</i> .....	27
3.1.2	Efecto del herbicida Bs sobre el peso fresco de la biomasa aérea.....	28
3.1.3	Efectos del herbicida Bs sobre el peso seco de la biomasa aérea.....	29
3.1.4	Efecto del herbicida Bs sobre altura de planta.....	30
3.1.5	Efecto del herbicida Bs sobre índice de clorofila (IC). ....	32
3.2	Estudio de dosis-respuesta de bispyribac-sodium sobre poblaciones de <i>Echinochloa crus-galli</i> presumiblemente resistentes. ....	35
3.2.1	Efecto del herbicida Bs sobre la sobrevivencia de plantas.....	35
3.2.2	Efecto del herbicida Bs sobre la producción de biomasa aérea fresca (GR <sub>50</sub> ).....	36
3.2.3	Efecto del herbicida Bs sobre la producción de biomasa aérea seca (GR <sub>50</sub> ). ....	38
3.2.4	Efecto de diversas dosis del herbicida sobre el control y la fitotoxicidad de <i>E. crus-galli</i> .....	39
3.2.5	Efectos del herbicida Bs sobre la altura de planta. ....	40
3.2.6	Efecto de Bs sobre el índice relativo de clorofila (IC) ....	43
3.2.7	Efecto sobre el fitness en poblaciones resistentes al herbicida Bs. ....	46
3.2.7.1	Número de semillas producidas y su viabilidad en biotipos de <i>E. crus-galli</i> resistentes tratadas con bispyribac-sodium.....	46
3.3	Estudio de sinergismo de bispyribac-sodium con malation sobre poblaciones de <i>Echinochloa crus-galli</i> . ....	48
3.3.1	Efectos sobre la producción de biomasa aérea fresca.....	48
3.3.2	Efecto en la sobrevivencia de las plantas. ....	50
3.3.3	Efecto sobre el índice relativo de clorofila (IC). ....	51
3.3.4	Efecto sobre la altura de planta.....	52
3.4	Ensayo de resistencia cruzada y múltiple de poblaciones de <i>E. crus-galli</i> .....	54
3.4.1	Sensibilidad a los herbicidas penoxsulam y cyhalofop butyl éster: Efecto en el peso fresco de la biomasa aérea.....	54
3.4.2	Sensibilidad a los herbicidas penoxsulam y cyhalofop butyl: Efecto en la sobrevivencia.....	55

3.4.3	Efectos de penoxsulam y cyhalofop butyl sobre el índice relativo de clorofila (IC)	
	57	
3.4.4	Efecto de penoxsulam y cyhalofop butyl sobre la altura de planta. ....	58
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>66</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>70</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>81</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Identificación y ubicación geo referenciada de treinta y cinco poblaciones de <i>E. crus-galli</i> presumiblemente resistentes a herbicidas inhibidores de ALS/AHAS, en dos localidades de la provincia del Guayas, Ecuador.....	16
<b>Tabla 2.</b> Características de los herbicidas y de malation (inhibidor de CYP) empleados en los bioanálisis.....	17
<b>Tabla 3.</b> Escala de evaluación visual de fitotoxicidad como el grado control de herbicidas sobre malezas propuesto por la Asociación Latinoamericana de Malezas (1974). .....	21
<b>Tabla 4.</b> Efecto sobre la <i>sobrevida</i> (plantas vivas luego de someterse a la tasa comercial de Bs 40 g (i.a) ha <sup>-1</sup> ), 35 poblaciones de <i>E. crus-galli</i> . .....	27
<b>Tabla 5.</b> Efecto del herbicida bispyribac-sodium sobre 35 poblaciones de <i>E. crus-galli</i> en el <i>peso fresco</i> (% respecto al control sin herbicida). .....	28
<b>Tabla 6.</b> Efecto del herbicida bispyribac-sodium sobre 35 poblaciones de <i>E. crus-galli</i> en el <i>peso seco</i> (% respecto al control sin herbicida). .....	29
<b>Tabla 7.</b> Valores de probabilidad de los ANOVA realizados sobre la <i>Altura de planta</i> (Pl) de 35 poblaciones de <i>E. crus-galli</i> muestran diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) en los días después de la aplicación (DDA) de la dosis comercial de bispyribac-sodium (40 g i.a ha <sup>-1</sup> ). .....	30
<b>Tabla 8.</b> Promedios de <i>altura de planta</i> (% respecto al control sin herbicida) de poblaciones de <i>E. crus-galli</i> (susceptibles y resistentes); pulverizadas a la tasa comercial de bispyribac-sodium. ....	31
<b>Tabla 9.</b> Efecto en el <i>índice de clorofila</i> (%) de poblaciones mayormente (susceptibles y resistentes); días después de la aplicación (0, 6, 10 y 14 días); tratamientos (Bispyribac-sodium y control) y sus interacciones. ....	32
<b>Tabla 10.</b> Promedios de <i>índice relativo de clorofila</i> (% respecto al control sin herbicida) de poblaciones de <i>E. crus-galli</i> (susceptibles y resistentes); pulverizadas a la tasa comercial de bispyribac-sodium. ....	33

<b>Tabla 11.</b> Valores medios de <i>Índice de clorofila (%)</i> evaluados 0, 6, 10 y 14 DDA de 35 poblaciones de <i>E. crus-galli</i> sometidas a la tasa comercial del herbicida bispyribac-sodium inhibidor de la ALS/AHAS. ....	34
<b>Tabla 12.</b> Parámetros del modelo de regresión no lineal para explicar el efecto de la dosis de bispyribac-sodium sobre la sobrevivencia de cada población. Se presentan los valores de probabilidad ( <i>P</i> ) para la precisión del modelo e índice de resistencia estimado (IR). ....	36
<b>Tabla 13.</b> Parámetros del modelo de regresión no lineal para la producción de biomasa aérea <i>peso fresco</i> , probabilidad ( <i>P</i> ) para la precisión del modelo e índice de resistencia (IR) estimado sobre las poblaciones susceptibles SY10 y SD4. ....	37
<b>Tabla 14.</b> Parámetros del modelo de regresión no lineal para la producción de biomasa aérea en <i>peso seco</i> , probabilidad ( <i>P</i> ) para la precisión del modelo e índice de resistencia estimado (IR). ....	38
<b>Tabla 15.</b> Parámetros del modelo de regresión no lineal de respuesta de <i>fitotoxicidad (%)</i> según la dosis de bispyribac-sodium, considerando la escala de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM). Se presenta la probabilidad ( <i>P</i> ) para la precisión del modelo e índice de resistencia (IR) estimado sobre dos poblaciones susceptibles (SY10 y SD4). ....	39
<b>Tabla 16.</b> Parámetros del modelo de regresión no lineal para explicar el efecto de la dosis de bispyribac-sodium sobre la <i>altura de la planta (%)</i> de cada población 14 DDA. Se presentan los valores de probabilidad ( <i>P</i> ) para la precisión del modelo. ....	41
<b>Tabla 17.</b> Parámetros del modelo de regresión no lineal para explicar el efecto de la dosis de bispyribac-sodium sobre el <i>índice de clorofila (%)</i> de cada población 14 DDA. Se presentan los valores de probabilidad ( <i>P</i> ) para la precisión del modelo. ....	43
<b>Tabla 18.</b> Análisis de varianza del <i>número de semillas</i> generadas de seis biotipos de <i>E. crus-galli</i> resistentes, provenientes de plantas expuestas a 320 y 640 g (i.a.) de bispyribac-sodium. ....	46
<b>Tabla 19.</b> Análisis de varianza de la <i>emergencia de semillas</i> en bandejas de <i>germinación</i> de seis biotipos de <i>E. crus-galli</i> resistentes, provenientes de plantas expuestas a 320 y 640 g (i.a.) de bispyribac-sodium. ....	48

<b>Tabla 20.</b> Efecto sobre el <i>peso fresco</i> de la biomasa aérea de la planta (% respecto al control) de poblaciones de <i>E. crus-galli</i> susceptibles y resistentes; tratamientos (bispiribac-sodium y malation + bispiribac-sodium) y las interacciones. ....	49
<b>Tabla 21.</b> Análisis de varianza de poblaciones de <i>E. crus-galli</i> (susceptibles y resistente); dos tratamientos (bispiribac-sodium y malation + bispiribac-sodium) y las interacciones sobre la <i>sobrevivencia</i> (%). ....	50
<b>Tabla 22.</b> Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de <i>E. crus-galli</i> (susceptible y resistentes), dos tratamientos (bispiribac-sodium y malation + bispiribac-sodium); el tiempo después de la aplicación (0, 6, 10, 14) y las interacciones sobre el contenido relativo de clorofila (%). ....	51
<b>Tabla 23.</b> Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de <i>E. crus-galli</i> (susceptible y resistentes); dos tratamientos (Bispiribac-sodium (Bs) y malation + Bs); el tiempo después de la aplicación (0, 6, 10, 14) y las interacciones sobre la altura de la planta (%). ....	53
<b>Tabla 24.</b> Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de <i>E. crus-galli</i> (susceptible y resistentes), dos tratamientos (cyhalofop butyl y penoxsulam) y las interacciones sobre el peso fresco de biomasa aérea respecto a su testigo sin aplicación de herbicida (%). ....	55
<b>Tabla 25.</b> Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de <i>E. crus-galli</i> (susceptible y resistentes), dos tratamientos (cyhalofop butyl y penoxsulam) y las interacciones sobre la <i>sobrevivencia</i> (%) respecto a su testigo sin aplicación de herbicida. ....	56
<b>Tabla 26.</b> Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de <i>E. crus-galli</i> (susceptible y resistentes), dos tratamientos (cyhalofop butyl y penoxsulam) y las interacciones sobre el <i>índice relativo de clorofila</i> (% respecto a su testigo sin aplicación de herbicida), evaluadas a los (0, 6, 10 y 14) días después de la aplicación (DDA). ....	57
<b>Tabla 27.</b> Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de <i>E. crus-galli</i> (susceptible y resistentes), dos tratamientos (cyhalofop butyl y penoxsulam) y las interacciones sobre la <i>altura de planta</i> (% respecto al control sin herbicida), evaluadas a los 0, 6, 10 y 14 días después de la aplicación. ....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Incremento cronológico de resistencia de malezas a herbicidas por modo de acción a nivel global. Línea con círculos rojos describe el comportamiento de los inhibidores de ALS hasta 2020 (Heap, 2020). ..... 7
- Figura 2.** Ubicación de poblaciones de *Echinochloa crus-galli* presumiblemente resistentes en la provincia del Guayas, Ecuador. Fuente: Pedro Fuentes (2020). .. 14
- Figura 3.** Proceso de implementación de ensayo de *screening* a) recolección de semillas en campo, b) siembra de semillas de *E. crus-galli* en bandejas de germinación, c) trasplante a macetas definitivas en el invernadero d) aplicación del herbicida bispyribac-sodium a tasa comercial..... 19
- Figura 4.** Variables evaluadas para el análisis de sensibilidad de poblaciones posiblemente resistentes y de mayor susceptibilidad; a) altura de planta, b) índice de clorofila, c) peso fresco, d) peso seco. .... 20
- Figura 5.** Selección de seis poblaciones sobrevivientes a los tratamientos 320 y 640 g (i.a.) a bispyribac-sodium para confirmación la posibilidad de generar descendencia y evaluar el porcentaje de germinación..... 24
- Figura 6.** Valores promedio de *sobrevivida* (%) de cada población de *E. crus-galli* de las localidades de Yaguachi (ECG-Y) y de Daule (ECG-D), sometida a la dosis comercial de bispyribac-sodium (40 g i.a ha<sup>-1</sup>), poblaciones identificadas con el color rojo fueron seleccionadas como susceptible y las de color verde y azul para determinar su índice de resistencia. Barras de dispersión indican el error estándar de la media..... 28
- Figura 7.** Valores promedio de *peso fresco* (% respecto al control sin herbicida) de cada población de *E. crus-galli* de las localidades de Yaguachi (ECG-Y) y Daule (ECG-D), sometida a la dosis comercial de bispyribac-sodium (40 g i.a ha<sup>-1</sup>). Barras de dispersión indican el error estándar de la media..... 29
- Figura 8.** Valores promedio de *peso seco* (% respecto al control sin herbicida) de cada población de *E. crus-galli* de las localidades de Yaguachi (ECG-Y) y Daule (ECG-D), sometida a la dosis comercial de bispyribac-sodium (40 g i.a ha<sup>-1</sup>) y posterior a la cosecha colocadas en una estufa a  $\pm 65^{\circ}$  C por 72 horas para su desecación hasta peso constante. Barras de dispersión indican el error estándar de la media..... 30

- Figura 9.** *Sobrevivencia* de poblaciones resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15/Daule y ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18/ Yaguachi) y susceptibles (SY10 Y SD04) de *E. crus-galli* expuestas a dosis crecientes de bispyribac-sodium, evaluados a los 21 días después de la aplicación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media y su ausencia precisa error mínimo..... 36
- Figura 10.** Dosis-respuesta de producción de *biomasa aérea* (peso fresco, % respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18) y susceptibles (SY10 Y SD04) a bispyribac-sodium, 21 días después de la aplicación (DDA). Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media. .... 37
- Figura 11.** Dosis-respuesta de producción de *biomasa aérea* (peso seco, % respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18) y susceptibles (SY10 Y SD04) a bispyribac-sodium, 21 días después de la aplicación (DDA). Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media. .... 38
- Figura 12.** Determinación visual del efecto del herbicida según valores de la Escala de ALAM de poblaciones resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18) y susceptibles (SY10 Y SD04) evaluados a dosis creciente del herbicida Bs a los 14 días después de la aplicación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media. La línea horizontal negra muestra la dosis efectiva para lograr el 70% del control, catalogado como (bueno) en la escala. .... 40
- Figura 13.** Efecto de dosis crecientes de bispyribac-sodium sobre la *altura de planta* (% respecto al control sin herbicida) de poblaciones resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15/Daule y ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18/ Yaguachi) y susceptibles (SY10 Y SD04) evaluados a los 14 días después de la aplicación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media y su ausencia precisa error mínimo. .... 42
- Figura 14.** Efecto de dosis crecientes de bispyribac-sodium sobre el *índice relativo de clorofila* (%) de poblaciones resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15/Daule y ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18/ Yaguachi) y susceptibles (SY10 Y SD04)

evaluados a los 0, 6, 10 y 14 días después de la aplicación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media y su ausencia precisa error mínimo. ... 44

- Figura 15.** Respuesta de poblaciones de *E. crus-galli* cultivadas en invernadero. Aspecto a los 14 días después de la aplicación en accesiones susceptibles (SD04 - SY10), pulverizadas con dosis crecientes de bispyribac-sodium de 0, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 g i.a. ha<sup>-1</sup>. ..... 45
- Figura 16.** Respuesta de poblaciones de *E. crus-galli* a dosis creciente de bispyribac-sodium, plantas cultivadas en invernadero, a los 14 días después de la aplicación en accesiones resistentes de Yaguachi (ECG-D07, ECG-Y18 y ECG-D15), pulverizadas con dosis de bispyribac-sodium de 0, 20, 40, 80, 160, 320 y 640 g i.a. ha<sup>-1</sup>. ..... 45
- Figura 17.** Número de semillas producidas por planta de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes, expuestas a 320 y 640 g (i.a.) de bispyribac-sodium. .... 46
- Figura 18.** Respuesta de poblaciones de *E. crus-galli* a dosis creciente de bispyribac-sodium, plantas cultivadas en invernadero. Aspecto a los 85 días después de la aplicación en accesiones resistentes (ECG-D12, ECG-D13, ECG-18, ECG-D07, ECG-D11 y ECG-D15) pulverizadas a una dosis de Bs 320 y 640 g (i.a) h<sup>-1</sup>, y un testigo sin aplicación de herbicida. .... 47
- Figura 19.** Panojas de plantas de una población de *E. crus-galli* resistente expuesta a 640 g (i.a) de bispyribac-sodium y control sin herbicida. Plantas cultivadas en época lluviosa luego de 85 días pos aplicación. .... 47
- Figura 20.** Tasa de emergencia de seis biotipos *E. crus-galli* resistentes a bispyribac-sodium, semillas provenientes de plantas expuestas a 320 y 640 g (i.a) del herbicida. a) Siembra de poblaciones b) Porcentaje más bajo de emergencia ECG-Y18 c) biotipo con mejor emergencia ECG-D07. .... 48
- Figura 21.** Producción de *biomasa aérea* (peso fresco, % respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a bispyribac-sodium (Bs) y malation + Bs. Se muestran los valores promedio respecto al testigo sin aplicación y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas en la disminución del peso ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos. .... 49

- Figura 22.** Sobrevida (% , respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a dos tratamientos (Bispyribac-sodium (Bs) y malation + Bs). Se muestran los valores promedios respecto al testigo sin aplicación y las barras representan  $\pm 1$  el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos. .... 50
- Figura 23.** Índice relativo de clorofila (% , respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a dos tratamientos a) Bispyribac-sodium (Bs) y b) malation + Bs tomados a 0, 6, 10 y 14 días después de la aplicación. Se muestran los valores promedio respecto al testigo sin aplicación de herbicida y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media. .... 52
- Figura 24.** Altura de planta (% respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a dos tratamientos (Bispyribac-sodium (Bs) y malation + Bs). Se muestran los valores promedio respecto al testigo sin aplicación y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media. .... 53
- Figura 25.** Efectos de 1) malation + bispyribac-sodium y 2) bispyribac-sodium sobre la altura de planta de poblaciones resistentes a bispyribac-sodium a) ECG-D11, b) ECG-Y 12, c) ECG-Y18, d) ECG-D 15 y e) ECG-D0 7 a los 20 días pos aplicación..... 54
- Figura 26.** Producción relativa de biomasa aérea (peso fresco, % respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a cyhalofop butyl y penoxsulam. Se muestran los valores promedio y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media. .... 55
- Figura 27.** Sobrevida (%) en relación al control sin aplicación de herbicida de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a cyhalofop butyl y penoxsulam. Se muestran los valores promedio y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media. .... 56

- Figura 28.** Índice relativo de clorofila (% , relativo al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a dos tratamientos a) Cyhalofop butyl y b) Penoxsulam; evaluadas a los 0, 6, 10 y 14 días después de la aplicación. Se muestran los valores promedio y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media. .... 58
- Figura 29.** Altura de la planta (% , relativa al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* tomados a los 0, 6, 10, 14 días después de la aplicación de a) Cyhalofop butyl b) Penoxsulam. .... 59
- Figura 30.** *E. crus-galli* resistente a bispyribac-sodium, efecto a los 20 días pos aplicación sobre la altura de planta de los herbicidas 1) penoxsulam y 2) cyhalofop butyl, pulverizadas a la tasa recomendada por el fabricante sobre las poblaciones a) ECG-Y18, b) ECG-Y12 c) ECG-D11 d) ECG-D07 y e) ECG-D15 para comprobar posibles casos de resistencia cruzada y múltiple de dichos biotipos. .... 60



## ABREVIATURAS

AHAS	Acetohidroxiácido sintasa.
ALAM	Asociación Latinoamericana de Malezas.
ALS	Acetolactato sintetasa.
ANOVA	Análisis de la varianza.
b	Pendiente de la recta.
Bs	Bispyribac-sodium.
°C	Grado centígrado.
cm	Centímetro.
CMG	Complejo de manchado de grano.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
CYP	Citocromo P450 Monooxigenasas.
D	Asíntota superior total.
DCA	Diseño completo al azar.
DDA	Días después de la aplicación.
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media.
ECG	<i>Echinochloa crus-galli</i> .
EELS	Estación Experimental Litoral Sur INIAP.
F	Fuente de variación.
g	Gramo.
GPS	Global Positioning System.
IC	Índice de clorofila.
Ha	Hectárea.
IMI	Imidazolinonas.
<i>I</i> <sub>50</sub>	Concentración o dosis de inhibición media.
IR	Índice o factor de resistencia.
i.a	Ingrediente activo.
INAMHI	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología del Ecuador.
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
FLAR	Fondo Latino Americano de Arroz bajo Riego.
kg	Kilogramo.
L	Litro.
Log <sub>10</sub>	Logaritmo en base 10.
m	Metro.
NTSR	Not target-site resistance
<i>P</i>	Valor P.
pH	Potencial de hidrógeno.

p.c.	Producto comercial.
PTB	Pirimidiniltiobenzoatos.
SDME	Superior a la dosis máxima evaluada.
S	Susceptible.
SU	Sulfonilureas.
SCT	Sulfonilamino-carbonil-triazolinona.
R	Resistente.
R <sup>2</sup>	Porcentaje de variación de la variable.
t	Tonelada.
TP	Triazolopirimidinas.
TSR	Target-site resistance.
x	Dosis recomendada.
VHBA	Virus de hoja blanca.

## RESUMEN

El aceleramiento de la evolución de malezas resistentes a nivel global sitúa en riesgo la producción de los cultivos y en un futuro cercano puede colocar en alerta la seguridad alimentaria de la población. La contribución de la tecnología en la industria agrícola mediante la producción de xenobióticos entre ellos los herbicidas, ha permitido controlar oportunamente especies invasoras y aportar al éxito de la producción. Sin embargo, el efecto selectivo sobre amplias poblaciones susceptibles permite la segregación de biotipos con sensibilidad diferenciada. Entre los casos más numerosos se encuentra *Echinochloa crus-galli* (ECG). En esta especie, el/los mecanismo/s de resistencia se han asociado ampliamente a mutaciones de punto en los genes codificantes de la enzima acetolactato sintetasa (ALS) y/o acetil-CoA carboxilasa (ACCase), blancos de acción de herbicidas. En el Ecuador, la presión de selección causada por el uso continuo de bispyribac-sodium (Bs), inhibidor de la enzima ALS, habría favorecido la selección de accesiones resistentes. Esta investigación propone conocer posibles casos de ECG resistente a Bs, evaluando los efectos de diversas dosis sobre poblaciones presumiblemente resistentes y determinando índices de resistencia. Con esta finalidad se llevaron a cabo varios ensayos en plantas completas en los que se evaluaron la acción de herbicidas sobre distintos parámetros: germinación, altura de planta, contenido relativo de clorofila, fitotoxicidad, peso fresco aéreo, peso seco y sobrevivencia.

Con este objetivo, se iniciaron las investigaciones mediante un experimento *screening*, recolectando de forma masal panojas de 35 poblaciones de ECG en la provincia del Guayas, Ecuador. Posteriormente se realizó la siembra en macetas y fueron pulverizadas con Bs a dosis comercial 40 g (i.a) ha<sup>-1</sup> cuando presentaron de 3-4 hojas desplegadas. Para el segundo estudio, de dosis-respuesta se seleccionaron las seis accesiones de mayor nivel de sobrevivencia que presentaron los valores más altos de peso fresco frente al control sin herbicida (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15/ Daule y ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18/ Yaguachi), y dos que mostraron alta susceptibilidad al herbicida (SD04 / Daule) y (SY10 / Yaguachi) (factor A) sobre las que se probaron nueve dosis de Bs 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 g (i.a) h<sup>-1</sup> (factor B) con un Diseño Completamente Aleatorizado. Los datos de dosis-respuesta se ajustaron mediante un modelo log-logístico calculando la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) para cada población y el IR (veces en las que se debe incrementar la dosis de herbicida en cierta población para

igualar el control logrado en una población susceptible). La  $DL_{50}$  de Bs para ECG-D11 (con una dosis de 364,30 g (i.a)  $ha^{-1}$ ) permitió calcular un IR= 16,08 y 14,01 frente a las poblaciones susceptibles SY10 y SD04 ( $DL_{50}$ : 22,65 y 24,43 g (i.a)  $ha^{-1}$ ). En las demás accesiones Bs no logró controlar el 50% de la población ni a la dosis más alta evaluada. Las poblaciones sobrevivientes lograron producir semilla, se realizaron análisis de germinación y se corroboró la viabilidad de la simiente. Luego de la confirmar la resistencia de estas poblaciones a Bs, se realizaron dos ensayos; uno para determinar posibles casos de resistencia cruzada evaluando otro herbicida inhibidor de ALS, pero perteneciente a un grupo químico diferente al de Bs y la comprobación de resistencia múltiple aplicando un herbicida inhibidor de ACCasa considerando que este grupo es habitualmente empleado en las zonas arroceras ecuatorianas. Asimismo, se pudo determinar la ocurrencia de un mecanismo de detoxificación mediado por una citocromo P450 monooxigenasa.

Estos resultados sugieren la necesidad de utilizar herbicidas alternativos como un inhibidor de EPSPS (glifosato) en pre-siembra, inhibidores de ACCasa (profoxydim, clethodim y cyhalofop-butyl) y la Auxina sintética florpyrauxifen (Rinskor®. HRAC Grupo O) con la adecuada rotación, como una herramienta válida para la prevención de resistencia y manejo de poblaciones de ECG resistentes.

**Palabra clave:** Resistencia a herbicidas, *Echinochloa crus-galli*, Bispyribac-sodium, malezas resistentes a inhibidores ALS, Ecuador.

## ABSTRACT

The acceleration of the resistant weeds' evolution of at a global level puts crop production at risk and in the near future it may put the population's food security on alert. The contribution of technology in the agricultural industry through the production of xenobiotics, including herbicides, has made it possible to control invasive species in a timely manner and contribute to the success of production. Among the most numerous is *Echinochloa crus-galli* (ECG). In this species, the resistance mechanism (s) have been widely associated with point mutations in the genes encoding the enzyme acetolactate synthetase (ALS) and /or acetyl-CoA carboxylase (ACCCase), targets of herbicide action. In Ecuador, the selection pressure caused by the continuous use of bispyribac-sodium (Bs), an inhibitor of the ALS enzyme, would have favored the selection of resistant accessions. This research proposes to determine possible cases of ECG resistant to Bs, evaluating the effects of different doses on presumably resistant populations and determining resistance levels, For this purpose, several tests were carried out on whole plants in which the action of herbicides on different parameters were evaluated; germination, plant height, relative chlorophyll content, phytotoxicity, fresh air weight, dry weight and survival.

With this objective, the investigations were initiated through a screening experiment, massively collecting panicles from 35 ECG populations in the province of Guayas, Ecuador. Subsequently, the sowing was carried out in pots and plants were sprayed with Bs at a commercial dose of 40 g (i.a) ha<sup>-1</sup> when they presented 3-4 unfolded leaves. For the second dose-response study, the six accessions with the highest survival level were selected that presented the highest values of fresh weight compared to the control without herbicide (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15 / Daule and ECG - Y12, ECG-Y13, ECG-Y18 / Yaguachi), and two that showed high susceptibility to the herbicide (SD04 / Daule) and (SY10 / Yaguachi) (factor A) on which nine doses of Bs were tested, 0, 5, 10, 0, 40, 80, 160, 320, 640 g (a.i) h<sup>-1</sup> (factor B) with a completely randomized design. The dose-response data were adjusted by means of a log-logistic model calculating the mean lethal dose (LD<sub>50</sub>) for each population and the IR (times in which the herbicide dose should be increased in a certain population to equal the control achieved in a given susceptible population). The LD<sub>50</sub> of Bs for ECG-D11 (with a dose of 364,30 g (a.i) ha<sup>-1</sup>) made possible to calculate an IR = 16,08 and 14,01, against the susceptible populations SY10 and SD04 (LD<sub>50</sub>: 22,65 and 24,43 g (a.i) ha<sup>-1</sup>). In the

other accessions, Bs could not control 50% of the population or at the highest dose evaluated. The surviving populations managed to produce seed, germination analyses were carried out and the viability of the seed was corroborated. After confirming the resistance of these populations to Bs, two tests were carried out; one to determine possible cases of cross-resistance by evaluating another ALS inhibitor herbicide, but belonging to a different chemical group other than Bs and the verification of multiple resistance by applying the populations with an ACCase inhibitor herbicide, considering that this group is commonly used in Ecuadorian rice-growing areas. Furthermore, the occurrence of a detoxification mechanism mediated by cytochrome P450 monooxygenase was proved. mechanism of resistance, and it was protancand.

These results suggest the need to use alternative herbicides such as an EPSPS (glyphosate) inhibitor in pre-planting, ACCase inhibitors (profoxydim, clethodim and cyhalofop-butyl) and florypyrauxifen (Rinskor®. HRAC Group O) with adequate rotation, as a valid tool for the prevention of resistance and management of resistant ECG populations.

**Keyword:** Herbicide resistance, *Echinochloa crus-galli*, Bispyribac-sodium, ALS inhibitor resistant weeds, Ecuador.

# **CAPÍTULO I**

## **1 INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Problemática.

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los principales cultivos a escala mundial, y constituye el alimento básico para la mitad de la población del planeta (Briceño y Álvarez, 2010). En el Ecuador, es uno de los cultivos no perennes con mayor superficie sembrada (junto con maíz), registrando un incremento del 21,6% respecto al año anterior. Actualmente, se producen 312.900 ha<sup>-1</sup>, cerca del 65% de la producción de arroz se concentra en la provincia del Guayas con 202.800 ha<sup>-1</sup>, seguido por Los Ríos con el 25% y otras provincias con el 10%, con un rendimiento nacional promedio de 4,27 t ha<sup>-1</sup> (INEC, 2020). Es un cultivo de producción autosuficiente, siendo capaz de cubrir la necesidad de la gramínea a nivel nacional; además, de tener gran importancia económica y social, por generar empleos directos e indirectos desde su establecimiento, y por ser el grano alimenticio básico de la dieta de los habitantes del país (Garcés et al. 2012); de hecho, los 53,20 kg año<sup>-1</sup> de consumo per cápita, ratifican su importancia frente a sus países vecinos como Perú y Colombia que consumen anualmente 47,4 y 40 kg año<sup>-1</sup> por habitante respectivamente (Gavilánez et al. 2016).

Uno de los mayores problemas fitosanitarios en el cultivo de arroz son las malezas. Su distribución y abundancia interfiere en el espacio y en el tiempo con el cultivo (Marzocca et al. 1976; Satorre et al. 2016). Poseen características particulares que les permite adaptarse, competir, sobrevivir y prosperar en ambientes manipulados por el hombre (Navas, 1991), con efectos tales como la reducción de rendimiento y calidad de la cosecha en los cultivos (Labrada y Paker, 1996).

La interferencia causada por las malezas es factor esencial en la limitación de la producción de cultivos en el Ecuador y en el mundo. En el cultivo de arroz el impacto negativo causado por las malezas es principalmente asociado a las especies del género *Echinochloa* (Poaceae), originario de Europa y la India. Si bien no existe un acuerdo sobre el número de las especies que constituyen este género, se han sugerido, entre veinte y cincuenta especies que están ampliamente distribuidas por regiones tropicales y templadas del planeta. De hecho, se conoce que el género *Echinochloa* presenta un elevado porcentaje de autogamia. Sin embargo, se ha documentado que existe un alto grado de cruzamiento entre las diversas especies de *Echinochloa spp.* por lo que existe suficiente evidencia para sospechar el intercambio de genes entre poblaciones (Maun y Barrett, 1986).



Entre las especies más comunes del género se encuentran: *Echinochloa colona* (Linnaeus) Link, Hort, *E. oryzoides* (Arduino) Fritsch, *E. oryzoides* Subsp. *phyllopogon* (Stapf), *E. crus-galli* (Linnaeus) P. Beauvois y *E. crus-galli* var. *mitis* (Pursh) Petermann, siendo estas dos últimas, un importante problema como maleza al interferir en 36 cultivos en 61 países, resultando la principal maleza para el cultivo de arroz a nivel global (Holm et al. 1991; Chen y Phillips, 2006).

## 1.2 Antecedentes

A lo largo de la historia de la agricultura, se han desarrollado varios métodos de control de malezas, tales como: mecánico, cultural, biológico y químico siendo todos capaces de generar un disturbio en la comunidad de malezas, lo que ha causado modificaciones en su composición y estructura funcional (Swanton et al. 1993; Clements et al. 1994).

En países desarrollados, al igual que en zonas en vía de desarrollo, la producción a gran escala es posible utilizando métodos de control químico de plagas, entre estos se encuentran los herbicidas como la principal herramienta de control de las malezas a nivel global (Owen, 2016). El uso de herbicidas como una tecnología ha resultado beneficioso para los agricultores, ya que han elevado sus rendimientos y disminuido sus costos. No obstante, la falta de rotación de sitios de acción, conlleva a la rápida evolución de malezas resistentes que están causando serios daños en los sistemas productivos agrícolas.

Se considera que una maleza es resistente cuando es capaz de sobrevivir y reproducirse después de ser expuesta a una dosis normalmente letal o fitotóxica de un herbicida a la que poblaciones anteriores de la misma especie resultaron susceptibles (Powles y Holtum, 1994). Al momento se conocen de doscientas sesenta y seis especies de malezas reportadas como resistentes a uno o varios herbicidas. Éstas han desarrollado resistencia en 21 de los 31 sitios de acción y a 164 herbicidas diferentes utilizados en 95 cultivos en 71 países. Asimismo, se conoce de 509 casos únicos (especie x sitio de acción) de malezas resistentes a herbicidas a nivel mundial (Heap, 2021a).

Los agricultores estadounidenses se han basado principalmente en el uso de herbicidas para manejar poblaciones de malezas resistentes, siendo poco consideradas

otras prácticas culturales específicamente por razones económicas a corto plazo (Riar et al. 2013). En la actualidad, los productores de arroz en el sur de los Estados Unidos todavía tienen opciones químicas de manejo. Sin embargo, ECG ya ha desarrollado múltiples resistencias a los herbicidas (Fischer et al. et al 2000; Rouse et al. 2018).

De igual forma, el incremento de los casos de resistencia en Sur América en los últimos años es evidente, siendo mayormente documentados los de malezas resistentes a glifosato en Argentina, así como los de inhibidores ALS en Brasil y propanil en Colombia, estos últimos en gran mayoría relacionados con las malezas del género *Echinochloa* y reportados en el cultivo de arroz (Vila-Aiub et al. 2008; Matzenbacher et al. 2013; Fischer et al. 1993).

Las moléculas de herbicidas desarrolladas para el cultivo de arroz en un pasado reciente e incorporadas como una de las herramientas de manejo de resistencia, basados en la implementación de programas con rotación y secuencialización, han incluido: fenoxaprop-ethyl y cyhalofop-butyl (inhibidores de acetil-CoA carboxilasa [ACCasa]), bispyribac-sodium y penoxsulam (inhibidores de acetolactato sintasa [ALS]) e imazethapyr e imazamox (también inhibidores de ALS para arroz resistente a imidazolinonas) mediante el uso repetido de los mismos activos o de los mismos mecanismos de acción (Mallory-Smith et al. 2003), se ha contribuido a la selección y acumulación de poblaciones de malezas resistentes (Carey et al. 1995; Valverde y Itoh, 2001). Por ello, el empleo de herbicidas debe estar ligado a un manejo que incluya al conocimiento de la biología de la especie de maleza a controlar y su interacción con programas a largo plazo, evitando una dependencia de un número reducido de herbicidas (Papa y Tuesca, 2013).

### **1.3 Interferencia de *Echinochloa crus-galli* en los cultivos y su impacto en el entorno global.**

Esta especie es altamente eficiente en el uso del agua, categorizada como planta C4, de rápido crecimiento, siendo competitiva con el cultivo debido a su adaptación a ambientes inundados (Marambe y Amarasingh, 2002), capaz de interferir sobresalientemente frente a plantas C3 y compitiendo aún mejor en condiciones de temperaturas altas y disponibilidad limitada de agua, posibles escenarios asociados al cambio climático (Rodenburg et al. 2011). Es una planta anual, erecta o semiprostrada, con tallos de 30 a 150 cm de largo, con hojas de 5 a 50 cm de longitud, sin lígula y la

base de la hoja a menudo color rojiza, linear-lanceoladas, planas y grabas. En 55-65 días desde la emergencia produce panojas de espiguillas densas que adquieren coloraciones rojizas en muchos de los casos y generalmente están provistas de arista (Holm et al. 1977; Salguero et al. 2015). Dado el alto grado de cruzamiento, algunas de sus características varían, existiendo biotipos con tonos claros en las bases del tallo en estado de plántula que luego se tornan rojizos como es característico de la especie.

En Canadá, un estudio reveló que la presencia de diez plantas por m<sup>2</sup> en condiciones ideales de esta especie puede llegar a producir entre 35.500 a 40.000 semillas planta<sup>-1</sup> año en asociación con cultivos de algodón y arroz, respectivamente (Bosnic y Swanton, 1997). La producción de semillas a fines de temporada es problema ya que aumenta las probabilidades de presencia de mutantes resistentes. Un componente válido para manejo de resistencia a los herbicidas es la diversificación de técnicas de control, minimizar la propagación de genes resistentes y prevenir la producción de semillas y la acumulación del banco semillas del suelo (Bagavathiannan y Norsworthy, 2012), éste es un factor determinante en la dinámica de población de malezas a largo plazo (Davis et al. 2003). Es probable que el ~~de~~ manejo de resistencia no tenga el éxito deseado si no es considerado el manejo efectivo del banco de semillas de mutantes resistentes.

Al momento, se han reportado en el cultivo de arroz 54 especies de malezas resistentes y es considerado el tercer cultivo (después de trigo y maíz) con más casos de resistencia. ECG ha expresado resistencia en al menos once sitios de acción diferentes, siendo la segunda especie (después de *Lolium rigidum*), en mayor número de modos de acción a los que ha evolucionado resistencia (Heap, 2021b). Por ello, es considerada una maleza de difícil manejo por su comprobada resistencia a herbicidas de diferentes modos de acción que ha sido reportada en 24 países. Actualmente existen 36 casos de resistencia reportados de ECG con relación al cultivo de arroz, 12 en las que se involucran herbicidas inhibidores del ALS (Heap, 2021c).

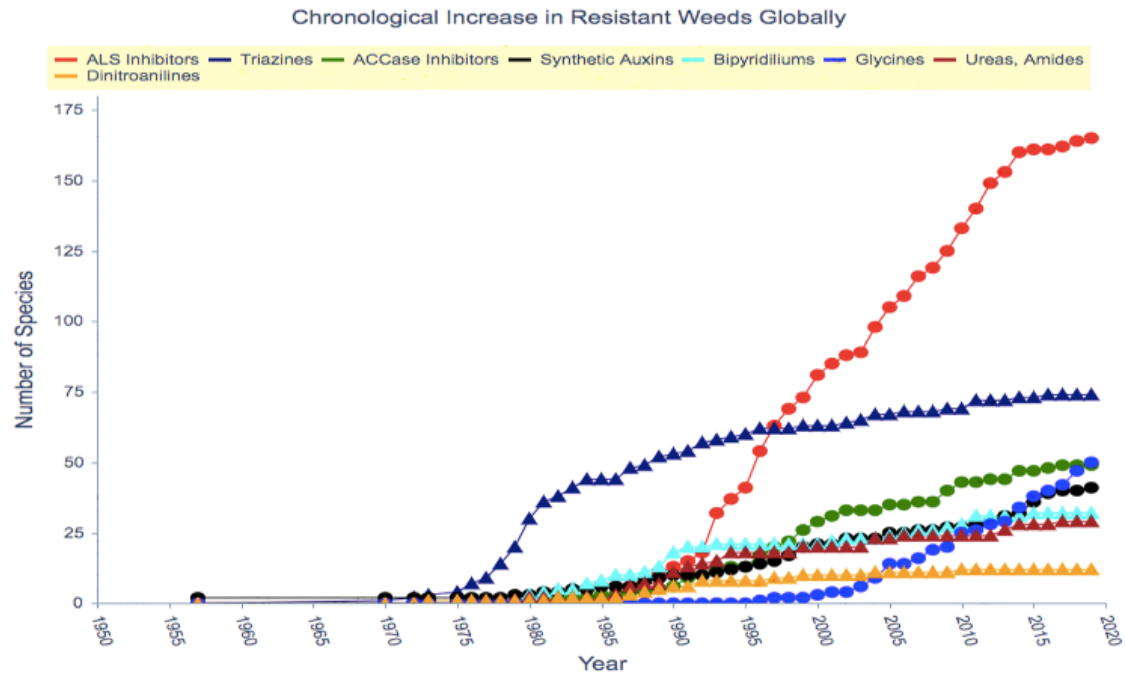
La resistencia a herbicidas puede estar conferida por uno o varios mecanismos y este puede brindar insensibilidad a uno o varios herbicidas (Fischer et al. 2009). Vale destacar que la mayoría de los casos estudiados, el/los mecanismo/s responsables de esta resistencia es por causa de mutaciones de punto en el gen que codifica el sitio de acción de los herbicidas (*ALS* y/o *ACCase*).

#### **1.4 Herbicidas inhibidores de ALS/AHAS y su importancia en el desarrollo de la resistencia.**

El uso de herbicidas que inhiben la enzima acetolactato sintetasa (ALS), también conocida como acetohidroxiácido sintasa (AHAS), aumentó desde su difusión en 1982; en gran medida, debido a la posibilidad de reducir el número de aplicaciones, fundamentado en su actividad residual y en el control de amplio espectro de malezas (Ray, 1984; Saari et al. 1994), baja toxicidad en mamíferos y tiempos flexibles de aplicación en una gran cantidad de cultivos (Tranel y Wright, 2002). Existen cinco grupos químicos distintos de inhibidores de ALS: imidazolinonas (IMI), pirimidiniltiobenzoatos (PTB), sulfonilureas (SU), sulfonilamino-carbonil-triazolinona (SCT) y triazolopirimidinas (TP) según la base de datos internacional sobre resistencia a herbicidas (Senseman, 2007). Estos actúan inhibiendo la enzima ALS que cataliza la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, entre ellos se encuentran leucina, isoleucina y valina (Umberger, 1978). Estos aminoácidos son esenciales para el crecimiento de las plantas y la incapacidad de biosíntesis es letal para la mayoría de especies de plantas.

Los herbicidas inhibidores de la enzima ALS presentan la mayor participación en el incremento cronológico de resistencia a nivel global, representando un tercio de todos los casos (166/509) y son particularmente un problema tanto en el cultivo de arroz como en otros cereales (Figura 1).

La resistencia a herbicidas inhibidores de ALS en varias especies de malezas se debe al menos a seis mutaciones puntuales que conducen a la sustitución de Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Trp574 o Ser653. Es conocido que más de la mitad están registradas como resistentes por sustituciones en Pro197 por His, Thr, Arg, Leu, Gln, Ser, Ala o Ile, siendo la más frecuente Pro197 por Ser. Se ha determinado también el incremento de resistencia por mecanismos de detoxificación de herbicidas (Kaloumenos et al. 2009; Hatami et al. 2016; Rey Caballero et al. 2017).



**Figura 1.** Incremento cronológico de resistencia de malezas a herbicidas por modo de acción a nivel global. Línea con círculos rojos describe el comportamiento de los inhibidores de ALS hasta 2020 (Heap, 2020).

Se conoce, que el cambio de aminoácido Ala-122-Asn en el gen ALS que confiere un alto nivel de resistencia cruzada en siete especies de malezas como lo define (Tranel et al. 2017). La resistencia múltiple a los herbicidas inhibidores de las enzimas ALS y ACCasa pueden ser causadas por una mutación en los genes que codifican las proteínas respectivas, conocida como TSR. Sustituciones en los aminoácidos en las posiciones Pro197 y Trp574 en la enzima ALS están frecuentemente relacionadas con la resistencia a herbicidas de la familia de las sulfonilureas. De manera similar, ocurre con la sustitución de aminoácidos en las posiciones Ile1781, Ile2041, Trp2027 (entre otras) en la enzima ACCasa especialmente en herbicidas de la familia de ariloxifenoxipropionato. En ambos casos, con frecuentes reportes de resistencia en malezas gramíneas (Vázquez et al. 2020).

Bispyribac-sodium (Bs) (marca comercial Nomine®, Bayer): (sodium, 2,6-bis(4,6-dimethoxypymidin-2-yloxy) benzoate), es un herbicida inhibidor de ALS, (Retzinger y Mallory-Smith, 1997), que pertenece a la familia química de los PTB, de acción sistémica, post-emergente, de naturaleza química suspensión concentrada, con una concentración de 400 g (i.a.) L<sup>-1</sup>, y una dosis comercial 40 g (i.a.) ha<sup>-1</sup> (Bayer, 2020). En el Ecuador ha sido habitualmente utilizado para el control de malezas

gramíneas especialmente del género *Echinochloa* tales como ECG y *E. colona*. Actualmente, en el país, existen varias marcas comerciales de la molécula (Grammya®, Calibre®, Jaquer®, entre otras) que están siendo utilizadas para el control de malezas en el cultivo de arroz.

En Arkansas, la limitada rotación del cultivo de arroz, junto a la presión de selección ejercida por los herbicidas (Jasieniuk et al. 1996; Rouse et al. 2018), debido al uso frecuente de propanil, quinclorac y clomazone, propiciaron la evolución de biotipos de ECG resistentes (Baltazar y Smith, 1994; Lovelace, 2003; Norsworthy et al. 2008), de igual forma ocurrió en los arrozales de Mississippi (Bond et al. 2011). Después de la comercialización de líneas de arroz resistente a IMI en el 2002, producto del desarrollo de la tecnología denominada Clearfield®, la evolución de biotipos de ECG resistentes a ALS fue de alto riesgo debido al uso indiscriminado de herbicidas inhibidores de este tipo encontrando biotipos resistentes a imazetapyr 70 g (i.a) ha<sup>-1</sup> en Arkansas entre los años 2008 y 2009 y en Mississippi en el 2010 (Bagavathiannan et al. 2014). Actualmente, son conocidos varios estudios que han revelado la resistencia específica de ECG a bispyribac-sodium: en Italia en el año 2005, Corea del Sur en 2008 (resistencia tanto a inhibidores de ALS como de ACCasa) y en Brasil, Italia y Turquía en el 2009 (a inhibidores de ALS y ACCasa) (Heap, 2021d).

### **1.5 Factores y mecanismos de resistencia a herbicidas conocidos.**

Habitualmente los términos tolerancia y resistencia a herbicidas suelen ser usados basados en la sobrevivencia de un biotipo a la exposición a un herbicida, aunque ambos expresen significados diferentes. Según la Sociedad Americana de Ciencia de la Maleza (WSSA – Weed Science Society of America) la tolerancia es la capacidad inherente de una planta de sobrevivir y generar descendencia luego de someterse a un tratamiento de herbicida. En este sentido, al no existir selección de biotipos o manipulación genética para que logren ser tolerantes, su condición es natural. Mientras que la resistencia, es la habilidad heredada para sobrevivir y reproducirse después de la exposición a la dosis un herbicida a la cual habitualmente era letal (WSSA, 1998).

Algunos factores que determinan la tasa de evolución de la resistencia de las malezas a los herbicidas son: la frecuencia en que originalmente aparecen los individuos resistentes (los mutantes); su fecundidad y su persistencia en el banco de semillas del

suelo, así como, su adaptabilidad ecológica “*fitness*” (Fischer y Valverde, 2012; Torres y Ortiz, 2017).

Son conocidos varios mecanismos de resistencia en las plantas, siendo los principales: la resistencia relacionada con el sitio de acción, objetivo del herbicida, (TSR, del inglés *Target-site resistance*) y la resistencia de tipo “no sitio activo” (NTSR, del inglés *Non target-site resistance*) (Yuan et al. 2007). TSR se presenta principalmente por mutaciones puntuales en las que el cambio en un codón causa la alteración en la conformación de la enzima, limitando así la afinidad del herbicida por el sitio de acción. También es conocido que la TSR puede ser causada por el aumento de la expresión de la enzima objetivo, que puede ocurrir como resultado del incremento en el número de copias del gen en el genoma o por mutaciones en la región promotora que desregulen su expresión (Gaines et al. 2010; Powles y Yu, 2010a). En cambio, la resistencia de tipo NTSR ocurre debido a mecanismos que impiden o limitan la llegada de la dosis letal del herbicida al sitio de acción. Estas interferencias influyen principalmente en menor absorción, translocación y/o degradación de xenobióticos (Powles y Yu, 2010b). Ambos mecanismos de resistencia tienen implicaciones genéticas muy diferentes, se conoce que las mutaciones que ocurren en un solo nucleótido suelen tener efectos pleiotrópicos negativos sobre la función del gen, mientras que se cree que los mecanismos NTSR habitualmente tienen efectos negativos sobre el crecimiento, ya que deben asignar mayor cantidad de recursos para el crecimiento y la defensa de la planta (Vila-Aiub et al. 2015).

Las familias de genes que se encuentran naturalmente en todas las plantas catalizando varias reacciones de su metabolismo, están involucradas en el mecanismo NTSR, entre ellas la del citocromo P450 monooxigenasas (CYP), glucosil transferasa (GT) y glutatión S-transferasa (GST) Yuan et al. (2007). La NTSR resulta compleja y comúnmente se produce por la sobreexpresión de un conjunto de genes que están involucrados en el metabolismo de varias sustancias, entre ellas los herbicidas. Se ha estudiado ampliamente que el mecanismo de resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS está frecuentemente asociado a mutaciones en el gen *ALS* o a un metabolismo potenciado por la acción de CYP (Ghosh, 2017). Estas forman una de las mayores familias de genes en las plantas que comparten hasta un 20% de identidad y catalizan reacciones complejamente diversas que conducen a los precursores de macromoléculas como la lignina, la cutina, la suberina y la esporopolenina, involucradas en biosíntesis y

catabolismos de todas las hormonas y moléculas de señalización, pigmentos, antioxidantes y compuestos de defensa de xenobióticos (Bak et al. 2011). Desde hace algún tiempo se ha demostrado que insecticidas organofosforados como el malation inhiben la detoxificación de herbicidas catalizada por CYP (Anzole, 2010), confirmada en varias especies como *Echinochloa crus-galli* y *Alopecurus myosuroides* Huds (Letouzé y Gasquez, 2003), *Lolium perenne* L. ssp. *multiflorum* (Lam), Husnot (ryegrass perenne) (Northcroft et al., 2001), entre otras. El aumento de la actividad enzimática propicia la degradación del herbicida transformándolo en un compuesto menos tóxico que la molécula original.

Varios estudios efectuados sobre malezas gramíneas con resistencia a herbicidas específicos inhibidores de las enzimas ALS-AHAS y ACCasa dotadas de un metabolismo exacerbado basado en CYP para la detoxificación del herbicida, expresaron una reducción del 20% en el crecimiento vegetativo (Vila-Aiub et al. 2005; Iftikhar et al. 2020). Los costos en el *fitness* que confieren los alelos de resistencia a los herbicidas pueden afectar la tasa de evolución de resistencia (Delye et al. 2013; Yang et al. 2017). Estos costos juegan un papel importante al evitar la fijación de los alelos adaptados y contribuir al mantenimiento de polimorfismos genéticos dentro de las poblaciones (Yannicari et al. 2016). Si este alelo tiene un impacto de costo en los fenotipos resistentes, la tasa de evolución será más baja para este fenotipo (Neve et al. 2014). Esta información es particularmente relevante para comprender la evolución de la resistencia.

### **1.6 Poblaciones de *E. crus-galli* presumiblemente resistentes en zonas arroceras ecuatorianas.**

Los rendimientos en el Ecuador en los últimos años se han visto afectados especialmente por factores bióticos. El Sistema de Información Nacional del Ministerio de Agricultura del Ecuador hizo conocer que los agricultores arroceros pertenecientes al Plan Semillas, Plan Piloto y otros (Programas de apoyo al área agrícola), encuentran entre sus principales problemas al complejo de manchado de grano (CMG), la baja efectividad de los plaguicidas y la incidencia negativa de las malezas (MAGAP, 2020). Esta última, conlleva hasta el 20% del costo de producción de la gramínea en el país (Peñaherrera, 2009), y la dinámica de la evolución de las malezas ha generado fallas en su control, debido al uso repetitivo de las mismas moléculas de herbicidas.



Las malezas del género *Echinochloa*, en el cultivo de arroz del Ecuador, son de alta incidencia, especialmente en el sistema bajo riego, estando presentes todo el año en zonas donde se practica el monocultivo. Si bien existen registros de relevamientos en otras provincias como Los Ríos, El Oro, es en Guayas donde está su mayor dispersión (Peñaherrera, 2007) lo que conlleva un importante problema por ser hospedante del virus de la hoja blanca (VHBA) transmitido por *Togasodes orizicolus* (Muir), en cultivares susceptibles en la región (Vivas e Intriago, 2012). El impacto negativo en los rendimientos causado por CMG y VHBA disminuyó con la incorporación de nuevos cultivares, específicamente genética del Fondo Latinoamericano de Arroz bajo Riego (FLAR), (INIAP, 2018). En cambio, la dificultad del control de las malezas gramíneas en el cultivo de arroz es un problema cada vez más frecuente y de mayor agresividad en el país, especialmente de las especies ECG y *Leptochloa uninervia*.

Bs es un herbicida habitualmente usado en el Ecuador, desde el año 2000, es utilizado ampliamente sobre poblaciones de malezas que habrían mostrado baja sensibilidad a propanil, caso similar al de Colombia (Valverde, 2007). En la última década, se mantuvo como opción en los paquetes del Plan Semillas, su uso en las zonas arroceras ecuatorianas ha sido extenso y repetido, inclusive en el mismo ciclo del cultivo. Actualmente, las fallas de control son atribuidas en la mayoría de los casos a Bs lo que ha provocado que en ciertas zonas utilicen entre dos y tres veces la dosis comercial, y en otras su uso ya no sea una alternativa.

Son escasas las ocasiones en que otros factores relativos a la eficiencia y la calidad de la aplicación del herbicida, tales como: calidad de agua, estado fenológico de la maleza, equipo de pulverización adecuado y calibrado, temperatura, humedad relativa, entre otros, son considerados como causantes de las fallas del control lo que contradice a las recomendaciones de los fabricantes y las expuestas por la FAO (2002); Leiva, (2007), sobre buenas prácticas de aplicaciones terrestres de plaguicidas para lograr el éxito deseado en una aplicación de plaguicidas.

Actualmente en el Ecuador, no existen publicaciones donde se haya determinado el nivel de resistencia de alguna especie de maleza a algún herbicida. Sin embargo, existen sospechas sobre varias especies de malezas que poseerían sensibilidad diferenciada a uno o varios herbicidas y conociendo que, ante un posible caso de resistencia, las pruebas de detección deben ser rápidas y rigurosas (Kim et al. 2000; Beckie et al. 2000). En el presente trabajo se propone evaluar la posible resistencia de

poblaciones de ECG al herbicida bispyribac-sodium en la provincia del Guayas-Ecuador.

### **1.7 Objetivo general**

Determinar posibles casos de resistencia de la especie ECG a herbicidas inhibidores de ALS mediante pruebas de diagnóstico.

#### **1.7.1 Objetivos específicos**

1. Identificar poblaciones de ECG resistentes a la dosis comercial del herbicida bispyribac-sodium mediante respuestas fisiológicas y supervivencia.
2. Evaluar el efecto del herbicida bispyribac-sodium en diversas dosis sobre poblaciones putativamente resistentes de ECG y determinar su índice de resistencia.
3. En caso de detectar poblaciones resistentes a bispyribac-sodium, evaluar la sensibilidad a otros herbicidas.

### **1.8 Hipótesis**

El control ineficaz de poblaciones de ECG empleando bispyribac-sodium en el cultivo de arroz de la provincia del Guayas (Ecuador), se debe a que tales poblaciones presentan resistencia a ese herbicida inhibidor de acetolactato sintetasa (ALS).

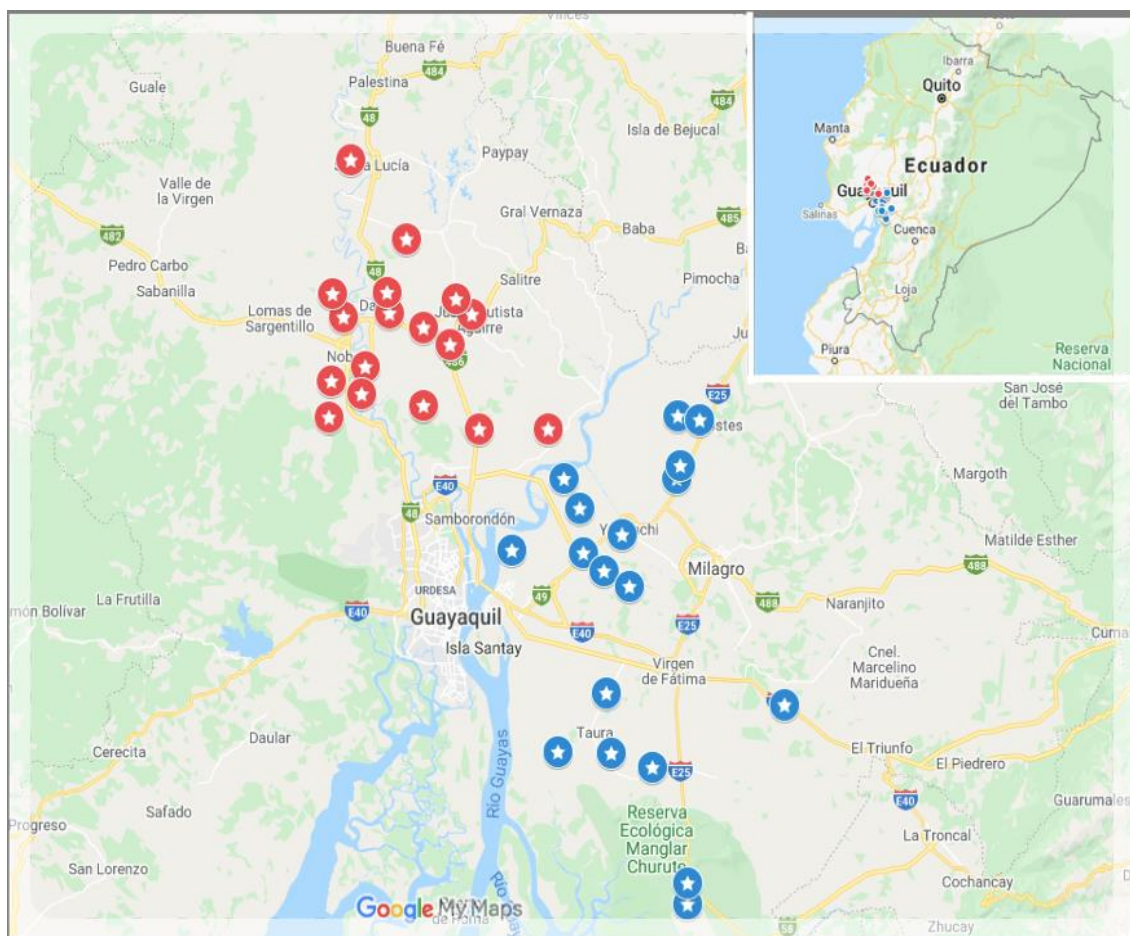
## **CAPÍTULO II**

### **2 MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en la República de Ecuador, en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en la Estación Experimental del Litoral Sur (EELS), ubicada en la provincia del Guayas, cantón Yaguachi, en el km. 26 de la vía Duran-Tambo, entre las coordenadas  $2^{\circ} 15' 15''$  latitud Sur y  $73^{\circ} 38' 40''$  longitud Occidental y a 17 msnm. La zona presenta una pluviosidad de 1030.8 mm, temperatura media anual  $25,5^{\circ}\text{C}$  y 79% de humedad relativa, (INAMHI, 2019). Esta Estación es la sede principal del Programa de Arroz en el país.

Durante la labor de muestreo, fueron recolectadas en zonas arroceras ecuatorianas treinta y cinco muestras (poblaciones) de semillas de ECG, las cosechadas en la zona Daule (puntos color rojo) y, las pertenecientes a sector de Yaguachi (puntos de color azul) (Figura 2).



**Figura 2.** Ubicación de poblaciones de *Echinochloa crus-galli* presumiblemente resistentes en la provincia del Guayas, Ecuador. (Fuentes et al. 2019).

Los proyectos investigativos se desarrollaron en un invernadero desde el momento de la siembra en las bandejas de germinación y su posterior traspaso a las macetas. Allí, se mantuvieron hasta la culminación de los ensayos donde se cultivaron en condiciones de  $\pm 32/22$  (día/noche) °C de temperatura y 12 horas de fotoperiodo, con una intensidad lumínica de  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con 65% de humedad relativa.

## 2.2 Material vegetal

En la campaña de época lluviosa (noviembre 2018 - febrero 2019), se recolectaron en forma masal panojas de ECG (en madurez fisiológica) de poblaciones putativamente resistentes (R), provenientes de arrozales de dos localidades (Daule y Yaguachi) de la provincia del Guayas, cuya principal actividad agrícola es la siembra de la gramínea. Los lotes han estado bajo siembra continua de arroz durante los últimos cinco años y con aplicaciones secuenciales de herbicidas inhibidores de ALS, especialmente bispyribac-sodium  $40 \text{ g (i.a) ha}^{-1}$ , y notada dificultad para controlar dicha maleza. Por otra parte, los lotes de donde provinieron las accesiones susceptibles (S) son de las mismas localidades, pero no tienen historial de siembra del cultivo de arroz ni de aplicaciones de herbicidas inhibidores de ALS.

La colección de muestras incluyó 35 accesiones: 17 de la zona de Daule y 18 de Yaguachi. Las panojas de cada una de las muestras se desgranaron y etiquetaron, identificando la zona y la ubicación mediante la utilización del Sistema de Posicionamiento Global. En este sentido, se denominaron: por la especie *Echinochloa crus-galli* (ECG), la zona Daule (D) y Yaguachi (Y), el número de accesión iniciando (ECG-D01 y ECG-Y01) por cada una de las muestras seleccionadas (Tabla 1). Posteriormente se almacenaron en una heladera a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y 65 % HR para preservar la viabilidad de la semilla hasta el momento que se inició los trabajos investigativos, según el procedimiento sugerido en otros trabajos (Valverde et al. 2000).

**Tabla 1.** Identificación y ubicación geo referenciada de treinta y cinco poblaciones de *E. crus-galli* presumiblemente resistentes a herbicidas inhibidores de ALS/AHAS, en dos localidades de la provincia del Guayas, Ecuador.

<b>Localidad</b>	<b>Población</b>	<b>Ubicación (GPS)</b>
YAGUACHI	ECG-Y01	2°04'31.9"S 79°44'59.9"W
YAGUACHI	ECG-Y02	2°02'40.9"S 79°46'04.3"W
YAGUACHI	ECG-Y03	2°06'10.2"S 79°42'03.7"W
YAGUACHI	ECG-Y04	2°07'23.2"S 79°44'45.1"W
YAGUACHI	ECG-Y05	2°07'12.7"S 79°49'35.9"W
YAGUACHI	ECG-Y06	2°08'28.5"S 79°43'18.9"W
YAGUACHI	ECG-Y07	2°09'31.5"S 79°41'34.0"W
YAGUACHI	ECG-Y08	2°02'37.8"S 79°38'23.3"W
YAGUACHI	ECG-Y09	2°01'52.1"S 79°38'06.7"W
YAGUACHI	ECG-Y10	1°58'43.0"S 79°38'18.8"W
YAGUACHI	ECG-Y11	1°58'55.1"S 79°36'48.0"W
YAGUACHI	ECG-Y12	2°29'36.4"S 79°37'38.9"W
YAGUACHI	ECG-Y13	2°16'14.1"S 79°43'09.2"W
YAGUACHI	ECG-Y14	2°28'16.4"S 79°37'38.4"W
YAGUACHI	ECG-Y15	2°20'54.2"S 79°40'02.3"W
YAGUACHI	ECG-Y16	2°19'58.9"S 79°46'29.1"W
YAGUACHI	ECG-Y17	2°17'00.5"S 79°31'03.9"W
YAGUACHI	ECG-Y18	2°20'01.6"S 79°42'50.5"W
DAULE	ECGD01	1°52'28.0"S 80°01'02.6"W
DAULE	ECGD02	1°50'57.0"S 80°01'45.6"W
DAULE	ECGD03	1°54'12.9"S 79°53'47.1"W
DAULE	ECGD04	1°59'32.5"S 79°51'50.2"W
DAULE	ECGD05	1°55'33.9"S 79°59'34.0"W
DAULE	ECGD06	1°57'19.7"S 79°59'50.2"W
DAULE	ECGD07	1°58'03.9"S 79°55'38.3"W
DAULE	ECGD08	1°42'30.8"S 80°00'35.0"W
DAULE	ECGD09	1°53'08.9"S 79°55'38.4"W
DAULE	ECGD10	1°52'16.1"S 79°52'16.8"W
DAULE	ECGD11	1°52'12.7"S 79°57'56.3"W
DAULE	ECGD12	1°50'54.6"S 79°58'06.9"W
DAULE	ECGD13	1°51'19.0"S 79°53'23.9"W
DAULE	ECGD14	1°47'28.7"S 79°56'45.8"W
DAULE	ECGD15	1°59'30.2"S 79°47'07.8"W
DAULE	ECGD16	1°58'46.8"S 80°02'02.6"W
DAULE	ECGD17	1°56'30.8"S 80°01'52.0"W

### 2.3 Xenobióticos

Para esta investigación se utilizaron tres herbicidas y un inhibidor de CYP. Dos herbicidas inhibidores de la enzima ALS y uno inhibidor de la ACCasa, cada uno perteneciente a familias químicas diferentes, y frecuentemente empleados dentro de su modo de acción en el país (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características de los herbicidas y de malation (inhibidor de CYP) empleados en los bioanálisis.

Tipo	Modo de acción	Familia	Ingrediente activo (i.a.)	Concentración (g i.a. kg <sup>-1</sup> o l <sup>-1</sup> )	Producto	Dosis/ Ha
Herbicida	ALS/AHAS	Pyrimidinyl benzoates	Bispyribac-sodium	400	Grammya 400	100 ml
Herbicida	ALS/AHAS	Triazolopirimidine – tipe 2	Penoxsulam	25	Bengala™ 25 OD®	1.6 lt
Herbicida	ACCasa	Aryloxyphenoxy-propionates	Cyhalofop-butyl	180	Clincher™	1.5 lt
Inhibidor de CYP	IAC	Organofosforado	Malation	604	Aliado 57EC	1.5 lt

### 2.4 Experimentos

Esta investigación constó de cuatro bioensayos en tiempos secuenciales en plantas completas en macetas y en condiciones controladas en invernáculos. El primero de tipo exploratorio, en el que se identificaron las posibles poblaciones resistentes y susceptibles. El segundo, un ensayo de análisis dosis-respuesta con aquellas poblaciones seleccionadas como posiblemente resistentes y altamente susceptibles obtenidas a partir del primer ensayo, con la finalidad de cuantificar la sensibilidad diferencial a dosis crecientes de bispyribac-sodium. Un tercer experimento sometió a las poblaciones que se detectaron como resistentes, a pulverizaciones mediante el empleo de herbicidas alternativos que actúan en sitios de acción diferentes al de Bs, con el que se determinaron los casos de resistencia cruzada y múltiple. Finalmente, un último ensayo donde se calculó el efecto del control evaluando el sinergismo de Bs con malation en poblaciones ECG resistentes. Siempre siguiendo los protocolos de detección, diagnóstico e interpretación de datos establecidos por Herbicide Resistance Action Committee (HRAC global, 2021). A continuación se detalla la forma de ejecución de cada uno:

### 2.4.1 Determinación de poblaciones resistentes y susceptibles al herbicida

#### **Bispyribac-sodium (Screening).**

Para la siembra de las poblaciones colectadas se colocaron las semillas en bandejas de germinación de 168 cavidades, las que contenían un sustrato turba formado por suelo:turba:arena (2:1:1). Las semillas fueron colocadas en la parte superior del sustrato y tapadas someramente con el mismo. Las bandejas de germinación se sobrepusieron en bandejas plásticas que mantuvieron una lámina de agua de alrededor de 1cm de altura lo que permitía mantener hidratado el sustrato evitando el desplazamiento de semillas por acción del riego en la parte superior, debido al pequeño tamaño de las semillas. Las plántulas de todas las accesiones recolectadas se extrajeron de las bandejas de germinación cuando tuvieron entre 1 a 2 hojas, esto ocurrió alrededor de los 7 días después de la siembra. Posteriormente, se trasplantaron dos plántulas por maceta plástica de 15 cm de diámetro en las que permanecieron hasta 21 días después de realizadas las pulverizaciones de los herbicidas fecha en la que se realizó la cosecha de las mismas.

La aplicación del herbicida se realizó cuando las plántulas presentaron de 3 a 4 hojas totalmente abiertas. Fueron pulverizadas con Bs en la dosis comercial recomendada por el fabricante (40 g i.a ha<sup>-1</sup>) con equipo pulverizador de espalda presurizado con CO<sub>2</sub> a 30 PSI, equipado con boquillas de abanico Tj 8002, calibrado para un gasto de 200 L ha<sup>-1</sup> junto con surfactante no iónico a una concentración de 0,1% (1 cm<sup>3</sup> litro<sup>-1</sup>) y un regulador de pH siguiendo las recomendaciones del fabricante (Figura 3). Posterior a ello se realizaron riegos periódicos de 200 ml agua cada 48 horas, lo que mantenía el sustrato hidratado.

#### ***Variables evaluadas.***

***Altura de planta:*** Se determinó la altura de planta mediante una regla graduada expresada en centímetros tomados previo a la aplicación del herbicida y luego a los 6, 10 y 14 días después de la aplicación (DDA), tomado desde el suelo hasta el ápice de la primera hoja completa extendida, evaluando un dato por maceta y siempre a la misma planta que fue seleccionada al azar inicialmente.

***Contenido de clorofila:*** Se cuantificó el contenido de clorofila mediante un medidor portátil de clorofila (SPAD 502®, Minolta, Konica Sensing, Inc.) tomado previo a la aplicación del herbicida y luego a los 6, 10, 14 DDA, para lo cual se consideró como el valor de clorofila por planta el promedio de tres mediciones tomadas



en el tercio medio de la tercera hoja. Se evaluó al 50% de individuos de cada una de las accesiones inicialmente seleccionada al azar y marcada para su posterior toma de datos.

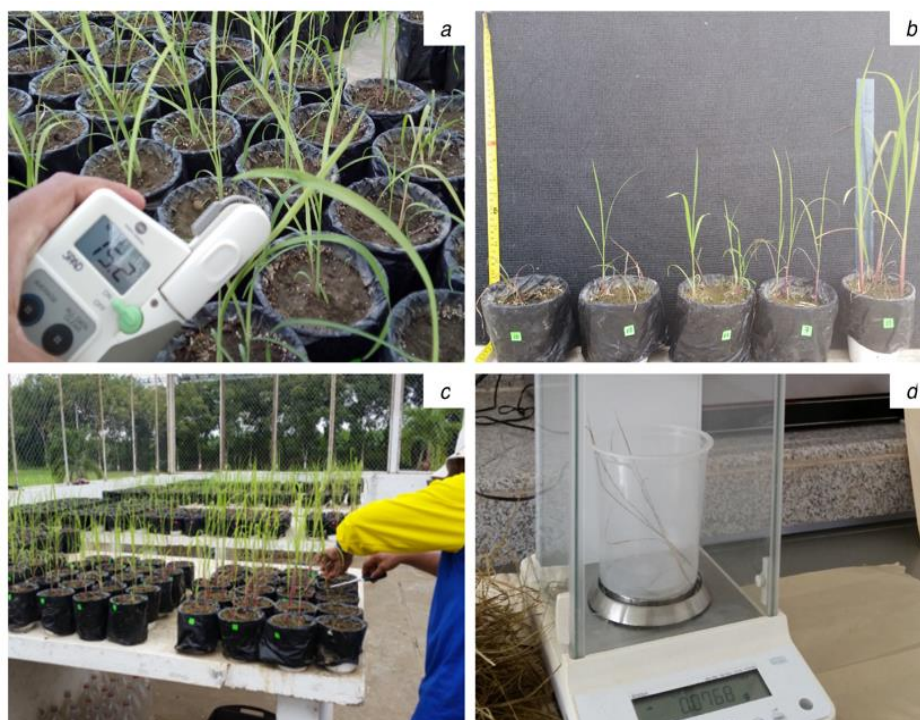


**Figura 3.** Proceso de implementación de ensayo de *screening* a) recolección de semillas en campo, b) siembra de semillas de *E. crus-galli* en bandejas de germinación, c) trasplante a macetas definitivas en el invernadero d) aplicación del herbicida bispyribac-sodium a tasa comercial.

**Sobrevida:** A los 21 días se determinó el número de plantas sobrevivientes por cada accesión a partir del número de plantas vivas respecto al total de plantas tratadas con esa dosis (%). Para esto, se consideraron como plantas controladas aquellas que presentaron síntomas generales de clorosis, marchitamiento y necrosis, sin evidencias de tejidos en crecimiento.

**Biomasa aérea por población a partir del peso fresco y peso seco:** Se determinó el peso fresco de la parte aérea al momento de la cosecha en el invernadero a los 21 DDA. Para ello, se cosechó la parte aérea de todas las plantas cortándolas con estilete al ras del suelo e inmediatamente se cuantificó el peso fresco. Luego las accesiones fueron colocadas en bolsas de papel y llevadas a una estufa a 65°C para su desecación hasta peso constante por un tiempo de 72 horas y se determinó el peso seco; en ambos casos, los valores se establecieron en gramos con la ayuda de una balanza digital de 0,001 mg de exactitud. Así correspondió la toma de datos de las variables evaluadas (Figura 4).

Todos los datos de las variables analizadas se expresaron como porcentaje respecto al promedio del testigo sin herbicida (tratamiento con herbicida/peso fresco del tratamiento sin herbicida x 100).



**Figura 4.** Variables evaluadas para el análisis de sensibilidad de poblaciones posiblemente resistentes y de mayor susceptibilidad; a) altura de planta, b) índice de clorofila, c) peso fresco, d) peso seco.

**Diseño experimental y análisis estadístico:** Para poder cumplir con los objetivos planteados para el primer ensayo e identificar las poblaciones putativamente R y S, se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), con un tratamiento a dosis comercial con 5 repeticiones por población incluido un testigo sin aplicación de herbicida. Cada repetición contó con 5 macetas y cada maceta 2 plantas (50 individuos por población), siendo un grupo de 5 macetas la unidad experimental. Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico de ANOVA y las comparaciones realizadas mediante una prueba de diferencias de Tukey al 5%.

#### 2.4.2 Dosis-respuesta de bispyribac-sodium sobre poblaciones de *Echinochloa crus-galli* presumiblemente resistentes.

Del bioensayo anterior se identificaron seis poblaciones con mayor frecuencia de plantas resistentes y dos susceptibles cuya mortalidad fue la mayor. Se emplearon semillas de las muestras de ECG almacenadas y se procedió nuevamente a la siembra en

las bandejas germinadoras luego se trasplantó en macetas definitivas. Todas las labores de establecimiento, equipos, aplicación del herbicida y cosecha que se utilizaron fueron similares a las descritas en el bioensayo 1, a diferencia de que se emplearon varias dosis. Adicionalmente a los datos de altura de planta, contenido de clorofila, peso fresco, peso seco y sobrevivencia, se evaluó para este ensayo el grado de fitotoxicidad (como se describe en lo posterior). Finalmente, se calculó el índice de resistencia de cada población como se detalla posteriormente.

**Dosis de herbicida:** Las dosis de Bs se incrementaron según multiplicador común siendo para las poblaciones R las siguientes: 0, 20, 40, 80, 160, 320, 640 g (i.a) ha<sup>-1</sup> y para la S 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 g (i.a) ha<sup>-1</sup>, de acuerdo a lo sugerido por Valverde et al. (2000).

**Fitotoxicidad:** Se evaluaron respuestas a las dosis crecientes del producto estimando el porcentaje de fitotoxicidad, en que cero fue ausencia del efecto del herbicida y el 100% es muerte completa de la planta mediante la utilización de la escala propuesta por la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM, 1974) (Tabla 3). Se determinó la dosis de bispyribac-sodium necesaria para controlar el 50% de la población ( $C_{50}$ ), y reducir el 50% de la producción de masa seca de ECG en accesiones R y S.

**Tabla 3.** Escala de evaluación visual de fitotoxicidad como el grado control de herbicidas sobre malezas propuesto por la Asociación Latinoamericana de Malezas (1974).

Porcentaje	Grado de control
0-40	Ninguno o Pobre
41-60	Regular
61-70	Suficiente
71-80	Bueno
81-90	Muy bueno
91-100	Excelente

### ***Diseño experimental y análisis estadístico:***

Este ensayo se llevó a cabo como un experimento factorial en un diseño completamente aleatorizado que consistió en los siguientes factores:

- a) Ocho poblaciones de ECG.
- b) Nueve dosis de herbicida Bs.

Las poblaciones seleccionadas R y S tuvieron cinco repeticiones por cada tratamiento (dosis de herbicidas), cada repetición consistió en cuatro macetas con dos plantas en cada una de ellas.

Los datos fueron analizados por su homocedasticidad y sometidos al análisis de varianza (ANOVA). A partir de los datos de sobrevivencia de plantas, fitotoxicidad, y materia fresca y seca aérea se elaboraron cada una de las curvas de dosis-respuesta a Bs siguiendo un modelo de regresión no lineal log-logístico utilizando el software GraphPadPrism® v8.00 (Graphpad Software, Inc.) y AgroEstat. Los valores de DL<sub>50</sub> y GR<sub>50</sub> se calcularon a partir de los parámetros de la ecuación propuesta por Seefeldt et al. (1995), que expresa la respuesta de la planta (control) a la dosis del herbicida.

$$y=C+\{(D-C)/[1+(x/I_{50})]^b\}$$

en que  $y$  es la respuesta= (por ejemplo, porcentaje de control o peso fresco);  $x$  = concentración del herbicida;  $C$  = asíntota del límite inferior,  $D$  = límite superior o repuesta media cuando la concentración de herbicida es cero,  $b$  = pendiente de la curva e  $I_{50}$  = es la dosis que proporciona el 50% de la respuesta a la variable evaluada (por ejemplo, sobrevivencia).

Para evaluar el ajuste del modelo se estudio las varianza del error y se calculó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Además, se realizaron pruebas F ( $P<0,05$ ) para comparar los parámetros de los modelos ajustados de las poblaciones susceptibles y de los resistentes a Bs.

#### ***2.4.2.1 Determinación del Índice de Resistencia (IR).***

Empleando los datos de sobrevivencia y de producción de biomasa, se ajustó un modelo log-logístico y se calculó la dosis letal media (LD<sub>50</sub>, dosis para la cual se reduce a un 50% el número de plantas sobrevivientes) y dosis de inhibición media del crecimiento (GR<sub>50</sub>, dosis para la cual se reduce el crecimiento de la planta tratada a un

50% respecto de la planta no tratada), para verificar si la población en duda es resistente. En función de los datos de sobrevivencia, se calculó el índice de resistencia (IR) mediante la relación  $LD_{50}$  de poblaciones sospechosas R dividido la  $DL_{50}$  de poblaciones S. De esta forma, si el IR es mayor de 2,0 y a la dosis recomendada sobrevive la población putativamente resistente, se confirma su resistencia (Fischer y Valverde, 2012).

Además, se determinó el IR en función de los parámetros de  $LD_{50}$ ,  $GR_{50}$  y  $I_{50}$  para fitotoxicidad siguiendo la metodología de cálculo indicada.

#### ***2.4.2.2 Efecto sobre el fitness en poblaciones resistentes a herbicidas inhibidores del ALS:***

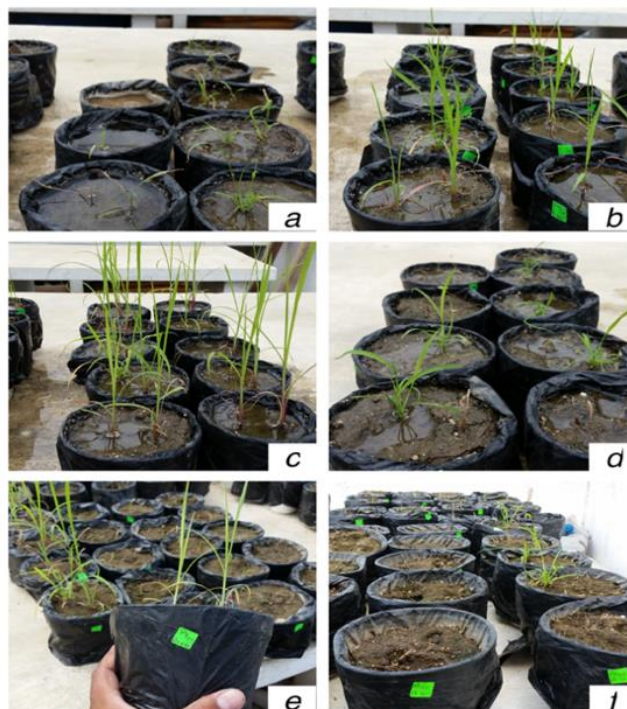
De las poblaciones seleccionadas como resistentes se mantuvo una repetición de los tratamientos correspondientes a las dosis más altas hasta la finalización del ciclo de las plantas y se determinó si fueron capaces de producir descendencia luego de estar expuestos al tratamiento con herbicida. Para ello, se cosecharon las plantas, se cuantificó la producción de semillas y posteriormente se corroboró la viabilidad de éstas mediante pruebas de germinación en bandejas provistas del mismo sustrato empleado anteriormente. La emergencia de plantas se registró periódicamente cada 3 días hasta los 10 días.

##### ***Diseño experimental y análisis estadístico:***

Este ensayo se llevó a cabo como un experimento factorial en un diseño completamente aleatorizado que consistió en los siguientes factores:

- a) Seis poblaciones de ECG-Resistentes.
- b) Dos tratamientos de Bs.

Se empleó un DCA, con dos tratamientos a 320 y 640 g i.a ha<sup>-1</sup>, se analizó la tasa de emergencia de cada población, plantando 180 semillas de cada población R, con tres repeticiones. Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico de ANOVA y las comparaciones realizadas mediante una prueba de Tukey al 5%.



**Figura 5.** Selección de seis poblaciones sobrevivientes a los tratamientos 320 y 640 g (i.a.) a bispyribac-sodium para confirmación la posibilidad de generar descendencia y evaluar el porcentaje de germinación.

### 2.4.3 Experimento evaluación de resistencia cruzada y/o múltiple en poblaciones resistentes.

Se emplearon semillas de las muestras almacenadas de ECG de las poblaciones que fueron seleccionadas para el ensayo dosis-respuesta tanto R como S, y se procedió nuevamente a la siembra en las bandejas germinadoras y su posterior trasplante en macetas definitivas. Todas las labores de establecimiento, toma de datos (altura de planta, índice de clorofila, peso fresco, peso seco y sobrevivencia), equipos, pulverización, cosecha y desecamiento fueron similares a las descritas en los bioensayos anteriores.

Con los antecedentes de la especie se evaluaron adicionalmente otros xenobióticos pulverizados a la dosis comercial recomendada por el fabricante en dos eventos diferentes. El primero para determinar los casos de resistencia cruzada con Bs mediante la aplicación del herbicida penoxsulam, a dosis comercial de 40 g (i.a.) ha<sup>-1</sup> que actúa al igual que Bs inhibiendo la enzima ALS, pero perteneciente a una familia química diferente (triazolopirimidinas). Asimismo, se determinó casos de resistencia múltiple, mediante la pulverización del herbicida inhibidor de la ACCasa, cyhalofop-butyl a dosis de 270 (i.a.) ha<sup>-1</sup>.

***Diseño experimental y análisis estadístico:***

Se siguió un DCA en la cual se emplearon seis poblaciones R y una S, sometidas a dos tratamientos de herbicidas (penoxsulam y cyhalofop) y un testigo sin aplicación, en ambos casos. Se emplearon cinco repeticiones por población y cada unidad experimental consistió en cuatro macetas con tres plantas cada una (60 individuos por población). Los datos se sometieron a un análisis estadístico de ANOVA y se realizaron comparaciones mediante una prueba de Tukey al 5%.

**2.4.4 Estudio de sinergismo de bispyribac-sodium con malation.**

Se planteó un cuarto bioensayo en el que se definió la existencia de sinergismo entre Bs y malation, y se determinó las accesiones que el inhibidor de CYP favoreció el control de dichas poblaciones por neutralizar el mecanismo de resistencia y desfavorecer la detoxificación de Bs. Para ello, se plantearon dos tratamientos a dosis comercial de Bs, uno de los tratamientos se pulverizó 6 horas antes con malation a dosis de 1000 g i.a ha<sup>-1</sup>, como se planteó en trabajos previos (Bonow et al. 2020; Torres y Ortiz 2017). De igual forma, todas las variables evaluadas fueron similares a las descritas en los ensayos anteriores. Para este bioensayo solo se empleó una población susceptible por falta de semillas.

***Diseño experimental y análisis estadístico:***

Se siguió un DCA con dos tratamientos que consistieron en Bs y malation + Bs y un testigo sin herbicida. Se emplearon cinco repeticiones por población. Cada unidad experimental consistió en cuatro macetas con tres plantas cada una (60 individuos por población), se emplearon seis poblaciones R y una S. Los datos se sometieron a un análisis estadístico de ANOVA y se realizaron comparaciones mediante una prueba de Tukey al 5%.

## **CAPÍTULO III**

### **3 RESULTADOS**



### 3.1 Bioensayo *screening* para el análisis de sensibilidad de poblaciones de *Echinochloa crus-galli* al herbicida bispyribac-sodium inhibidor de la ALS.

#### 3.1.1 Efectos del herbicida Bs en la sobrevida de poblaciones de *E. crus-galli*.

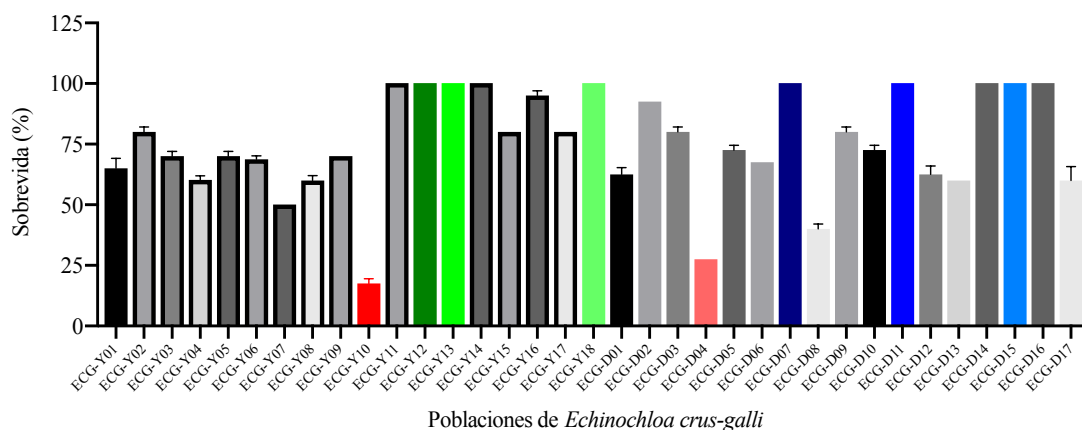
El análisis de varianza mostró que 22 (62,85%) de las 35 poblaciones evaluadas no presentaron un control satisfactorio (>70%) a la dosis comercial del herbicida recomendada por el fabricante, i.e. Bs 40 g (i.a) ha<sup>-1</sup>. Los datos fueron analizados en ANOVA a una vía donde la fuente de variación fue la *población*. Al considerar los efectos sobre la *sobrevivencia* se determinó diferencias altamente significativas entre las poblaciones ( $P < 0,001$ ) (Tabla 4, Anexo 1).

**Tabla 4.** Efecto sobre la *sobrevida* (plantas vivas luego de someterse a la tasa comercial de Bs 40 g (i.a) ha<sup>-1</sup>), 35 poblaciones de *E. crus-galli*.

Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Población	34	1878,98	541,27	<0,0001
Error	105	3,47		
Total	139			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F

En la comparación de medias entre poblaciones de ECG, los valores más bajos se muestran en las accesiones ECG-Y10 con el 17,50%, seguida de ECG-D04 con el 27,50%. En sentido contrario, 10 (28,57%) de las 35 poblaciones de ECG evaluadas mantuvieron el 100% de sobrevivencia con respecto al testigo. Entre ellas se encuentran las accesiones ECG-Y13, ECG-Y18, ECG-Y12 por la localidad de Yaguachi y ECG-D11, ECG-D15 y ECG-D07 por Daule (Figura 6).



**Figura 6.** Valores promedio de *sobrevida* (%) de cada población de *E. crus-galli* de las localidades de Yaguachi (ECG-Y) y de Daule (ECG-D), sometida a la dosis comercial de bispyribac-sodium (40 g i.a ha<sup>-1</sup>), poblaciones identificadas con el color rojo fueron seleccionadas como susceptible y las de color verde y azul para determinar su índice de resistencia. Barras de dispersión indican el error estándar de la media.

### 3.1.2 Efecto del herbicida Bs sobre el peso fresco de la biomasa aérea.

Basados en los resultados del peso de las poblaciones asperjadas con Bs a la tasa comercial y el comportamiento contrastante de las accesiones presumiblemente resistentes y evidentemente sensibles, el análisis de varianza, al considerar los efectos sobre el *peso fresco* de la planta se determinó diferencias altamente significativas entre las poblaciones en un ANOVA a una vía ( $P < 0,001$ ) (Tabla 5).

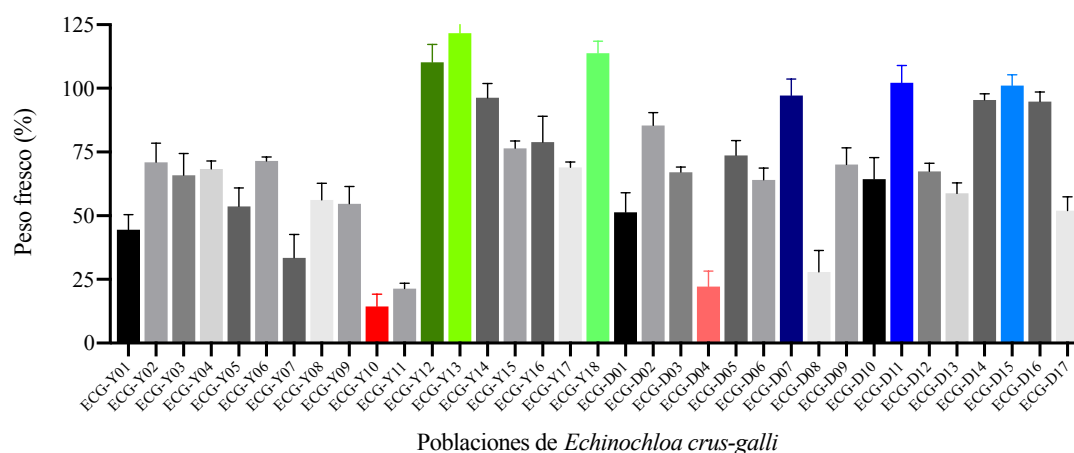
**Tabla 5.** Efecto del herbicida bispyribac-sodium sobre 35 poblaciones de *E. crus-galli* en el *peso fresco* (% respecto al control sin herbicida).

Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Población	34	2861,93	20,16	<0,0001
Error	105	141,95		
Total	139			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F

Los valores en la comparación de medias de *peso fresco* y *sobrevida* entre poblaciones de ECG fueron los determinantes para seleccionar las accesiones susceptibles y posibles resistentes para los ensayos posteriores. Los datos más bajos de peso fresco se hallaron en las accesiones ECG-Y10 con el 14,46%, y ECG-D04 con el 22,22% seleccionadas como susceptibles (S) y posteriormente identificadas como SY10 y SD04; los valores más altos se obtuvieron en las poblaciones ECG-Y13, ECG-Y18, ECG-Y12 por la localidad de Yaguachi y ECG-D11, ECG-D15 y ECG-D07 por Daule

seleccionadas como resistentes (R), todas con valores cercanos y sobre el 100% respecto al tratamiento control sin herbicida (Figura 7).



**Figura 7.** Valores promedio de *peso fresco* (% respecto al control sin herbicida) de cada población de *E. crus-galli* de las localidades de Yaguachi (ECG-Y) y Daule (ECG-D), sometida a la dosis comercial de bispyribac-sodium (40 g i.a ha<sup>-1</sup>). Barras de dispersión indican el error estándar de la media.

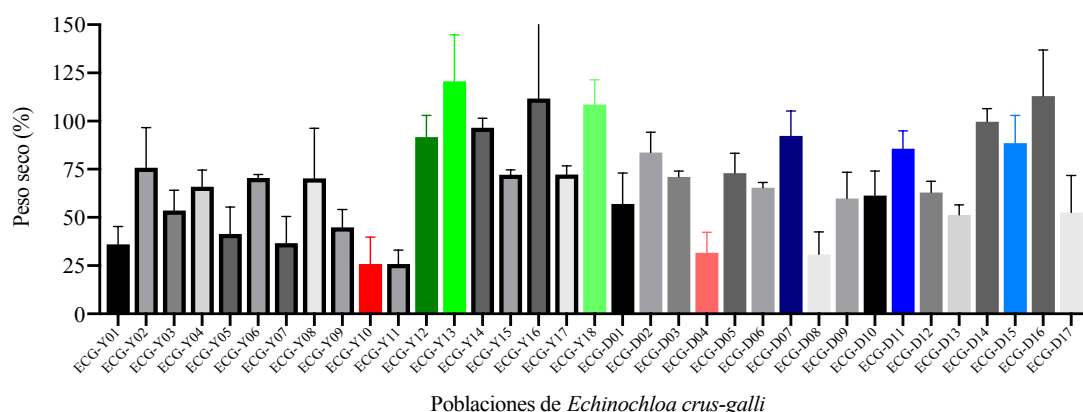
### 3.1.3 Efectos del herbicida Bs sobre el peso seco de la biomasa aérea.

Al igual que en la variable anterior, al observar los valores de *peso seco* el análisis de varianza muestra diferencias altamente significativas entre las poblaciones (Tabla 6). En este sentido, las poblaciones que presentaron los valores más bajos fueron ECG-Y11, ECG-Y10 y ECG-D04 obteniendo valores de 25,89%, 25,97% y 30,97%. Mientras que, las accesiones que presentaron los valores más altos fueron ECG-Y18, ECG-Y16 y ECG-Y13 con valores sobre el 100% respecto al control sin herbicida (Figura 8 y Anexo 2).

**Tabla 6.** Efecto del herbicida bispyribac-sodium sobre 35 poblaciones de *E. crus-galli* en el *peso seco* (% respecto al control sin herbicida).

Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Población	34	2692,1	11,23	<0,0001
Error	105	239,82		
Total	139			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F



**Figura 8.** Valores promedio de *peso seco* (% respecto al control sin herbicida) de cada población de *E. crus-galli* de las localidades de Yaguachi (ECG-Y) y Daule (ECG-D), sometida a la dosis comercial de bispyribac-sodium (40 g i.a ha<sup>-1</sup>) y posterior a la cosecha colocadas en una estufa a  $\pm 65^{\circ}$  C por 72 horas para su desecación hasta peso constante. Barras de dispersión indican el error estándar de la media.

### 3.1.4 Efecto del herbicida Bs sobre altura de planta.

En cuanto a la variable *altura de planta*, el análisis de varianza indicó que existieron diferencias altamente significativas entre las poblaciones de ECG, al igual que en los días después de la aplicación (DDA) de Bs, sin existir interacción entre ellas ( $P < 0,001$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Valores de probabilidad de los ANOVA realizados sobre la *Altura de planta* (Pl) de 35 poblaciones de *E. crus-galli* muestran diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) en los días después de la aplicación (DDA) de la dosis comercial de bispyribac-sodium (40 g i.a ha<sup>-1</sup>).

Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Población	34	1210,39	6,55	<0,0001
DDA	3	22376,71	121,08	<0,0001
Población*DDA	102	169,24	0,92	0,7007
Error	420	184,81		
Total	559			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F

Las medias más bajas se hallaron en las poblaciones ECG-Y10, ECG-Y05 y ECG-Y04 de Yaguachi, siendo estadísticamente diferentes del resto, con un efecto negativo de entre el 35% - 45% de pérdida de altura respecto al control. Las medias más altas las obtuvieron las accesiones ECG-D02 y ECG-D12 por Daule y la población ECG-Y14 por Yaguachi (Tabla 8). En la comparación de medias, la accesión con mayor efecto sobre la disminución de altura fue ECG-Y10 con pérdidas de 56,86% a los 10 DDA y 63,88% a los 14 DDA. En contraste, las poblaciones que presentaron menor

impacto fueron ECG-D07, ECG-D15 con el 12% y 14% respectivamente; mientras que, en Yaguachi fueron las poblaciones de ECG-Y18, ECG-Y12 y ECG-Y13 con alrededor del 22% de disminución de altura (datos no mostrados). La sensibilidad de las accesiones se acentuó a los 14 y 10 DDA con un impacto cercano al 35%, sin existir diferencia significativa entre ellas ( $P > 0,05$ ), mientras que, 6 DDA las pérdidas estuvieron alrededor del 25%.

**Tabla 8.** Promedios generales de *altura de planta* (% respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* (susceptibles y resistentes); pulverizadas a la tasa comercial de bispyribac-sodium.

<b>Población</b>	<b>Medias</b>	
ECG-Y10	55,74	a
ECG-Y05	57,25	ab
ECG-Y04	63,44	ab
ECG-D10	66,01	bc
ECG-Y07	67,82	cd
ECG-D13	68,30	cd
ECG-Y06	68,56	cde
ECG-Y01	68,90	cde
ECG-Y08	68,96	c-f
ECG-D17	69,01	c-f
ECG-D09	69,12	c-f
ECG-Y03	70,10	c-g
ECG-D08	70,26	c-h
ECG-D16	70,85	c-i
ECG-D14	76,13	d-j
ECG-D04	77,95	e-k
ECG-D03	78,41	f-k
ECG-D05	79,01	g-k
ECG-Y15	79,43	g-k
ECG-Y02	79,70	h-l
ECG-Y17	80,13	i-l
ECG-D06	80,38	j-m
ECG-Y11	80,84	j-m
ECG-Y12	81,14	j-m
ECG-D07	81,60	j-m
ECG-Y18	81,63	j-m
ECG-D11	81,69	j-m
ECG-D01	83,25	j-m
ECG-Y16	83,69	j-m
ECG-Y13	84,83	j-m
ECG-D15	85,30	j-m
ECG-Y09	86,11	klm
ECG-D12	86,94	klm
ECG-D02	89,03	lm
ECG-Y14	89,69	m

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

### 3.1.5 Efecto del herbicida Bs sobre índice de clorofila (IC).

El efecto fitotóxico del herbicida sobre el *contenido relativo de clorofila* (i.e. IC) de ciertas poblaciones fue evidente y el ANOVA factorial muestra la existencia de una interacción doble *Población x Días después de la aplicación* (Tabla 9), por lo que se evidencia que el contenido de clorofila fue condicionado por el tiempo pos aplicación.

**Tabla 9.** Efecto en el *índice de clorofila* (%) de poblaciones mayormente (susceptibles y resistentes); días después de la aplicación (0, 6, 10 y 14 días); tratamientos (Bispyribac-sodium y control) y sus interacciones.

Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Población	34	4263,68	22,35	<0,0001
DDA	3	27617,44	144,77	<0,0001
Población*DDA	102	855,27	4,48	<0,0001
Error	420	190,76		
Total	559			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F

Las poblaciones evidencian diferencia significativa entre los valores de IC tomados a los 6 DDA con los previos a la aplicación con pérdidas cercanas al 25%. Mientras que, se evidencia un decrecimiento del 32% y 34% a los 10 y 14 DDA no difiriendo significativamente entre ellos.

En comparación de los valores medios, cinco poblaciones de Daule ECG-D (7, 10, 6, 5 y 4) y ECG-Y04 mostraron mayor efecto negativo en la disminución del IC sin diferir significativamente entre ellas, con pérdidas entre el 40% y 60%. En sentido contrario, las poblaciones de Yaguachi ECG-Y (18, 16, 13, 1, 12, 2, 17 y 8) y de Daule ECG-D12 y ECG-D13, evidenciaron mínimo o nulo impacto (Tabla 10 y Anexo 3).

**Tabla 10.** Promedios generales de *índice relativo de clorofila* (% respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* (susceptibles y resistentes); pulverizadas a la tasa comercial de bispyribac-sodium.

<b>Poblaciones</b>	<b>Medias</b>	
ECG-D07	41,66	n
ECG-D10	42,62	mn
ECG-D06	52,44	lmn
ECG-D05	53,23	lmn
ECG-Y04	55,77	K-n
ECG-D04	59,71	j-n
ECG-D08	60,92	i-m
ECG-D02	61,21	i-m
ECG-D09	66,29	h-l
ECG-D14	68,79	g-l
ECG-D03	69,06	g-l
ECG-Y06	73,49	f-k
ECG-D11	74,82	f-j
ECG-D01	76,26	f-j
ECG-D15	78,72	e-i
ECG-Y09	78,73	e-i
ECG-Y15	78,84	d-i
ECG-Y14	79,15	d-i
ECG-D16	80,31	c-h
ECG-Y10	81,52	c-h
ECG-Y05	82,26	b-h
ECG-Y11	82,85	b-h
ECG-D17	83,25	b-h
ECG-Y07	84,98	b-h
ECG-Y03	85,73	a-g
ECG-D12	86,77	a-g
ECG-D13	89,37	a-f
ECG-Y18	89,92	a-f
ECG-Y16	95,11	a-e
ECG-Y13	95,56	a-e
ECG-Y01	96,42	a-e
ECG-Y12	97,64	a-d
ECG-Y02	98,66	abc
ECG-Y17	100,32	ab
ECG-Y08	104,46	a

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

Al analizar las interacciones, los valores más bajo registrados de IC fueron de 13,31%, 17,96% y 18,86% a los 14 DDA, valores que correspondieron a las poblaciones ECG-Y04, ECG-D07 y ECG-D10. En contraste, los valores más altos registrados en las poblaciones de Daule a los 14 DDA pertenecieron a las poblaciones

ECG-D13 y ECG-D12 con el 81,12% y 86,60%. En el mismo sentido, las poblaciones de Yaguachi presentan los mayores valores promedios en la interacción *Población x DDA* (Tabla 11) difiriendo estadísticamente del resto con 121,49% y 112,73% que pertenecieron a las accesiones ECG-Y08 y ECG-Y12, respectivamente.

**Tabla 11.** Valores medios de *Índice de clorofila (%)* evaluados 0, 6, 10 y 14 DDA de 35 poblaciones de *E. crus-galli* sometidas a la tasa comercial del herbicida bispyribac-sodium inhibidor de la ALS/AHAS.

Población	0 DDA		6DDA		10 DDA		14 DDA	
ECG-D01	104,61	aA	65,94	a-gB	59,40	e-iB	75,10	c-iB
ECG-D02	104,73	aA	46,08	d-gB	47,67	f-jB	46,35	f-lB
ECG-D03	95,85	aA	69,50	a-fB	58,98	e-iB	51,93	e-lB
ECG-D04	99,79	aA	65,16	a-gB	38,11	hijC	35,80	jdkC
ECG-D05	89,61	aA	39,08	f-gB	40,46	hijB	43,80	g-lB
ECG-D06	93,22	aA	60,34	b-gB	32,69	ijC	23,50	klC
ECG-D07	95,42	aA	30,12	gB	17,96	jB	23,12	klB
ECG-D08	104,64	aA	56,35	c-gB	43,16	g-jB	39,53	i-lB
ECG-D09	101,44	aA	81,85	a-dA	39,32	hijB	42,54	h-lB
ECG-D10	87,50	aAB	42,53	efgB	18,69	jB	21,77	klB
ECG-D11	96,27	aA	87,38	abcA	54,24	e-jB	61,40	d-jB
ECG-D12	99,02	aA	89,58	abcAB	71,90	b-hB	86,60	a-eAB
ECG-D13	105,33	aA	100,15	aA	70,87	b-hB	81,12	b-gAB
ECG-D14	94,03	aA	93,31	abcA	47,15	f-jB	40,65	i-lB
ECG-D15	88,43	aAB	88,74	abcA	68,96	b-iB	68,74	c-jA
ECG-D16	108,97	aA	75,55	a-fB	69,56	b-iA	67,15	c-jB
ECG-D17	98,13	aA	80,73	a-dA	79,55	a-gAB	74,60	c-iA
ECG-Y01	111,75	aA	84,37	abcB	102,35	a-dAB	87,21	a-eAB
ECG-Y02	102,78	aA	95,83	abA	105,91	abA	90,11	a-dA
ECG-Y03	98,22	aA	79,02	a-eA	81,98	a-fA	83,71	b-fA
ECG-Y04	93,64	aA	80,33	a-dA	35,83	hijB	13,31	lB
ECG-Y05	86,33	aAB	82,67	a-dA	89,25	a-eA	70,80	c-jA
ECG-Y06	90,53	aA	86,55	abcA	66,35	c-iAB	50,53	e-lA
ECG-Y07	98,67	aA	86,78	abcA	80,11	a-gAB	74,36	c-iB
ECG-Y08	97,04	aA	86,97	abcB	112,36	aAB	121,49	aB
ECG-Y09	94,60	aA	67,86	a-fB	88,41	a-eB	64,07	c-jB
ECG-Y10	99,11	aA	80,75	a-dAB	69,85	b-iAB	76,35	b-iB
ECG-Y11	96,68	aA	83,56	a-dAB	65,48	d-iAB	85,68	a-eB
ECG-Y12	100,63	aA	78,02	a-eB	99,19	a-Dab	112,73	abB
ECG-Y13	101,07	aA	90,67	abcA	103,75	abcA	86,75	a-eA
ECG-Y14	92,50	aA	80,03	a-eAB	79,66	a-gAB	64,42	c-jB
ECG-Y15	91,15	aA	75,23	a-fA	69,50	b-iA	79,48	b-hA
ECG-Y16	101,28	aA	83,10	a-dA	97,93	a-dA	98,13	a-dA
ECG-Y17	90,00	aA	98,47	aA	112,98	aA	99,86	abcA
ECG-Y18	96,91	aA	86,60	abcA	81,22	a-fA	94,98	a-dA

Medias con una letra minúsculas en común no son estadísticamente diferentes entre poblaciones ( $p > 0,05$ ), al igual que letras mayúsculas entre días después de la aplicación (DDA).



### **3.2 Estudio de dosis-respuesta de bispyribac-sodium sobre poblaciones de *Echinochloa crus-galli* presumiblemente resistentes.**

Para este segundo ensayo se seleccionaron seis poblaciones del ensayo 1 (tres por cada localidad) como posiblemente resistentes (R) al herbicida Bs habiendo mostrado los valores más altos en *sobrevivencia y peso fresco de la biomasa aérea*, éstas fueron: ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18/Yaguachi, ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15/Daule y dos poblaciones SY10 y SD04 que evidencian ser altamente susceptibles (S) habiendo sido aquellas con mayor mortalidad a la tasa comercial del herbicida.

#### **3.2.1 Efecto del herbicida Bs sobre la sobrevida de plantas.**

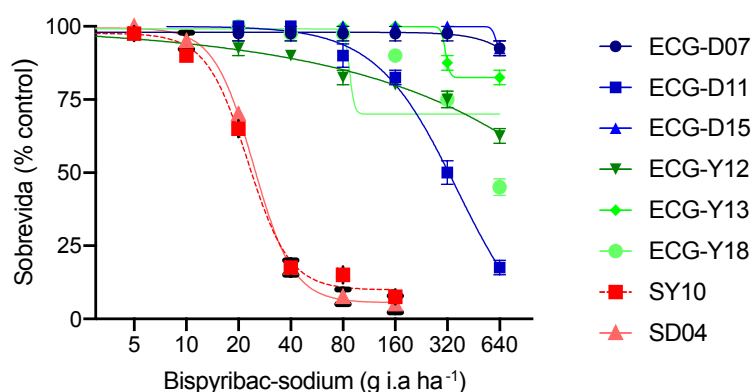
La relación entre las dosis crecientes de Bs y las plantas sobrevivientes a la pulverización permitió determinar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), el cual reveló que la *sobrevivencia* de las poblaciones susceptibles estaba condicionada a la dosis, siendo necesaria sólo la mitad de la dosis comercial para generar el 50% de control. En este sentido, las poblaciones susceptibles SY10 y SD04 evidenciaron una  $DL_{50} = 22,65$  y  $24,43$  g (i.a)  $ha^{-1}$  de Bs, respectivamente. Por el contrario, las seis poblaciones resistentes evidenciaron muy baja mortalidad, tal como ECG-D11 que obtuvo una  $DL_{50}$  de  $364,30$  g i.a.  $ha^{-1}$  y mostró un  $IR = 16,08$  para la accesión SY10 y  $14,91$  para SD04. Para las restantes cinco poblaciones resistentes analizadas (ECG-D07, ECG-D15, ECG-Y12 y ECG-Y13, ECG-Y18), no fue posible ajustar su IR en el rango de dosis evaluadas en este bioensayo, ya que no se logró calcular la  $DL_{50}$ , es decir, a la máxima dosis de Bs no se llegó a disminuir la sobrevivencia por debajo del 50%; por lo tanto, dichas poblaciones mantienen un IR superior a la dosis máxima evaluada (SDME). En este caso, estas accesiones mantienen un  $IR > 28,25$  y  $26,19$ . (Tabla 12 y Figura 9).

**Tabla 12.** Parámetros del modelo de regresión no lineal para explicar el efecto de la dosis de bispyribac-sodium sobre la *sobrevida* de cada población. Se presentan los valores de probabilidad ( $P$ ) para la precisión del modelo e índice de resistencia estimado (IR). El modelo ajustado fue:

$$\text{Sobrevida (\%)} = C + \{(D-C)/[1+(x/DL_{50})]^b\}$$

Condición	Población	D	C	B	DL <sub>50</sub> (g (i.a) h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	IR-SY10	IR-SD4
Resistente	ECG-D07	~ -1988	98,05	~ -3,006	~ 4601	0,84	SDME	SDME
Resistente	ECG-D11	-11,77	100,10	-1,86	364,30	1,00	16,08	14,91
Resistente	ECG-D15	96,25	100,00	~ -171,0	~ 220,3	0,42	SDME	SDME
Resistente	ECG-Y12	100,00	~ -29900	0,4363	~ 30277	0,99	SDME	SDME
Resistente	ECG-Y13	85,00	100,00	~ -379,9	~ 214,3	0,96	SDME	SDME
Resistente	ECG-Y18	-42,23	99,92	-1,56	860,80	1,00	SDME	SDME
Susceptible	SY10	97,67	9,91	3,62	22,65	1,00		
Susceptible	SD04	99,53	5,51	3,80	24,43	1,00		

SDME= superior a la dosis máxima evaluada; D= límite superior de la respuesta C= límite inferior de la respuesta b= pendiente de la curva x= dosis del herbicida (g (i.a) h<sup>-1</sup>) y DL<sub>50</sub>= dosis necesaria para obtener el 50% de plantas sobrevivientes.



**Figura 9.** Sobrevivencia de poblaciones resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15/Daule y ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18/ Yaguachi) y susceptibles (SY10 Y SD04) de *E. crus-galli* expuestas a dosis crecientes de bispyribac-sodium, evaluados a los 21 días después de la aplicación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media y su ausencia precisa error mínimo.

### 3.2.2 Efecto del herbicida Bs sobre la producción de biomasa aérea fresca (GR<sub>50</sub>).

En las comparaciones de las poblaciones en estudio, el *peso fresco* respondió a la pulverización de varias dosis ascendentes de Bs. Se evidenció que las poblaciones presumiblemente resistentes mostraron menor sensibilidad al herbicida, conllevando menor efecto sobre la variable descrita en relación a su control sin herbicida.

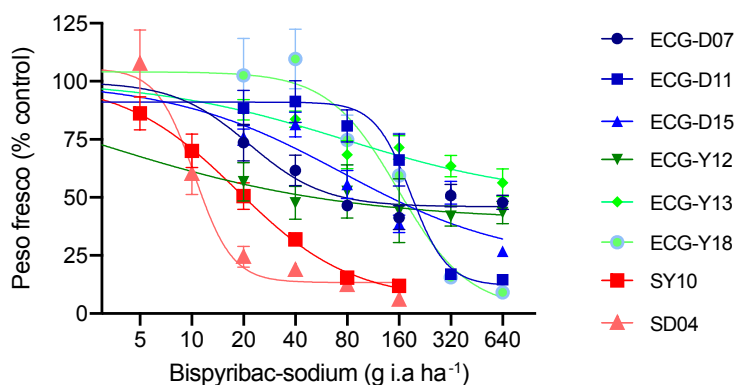
El índice de resistencia (IR) confirmó que fue necesario elevar la dosis sobre ECG-D11 hasta 18,05 y 10,16 veces para obtener un resultado similar a lo mostrado en las poblaciones susceptibles SD04 y SY10, correspondientemente. En el mismo sentido, sobre ECG-Y18 se debió incrementar la dosis 15,29 y 8,6 veces. Mientras que la

población ECG-Y12 respondió con una caída en la producción de biomasa aérea a las dosis de Bs  $\leq 40$  g i.a ha<sup>-1</sup>; sin embargo, la tendencia no se mantuvo a medida que se incrementó la dosis. Las accesiones ECG-D15 y ECG-Y13 muestran valores similares de IR de entre 4 y 7. Finalmente, ECG-D07 mostró un IR de 2 en relación a las poblaciones sensibles. Todas las accesiones seleccionadas como resistentes requirieron incrementar entre 2 y 18 veces la dosis de Bs para lograr el efecto obtenido por el herbicida en la producción de biomasa aérea de poblaciones susceptibles (Tabla 13 y Figura 10).

**Tabla 13.** Parámetros del modelo de regresión no lineal para la producción de *biomasa aérea* (peso fresco), probabilidad (*P*) para la precisión del modelo e índice de resistencia (IR) estimado sobre las poblaciones susceptibles SY10 y SD4.

Condición	Población	<i>D</i> (g)	<i>C</i> (g)	<i>B</i>	<i>GR</i> <sub>50</sub> (g i.a ha <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	IR SY10	IR SD4
Resistente	ECG-D07	99,78	45,98	1,992	21,61	0,97	1,17	2,08
Resistente	ECG-D11	91,05	12,02	4,169	187,4	0,98	10,16	18,05
Resistente	ECG-D15	99,75	21,85	0,8762	74,26	0,89	4,02	7,15
Resistente	ECG-Y12	100,0	40,02	0,6099	3,65	0,98	0,2	0,35
Resistente	ECG-Y13	100,2	49,91	0,7899	76,02	0,96	4,12	7,32
Resistente	ECG-Y18	100,9	104,1	-2,135	158,7	0,97	8,6	15,29
Susceptible	SY10	100,0	5,713	1,318	18,45	1,00	-	-
Susceptible	SD04	105,5	13,36	3,967	10,38	0,98	-	-

El modelo ajustado fue: Peso fresco (g) =  $C + \frac{D-C}{1 + (x/GR_{50})^b}$ . Donde *D* = límite superior de la respuesta *C* = límite inferior de la respuesta *b* = pendiente de la curva *x* = dosis del herbicida (g (i.a) h<sup>-1</sup>) y *GR*<sub>50</sub> = dosis necesaria para reducir el 50% del peso fresco de la población.



**Figura 10.** Dosis-respuesta de producción de *biomasa aérea* (peso fresco, % respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18) y susceptibles (SY10 Y SD04) a bispyribac-sodium, 21 días después de la aplicación (DDA). Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

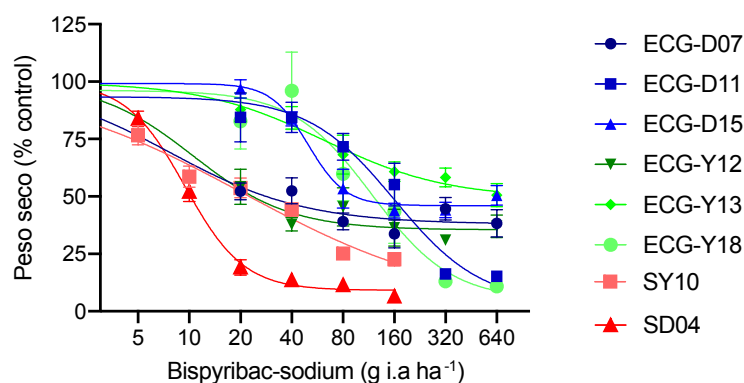
### 3.2.3 Efecto del herbicida Bs sobre la producción de biomasa aérea seca (GR<sub>50</sub>).

Se hallaron diferencias significativas entre poblaciones R y S en la sensibilidad a Bs determinando el *peso seco* (% respecto al control sin herbicida). En este sentido, SD04 presenta el DL<sub>50</sub> más bajos entre las poblaciones S. Las poblaciones con el IR más elevado para esta variable fueron de ECG-D11 y ECG-Y18 que mostraron poseer sensibilidad diferencial y por ende mayor acumulación de materia seca, con un IR de: 7,64 – 17,05 y 5,65 – 12,60 veces superior al de las poblaciones SY10 y SD04. Así mismo, en un rango intermedio se encuentran las ECG-D115 y ECG-Y13 con un IR de entre 3 a 6. Mientras que, poblaciones como ECG-D07 Y ECG-Y12 presentaron los valores bajos del IR. Estos resultados guardan relación con lo hallado en la evaluación de biomasa aérea mediante el peso fresco (Tabla 14 y Figura 11).

**Tabla 14.** Parámetros del modelo de regresión no lineal para la producción de biomasa aérea en *peso seco*, probabilidad (*P*) para la precisión del modelo e índice de resistencia estimado (IR).

Condición	Población	D (g)	C (g)	B	GR <sub>50</sub> (g (i.a) h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	IR-SY10	IR-SD04
Resistente	ECG-D07	99,96	37,88	1,1	7,79	0,96	0,37	0,83
Resistente	ECG-D11	93,43	3,44	1,71	160,8	0,97	7,64	17,05
Resistente	ECG-D15	99,13	46,01	3,97	49,91	0,99	2,37	5,29
Resistente	ECG-Y12	100,0	35,45	1,53	10,51	0,97	0,49	1,11
Resistente	ECG-Y13	99,82	49,23	1,2	61,58	0,98	2,92	6,53
Resistente	ECG-Y18	96,17	5,05	1,86	118,8	0,96	5,65	12,59
Susceptible	SY10	100,1	2,21	0,7	21,04	0,98		
Susceptible	SD04	99,73	9,14	2,51	9,43	1		

El modelo ajustado fue:  $\text{Peso seco (g)} = C + \{(D-C)/[1+(x/GR_{50})]^b\}$ . Donde *D*= límite superior de la respuesta *C*= límite inferior de la respuesta *b*= pendiente de la curva *x*= dosis del herbicida (g (i.a) h<sup>-1</sup>) y *GR*<sub>50</sub>= dosis necesaria para reducir el 50% del peso fresco de la población.



**Figura 11.** Dosis-respuesta de producción de biomasa aérea (peso seco, % respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18) y susceptibles (SY10 Y SD04) a bispyribac-sodium, 21 días después de la aplicación (DDA). Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

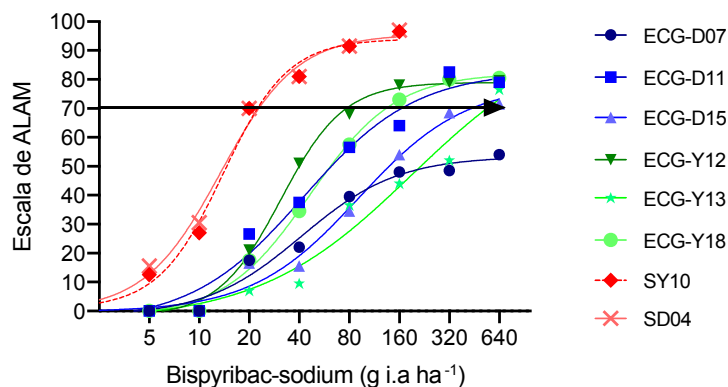
### 3.2.4 Efecto de diversas dosis del herbicida sobre el control y la fitotoxicidad de *E. crus-galli*.

Según control visual determinado a los 14 días después de la aplicación de las diversas dosis evaluadas mediante la utilización de la escala de ALAM, hubo diferencias explicadas por la interacción *población x dosis* (Tabla 15). En este sentido, fue evidente el efecto del herbicida en las dosis crecientes en las accesiones seleccionadas como susceptibles SD04 y SY10. Siendo así, las dosis de Bs de 21,7 y 22,3 g i.a ha<sup>-1</sup>, fueron suficiente para generar el 71% de control (valor determinado como *Bueno* mediante la escala descrita) (Anexo 7). Cuando la aplicación fue a la tasa comercial del herbicida, el control sobre poblaciones susceptibles superó el 89% (Muy Bueno), con un comportamiento similar en ambas poblaciones. En ese sentido, los valores más altos registrados en la escala coincidieron cuando las accesiones S fueron expuestas al tratamiento de la dosis más alta (160 g i.a. ha<sup>-1</sup>) obteniendo un control del 96,5% y 97% sobre la escala (el más alto entre las 8 poblaciones evaluadas). Mientras que sobre las accesiones con sensibilidad diferencial ECG-Y18 y ECG-D11, un control bueno se logró utilizando entre 4 y 5 veces la tasa comercial, siendo así 144,35 y 181,24 g. i.a ha<sup>-1</sup>. Su respuesta a la dosis más alta evaluada determinó un nivel de control de entre 80,5 y 82,5% para ECG-Y18 y ECG-D11, respectivamente. Para las poblaciones restantes ni el empleo de las dosis más altas determinó un control efectivo (Figura 12).

**Tabla 15.** Parámetros del modelo de regresión no lineal de respuesta de *fitotoxicidad* (%) según la dosis de bispyribac-sodium, considerando la escala de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM). Se presenta la probabilidad (*P*) para la precisión del modelo e índice de resistencia (IR) estimado sobre dos poblaciones susceptibles (SY10 y SD4).

Condición	Población	D (%)	C (%)	B	$I_{50}$ (g i.a. h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	IR-SY10	IR-SD4
Resistente	ECG-D07	-1,594	53,33	1,514	41,32	0,98	2,96	3,05
Resistente	ECG-D11	-3,398	82,47	1,324	42,67	0,98	3,06	3,15
Resistente	ECG-D15	-0,263	78,37	1,362	91,19	0,99	6,54	6,73
Resistente	ECG-Y12	-1,847	78,99	2,298	31,02	1	2,22	2,29
Resistente	ECG-Y13	-2,741	94,30	0,9872	178,3	0,97	12,78	13,17
Resistente	ECG-Y18	-1,799	82,12	1,691	46,42	1	3,33	3,43
Susceptible	SY10	1,008	94,02	2,231	13,95	0,99		
Susceptible	SD04	0,672	95,55	1,914	13,54	0,99		

Efecto fitotóxico; escala de ALAM evaluado de (0%-100 %) cuando 0 es efecto nulo y 100 es muerte total de la planta. El modelo ajustado fue: fitotoxicidad (%) =  $C + \frac{D-C}{1+(x/I_{50})^b}$ . Donde. *D*= límite inferior de la respuesta *C*= límite superior de la respuesta *b*= ascendente de la curva *x*= dosis del herbicida (g (i.a) h<sup>-1</sup>) y *I*<sub>50</sub>= dosis necesaria para producir el 50% de control.



**Figura 12.** Determinación visual del efecto del herbicida según valores de la Escala de ALAM de poblaciones resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18) y susceptibles (SY10 Y SD04) evaluados a dosis creciente del herbicida Bs a los 14 días después de la aplicación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media. La línea horizontal negra muestra la dosis efectiva para lograr el 70% del control, catalogado como (bueno) en la escala.

### 3.2.5 Efectos del herbicida Bs sobre la altura de planta.

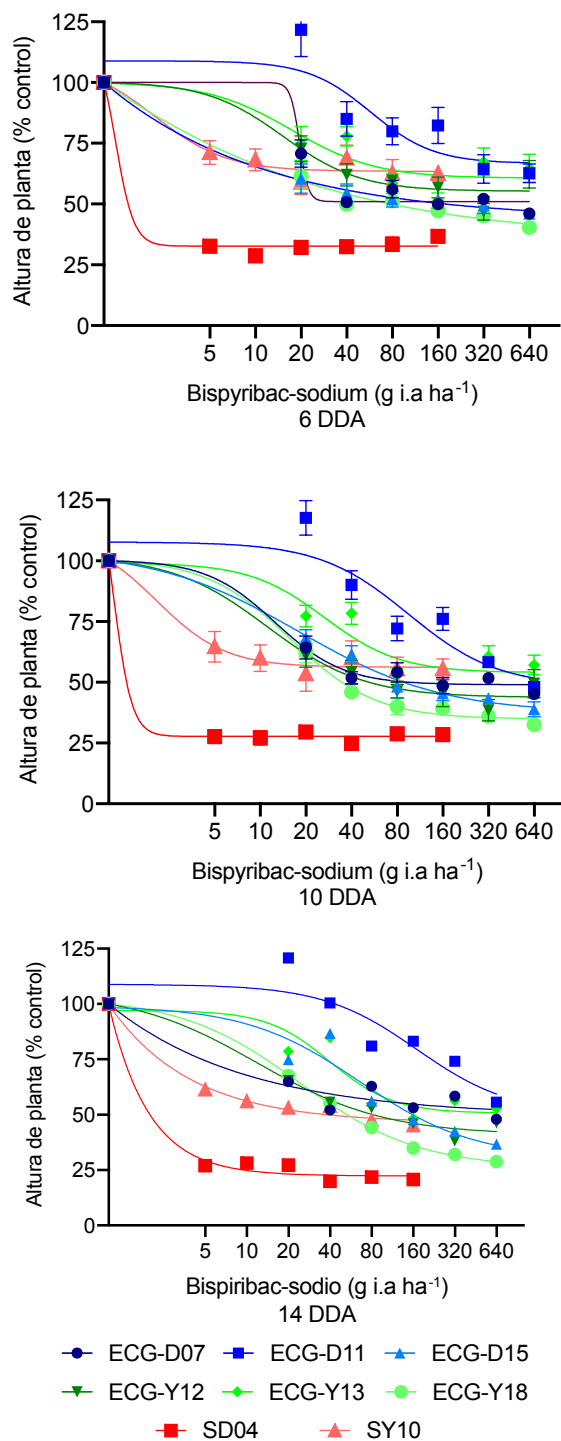
Se determinó que en la variable *altura de planta* (% respecto al control sin herbicida) existieron diferencias altamente significativas tanto en las poblaciones R como en S. Los efectos estuvieron condicionados por las dosis de aplicación de Bs y sus evaluaciones posteriores al tratamiento. Los valores obtenidos de SY10 evidenciaron diferencias altamente significativas en su condición de S frente a algunas poblaciones R y SD04 (Figura 13, Tabla 16). La población SD04 mostró diferencias significativas frente a las poblaciones R evidenciando mayor efecto sobre la altura; en este sentido, al momento de ser expuestas a la dosis mínima evaluada, perdió sobre el 70% de altura. Asimismo, las poblaciones R, evidencian efecto negativo en el crecimiento según la dosis creciente aplicada, además de la interacción con los *días pos aplicación* 6, 10 y 14 (Figura 14 y 16). Una dosis menor a la mínima evaluada hubiese sido suficiente para reducir el 50% de la altura de planta ( $I_{50}$ ) de SD04. Mientras que, para ECG-D07 y SY10 ni la dosis más alta pudo lograr disminuir considerablemente su altura. (Tabla 16).

**Tabla 16.** Parámetros del modelo de regresión no lineal para explicar el efecto de la dosis de bispyribac-sodium sobre la *altura de la planta (%)* de cada población 14 DDA. Se presentan los valores de probabilidad (*P*) para la precisión del modelo.

Condición	Población	<i>D</i> (g)	<i>C</i> (g)	<i>B</i>	<i>I</i> <sub>50</sub> (g (i.a) h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Resistente	ECG-D07	~ 3352	49,32	~ 0,4416	~ 8,072e-005	0,92
Resistente	ECG-D11	108,9	50,07	1,264	169,9	0,81
Resistente	ECG-D15	99,25	30,44	1,052	65,84	0,92
Resistente	ECG-Y12	105,7	40,92	0,9421	11,97	0,98
Resistente	ECG-Y13	97,1	50,7	1,896	39,95	0,87
Resistente	ECG-Y18	103,1	26,08	1,001	23,89	1
Susceptible	SY10	~ 62069	22,4	~ 1,503	~ 0,01172	0,99
Susceptible	SD04	~ 98691	46,29	~ 0,7337	~ 3,541e-005	0,99

El modelo ajustado fue:  $Altura\ de\ planta\ (\%) = C + \frac{(D-C)}{[1+(x/I_{50})^b]}$ . Donde. *D*= límite superior de la respuesta *C*= límite inferior de la respuesta *b*= pendiente de la curva *x*= dosis del herbicida (g (i.a) h<sup>-1</sup>) y *I*<sub>50</sub>= dosis necesaria para reducir el 50% del índice de clorofila. *NC*= No calculado (inferior/superior a la dosis mínima evaluada)

El análisis de la regresión evidenció que el mayor efecto del herbicida sobre todas las poblaciones fue generado a los 14 DDA. La accesión con la media más baja en relación a la altura de planta fue SD04 con 19,99% cuando fue expuesta a una dosis de 40 g (i.a) ha<sup>-1</sup>. En contraste, las que menor efecto negativo evidenciaron fueron: ECG-D11 con una media de 55,72% seguido de ECG-Y13 con 52,70% cuando fueron expuestas a la dosis más alta de Bs (640 g i.a. ha<sup>-1</sup>). Además, en ECG-D11 se evidenció el crecimiento superior al testigo cuando se la expuso a las dos dosis más bajas de 20 y 40 g i.a. ha<sup>-1</sup>, fenómeno conocido como hormesis, produciendo en este caso una estimulación del crecimiento, con el 100,49% y 120,84% a los 14 y 10 DDA sobre el valor del testigo sin herbicida (Figura 13).



**Figura 13.** Efecto de dosis crecientes de bispyribac-sodium sobre la *altura de planta* (% respecto al control sin herbicida) de poblaciones resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15/Daule y ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18/ Yaguachi) y susceptibles (SY10 Y SD04) evaluados a los 14 días después de la aplicación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media y su ausencia precisa error mínimo.



### 3.2.6 Efecto de Bs sobre el índice relativo de clorofila (IC)

Las dosis crecientes de Bs empleadas para evaluar el efecto sobre el *índice de clorofila* detectaron diferencias altamente significativas entre las poblaciones R y S, mostrando valores más bajos en las poblaciones S. Además, este efecto estuvo condicionado con los *días pos aplicación* 6, 10 y 14 (Figura 14). La evaluación final a los 14 DDA permitió determinar que una dosis inferior a la mínima evaluada (5 g i.a ha<sup>-1</sup>) hubiese sido suficiente para reducir el 50% del IC (*I*<sub>50</sub>) de las poblaciones susceptibles SD04, SY10 al igual que en las poblaciones R ECG-Y12 y ECG-Y18 (Tabla 17).

Se determinó diferencias significativas a los 6 DDA tanto en las poblaciones R como las S frente a sus controles. El efecto provocado por el herbicida en la disminución del IC se mantuvo de forma tendencial en las posteriores evaluaciones (10 y 14 DDA) siendo éste más agudo en las poblaciones S difiriendo significativamente de las R (Figura 14). No se evidenció diferencias significativas entre poblaciones S. La población con los valores más bajos obtenidos fue SY10 cuando estuvo expuesta a su dosis más alta (160 g i.a. ha<sup>-1</sup>), evidenciando una reducción progresiva del IC del 67,17%, 74,22% y 87,12% a los 6, 10 y 14 DDA respectivamente, frente a su control (Figuras 15 y 16).

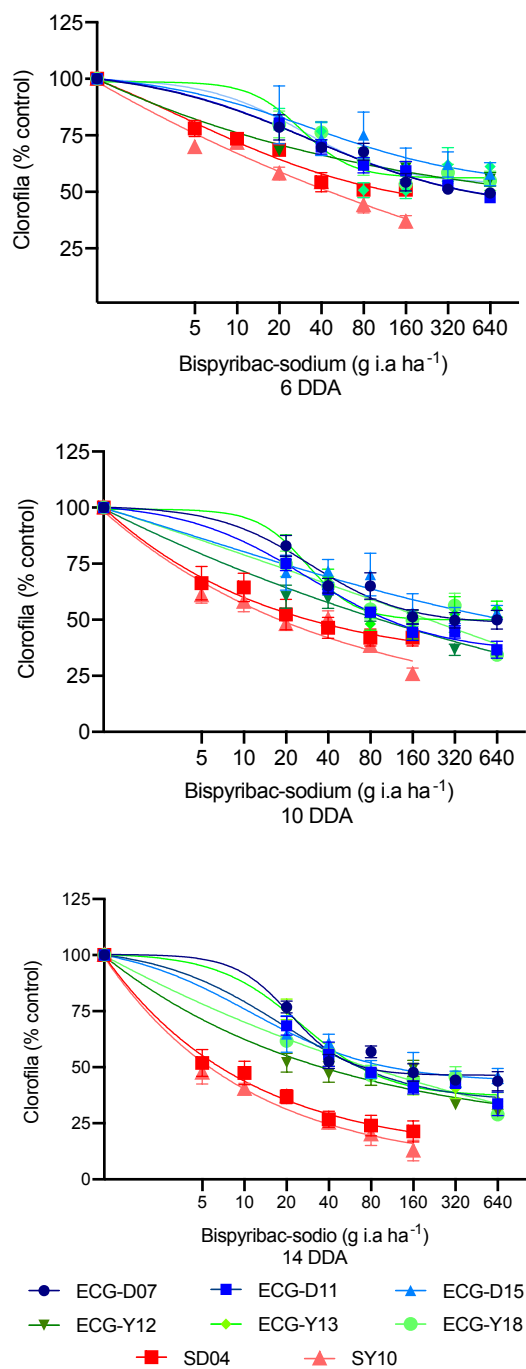
**Tabla 17.** Parámetros del modelo de regresión no lineal para explicar el efecto de la dosis de bispyribac-sodium sobre el *índice de clorofila* (%) de cada población 14 DDA. Se presentan los valores de probabilidad (*P*) para la precisión del modelo.

Condición	Población	<i>D</i> (g)	<i>C</i> (g)	<i>B</i>	<i>I</i> <sub>50</sub> (g (i.a) h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Resistente	ECG-D07	100,3	46,41	2,193	21,35	0,96
Resistente	ECG-D11	104	34,39	0,9677	18,42	0,99
Resistente	ECG-D15	106	43,52	0,9352	10,82	0,99
Resistente	ECG-Y12	~ 15471	19,99	~ 0,2740	~ 4,544e-009	0,95
Resistente	ECG-Y13	100,8	37,06	1,431	25,53	0,99
Resistente	ECG-Y18	1984	-17,44	0,1334	9,15E-10	NC
Susceptible	SY10	18826	11,15	0,4344	0,000004432	NC
Susceptible	SD4	43540	5,257	0,4288	6,08E-07	NC

El modelo ajustado fue: *Índice de clorofila* (%) =  $C + \frac{(D-C)}{[1+(x/I_{50})^p]}$ . Donde. *D*= límite superior de la respuesta *C*= límite inferior de la respuesta *b*= pendiente de la curva *x*= dosis del herbicida (g (i.a) h<sup>-1</sup>) y *I*<sub>50</sub>= dosis necesaria para reducir el 50% del índice de clorofila. NC= No calculado (inferior/superior a la dosis mínima evaluada)

La población ECG-D15 fue la población que menor disminución presentó con el 24,21% frente a su control, diferenciándose significativamente del resto de poblaciones. La tendencia de disminución del IC en las poblaciones R, a medida que se incrementó la dosis de Bs, fue proporcional y también visible (pero con menor efecto que las

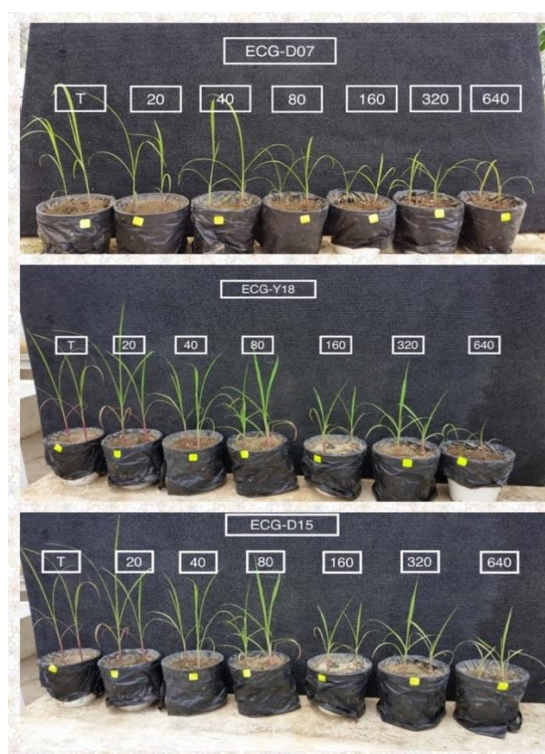
poblaciones S), mostrando diferencias significativas en las relaciones *Población x Dosis*. (Figura 16 y 17).



**Figura 14.** Efecto de dosis crecientes de bispyribac-sodium sobre el *índice relativo de clorofila* (%) de poblaciones resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15/Daule y ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18/Yaguachi) y susceptibles (SY10 Y SD04) evaluados a los 0, 6, 10 y 14 días después de la aplicación. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar de la media y su ausencia precisa error mínimo.



**Figura 15.** Respuesta de poblaciones de *E. crus-galli* cultivadas en invernadero. Aspecto a los 14 días después de la aplicación en accesiones susceptibles (SD04 - SY10), pulverizadas con dosis crecientes de bispyribac-sodium de 0, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 g i.a. ha<sup>-1</sup>.



**Figura 16.** Respuesta de poblaciones de *E. crus-galli* a dosis creciente de bispyribac-sodium, plantas cultivadas en invernadero, a los 14 días después de la aplicación en accesiones resistentes de Yaguachi (ECG-D07, ECG-Y18 y ECG-D15), pulverizadas con dosis de bispyribac-sodium de 0, 20, 40, 80, 160, 320 y 640 g i.a. ha<sup>-1</sup>.

### 3.2.7 Efecto sobre el fitness en poblaciones resistentes al herbicida Bs.

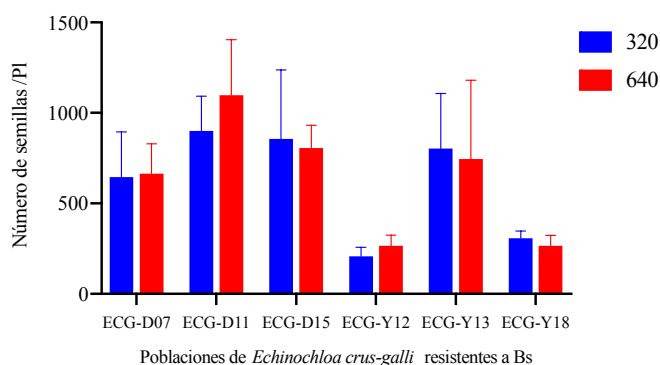
#### 3.2.7.1 Número de semillas producidas y su vialidad en biotipos de *E. crus-galli* resistentes tratadas con bispyribac-sodium.

Al comparar las poblaciones resistentes en estudio respecto al número de semillas generadas por las accesiones que sobrevivieron a los tratamientos de las dosis altas de Bs, encontramos diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los biotipos (Tabla 18). No se evidenciaron diferencias respecto al número de semillas generadas por planta en relación a las dosis. Las poblaciones con mayor número de semillas producidas fueron ECG-D11, ECG-D15, y ECG-Y13 difiriendo significativamente de ECG-D07, ECG-Y12 y ECG-Y18 (Figura 17).

**Tabla 18.** Análisis de varianza del número de semillas generadas de seis biotipos de *E. crus-galli* resistentes, provenientes de plantas expuestas a 320 y 640 g (i.a.) de bispyribac-sodium.

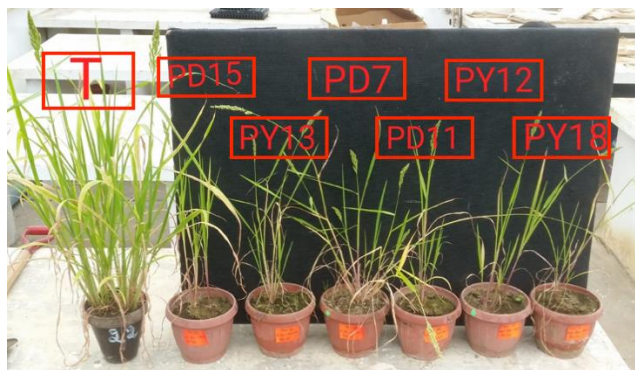
Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Población	5	8000017,9	8,08	<0,0001
Dosis	1	5860,8	0,06	0,808
Población*Dosis	5	5814,88	0,06	0,997
Error	48	99014,5		
Total	59			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F



**Figura 17.** Número de semillas producidas por planta de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes, expuestas a 320 y 640 g (i.a.) de bispyribac-sodium.

No se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones resistentes en cuanto al periodo vegetativo luego de sobrevivir a la sobredosis de Bs ( $P > 0,05$ ). Éste estuvo alrededor de los 95 días después del trasplante hasta la última recolección y conteo de semillas (Figura 18 y 19).



**Figura 18.** Respuesta de poblaciones de *E. crus-galli* a dosis creciente de bispyribac-sodium, plantas cultivadas en invernadero. Aspecto a los 85 días después de la aplicación en accesiones resistentes (ECG-D12, ECG-D13, ECG-18, ECG-D07, ECG-D11 y ECG-D15) pulverizadas a una dosis de Bs 320 y 640 g (i.a)  $h^{-1}$ , y un testigo sin aplicación de herbicida.



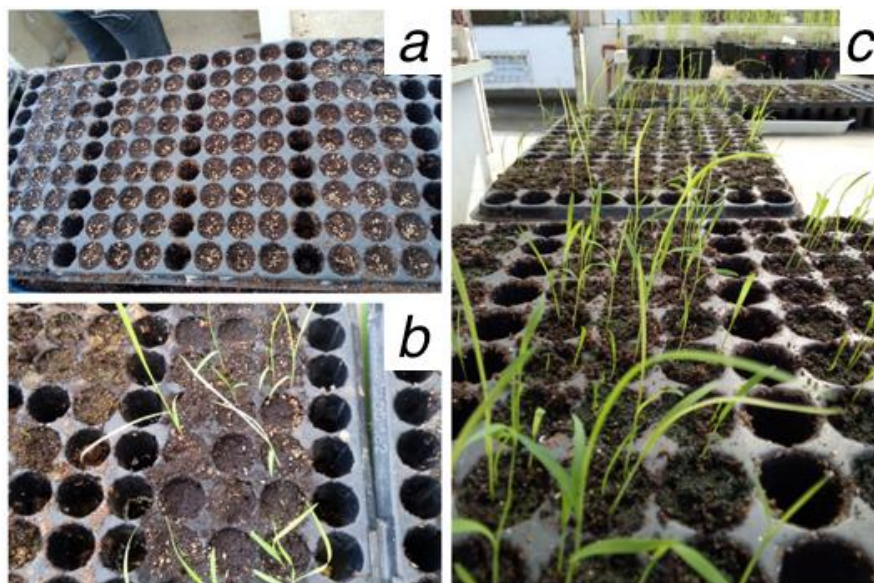
**Figura 19.** Panojas de plantas de una población de *E. crus-galli* resistente expuesta a 640 g (i.a) de bispyribac-sodium y control sin herbicida. Plantas cultivadas en época lluviosa luego de 85 días pos aplicación.

El porcentaje de emergencia entre los biotipos resistentes mostró efectos significativos según la población ( $P < 0,05$ ) (Tabla 19). En este sentido, las accesiones con menor porcentaje de germinación fueron ECG-Y18 y ECG-D11 con el 21,11 y 30% respectivamente, sin diferir significativamente entre ellas. Las accesiones que mejores resultados obtuvieron fueron ECG-D07 y ECG-D15 con valores cercanos al 60% (Figura 20).

**Tabla 19.** Análisis de varianza de la emergencia de semillas en bandejas de germinación de seis biotipos de *E. crus-galli* resistentes a bispyribac-sodium.

Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Poblaciones	5	767,27	6,9	0,003
Error	12	111,23		
Total	17			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F



**Figura 20.** Tasa de emergencia de seis biotipos *E. crus-galli* resistentes a bispyribac-sodium, semillas provenientes de plantas expuestas a 320 y 640 g (i.a) del herbicida. a) Siembra de poblaciones b) Porcentaje más bajo de emergencia ECG-Y18 c) biotipo con mejor emergencia ECG-D07.

### 3.3 Estudio de sinergismo de bispyribac-sodium con malation sobre poblaciones de *Echinochloa crus-galli*.

#### 3.3.1 Efectos sobre la producción de biomasa aérea fresca.

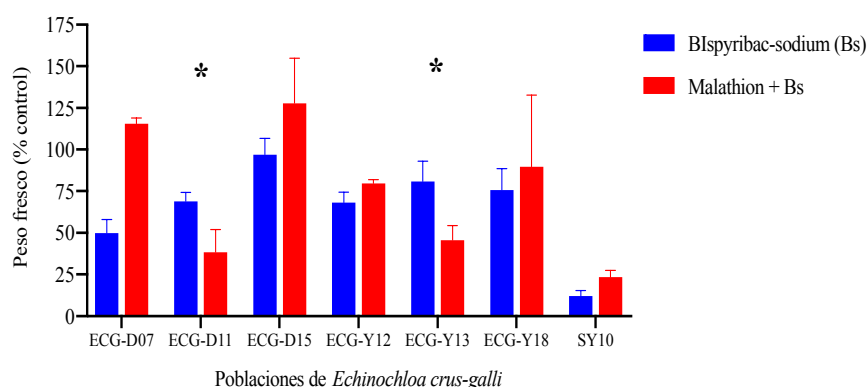
Las comparaciones entre los tratamientos en poblaciones de ECG resistentes, para determinar la sensibilidad a Bs a la tasa comercial, con plantas pretratadas con malation, evidenciaron que existió diferencias altamente significativas entre las poblaciones R (Tabla 20). Esta respuesta fue explicada por la interacción *Población x Tratamiento*. De las seis poblaciones resistentes evaluadas, dos (ECG-D11 y ECG-Y13) obtuvieron los promedios más bajos cuando fueron expuestas al tratamiento *malation + Bs* con un control de 61,6% y 54,5% en relación al control sin aplicación, respectivamente. El efecto de la disminución del peso seco en dichas poblaciones presentó la misma tendencia (64,63% y 61,37%). La población susceptible SY10, mostró diferencias entre

tratamientos, pero en ambos casos las pérdidas estuvieron alrededor del 90% de los pesos (Figura 22). Las poblaciones resistentes ECG-D07, ECG-D15, ECG-Y12 y ECG-Y18 mostraron un efecto antagónico al tratamiento *malation* + Bs al incrementar su peso hasta en el 45% como fue el caso de ECG-D07. De igual forma, ocurrió con las otras tres accesiones, siendo ECG-Y12 la de menor incremento de estas con el 16,97% sobre el tratamiento con Bs (Figura 21).

**Tabla 20.** Efecto sobre el *peso fresco* de la biomasa aérea de la planta (% respecto al control) de poblaciones de ECG susceptibles y resistentes; tratamientos (bispyribac-sodium y malation + bispyribac-sodium) y las interacciones.

Fuente de variación	GI	CM	F	p-valor
Población	6	6014,88	28,39	<0,0001
Tratamiento	1	1314,55	5,4	0,0251
Población*Tratamiento	6	2416,25	9,92	<0,0001
Error	42	243,54		
Total	55			

GI= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F



**Figura 21.** Producción de *biomasa aérea* (peso fresco, % respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a bispyribac-sodium (Bs) y malation + Bs. Se muestran los valores promedio respecto al testigo sin aplicación y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas en la disminución del peso ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos.

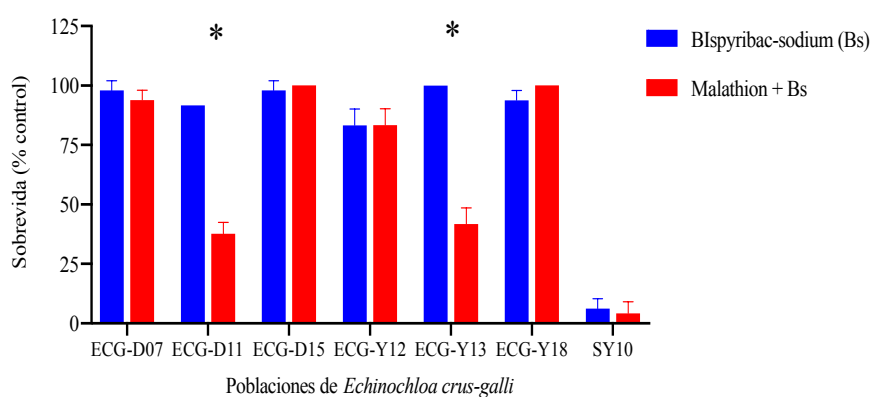
### 3.3.2 Efecto en la sobrevivencia de las plantas.

Todos los factores en estudio mostraron diferencias altamente significativas (Tabla 21). La población susceptible SY10 difiere significativamente de las resistentes independientemente del tratamiento. Las poblaciones resistentes ECG-D11 y ECG-Y13 son las que muestran valores más bajos en la supervivencia y difirieron significativamente con las restantes poblaciones R. En este sentido, el tratamiento *malation* + *Bs*, logró disminuir la sobrevivencia de ECG-D11 en un 62,5% y un 58,33% en la población ECG-Y13 respecto al tratamiento donde sólo se aplicó *Bs* que no se diferenció estadísticamente del control. Las restantes poblaciones R no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, manteniendo una sobrevivencia cercana al 100% (Figura 22 y Anexo 8)

**Tabla 21.** Análisis de varianza de poblaciones de *E. crus-galli* (susceptibles y resistente); dos tratamientos (bispyribac-sodium y malation + bispyribac-sodium) y las interacciones sobre la *sobrevivencia* (%).

Fuente de variación	GI	CM	F	p-valor
Población	6	8720,76	448,87	<0,0001
Tratamiento	1	3483,59	179,31	<0,0001
Población*Tratamiento	6	1553,44	79,96	<0,0001
Error	42	19,43		
Total	55			

GI= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba



**Figura 22.** Sobrevivencia (% respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a dos tratamientos (Bispyribac-sodium (Bs) y malation + Bs). Se muestran los valores promedios respecto al testigo sin aplicación y las barras representan  $\pm 1$  el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos.



### 3.3.3 Efecto sobre el índice relativo de clorofila (IC).

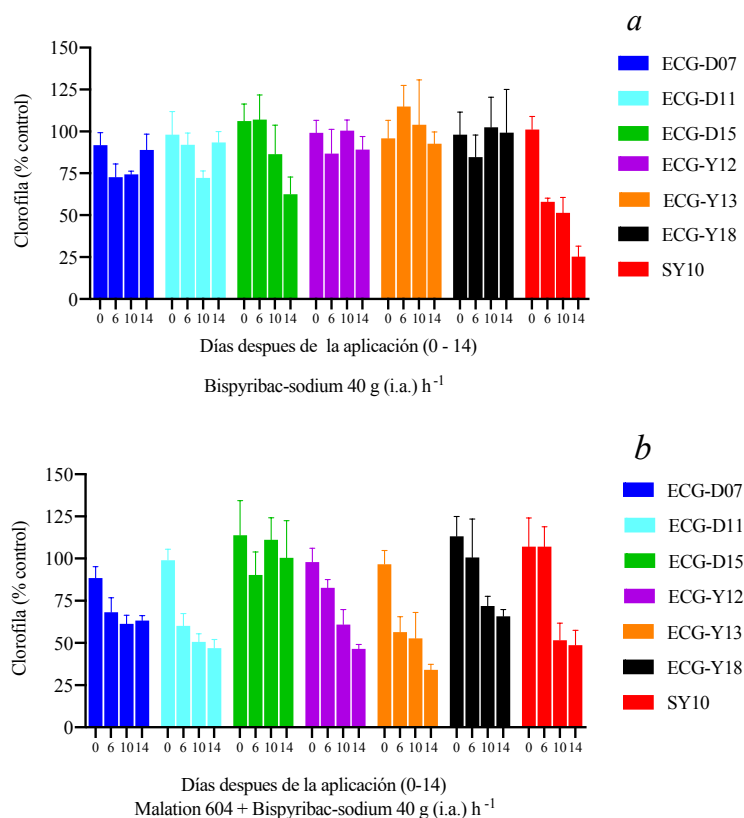
El ANOVA mostró significancia estadística en el efecto de la interacción triple entre las poblaciones (susceptible y resistente), los tratamientos (Bs y malation + Bs) y los días pos aplicación (0, 6, 10 y 14) (Tabla 22). Los valores registrados en la población susceptible SY10 y resistentes ECG-Y13, ECG-Y12 y ECG-D11 presentaron pérdidas que dependieron significativamente de los efectos de la interacción *Tratamiento x DDA*, cuyas diferencias fueron condicionadas al efecto del tratamiento *malation + Bs*. En este sentido, ECG-Y13 fue la población que presentó mayor pérdida con valores promedio del 40%, seguida de ECG-D11 con el 35%. (Anexo 9).

Todas las poblaciones indicaron un proceso de inhibición significativa por acción del tratamiento *malation + Bs* desde los 6 DDA, que posteriormente se mantuvo de forma tendencial hasta la última evaluación, las cuales registraron pérdidas IC cercanos al 50%. (Figura 23 y Anexo 10).

**Tabla 22.** Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de *E. crus-galli* (susceptible y resistentes), dos tratamientos (bispyribac-sodium y malation + bispyribac-sodium); el tiempo después de la aplicación (0, 6, 10, 14) y las interacciones sobre el contenido relativo de clorofila (%).

Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Población	6	3058,19	22,56	<0,0001
Tratamiento	1	6482,36	47,83	<0,0001
DDA	3	10800,88	79,69	<0,0001
Población*Tratamiento	6	3736,77	27,57	<0,0001
Población*DDA	18	667,4	4,92	<0,0001
Tratamiento*DDA	3	1799,8	13,28	<0,0001
Población*Tratamiento*DDA	18	907,52	6,7	<0,0001
Error	168	135,54		
Total	223			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba



**Figura 23.** Índice relativo de clorofila (% control) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a dos tratamientos *a*) Bispyribac-sodium (Bs) y *b*) malation + Bs tomados a 0, 6, 10 y 14 días después de la aplicación. Se muestran los valores promedio respecto al testigo sin aplicación de herbicida y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

### 3.3.4 Efecto sobre la altura de planta.

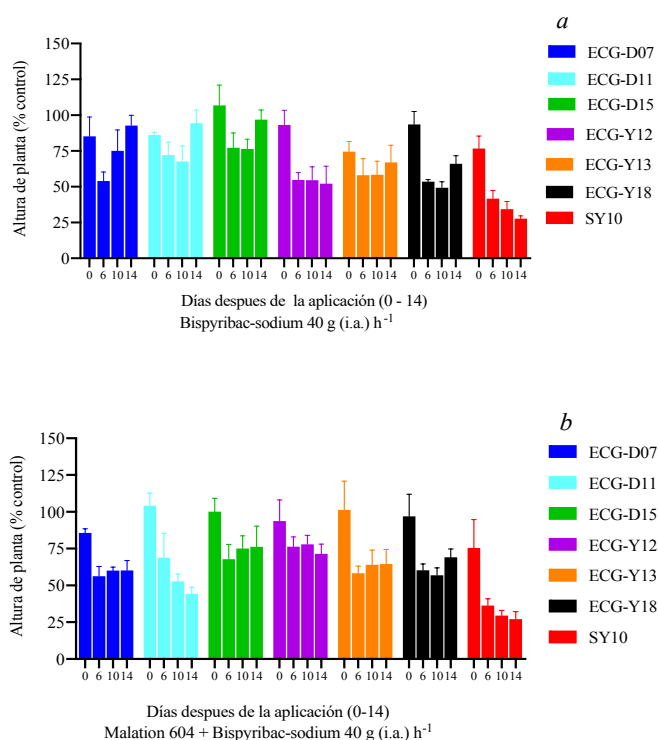
La evolución de la tasa de crecimiento fue visible 6 DDA del herbicida Bs y malation + Bs. En este momento, se evidenciaron las primeras diferencias en los registros entre las poblaciones resistentes y la susceptible frente a sus controles. El ANOVA muestra una alta significancia estadística ( $P < 0,01$ ) justificado por el efecto de la interacción triple entre las poblaciones (susceptible y resistente), los tratamientos (Bs y malation + Bs) y los días pos aplicación (0, 6, 10 y 14) (Tabla 23). Los valores registrados en la población susceptible SY10 difieren significativamente del resto independientemente del tratamiento. El efecto negativo sobre la altura en el tratamiento Bs se evidencia mayormente a los 10 DDA en las poblaciones R, teniendo un incremento en la tasa de altura a los 14 DDA en relación a la población SY10 (Figura 24a). En este sentido, se determinó que existe mayor efecto sobre la tasa de altura logrando inhibir entre un 35 y 45% la variable debido al efecto del tratamiento de

*malation + Bs*. Esta respuesta se mantuvo constante en las tres evaluaciones realizadas después de la aplicación (Figura 24b). El valor más bajo en las poblaciones R, que presentaron mayor efecto sobre la altura, lo obtuvo ECG-D11 ocurrido en el tratamiento *malation + Bs* con valores cercanos al 60% respecto al control (Figura 25).

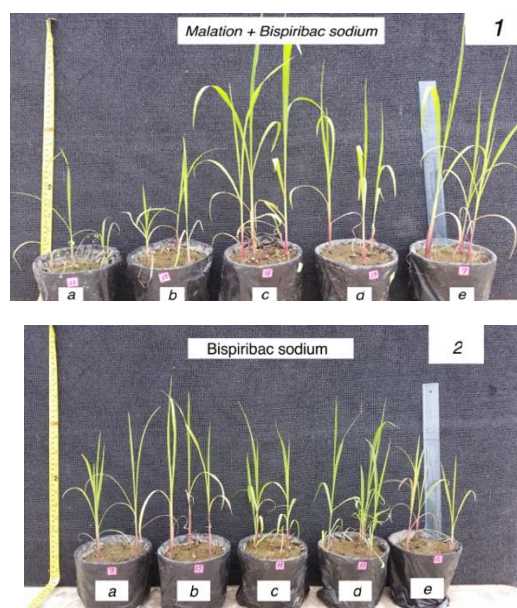
**Tabla 23.** Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de *E. crus-galli* (susceptible y resistentes); dos tratamientos (Bispyribac-sodium (Bs) y malation + Bs); el tiempo después de la aplicación (0, 6, 10, 14) y las interacciones sobre la altura de la planta (%).

Fuente de variación	GI	CM	F	p-valor
Población	6	4923,93	57	<0,0001
Tratamiento	1	65,48	0,76	0,3852
DDA	3	12603,24	145,9	<0,0001
Población*Tratamiento	6	960,85	11,12	<0,0001
Población*DDA	18	339,94	3,94	<0,0001
Tratamiento*DDA	3	830,34	9,61	<0,0001
Población*Tratamiento*DDA	18	341,66	3,96	<0,0001
Error	168	86,38		
Total	223			

GI= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba



**Figura 24.** Altura de planta (% respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a dos tratamientos (Bispyribac-sodium (Bs) y malation + Bs). Se muestran los valores promedio respecto al testigo sin aplicación y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media.



**Figura 25.** Efectos de 1) malation + bispyribac-sodium y 2) bispyribac-sodium sobre la altura de planta de poblaciones resistentes a bispyribac-sodium a) ECG-D11, b) ECG-Y 12, c) ECG-Y18, d) ECG-D 15 y e) ECG-D0 7 a los 20 días pos aplicación.

### 3.4 Ensayo de resistencia cruzada y múltiple de poblaciones de *E. crus-galli*.

#### 3.4.1 Sensibilidad a los herbicidas penoxsulam y cyhalofop butyl éster: Efecto en el peso fresco de la biomasa aérea.

El ANOVA mostró diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre la producción de *biomasa aérea* de las poblaciones y los tratamientos de herbicidas a los 21 días después de la aplicación (Tabla 24). El tratamiento con mayor efecto sobre las poblaciones fue el herbicida inhibidor de la enzima ACCasa cyhalofop butyl con el 53,59% de reducción del peso fresco. Mientras que, el inhibidor de ALS, penoxsulam logró inhibir el 31,61% respecto a los controles sin herbicidas. La población que mostró un elevado efecto inhibitorio en la producción de biomasa aérea fue SY10 cuando se sometió al tratamiento con penoxsulam, con el 93,01% de disminución. En el mismo sentido, ECG-D07 en respuesta a ambos tratamientos de herbicidas presentó un comportamiento de similar tendencia y diferente magnitud, con pérdidas del 45%. Las poblaciones ECG-Y12 y ECG-Y13 presentaron disminución del peso de 30% y 35%. Las demás poblaciones ECG-D11, ECG-D15 y ECG-Y18 no mostraron diferencias

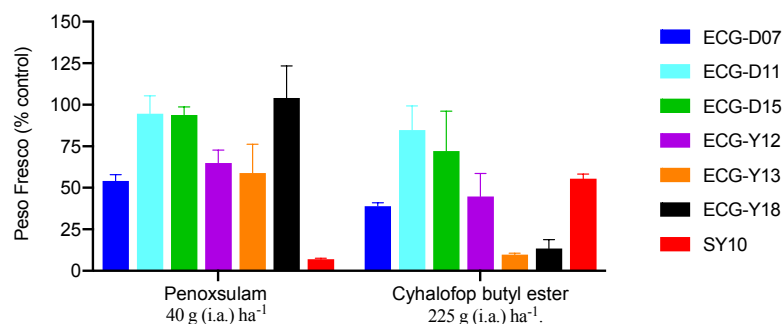
mayores al 5% respecto al control en el tratamiento con penoxsulam (Figura 26 y Anexo 4).

En las poblaciones de Yaguachi ECG-D13, ECG-Y18 cuando fueron expuestas al tratamiento cyhalofop butyl, se encontró la mayor inhibición de producción de biomasa aérea, asociado a pérdidas del 90,07 y 86,41 %, respectivamente. En sentido contrario se evidenció que ECG-D15 y ECG-D11 mostraron la menor sensibilidad al herbicida mencionado (Figura 26).

**Tabla 24.** Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de *E. crus-galli* (susceptible y resistentes), dos tratamientos (cyhalofop butyl y penoxsulam) y las interacciones sobre el peso fresco de biomasa aérea respecto a su testigo sin aplicación de herbicida (%).

Fuente de variación	GI	CM	F	p-valor
Población	6	4002,22	33,84	<0,0001
Tratamiento	1	6763,25	57,18	<0,0001
Población*Tratamiento	6	3572,62	0,21	<0,0001
Error	42	118,28		
Total	55			

GI= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F



**Figura 26.** Producción relativa de biomasa aérea (peso fresco, % respecto al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a cyhalofop butyl y penoxsulam. Se muestran los valores promedio y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

### 3.4.2 Sensibilidad a los herbicidas penoxsulam y cyhalofop butyl: Efecto en la sobrevivencia.

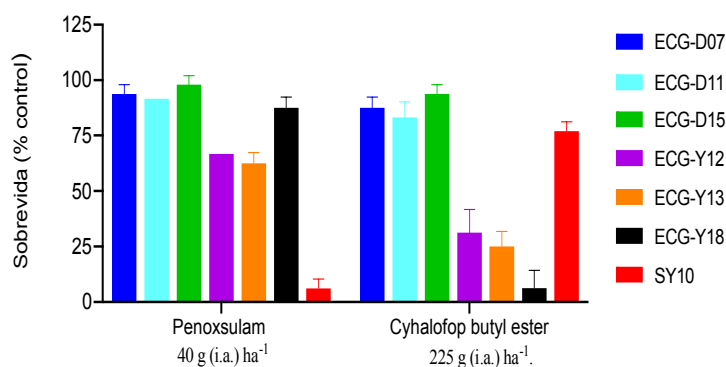
El ANOVA explica que la sobrevivencia de las poblaciones fue condicionada por la existencia de una interacción doble *población x tratamiento* altamente significativa ( $P < 0,001$ ) (Tabla 25). En este sentido, el tratamiento cyhalofop butyl fue

determinante para producir una elevada mortalidad de las poblaciones resistentes a Bs de Yaguachi ECG-Y18, ECG-Y13 y ECG-Y12 las cuales presentaron los valores más bajos de sobrevivencia de entre 6,25%, 25,00% y 31,25%, respectivamente. Diferente comportamiento presentaron las accesiones de Daule ECG-D15, ECG-D07 y ECG-D11 que mostraron menor efecto en ambos tratamientos (cyhalofop y penoxsulam), con una sobrevivencia de entre 83,33% y 97,92% respectivamente. Por lo tanto, estos resultados definen a ECG-Y18 como la población resistente tanto a Bs como a penoxsulam pero sensible a cyhalofop butyl. Mientras que, la accesión susceptible SY10 obtuvo una mortalidad del 93,75% con penoxsulam, y un deficiente control con cyhalofop del 22,92% (Figura 27).

**Tabla 25.** Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de *E. crus-galli* (susceptible y resistentes), dos tratamientos (cyhalofop butyl y penoxsulam) y las interacciones sobre la *sobrevivencia* (%) respecto a su testigo sin aplicación de herbicida.

Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Población	6	4927,58	163,29	<0,0001
Tratamiento	1	2977,82	98,68	<0,0001
Población*Tratamiento	6	4305,68	142,68	<0,0001
Error	42	30,18		
Total	55			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F



**Figura 27.** Sobrevivencia (%) en relación al control sin aplicación de herbicida de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a cyhalofop butyl y penoxsulam. Se muestran los valores promedio y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

### 3.4.3 Efectos de penoxsulam y cyhalofop butyl sobre el índice relativo de clorofila (IC)

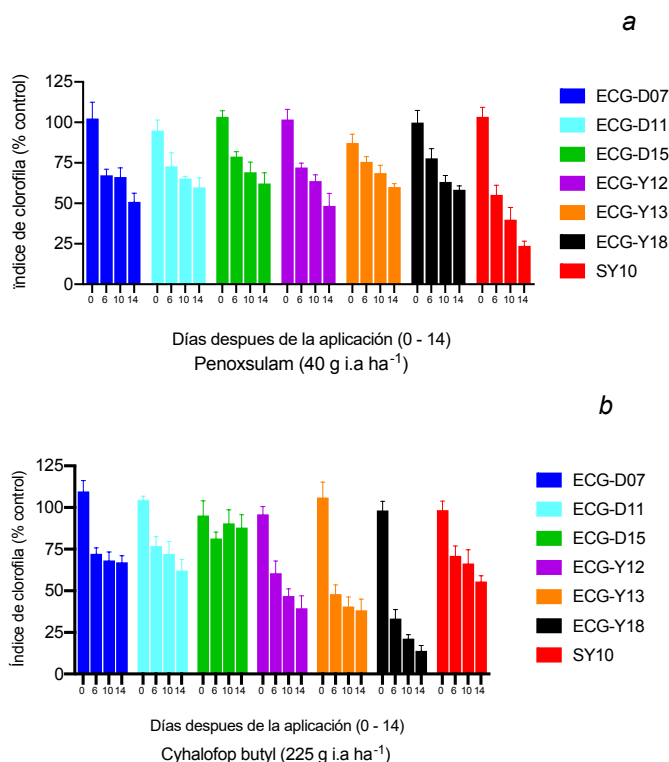
El ANOVA reveló la disminución progresiva del IC en todas las poblaciones sin diferir entre tratamientos ( $P > 0,05$ ) (Tabla 26). Se muestran diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ) iniciadas a los 6 DDA de realizadas las aplicaciones entre los biotipos resistentes y sus controles sin herbicida, que es explicada por la interacción doble *Población x DDA* (Figura 28). Posteriormente, en los días 10 y 14 DDA se acentúa la tendencia del decrecimiento del contenido de clorofila en las poblaciones de Yaguachi ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18 cuando fueron expuestas en el tratamiento de cyhalofop butyl (Figura 28). En contraste, las poblaciones de Daule en las dos últimas evaluaciones no mostraron inhibición respecto a los valores obtenidos a los 6 DDA. En el caso del tratamiento con penoxsulam, la caída en el contenido de clorofila fue gradual siendo el de mayor valor a los 14 DDA.

**Tabla 26.** Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de *E. crus-galli* (susceptible y resistentes), dos tratamientos (cyhalofop butyl y penoxsulam) y las interacciones sobre el *índice relativo de clorofila* (%), respecto a su testigo sin aplicación de herbicida), evaluadas a los (0, 6, 10 y 14) días después de la aplicación (DDA).

Fuente de variación	Gl	CM	F	p-valor
Población	6	1200,21	14,01	<0,0001
Tratamiento	1	5,54	0,06	0,7996
DDA	3	19242,98	224,64	<0,0001
Población*Tratamiento	6	796,82	9,3	<0,0001
Población*DDA	18	493,18	5,76	<0,0001
Tratamiento*DDA	3	84,57	0,99	0,4002
Población*Tratamiento*DDA	18	114,17	1,33	0,1731
Error	168	85,66		
Total	223			

Gl= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F

En este sentido, las pérdidas se determinaron en las accesiones resistentes con un 50% menos de pigmento y en la susceptible el 72,37% respecto a sus testigos sin herbicida. Los biotipos ECG-D07 y ECG-D15 mostraron mayor sensibilidad en la primera toma a los 6 DDA, pero esta no resultó una tendencia decreciente, contrario a esto se mantuvo con un nivel del 25% inferior al control (Figura 28).



**Figura 28.** Índice relativo de clorofila (% relativo al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* resistentes (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15, ECG-Y12, ECG-Y13 y ECG-Y18) y susceptible (SY10) sometidas a dos tratamientos a) Cyhalofop butyl y b) Penoxsulam; evaluadas a los 0, 6, 10 y 14 días después de la aplicación. Se muestran los valores promedio y las barras representan  $\pm 1$  error estándar de la media.

### 3.4.4 Efecto de penoxsulam y cyhalofop butyl sobre la altura de planta.

A partir del ANOVA se detectaron interacciones triples de significancia estadística ( $P < 0,05$ ). Las poblaciones interactuaron con el tratamiento a medida que transcurrió el tiempo al que fueron expuestas a los herbicidas mostrando diferencias en la disminución en el tamaño de las plantas en relación a sus controles (Tabla 27, Figura 29). Luego de realizadas las aplicaciones se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) que variaron en los días después de la aplicación generando las medias más bajas a los seis días en ambos tratamientos.

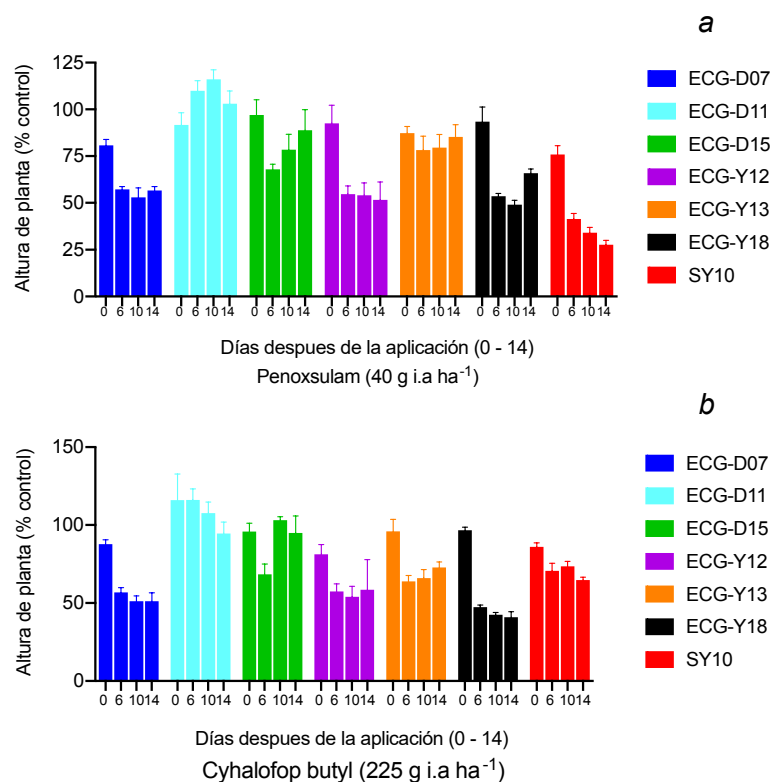
La población susceptible SY10 presentó una tendencia marcada de disminución de altura en relación al tiempo frente a su control. Por otra parte, los efectos reflejados en alturas superiores al control se hallaron en las poblaciones resistentes ECG-D11 con el 127,2% y 109,68 con los tratamientos penoxsulam y cyhalofop correspondientemente, seguido de ECG-D15 con valores cercanos al 90% respecto a sus controles sin aplicación de herbicidas (Figura 30).



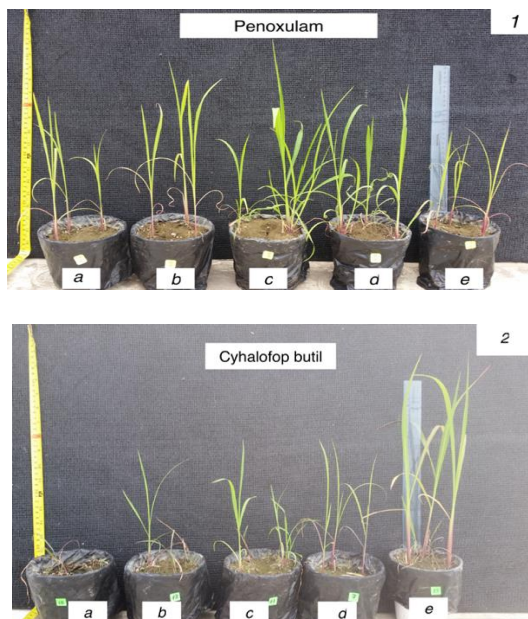
**Tabla 27.** Análisis de varianza de los efectos de las poblaciones de *E. crus-galli* (susceptible y resistentes), dos tratamientos (cyhalofop butyl y penoxsulam) y las interacciones sobre la *altura de planta* (% respecto al control sin herbicida), evaluadas a los 0, 6, 10 y 14 días después de la aplicación.

Fuente de variación	GI	CM	F	p-valor
Población	6	14429,94	26,69	<0,0001
Tratamiento	1	30,14	0,06	0,8136
DDA	3	7292,17	13,49	<0,0001
Población*Tratamiento	6	2224,85	4,12	0,0007
Población*DDA	18	1173,65	2,17	0,0056
Tratamiento*DDA	3	1046,69	1,94	0,1257
Población*Tratamiento*DDA	18	1091,44	2,02	0,0112
Error	168	540,63		
Total	223			

GI= grados de libertad; CM= cuadrado medio; P=Valor de la probabilidad de la prueba F



**Figura 29.** Altura de la planta (% , relativa al control sin herbicida) de poblaciones de *E. crus-galli* tomados a los 0, 6, 10, 14 días después de la aplicación de a) Cyhalofop butyl b) Penoxsulam.



**Figura 30.** *E. crus-galli* resistente a bispyribac-sodium, efecto a los 20 días pos aplicación sobre la altura de planta de los herbicidas 1) penoxsulam y 2) cyhalofop butyl, pulverizadas a la tasa recomendada por el fabricante sobre las poblaciones a) ECG-Y18, b) ECG-Y12 c) ECG-D11 d) ECG-D07 y e) ECG-D15 para comprobar posibles casos de resistencia cruzada y múltiple de dichos biotipos.

## **CAPÍTULO IV**

### **4 DISCUSIÓN**

En respuesta a los objetivos planteados en este trabajo, el desarrollo de cada uno de los bioensayos aportó información significativa al evidenciar la sensibilidad diferencial a los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintetasa (ALS) / Acetohidroxiácido sintetasa (AHAS), que manifiestan varias poblaciones de la maleza *Echinochloa crus-galli* (ECG) estudiadas en la provincia del Guayas, Ecuador.

En este sentido, el desarrollo de estos experimentos desde el screening mediante las accesiones tomadas al azar, las respuestas similares entre las repeticiones de cada población, confirman el alto grado de homogeneidad de las poblaciones al comparar la sensibilidad de los individuos de cada una de las accesiones evaluadas, lo que sugiere que la especie ha sido sometida a medidas de control altamente específicas. Esto concuerda con lo descrito por Neve et al. (2009), que considera que la heterogeneidad ambiental tanto de cultivos como malezas reduce la selección de genotipos resistentes.

La práctica del monocultivo de arroz que se ha desarrollado desde hace varias décadas en ciertas zonas del Ecuador, especialmente en la provincia del Guayas, el uso de herbicidas del mismo modo de acción y la falta de adopción de un manejo integrado de malezas, está relacionada con la baja sensibilidad de las poblaciones evaluadas.

En cuanto a las variables evaluadas, se evidencian comportamientos particulares, que puede atribuirse como resultado de algún proceso fisiológico complejo de descifrar y en algunos casos específicos de cada población resistente. El estudio de la variable altura de planta evidenció que a medida que se incrementaron las dosis de Bs el efecto sobre la variable era mayor. Un caso particular presentó la accesión ECG-D11, que en la dosis más baja evaluada ( $1/2x$ ) mostró una estimulación del crecimiento presentando valores superiores al de su tratamiento control, fenómeno que ha sido denominado como hormesis. Esto concuerda con varios trabajos, entre ellos el de Cedergreen y Olesen (2010), quienes describen a este fenómeno como el proceso por el cual la exposición a una dosis baja de un agente químico que es dañino a dosis altas, induce una respuesta adaptativa de estímulo y/o benéfico en la célula o el organismo, que podría tener como origen una serie de condiciones de mal manejo tales como: equipos mal calibrados, presencia de lluvia poco después de las aplicaciones de herbicidas o al no respetar la dosis de la etiqueta (Costa da Silva et al. 2016). De Moraes et al. (2020) también documentaron hormesis observando el incremento del peso de *Urochloa decumbens* cuando fuera expuesta a glifosato a una tasa  $1/64$  de la tasa comercial.

El efecto fitotóxico causado por el herbicida Bs sobre poblaciones S evidenció un control satisfactorio a dosis menores a la tasa comercial. En contraste, las poblaciones resistentes ECG-D07, ECG, D15 y ECG-Y13 mantuvieron una respuesta de control deficiente según la escala empleada. Los IR determinados para la variable fitotoxicidad concuerda con nuestra variable de mayor interés (la sobrevivencia), evaluada una semana después. Estos datos guardan relación con lo observado por Matzenbacher et al. (2013) cuando evaluaron daño visual en ECG generado por la aplicación de dosis ascendentes de herbicidas inhibidores de ALS determinado que las poblaciones S presentaron daños muy superiores a las observadas en las poblaciones R.

Las accesiones que mayor sobrevivencia presentan, inclusive en las dosis más altas evaluadas, fueron ECG-D07, ECG-D15, ECG-Y12 y ECG-Y13. Además, se observó menor efecto sobre fitotoxicidad y en las demás variables evaluadas. Dichas poblaciones se sospechan que su condición de resistencia estaría mediada por TSR. Esto características concuerda con lo observado por Panozzo et al. (2013), al evaluar la sobrevivencia y el peso de biomasa aérea de ECG luego de ser expuestas a varias dosis ascendentes de tratamientos con herbicidas inhibidores del ALS y ACCasa en la cual identificaron resistencia cruzada y múltiple mediada por TSR; además, los análisis moleculares arrojaron la primera secuencia de consenso informada para el gen ALS de ECG.

Los resultados obtenidos respecto al peso fresco y peso seco de la biomasa aérea, guardan relación entre sí, y reflejan una respuesta fisiológica particular de cada población luego de estar expuesto a la acción del herbicida. En este sentido, tres poblaciones (ECG-Y18, ECG-D11 y ECG-Y13), presentaron los valores más altos de IR (8 a 10). Este estudio concuerda con lo reportado en Irán y Turquía por Haghnama y Mennan (2020), cuando se evaluó el efecto de herbicidas inhibidores de la ALS sobre poblaciones de ECG, siendo Bs el que presentó el mayor índice de resistencia (IR=8) entre los herbicidas evaluados.

Riar et al. (2013) en poblaciones de ECG de Arkansas, determinaron que el cambio de aminoácido Ala-122-Asn en el gen ALS confirió resistencia no solo a imidazolinonas sino también a triazolopirimidinas en Bs confirmando así resistencia cruzada. En general, las mutaciones que confieren resistencia Ala-122 del gen ALS sugieren un patrón de resistencia que puede variar independientemente de la especie y el aminoácido. En el presente trabajo, las seis poblaciones evidenciaron una alta tasa de

sobrevivencia a Bs; y entre ellas ECG-D07, ECG-D15 y ECG-Y18 por las respuestas generadas en los bioanálisis evidencian resistencia cruzada a Bs y penoxsulam con una tasa de sobrevivencia mayor al 92%. Estos resultados concuerdan con diversos estudios en el que ECG logra sobrevivir a pulverizaciones de herbicidas de diversos modos de acción, entre ellos el descrito por Bonow et al. (2018) en el cual confirmaron que además de los herbicidas evaluados pertenecientes al grupo químico de imidazolinona, Bs ni penoxsulam fueron capaces de efectuar el control sobre estas poblaciones.

Posteriormente, se identificó que las poblaciones ECG-D07 y ECG-D15 presentan resistencia múltiple, mostrando una alta tasa de biomasa aérea y sobrevivencia en respuesta a Bs y penoxsulam (inhibidores del ALS) y a cyhalofop butyl (inhibidor de ACCasa). Resultados similares fueron obtenidos en un estudio realizado en Brasil por Eberhardt, et al. (2016), en el que mediante evaluaciones del control y de biomasa aérea determinaron la resistencia múltiple en varias poblaciones de ECG a herbicidas inhibidores de ALS y de ACCasa, además de auxina sintética. En este sentido, es evidente que cada caso de resistencia tiene necesidad de generar un estudio específico, por condiciones ambientales, antecedentes en campo y diversidad entre poblaciones.

Es conocido que la resistencia fuera del sitio objetivo (NTSR) es un mecanismo de resistencia generalista que ocurre independiente del tipo TSR, que puede conferir resistencia a un herbicida o resistencia cruzada. En el caso actual, como referimos anteriormente, las evidencias permiten sostener de manera preliminar que las poblaciones ECG-D11 y ECG-Y13 presentan este tipo resistencia basado en el sinergismo obtenido por la mezcla malation + Bs que involucra la acción del CYP en biotipos resistentes, disminuyendo la sobrevivencia de un 60% de dichas poblaciones y reduciendo 60% de biomasa área. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Bonow et al. (2020), quienes determinaron la reducción de entre el 31% al 40% de biomasa área de ECG cuando se empleó un inhibidor de CYP previo a la aplicación de un herbicida inhibidor de ALS, lo que sugiere que se trata un caso de la degradación metabólica mejorada del herbicida. Resulta imperioso explorar otras dosis de herbicidas y, diferentes inhibidores de CYP Yannicari et al. (2020) a fin de descartar este mecanismo de resistencia en las poblaciones donde no se halló sinergismo entre Bs y malation.

La mayoría de estudios se centran en determinar costos en el *fitness* asociado a TSR, siendo poco considerados los costos de resistencia fuera del sitio activo Yang, et al. (2017). En este estudio, mediante el análisis dosis-respuesta se conoce que estas poblaciones de ECG resistentes pueden sobrevivir a dosis elevadas de Bs y generar descendencia. En este sentido, al evaluar los costos de la resistencia generados por la accesión ECG-D11 la cual presentó el porcentaje más elevado de generación de semillas; aunque, en gran medida estas no resultaron viables al presentar la tasa más baja de emergencia de semillas entre las poblaciones R. De forma similar, se determinó que ECG-Y12 presenta la tasa de producción de semillas más baja dentro de las accesiones R. Estos datos concuerdan con lo observado por Panozzo et al. (2017) quien describe que los efectos pleiotrópicos sobre la aptitud de las plantas generan menor número de panículas (hasta un 40%) y en competencia pudieran ser insignificantes, en comparación con biotipos S. Por ello, sugiere, que mantener la densidad de infestación de biotipos R lo más baja posible, podría aumentar el éxito de reproducción de biotipos S y contribuir a reducción de alelos resistentes.

En términos generales, quedaría pendiente la corroboración de estas sospechas sobre el tipo de resistencia, y si bien las variables evaluadas como IC, fitotoxicidad, peso de biomasa aérea aportan al estudio y la caracterización de los biotipos, la variable sobrevivencia resulta contundente para la señalización de poblaciones resistentes.

## **CAPÍTULO VI**

### **5 CONCLUSIONES**



Varios estudios han demostrado que herbicidas inhibidores de ALS pulverizados a las tasas comercial tienen alta eficiencia en controlar poblaciones de *Echinochloa crus-galli* susceptibles. Sin embargo, se evidenció la baja efectividad de este grupo de herbicidas sobre poblaciones que ya poseen cierto grado de resistencia.

En esta investigación, las seis poblaciones seleccionadas como R, confirmaron ser resistentes al menos a un herbicida inhibidor de la ALS, y mediante los análisis ejecutados se logró evidenciar que estas poblaciones mantienen patrones de resistencia distintos: los dos primeros descritos a continuación podrían estar relacionados con la alteración con el sitio activo (TSR) y el tercero ajeno al sitio de acción (NTSR).

Las accesiones seleccionadas resistentes a Bs, tres por la zona Daule y una de Yaguachi (ECG-D07, ECG-D11, ECG-D15 y ECG-Y18), mostraron también un alto grado de resistencia al herbicida penoxsulam, confirmando resistencia cruzada, las restantes dos poblaciones muestran una resistencia intermedia o en proceso evolutivo de resistencia cruzada, con una sobrevivencia promedio del 65% evaluado a la tasa comercial. Los valores obtenidos en las otras variables como producción de biomasa (peso fresco y seco) guardan relación con la sobrevivencia. Los herbicidas inhibidores de la enzima ALS presentan variaciones en cuanto al nivel de resistencia cruzada esto puede deberse a la unión diferenciada de herbicida por sitio de acción y diferentes mutaciones que se presentan en el gen que codifica la enzima ALS.

En este sentido, nuevamente las poblaciones de Daule evidenciaron una alta tasa de sobrevivencia mayor al 90% al tratamiento de cyhalofop butyl, confirmando así resistencia múltiple tanto a inhibidores de ALS o de ACCasa. Mientras que, el mismo tratamiento logró controlar las poblaciones de la zona Yaguachi (ECG-Y12, ECG-Y13, ECG-Y18) que evidenciaron una mortalidad mayor al 80%.

Se demostró que las accesiones ECG-D11 y ECG-Y13 mantienen una resistencia NTSR, pues el efecto herbicida fue capaz de ser revertido por el uso de malation como inhibidor de CYP, lo que provocó que la sobrevivencia sobre dichas poblaciones disminuya considerablemente. Cada vez son mayores los casos de malezas que incrementan su capacidad metabólica para detoxificar los herbicidas. La importancia de este tipo de resistencia metabólica radica en que ocurre frente a diferentes herbicidas de diferente grupo químico o modos de acción, inclusive a herbicidas jamás empleados con anterioridad.

Este es el primer informe sobre poblaciones de malezas resistentes a herbicidas con resistencia a inhibidores de la ALS y ACCasa en el Ecuador. Los resultados expuestos en el *screening* dan pauta del estado evolutivo de la resistencia actual de las poblaciones de ECG en la provincia del Guayas. Los bioensayos posteriores, dosis respuesta, comprobación de resistencia cruzada, múltiple y posteriormente el de sinergismo, concordaron en la aceptación de la hipótesis del presente trabajo: Se confirma la existencia de poblaciones resistentes a herbicidas inhibidores de la enzima ALS en el país.

La casi nula rotación del cultivo de arroz en toda la zona arroceras de la provincia del Guayas y, la presencia ya imponente de la especie ECG con sensibilidad diferenciada en varios sectores como: Taura, Coop. Cristóbal Colón, La T de Salitre, Los Lojas y Daule inmersos en las localidades evaluadas, son las que presentan mayor avance evolutivo de resistencia tanto cruzada bispyribac-sodium (PTB) y penoxsulam (TP), como cyhalofop butyl (ACCasa), presentando los valores más altos de IR, lo expone la necesidad de adoptar planes de control urgente.

El ingreso y aplicación de nuevas alternativas de control es preciso, de lo contrario, las mermas por calidad de grano, el incremento de los costos de producción, la depreciación del valor de la tierra y la falta de una política de regulación de precios de la cosecha, vendría a desfavorecer aún más al sector. En este sentido, es considerable valorar que la emergencia de la maleza en las zonas arroceras del Guayas se presenta abundantemente a inicios de la temporada lluviosa (diciembre-febrero), y van siempre regulados por el incremento de temperatura, lo que podría permitir estudiar el comportamiento de la especie, de su abundancia y dispersión en lo posterior. Se sugiere una estrategia integrada de manejo de malezas a mediano y largo plazo, y en lo posible, el seguimiento geoespacial de la dispersión de genes de resistencia de ECG sobre las localidades de mayor conflicto, especialmente en zonas arroceras, en este sentido, se podría disminuir la velocidad evolutiva de la resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS o su impacto.

Queda pendiente obtener la secuencia del gen ALS de ECG y conocer las posibles sustituciones involucradas en los casos de resistencia descritos. Al momento, corresponde seguir analizando, caracterizando e identificando los biotipos y las zonas agroecológicas donde mayormente han ocurrido estos disturbios que han promovido y están generando resistencia de malezas en el cultivo de arroz, especialmente con ECG.

Teniendo en cuenta, que los reportes de observaciones en campo de la posible pérdida de sensibilidad de una maleza deben ser validados mediante el diagnóstico de la resistencia a través de ensayos convencionales o moleculares contundentes y con el rigor experimental adecuado.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALAM. 1974. Revista de la Asociación Latinoamericana de Malezas. Resumen del panel sobre métodos para la evaluación de ensayos en control de malezas en Latinoamérica. *II Congreso de ALAM*. Cali, Colombia. 12 p.
2. Anzalone, A. 2010. Detoxificación de herbicidas en plantas. En *Congreso de la Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas*. Barquisimeto, Venezuela (pp. 13-24).
3. Bagavathiannan, M. y Norsworthy, J. 2012. Producción de semillas a fines de temporada en comunidades de malezas cultivables: implicaciones de manejo. *Weed Science*, 60(3), 325-334. <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00222.1>
4. Baltazar, A. y Smith Jr, R. 1994. "Propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control in rice (*Oryza sativa*)," *Weed Technology*, 8(3), 576-581.
5. Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S. y Werck-Reichhart, D. 2011. Cytochromes p450. *The arabidopsis book*, 9, e0144. <https://doi.org/10.1199/tab.0144>
6. Bayer cropscience. Recomendaciones del fabricante. Producto Nominee® SC Bispiribac-sodium 400 g/L. Disponible: <https://www.cropscience.bayer.es/Productos/Herbicidas/Nominee>. En línea (lunes, 8 noviembre, 2021).
7. Beckie, H., Heap, I., Smeda, R. y Hall, L. 2000. Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology*, 14(2), 428-445.
8. Bond, J., Nandula, V., Bond, R. y Eubank T. 2011. Differences in herbicide response among barnyardgrass populations from Mississippi, in *Proceedings of the 51st- Weed Science of America Annual Meeting*, Portland, Ore, USA.
9. Bonilla, A. y Singaña, D. 2019. La productividad agrícola más allá del rendimiento por hectárea: Análisis de los cultivos de arroz y maíz duro en el Ecuador. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, 29(1), 70-83. <https://dx.doi.org/10.17163/lgr.n29.2019.06>
10. Bonow, J. F. L., Lamego, F. P., Andres, A., Avila, L. A., Teló, G. M. y Egewarth, K. 2018. Resistance of *Echinochloa crus-galli* var. mitis to imazapyr + imazapic herbicide and alternative control in irrigated rice. *Planta Daninha*, 36.

11. Bonow, J. F. L., Andres, A. y Lamego, F. P. 2020. *Echinochloa crus-galli* var. Mitis metabolism as resistance mechanism to imazapyr and imazapic. *Acta Agronómica*, 69(2), 117-123. <https://doi.org/10.15446/acag.v69n2.81305>
12. Bosnic, A. C. y Swanton, C. J. 1997. Influence of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) time of emergence and density on corn (*Zea mays*). *Weed Science*: 45, 276-282.
13. Briceño, I. y Álvarez, L. 2010. Evaluación de un sistema de preparación del suelo y siembra en el cultivo de arroz (*Oriza sativa* L). *Rev. Unelles de Ciencia y Tecnología*, 28: 16-24.
14. Carey, V. F., Hoagland, E. y Talbert, R. 1995. Verification and distribution of propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas. *Weed Technology*, 9:366–372. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0890037X00023496>
15. Cedergreen, N. y Olesen, C. 2010. Can glyphosate stimulate photosynthesis?. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3): 140–148.
16. Chen, S. y Phillips, S. M. 2006. Poaceae (Gramineae). In *Flora of China*, Vol. 22. Wu, Z., Raven, P. y Hong, D. (eds.), Science Press and Missouri Botanical Garden Press, Beijing and St. Louis. Pp. 515-518.
17. Clements, D., Weise, S. y Swanton, C. 1994. Integrated weed management and weed species diversity. *Phytoprotection*, 75:1–18. DOI <https://doi.org/10.7202/706048ar>
18. Costa da Silva, J., Gerlach, G., Ferreira, R. y Arf, O. 2016. Influence of low doses and application times on the hormesis effect of glyphosate in common bean. *Rev. Facultad de Agronomía (La Plata)*, 115(2): 191-199.
19. Culpepper, A. S. 2006. Glyphosate-Induced Weed Shifts. *Weed Technology*. 20(2): 277– 281.
20. Davis, A. S., Dixon, P. M. y Liebman, M. 2003. Cropping system effects on giant foxtail (*Setaria faberi*) demography: II. Retrospective perturbation analysis. *Weed Science*, 51, 930–939. DOI: <https://doi.org/10.1614/P2002-133A>
21. De Moraes, C., De Brito, I., Tropaldi, L., Carbonari, C. y Velini, E. 2020. Efecto hormonal del glifosato en plantas de *Urochloa decumbens*. *Revista de Ciencias Ambientales y Salud, Parte B*, 55(4), 376-381.
22. Eberhardt, D. S., Oliveira, A. M., Noldin, J. A. y Vanti, R. M. 2016. Barnyardgrass with multiple resistance to synthetic auxin, ALS and ACCase Inhibitors1. *Planta Daninha*, 34, 823-832.

23. FAO. 2002. Guía sobre buenas prácticas para la aplicación terrestre de plaguicidas. Código de conducta: Directrices. Roma (Italia). 13-30. <http://www.fao.org/3/y2767s/y2767s00.htm>
24. Fischer, A., Granados, E. y Trujillo, D. 1993. Propanil resistance in populations of junglerice (*Echinochloa colona*) in Colombian Rice Fields. *Weed Science*, 41(2), 201-206. Retrieved February 27, 2021, from <http://www.jstor.org/stable/4045305>
25. Fischer, A., Ateh, C., Bayer, D. y Hill, J. 2000. Herbicide-resistant *Echinochloa oryzoides* and *E. phyllopogon* in California *Oryza sativa* fields. *Weed Science*, 48:225-230.
26. Fischer, A. J., Pavlovic, D., Yasuor, H. y Merotto Jr, A. 2009. ¿Se relaciona la evolución de los mecanismos multifactoriales de resistencia a herbicidas con la tolerancia al estrés? *Seminario Internacional de Diagnóstico y Manejo de la Resistencia a Herbicidas. Serie de Actas INIA*, (44), 71-79.
27. Fischer, A. y Valverde, B. E. 2012. Resistencia a herbicidas en malezas asociadas con arroz. IV. Degiovanni B., C. P. Martínez R. y F. Motta O. (red.). Producción eco-eficiente del arroz en América Latina. (Bind 1., s. 447-487). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
28. Fuentes, P.; Peñaherrera, L.; Yannicari, M., “Estudio de poblaciones de *Echinochloa crus-galli* presumiblemente resistentes a bispyribac-sodium de la Provincia del Guayas, Ecuador”. VII Congreso de la Red Ecuatoriana de Universidades para la Investigación y Posgrados. (REDU). (Campus Yachay-Tech). Urcuquí, Ecuador. 11-15 noviembre 2019.
29. Gaines, T., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S., Shaner, D. y Grey, T. 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 1029-1034.
30. Garcés, F., Díaz, T. y Aguirre, A. 2012. Severidad de la quemazón (*Pyricularia oryzae* Cav.) en germoplasma de arroz F1 en la Zona Central del Litoral ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología*, 5(2): 1-6.
31. Ghosh, S. 2017. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1886. DOI=10.3389/fpls.2017.01886
32. Gavilánez, F., Martillo, J., Morán, C., Crus, C. y Martínez, F. 2016. Influencia del zinc sobre el estrés generado por la aplicación de una mezcla

- de herbicida en el cultivo de arroz *Oriza sativa*. *El Misionero del Agro*, 10(3): 8-17.
33. Haghnama, K. y Mennan, H. 2020. Herbicide resistant barnyardgrass in Iran and Turkey. *Planta Daninha*, 38.
  34. Hatami, Z., Gherekhloo, J., Rojano-Delgado, A., Osuna, M., Alcantara, R., Fernandez, P., Sadeghipour, H. y De Prado, R. 2016. Múltiples mecanismos aumentan los niveles de resistencia en *Rapistrum rugosum* a los herbicidas ALS. *Frontiers in Plant Science*, (7):169. DOI=10.3389/fpls.2016.00169
  35. Herbicide Resistance Action Committee. “detecting herbicide resistance guidelines for conducting diagnostic tests and interpreting results. 1999” Disponible: [www.hracglobal.com](http://www.hracglobal.com) (lunes, 8 noviembre, 2021).
  36. Heap, I. 2021a. The International Herbicide-Resistant Weed Database. Disponible: <http://www.weedscience.org/Pages/crop.aspx>. En línea (lunes, 8 noviembre, 2021).
  37. Heap, I. 2021b The International Herbicide-Resistant Weed Database. Disponible: <http://www.weedscience.org/Pages/Species.aspx>. En línea (lunes, 8 noviembre, 2021).
  38. Heap, I. 2021c The International Herbicide-Resistant Weed Database. Disponible: <http://www.weedscience.org/Home.aspx>. En línea (lunes, 8 noviembre, 2021).
  39. Heap, I. 2021d The International Herbicide-Resistant Weed Database. Disponible: <http://www.weedscience.org/Pages/MOA.aspx?MOAID=3>. En línea (lunes, 8 noviembre, 2021).
  40. Holm L., Plucknett, D., Pancho, J. y Herberger, J. 1977. The World's Worst Weeds, Distribution and Biology. *University Press of Hawaii*.
  41. Iftikhar, A., Tanveer, A., Maqbool, R. y Yaseen, M. 2020. Effect of cytochrome P450 inhibitors on ACCase resistant *Phalaris minor* biotypes. *Pakistan Journal Agriculture Science*, 57(4), 1073-1078.
  42. Holm L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J. V. y Herberger, J. P. 1991. The World's Worst Weeds. Distribution and Biology, *Krieger Publishing*, Malabar, Fla, USA.
  43. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). 2020. “Encuestas de la Superficie y Producción Agraria Continua (ESPAC) 2020.” Disponible:

- <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/> (lunes, 15 noviembre 2021).
44. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, INAMHI. 2019. “Red de estaciones Automáticas Hidrometeorológicas”. Available: <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/informacion-en-linea>.(lunes, 15 noviembre 2021).
  45. Instituto Nacional de Investigaciones agropecuarias. 2018. “INIAP cuenta con nuevas variedades de arroz cristalino” Disponible: <http://www.iniap.gob.ec>. En línea. (lunes, 15 noviembre 2021).
  46. Jasieniuk, M., Brûlé-Babel, A. L. y Morrison, I. N. 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science*, 176-193.
  47. Kaloumenos, N., Dordas, C., Diamantidis, G. y Eleftherohorinos, I. 2009. Multiple Pro 197 substitutions in the acetolactate synthase of corn poppy (*Papaver rhoeas*) confer resistance to tribenuron. *Weed Science*, 57(4), 362-368 DOI: <https://doi.org/10.1614/WS-08-166.1>
  48. Kim, D., Caseley, J., Brian, P., Riches, C. y Valverde, B. 2000. Rapid detection of propanil and fenoxaprop resistance in *Echinochloa colona*. *Weed Science*. 48: 695-700.
  49. Labrada, R. y Parker, C. 1996. El control de las malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. En: “Manejo de malezas para países en desarrollo”. Labrada, R.; Caseley, J. y Parker, C. Roma. FAO. 403 pp.
  50. Leiva, P. D. 2007. Calidad de aplicación de plaguicidas. *Centro Internacional de Capacitación INTA-CIMMYT. I Jornada de Control Químico de enfermedades del trigo. Centro Internacional de Capacitación INTA-CIMMYT. CDRom interactivo Bayer-División Agrícola*.
  51. Letouzé, A. y Gasquez, J. (2003). Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes: a suggested mechanism responsible for multiple resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). *Agronomie*, 23(7), 601-608.
  52. Lovelace, M. L. 2003. Implications of quinclorac use in Arkansas: impacts of quinclorac drift on tomato physiology and development of quinclorac resistance in barnyardgrass [Ph.D. thesis], University of Arkansas, Fayetteville, NC, USA.
  53. Mallory-Smith, C. A. and E. J. Retzinger Jr. 2003. Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed*



- Technol*, 17:605–619. DOI: [https://doi.org/10.1614/0890-037X\(2003\)017\[0605:RCOHBSfont>2.0.CO:2](https://doi.org/10.1614/0890-037X(2003)017[0605:RCOHBSfont>2.0.CO:2)
54. Marambe, B. y Amarasinge, L. 2002. Seeding growth and control of propanil-resistant barnyardgrass in lowland direct-seeded rice field of Sri Lanka. *In International Rice Research Conference*, Los Baños, Laguna (Philippines), 31 Mar-3 Apr 2000. IRRI.
  55. Maun, M. y Barrett S. C. 1986. The biology of Canadian weeds. 77. *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. *Canadian Journal of Plant Science*, 66(3), 739-759.
  56. Marzocca, A., Mársico, O. y del Puerto, O. 1976. Manual de malezas. *Editorial Hemisferio Sur*. 564 pp.
  57. Matzenbacher, F., Kalsing, A., Menezes, V., Barcelos, J. y Merotto Junior, A. 2013. Rapid diagnosis of resistance to imidazolinone herbicides in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and control of resistant biotypes with alternative herbicides. *Planta daninha*, 31, 645-656
  58. Matzenbacher, F., Bortoly, E., Kalsing, A. y Merotto, A. 2015. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone y quinclorac herbicides. *The Journal of Agricultural Science*, 153(6), 1044. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859614000768>
  59. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca del Ecuador. 2020. “Rendimiento de arroz cáscara primer cuatrimestre 2018. Principales problemas del sector arrocero, pp. 5. Disponible: [http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/estudios/rendimientos/arroz/rendimiento\\_arroz\\_primer\\_cuatrimestre\\_2017.pdf](http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/estudios/rendimientos/arroz/rendimiento_arroz_primer_cuatrimestre_2017.pdf) En línea (lunes, 8 noviembre, 2021)
  60. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca del Ecuador. 2020. “Productores de arroz y maíz beneficiados con semillas e insumos Disponible: <https://www.agricultura.gob.ec/productores-de-arroz-y-maiz-beneficiados-con-semillas-e-insumos/> En línea (lunes, 8 noviembre, 2021).
  61. Navas, M.L. 1991. Using plant population biology in Weed Research: a strategy to improve weed management. *Weed Research*, 31, 171-179.
  62. Neve, P. Vila-Aiub, M. y Roux, F. 2009. Evolutionary-Thinking in Agricultural Weed Management. *Wiley*, 184 (4), 783 – 793. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03034.x>

63. Neve, P., Busi, R., Renton, M. y Vila-Aiub, M. 2014. Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. *Pest Manag Science*, 70(9):1385–1393. <https://doi.org/10.1002/ps.3757>
64. Norsworthy, J. K., Scott, R., Smith, K., Still, J., Estorninos Jr. L. y Bangarwa, S. 2008. Confirmation and management of clomazone-resistant barnyardgrass. *BR Wells, Rice Research Series 560*, pp. 113-116
65. Norsworthy, J., Ward, S., Shaw, D., Llewellyn, R., Nichols, R., Webster, T. y Barrett, M. 2012. Reducing the Risks of Herbicide Resistance: Best Management Practices and Recommendations. *Weed Science*, 60(SP1), 31-62. doi:10.1614/WS-D-11-00155.1
66. Northcroft, D., Coleman, J. y Moss, S. 2001. “Resistance to ACCase-inhibiting herbicides and isoproturon in UK populations of *Lolium multiflorum*: mechanisms of resistance and implications for control,” *Pest Management Science*, 57(7), 587–597.
67. Owen, M. .2016. Diverse approaches to herbicide-resistant weed management. *Weed Science*, 64:570–584. DOI: <https://doi.org/10.1614/WS-D-15-00117.1>
68. Panozzo, S., Scarabel, L., Rosan, V. y Sattin, M. 2017. A new Ala-122-Asn amino acid change confers decreased fitness to ALS-resistant *Echinochloa crus-galli*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2042.
69. Panozzo, S., Scarabel, L., Tranel, P. J. y Sattin, M. 2013. Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(2), 93-101. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.12.003>
70. Papa, J. C. y Tuesca, D. 2013. Los problemas actuales de malezas en la región sojera núcleo argentina: origen y alternativas de manejo. *Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables*, 59-82.
71. Peñaherrera, L. 2007. Manual del cultivo de arroz: Manejo integrado de malezas en el cultivo de arroz. INIAP. Manual No 66. Guayas. s. e. 123 y 124.
72. Peñaherrera, L. 2009. Mezclas de herbicidas en arroz: Guía de procedimiento Disponible: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2003> En línea (lunes, 8 noviembre, 2021).
73. Powles, S. B. y Holtum, J.A.M. 1994. Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry: *Lewis Publishers*. Boca Raton, Fl.

74. Powles, S. B. y Yu, Q. 2010a. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 317-331.
75. Powles, S. B. y Yu, Q. 2010b. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 332-347.
76. Ray, T. B. 1984. Site of action of chlorsulfuron. *Plant Physiology*, 75, 827-847.
77. Retzinger, E. J. y Mallory-Smith, C. 1997. Classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technology*, 11:384-393.
78. Rey Caballero, J., Menéndez, J., Osuna, M., Salas, M. y Torra Farré, J. 2017. Target-site and non-target-site resistance mechanisms to ALS inhibiting herbicides in *Papaver rhoeas*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 138, p. 57- 65. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.03.001>.
79. Riar, D., Norsworthy, J., Srivastava, V., Nandula, V., Bond, J. y Scott, R. 2013. Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 278-289.
80. Rodenburg, J., Meinke, H. y Johnson, D., 2011. Challenges for weed management in African rice systems in a changing climate. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge 149, 427-435. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859611000207>
81. Rouse, C. E., Roma-Burgos, N., Norsworthy, J. K., Tseng, T. M., Starkey, C. E. y Scott, R. C. 2018. *Echinochloa* resistance to herbicides continues to increase in Arkansas rice fields. *Weed Technology*, 32(1), 34-44.
82. Salguero, J., Romano, Y., Álvarez-Barrientos, A., Torralbo, P., Alarcón, M. V., Amaro-Blanco, I. y Osuna, M. D. 2015. Identification of species of *Echinochloa spp.* in Extremadura rice paddies by flow cytometry. In XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, SEMh 2015," La Malherbología y la Transferencia Tecnológica" Sevilla, España, 19 al 22 de octubre de 2015 (pp. 451-457). Sociedad Española de Malherbología.
83. Saari, L. L., Cotterman, J. C. y Thill, D. C. 1994. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*; Powles, S. B. y Holtum, J. A. M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 83-139.

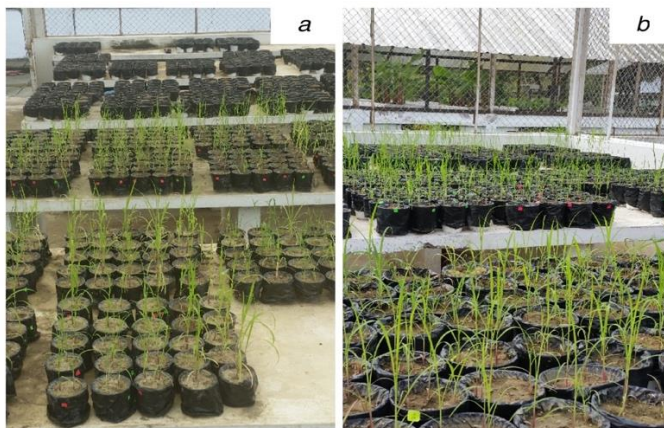
84. Satorre, E. H., Kruk B. C. y De la Fuente, E. 2016. Bases y herramientas para el manejo de malezas. *UBA Facultad de Agronomía*. Bs Ar, Argentina. 14-17.
85. Senseman, S. A. 2007. Herbicide handbook Weed Science of America. 9<sup>th</sup> edition. 2007. 458 pp.
86. Seefeldt, S., Jensen, J. y Fuerst, E., 1995. Log-Logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology*, 9(2), pp. 218-227.
87. Swanton, C., Clements, D. y Derksen, D. 1993. Weed succession under conservation tillage: A hierarchical framework for research and management. *Weed Technology*, 7:286–297. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0890037X00027615>
88. Torres, S. y Ortiz, A. 2017. Mechanisms of byspiribac-sodium herbicide resistance in wrinklegrass weed (*Ischaemum rugosum Salisb.*) in rice. *Bioagro*, 29(2), 95-104.
89. Tranel, P. J. y Wright, T.R. 2002. “Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned?” *Weed Science*, 50(6). 700-712 pp.
90. Tranel, P. J., Wright, T. R. y Heap, IM. 2017. Mutaciones en malezas resistentes a herbicidas a inhibidores de ALS. Disponible: <http://www.weedscience.com> En línea (lunes, 8 noviembre, 2021).
91. Umbarger, H. E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 47, 533–606.
92. Valverde, B. E., Riches, C.R. y Caseley, J. C. 2000. Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona*. *Cámara Insumos Agropecuarios*, Costa Rica. 135 p.
93. Valverde, B. E. y K. Itoh. 2001. World rice and herbicide resistance. Pages 195–249 in S. B. Powles y D. L. Shaner, eds. *Herbicide Resistance and World Grains*. Boca Raton, FL: CRC.
94. Valverde, B. E. (2007). Status and management of grass-weed herbicide resistance in Latin America. *Weed Technology*, 21(2), 310–323. <https://doi.org/10.1614/WT-06-097.1>
95. Vázquez-García, JG, Alcántara-de la Cruz, R., Palma-Bautista, C., Rojano-Delgado, AM, Cruz-Hipólito, HE, Torra, J. y De Prado, R. (2020).

- Accumulation of Target Gene Mutations Confers Multiple resistance to ALS, and ACCase, and EPSPS Inhibitors in *Lolium* Species in Chile. *Frontiers in plant science*, 11.
96. Vila-Aiub, M. M., Neve, P. y Powles, S. B. 2005. Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. *New Phytologist*. 167, 787–796. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01465.x>
  97. Vila-Aiub, M., Vidal, R., Balbi, M., Gundel, P., Trucco, F. y Ghersa, C. 2008. Malezas resistentes al glifosato de los sistemas de cultivo de América del Sur: una visión general. *Pest Management Science: anteriormente Pesticide Science*, 64(4), 366-371.
  98. Vila-Aiub, MM, Gundel, P. E. y Preston, C. 2015. Métodos experimentales para estimar los costos de aptitud de la planta asociados con genes de resistencia a herbicidas. *Weed Science*. 63, 203–216. doi: 10.1614 / WS-D-14-00062.1
  99. Vivas, L. e Intriago, D. 2012. Guía para el reconocimiento y manejo de las principales enfermedades en el cultivo de arroz en Ecuador. Yaguachi, Ec. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Extensión Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja. *Boletín divulgativo* N° 426. 12 p.
  100. Weed Science Society of America. 1998. Technology Notes. *Weed Technology*. 12: 789
  101. Yang, X., Zhang, Z., Gu, T., Dong, M., Peng, Q., Bai, L., Li, Y. 2017. Quantitative proteomics reveals ecological fitness cost of multi-herbicide resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.). *J Proteomics*. 150:160-169. doi: 10.1016/j.jprot.2016.09.009.
  102. Yanniccari, M., Vila-Aiub, M., Istilart, C., Acciaresi, H. y Castro, A. 2016. Glyphosate resistance I Perennial Reygrass (*Lolium perenne* L.) is Associated with a Fitness Penalty. *Weed Science*. 64: 71 – 79. DOI: <https://doi.org/10.1614/WS-D-15-00065.1>
  103. Yanniccari, M., Gigon, R. y Larsen, A. 2020. Cytochrome P450 herbicide metabolism as the main mechanism of cross-resistance to ACCase- and ALS-inhibitors in *Lolium* spp. populations from Argentina: a molecular approach in characterization and detection. *Frontiers in Plant Science*. 11. doi: 10.3389/fpls.2020.600301

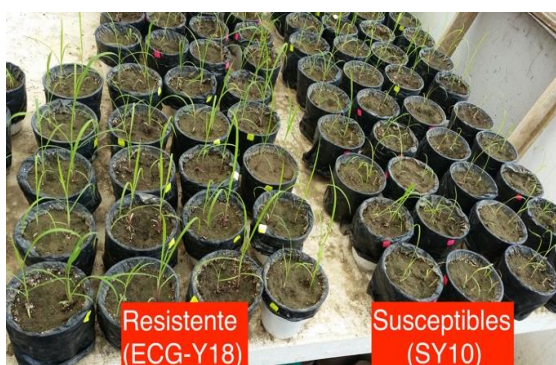
104. Yuan, J. S., Tranel, P. J. y Neal, S. J. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science*, 12(1), 6-13.

**ANEXO**

**Anexo 1.** Experimento screening; treinta y cinco poblaciones de *E. crus-galli* procedentes de las localidades *a)* Daule y *b)* Yaguachi 14 días después de la aplicación de byspiribac-sodium.



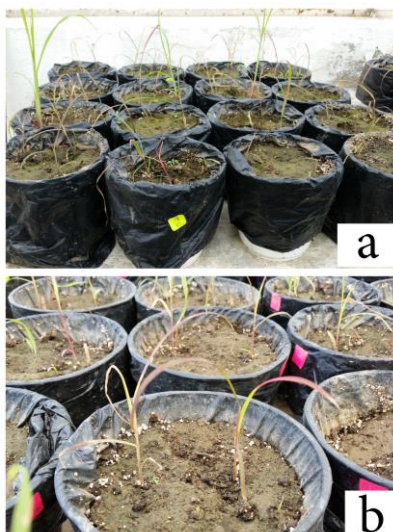
**Anexo 2.** Experimento screening poblaciones de *E. crus-galli* seleccionadas como resistentes y susceptibles procedentes de las localidades de Yaguachi. efecto 6 días después de la aplicación de byspiribac-sodium.



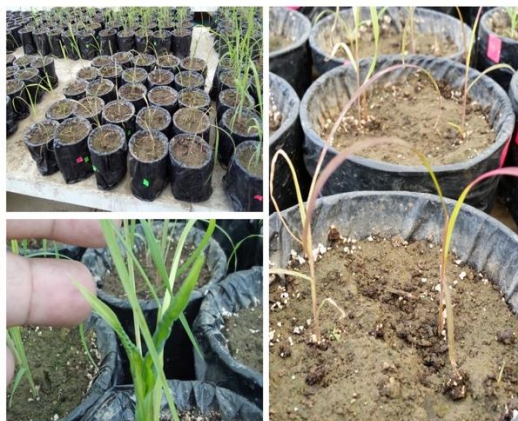
**Anexo 3.** Efecto clorótico y deformaciones en poblaciones de *E. crus-galli* seleccionadas como resistentes 6 días después de la aplicación de byspiribac-sodium.



**Anexo 4.** Efecto del tratamiento cyhalofop-butyl sobre poblaciones de *E. crus-galli* a) ECG-Y13 y b) ECG-Y18 resistentes a byspiribac-sodium y susceptibles a cyhalofop-butyl; 6 días después de la aplicación.



**Anexo 5.** Efecto sobre poblaciones de *E. crus-galli* susceptibles a la tasa comercial del herbicida byspiribac-sodium de la localidad de Daule.



**Anexo 6.** Poblaciones *E. crus-galli* de la localidad de Daule, a) resistente (R) y b) susceptible (S); Tratamiento Control; 6 días después de la aplicación.





**Anexo 7.** Efecto del herbicida byspiribac-sodium aplicado a la tasa comercial 40 g (i.a.) sobre poblaciones de *E. crus galli* a) resistentes y b) susceptibles 6 días pos aplicación.



**Anexo 8.** Sinergismo de poblaciones de *E. crus-galli* (susceptibles y resistente); dos tratamientos bispyribac-sodium (Bs) y malation + bispyribac-sodium (Mal + Bs) y las interacciones sobre la *sobrevivencia* (%).

Población	Tratamiento	Medias	Tratamiento	Medias
ECG-D07	BS	97,92 aA	Mal + Bs	93,75 aA
ECG-D11	BS	91,67 abA	Mal + Bs	37,50 cB
ECG-D15	BS	97,92 aA	Mal + Bs	100,00 aA
ECG-Y12	BS	83,33 bA	Mal + Bs	83,33 bA
ECG-Y13	BS	100,00 aA	Mal + Bs	41,67 cB
ECG-Y18	BS	93,75 aA	Mal + Bs	100,00 aA
SY10	BS	6,25 cA	Mal + Bs	4,17 dA

Medias con una letra minúsculas en común no son estadísticamente diferentes ( $p > 0,05$ ) entre poblaciones y letras mayúsculas entre tratamientos

**Anexo 9.** Sinergismo de poblaciones de *E. crus-galli* (susceptibles y resistente); dos tratamientos bispyribac-sodium (Bs) y malation + bispyribac-sodium (Mal + Bs) y la interacción sobre *el índice relativo de clorofila* (%).

Población	Tratamiento	Medias	Tratamiento	Medias
ECG-D07	BS	81,94 cA	Mal + Bs	70,28 cdB
ECG-D11	BS	88,96 bcA	Mal + Bs	64,18 dB
ECG-D15	BS	90,56 abcB	Mal + Bs	103,98 aA
ECG-Y12	BS	101,81 aA	Mal + Bs	59,99 dB
ECG-Y13	BS	96,13 abA	Mal + Bs	87,9 bB
ECG-Y18	BS	58,99 dB	Mal + Bs	78,64 bcA
SY10	BS	93,93 abcA	Mal + Bs	72,04 cdB

Medias con una letra minúsculas en común no son estadísticamente diferentes ( $p > 0,05$ ) entre poblaciones y letras mayúsculas entre tratamientos.

**Anexo 10.** Valores promedios del *índice relativo de clorofila (%)* y los DDA y sus interacciones del sinergismo entre malation y Bs sobre poblaciones de *E. crus-galli* (susceptibles y resistente).

<b>Población</b>	<b>0 DDA</b>		<b>6 DDA</b>		<b>10 DDA</b>		<b>14 DDA</b>	
ECG-D07	90,09	bA	70,43	cAB	67,83	cdeB	76,10	abB
ECG-D11	98,50	abA	76,08	bcB	61,51	deB	70,18	abB
ECG-D15	110,00	aA	98,74	aA	98,82	aA	81,52	aB
ECG-Y12	96,26	abA	85,65	abcAB	78,32	bcdBC	63,38	bC
ECG-Y13	105,63	abA	92,64	abAB	87,17	abB	82,61	aB
ECG-Y18	104,12	abA	82,56	abcB	51,58	eC	37,00	cC
SY10	98,54	abA	84,77	abcAB	80,70	bcBC	67,93	abC

Medias con una letra minúsculas en común no son estadísticamente diferentes ( $p > 0,05$ ) entre poblaciones y letras mayúsculas entre DDA.