

Confirmación de la Resistencia a Glifosato en un Biotipo de Raigrás Anual (*Lolium multiflorum* Lam.) del Noreste de la Provincia de Buenos Aires

Papa, Juan Carlos¹; Tuesca, Daniel²; Ponsa, Juan Carlos³ y Picapietra, Gabriel³

¹ Protección Vegetal, Manejo de Malezas, EEA Oliveros del INTA. jcpapa@correo.inta.gov.ar

² Cátedra de Malezas, Facultad de Ciencias Agrarias de Rosario, UNR. dtuesca@unr.edu.ar

³ Protección Vegetal, Malezas, EEA Pergamino del INTA. permal@pergamino.inta.gov.ar

Trabajo presentado en las XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas (2012)

Resumen

La presión de selección ejercida sobre las malezas por el modelo productivo agrícola actual, con una elevada dependencia del control químico y con el empleo uno o unos pocos herbicidas, permitió la manifestación de problemas de malezas tolerantes y resistentes, en particular al glifosato. En los últimos tres años, los productores y los técnicos asesores de la región sojera núcleo, manifestaron su preocupación por la falta de control de poblaciones de raigrás anual (*Lolium multiflorum*) con dosis normales de glifosato. Con el objeto de corroborar si las reiteradas fallas de control con glifosato, en una población de *L. multiflorum* del Noreste de la provincia de Buenos Aires, podían ser atribuidas a la resistencia, se realizó un experimento en condiciones de campo donde se determinó la susceptibilidad del biotipo a dosis crecientes de glifosato y a dosis normales de cletodim y haloxifop R metil y dos experimentos en condiciones controladas de macetas en invernáculo y de cajas de Petri en cámara de germinación, para construir curvas de dosis-respuesta a glifosato comparando el biotipo sospechoso de ser resistente con un biotipo susceptible. En el experimento a campo se requirieron 11520 g. ea ha⁻¹ de glifosato para lograr un control superior al 90% y 5760 g. ea ha⁻¹ para equiparar el impacto del haloxifop R metil. En el experimento realizado en macetas, sobre plantas de raigrás macolladas, se determinó un índice de resistencia ($GR_{50}(R)/GR_{50}(S)$) de 10,19 y en el experimento realizado en cajas de Petri, el índice de resistencia obtenido fue de 9,65. Estos resultados sugieren que el biotipo de *L. multiflorum* de Rojas evolucionó resistencia a glifosato y de una magnitud mayor a la detectada en biotipos del Sudoeste de la provincia de Buenos Aires, no obstante aún conserva la susceptibilidad a los gramínicos selectivos postemergentes evaluados.

Introducción

La consolidación del modelo productivo basado en la ausencia de labranzas, el empleo de glifosato como herbicida, casi exclusivo, tanto para barbechos como para cultivos y las escasas o nulas rotaciones con soja (RR) como cultivo predominante, trajeron como consecuencia inmediata una disminución en la diversidad productiva y una reducción sustancial en la abundancia de numerosas especies de malezas. Sin embargo, como resultado de un proceso de adaptación a la fuerte presión de selección ejercida por el uso de glifosato, se verificó un incremento en la abundancia de especies capaces de sobrevivir a aplicaciones con dosis normales de este principio activo “malezas tolerantes a glifosato” y el registro de varias especies resistentes a este herbicida (Tuesca *et al.* 2010).

Lolium multiflorum Lam. es una gramínea originaria de Europa, adventicia en América, naturalizada en toda la región pampeana argentina (Marzocca, 1976). Suele interferir con los barbechos así como con cultivos invernales, en especial de cereales. En el SO de Buenos Aires, se ha transformado en una de las principales malezas (Catullo, 1982; Istilart, 1991; Scursoni, 1994).

En las últimas 3 campañas agrícolas, los especialistas en malezas de INTA y universidades, dentro de la región sojera núcleo, recibieron numerosas consultas referidas a la falta de control de plantas de raigrás anual (*L. multiflorum*) tratadas con glifosato a dosis normales de uso, del orden de 720 a 1080 g.ea. ha⁻¹; este hecho, sumado a la detección de biotipos de esa maleza resistentes a glifosato en el Sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Vigna *et al.* 2008), así como los antecedentes en el mismo sentido en países limítrofes como Chile (Perez y Kogan 2003; Espinoza, *et al.* 2005) y Brasil (Galli *et al.*, 2005) motivaron la realización de este trabajo cuyo objetivo fue corroborar, mediante la aplicación de tres métodos diferentes, la existencia de un biotipo de *L. multiflorum* resistente a glifosato en el Noreste de la provincia de Buenos Aires.

Materiales y Métodos

Entre los años 2011 y 2012, se realizaron 3 experimentos, uno en condiciones de campo y dos en condiciones controladas, tendientes a determinar la sensibilidad a glifosato de un biotipo de *L. multiflorum*, detectado en el

partido de Rojas, 34° 10' Sur y 60° 34' Oeste, provincia de Buenos Aires, y sospechoso de ser resistente a ese herbicida.

Experimento 1: Determinación de la sensibilidad a glifosato y a graminicidas selectivos postemergentes del biotipo sospechoso de ser resistente a glifosato, en condiciones de campo.

Este experimento se realizó sobre matas de raigrás anual de 20 cm de altura, en estado macollaje – inicio de encañazón (2 a 3 nudos visibles), sin ningún tipo de estrés y en activo crecimiento. Esas plantas eran sobrevivientes de un tratamiento realizado 60 días atrás, con glifosato a una dosis de 1260 g.ea. ha⁻¹.

Los tratamientos fueron los siguientes:

Trats.	Herbicida	Dosis
1	Glifosato	180 g.ea. ha ⁻¹
2	Glifosato	360 g.e.a. ha ⁻¹
3	Glifosato	720 g.ea. ha ⁻¹
4	Glifosato	1440 g.ea. ha ⁻¹
5	Glifosato	2880 g.ea. ha ⁻¹
6	Glifosato	5760 g.ea. ha ⁻¹
7	Glifosato	11520 g.ea. ha ⁻¹
8	Haloxifop R metil + aceite mineral (1%)	100 g.ia. ha ⁻¹
9	Cletodim + aceite mineral (1%)	192 g.ia. ha ⁻¹
10	Testigo sin tratar	-----

La aplicación se realizó el 29 de setiembre de 2011 para lo cual se empleó una mochila de presión constante con fuente de CO₂, con una barra de 4 boquillas a 50 cm de separación y dotadas de pastillas Teejet 8001 que erogaban un caudal de 115 L ha⁻¹ a una velocidad de 4 km h⁻¹ y una presión de 2 bares. La formulación de glifosato utilizada fue una sal potásica líquida soluble a una concentración de 506 g. ea L⁻¹.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con 3 repeticiones y parcelas de 3 metros de ancho por 8 metros de longitud. A los 30 días luego de la aplicación se realizó una evaluación visual del grado de control en porcentaje respecto al testigo sin tratar (control nulo). Los datos de control fueron sometidos al análisis de la variancia y las medias comparadas a través del test LSD, previa transformación a arco seno de la raíz cuadrada del valor; además se construyó una curva de dosis-respuesta ajustada al modelo log-logístico descrito por Seefeldt *et al.* (1995) cuya expresión matemática es: $y = f(x) = C + [(D - C)/1 + (x/50)^b]$ donde y es la respuesta (% de control), D y C son el límite superior e inferior de la respuesta, b es la pendiente de la curva, x es la dosis del herbicida (g.ea. ha⁻¹) e I_{50} es la dosis que provee un control del 50%.

Experimento 2: Determinación de la curva de dosis-respuesta a glifosato de dos biotipos de raigrás en macetas

Este experimento se realizó en condiciones controladas de invernáculo, en macetas de 3,0 litros de capacidad, llenas con una mezcla en partes iguales de perlita y seca al aire y tamizada. En Julio de 2011 se sembraron semillas de *Lolium multiflorum* del biotipo Rojas (Bs. As.) sospechoso de ser resistente a glifosato y de un biotipo susceptible de una población de Zavalla (Santa Fe). Cuando las plantas alcanzaron 15 cm de altura y 24 macollos fueron tratadas con dosis crecientes de glifosato (0, 45, 90, 180, 360, 720, 1440, 2880 y 5760 g ea ha⁻¹) para lo cual se empleó una sal isopropilamina de glifosato formulación líquida soluble a una concentración de 360 g ea L⁻¹ y se aplicó con una mochila de presión constante por fuente de CO₂ erogando un caudal de 100 L ha⁻¹ a una presión de 2 bares y a una velocidad de 4 km h⁻¹. El diseño del experimento fue totalmente aleatorizado con 5 repeticiones por tratamiento. A los 30 días de la aplicación se cosechó la biomasa aérea y se colocó en estufa de secado a 60 °C durante 72 horas. Las muestras se pesaron y los datos de biomasa obtenidos de cada población fueron relacionados con su testigo sin tratar considerando al mismo como valor 100. Con los guarismos obtenidos se realizó una prueba de T (P≤5%) para determinar la diferencia de susceptibilidades entre biotipos y se ajustaron curvas de dosis-respuesta utilizando el modelo log-logístico de Seefeldt *et al.* (1995) cuya expresión matemática es: $y = f(x) = C + [(D - C)/1 + (x/50)^b]$ donde y es la respuesta (% de control), D y C son el límite superior e inferior de la respuesta, b es la pendiente de la curva, x es la dosis del herbicida (g.ea. ha⁻¹) e I_{50} es la dosis que provee una reducción en el crecimiento 50% respecto al testigo. Con los valores de Gr₅₀ se obtuvo el índice de resistencia (R/S) que es el cociente entre Gr₅₀ del biotipo sospechoso de ser resistente y Gr₅₀ del biotipo susceptible.

Experimento 3: Determinación de la curva de dosis-respuesta a glifosato de dos biotipos de raigrás en cajas de Petri.

Este experimento se realizó en condiciones controladas de cámara de germinación comparando el biotipo sospechoso de ser resistente con un biotipo susceptible cuyas semillas fueron recolectadas en el área de la EEA Oliveros. Se empleó una técnica de biotest en cajas de Petri similar a la utilizada por Pérez y Kogan (2003) para comparar la respuesta de poblaciones de *L. multiflorum* frente a concentraciones crecientes de glifosato de 0, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 mg ea L⁻¹ de solución. En cada caja y sobre una hoja de papel de germinación (Schleicher & Schuell, 65 g m⁻²), se sembraron 25 semillas previo agregado de 6 ml de cada dilución correspondiente a cada uno de los tratamientos, el cual fue replicado 4 veces con un diseño completamente aleatorizado. El material se colocó en cámara de crecimiento a 22° C y condiciones de luz continua. A los seis días se midió la longitud del brote (coleoptile + primer hoja), considerando la distancia desde el cariope al ápice de la primera hoja o bien del coleoptile (en el caso de no estar expuesta la hoja). Se obtuvo el promedio de las mediciones en cada caja y los valores obtenidos en los tratamientos dentro de cada población fueron relacionados con su testigo sin tratar (dilución 0) considerando al mismo como valor 100. Con los guarismos obtenidos se realizó una prueba de T (P≤5%) para determinar la diferencia de susceptibilidades entre biotipos y se ajustaron curvas de dosis-respuesta utilizando el modelo log-logístico de Seefeldt *et al.* (1995) cuya expresión matemática es: $y = f(x) = C + [(D - C) / (1 + (x / I_{50})^b)]$ donde y es la respuesta (en este caso la longitud del brote), D y C son el límite superior e inferior de la respuesta, b es la pendiente de la curva, x es la concentración del herbicida (g.ea. L⁻¹) e I_{50} es la concentración que provee un 50% de longitud del brote en relación al testigo sin glifosato. Con los valores de Gr_{50} se obtuvo el índice de resistencia (R/S) que es el cociente entre Gr_{50} del biotipo sospechoso y Gr_{50} del biotipo susceptible.

Resultados y Discusión

En el experimento 1, a los 30 días luego de la aplicación de los tratamientos, se registró un incremento en la magnitud del control siguiendo el aumento de dosis de glifosato, lográndose con los niveles de dosis considerados estándar, 720 a 1440 g ea ha⁻¹, impactos relativamente bajos, de entre 41,67 y 60% respectivamente, alcanzándose un valor aceptable de 92,67% con la dosis más alta evaluada de 11520 g ea ha⁻¹ lo que equivale a 32 l ha⁻¹ de una formulación LS a una concentración de 360 g ea L⁻¹ y que es, desde todo punto de vista, una dosis excesivamente alta destinada al control de una gramínea ya que las dosis comerciales aconsejadas para el control de *L. multiflorum* varían desde 600 a 1200 g ea ha⁻¹ en los estadios desde 10 cm hasta floración (MONSANTO ARGENTINA SAIC). Los gramínicidas expresaron una performance de acuerdo a lo esperado y fue estadísticamente similar a la obtenida con glifosato a una dosis superior al doble de la máxima recomendada de 2880 g ea ha⁻¹ y que equivale a 8 litros de una formulación LS 360 g ea L⁻¹. Fueron necesarios 5760 g ea ha⁻¹ (16 l de una formulación LS 360 g ea L⁻¹) para alcanzar un impacto similar al tratamiento con haloxifop R metil (Tabla 1).

La curva de dosis-respuesta muestra que el biotipo estudiado manifestó una relativamente baja sensibilidad al glifosato con un valor de I_{50} de 778 g ea ha⁻¹ e I_{90} de 8900 g ea ha⁻¹ (Figura 1). Este último guarismo es también, elevado considerando la dosis máxima sugerida para el control de gramíneas anuales en general, que es de 1332 g ea ha⁻¹ según la Guía de Productos Fitosanitarios de la CASAFE 2011.

Considerando estos resultados y una manifiesta dificultad de control de esta maleza con glifosato en las últimas 3 campañas asumimos que es altamente probable que este biotipo haya evolucionado resistencia a este principio activo.

El experimento 2 mostró que el biotipo Rojas fue menos sensible a glifosato que el biotipo de Zavalla; estas diferencias fueron altamente significativas a partir de la dosis de 90 g. ea ha⁻¹ y hasta 1440 g. ea ha⁻¹ (Figura 2). Las curvas de dosis respuesta mostraron que el biotipo de Zavalla (GR_{50} : 86,84) fue 10,19 veces más sensible a glifosato que el biotipo de Rojas (GR_{50} : 885,20) (Figura 3).

De los datos obtenidos en el experimento 3 se determinó que los dos biotipos estudiados, manifestaron sensibilidades muy diferentes al herbicida glifosato. El biotipo de Rojas resultó ser significativamente menos susceptible que el biotipo de Oliveros; estas diferencias se registraron en la totalidad de las concentraciones de glifosato consideradas, con excepción del testigo (Figura 4). Estos resultados fueron corroborados por las curvas de dosis-respuesta que mostraron que el biotipo de Rojas fue casi 10 veces menos sensible a glifosato (GR_{50} : 121 g ea L⁻¹) que el biotipo de Oliveros (GR_{50} : 12,53 g ea L⁻¹); (Figura 5).

Los experimentos 2 y 3 brindaron valores de índice de resistencia muy próximos. Pérez y Kogan (2003) en Chile y Vigna *et al.* (2008) en Sudoeste de la provincia de Buenos Aires, a partir de experimentos similares, observaron

que los biotipos de *L. multiflorum* considerados resistentes, manifestaron un GR_{50} cuatro veces superior a uno sensible utilizado como control; esas poblaciones provenían de campos con historia de unos 10 años de uso continuado de glifosato, lo mismo registraron Vigna *et al.* (2008). Los lotes de los que provenía el material empleado en este experimento registraban, en los últimos 10 años, un mínimo de 3 aplicaciones al año con no menos de 900 g ea ha⁻¹ de glifosato, solo o en combinación con herbicidas hormonales y/o inhibidores de ALS, no obstante la manifestación de este tipo de problemas en lotes con una mayor rotación de herbicidas, nos permite suponer que la presión ejercida por el glifosato no es el único factor involucrado. Michitte, *et al.* (2007), trabajando con biotipos de *L. multiflorum* en Chile, concluyeron que la resistencia a glifosato es la resultante de expresión de varios atributos, como la baja retención del follaje, baja penetración foliar y alteración en el transporte los que, actuando en forma conjunta, mediante sucesivas hibridaciones, contribuirían cada uno de ellos a pequeñas reducciones en la susceptibilidad y que finalmente conduciría a la manifestación de la resistencia en condiciones de campo.

Conclusiones

Para las condiciones en las que se ejecutaron estos experimentos, podemos concluir que el biotipo de *L. multiflorum* de Rojas evolucionó resistencia a glifosato y tal resistencia es de una magnitud mayor a la detectada, a la fecha, en biotipos del Sudoeste de la provincia de Buenos Aires, no obstante conserva la susceptibilidad a los graminicidas selectivos postemergentes evaluados.

Bibliografía

- CASAFE. 2011.** Guía de Productos fitosanitarios. Glifosato. 2: 1004-1022.
- Catulo, J.C.; Valetti, O.E.; Rodríguez, M.L.; y Sosa, C.A.**1982. Relevamiento de malezas en cultivos comerciales de trigo y girasol en el centro sur bonaerense. IX Reunión Argentina sobre la Maleza y su Control. Revista Malezas (ASAM). 11:204-235.
- Espinoza, N Y Diaz, J.** 2005. Situación de la resistencia de malezas a herbicidas en cultivos anuales en Chile. Seminario Taller Iberoamericano Resistencia a Herbicidas y cultivos Transgénicos. INIA –FAO, Facultad de Agronomía Universidad de la República. Colonia, Uruguay. P. 74-82.
- Galli, A.J.B.; Marochi, A.I.; Christoffoleti, P.J.; Trentin, R.; Tochetto, S.** 2005. Ocorrência de *Lolium multiflorum* Lam resistente a glyphosate no Brasil. Seminario Taller Iberoamericano Resistencia a Herbicidas y cultivos Transgénicos . INIA –FAO, Facultad de Agronomía Universidad de la República. Colonia, Uruguay.
- Istilart, C.M.** 1991 Relevamiento de malezas en cultivos de trigo en los partidos de Tres Arroyos, González Chávez y Necochea. XII Reunión Argentina sobre la maleza y su control. ASAM. Tomo 2: 87-96, 1991.
- Marzoca, A.** 1976. Manual de Malezas. 564. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. P.564
- Michitte, P.; De Prado, R.; Espinoza, N., Ruiz-Santaella, J.P. and Gauvrit, C.** 2007. Mechanisms of Resistance to Glyphosate in a Ryegrass (*Lolium multiflorum*) Biotype from Chile. Weed Science 55:435–440.
- Monsanto Argentina SAIC.** Manual de Uso. Roundup Full II. Monsanto Argentina SAIC 21 pp.
- Perez, A. y Kogan, M.** 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. Weed Research 43:12-19.
- Scursoni, J.A.** 1994. Las malezas y el cultivo de cebada cervecera en Argentina. Primera Jornada de actualización técnico económica del cultivo de cebada cervecera. SAGYP. Bolsa de Cereales 10/5/94 .Buenos Aires Publ. Miscelánea , pp. 115-121.
- Seefeldt, S.S., Jenesen, J.C. y Fuerst, P.E.** 1995 Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. Weed Technology. 9 (2):218-227.
- Tuesca, D.; Nisensohn, L. and Papa, J.C.** 2010. Glyphosate resistance in biotipes of *Sorghum halepense* in the main soybean area of Argentina. Actas Pan American Weed Resistance Conference. Bayer. Miami Fla. Available in CD.
- Vigna, M.; López, R.; Gigón, R. y Mendoza, J.** 2008. Estudios de Curvas Dosis-respuesta de Poblaciones de *Lolium multiflorum* a Glifosato en el SO de Buenos Aires, Argentina. _XXVI Congresso Brasileiro de Plantas Daninhas XVIII Congresso de la Asociación Latinoamericana de Malezas. 4 a 8 de mayo 2008. Ouro Preto: MG: BRASIL. ISBN: 978-85-98410-04-3. Compact Disk Editora: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD).

Tabla 1: Control (% respecto al testigo sin aplicación) de raigrás del biotipo de Rojas a los 30 después de la aplicación

Trat	Herbicida	Control (%)
1	Glifosato	9,33 g
2	Glifosato	21,67 f
3	Glifosato	41,67 e
4	Glifosato	60,00 d
5	Glifosato	73,33 c
6	Glifosato	85,00 b
7	Glifosato	92,67 a
8	Galant R + aceite mineral (1%)	79,33 bc
9	Select + aceite mineral (1%)	78,33 c

Letras distintas significan diferencias estadísticas según una prueba de LSD (P=0,05).

Figura 1: Curva de dosis-respuesta elaborada sobre la base de datos obtenidos en condiciones de campo

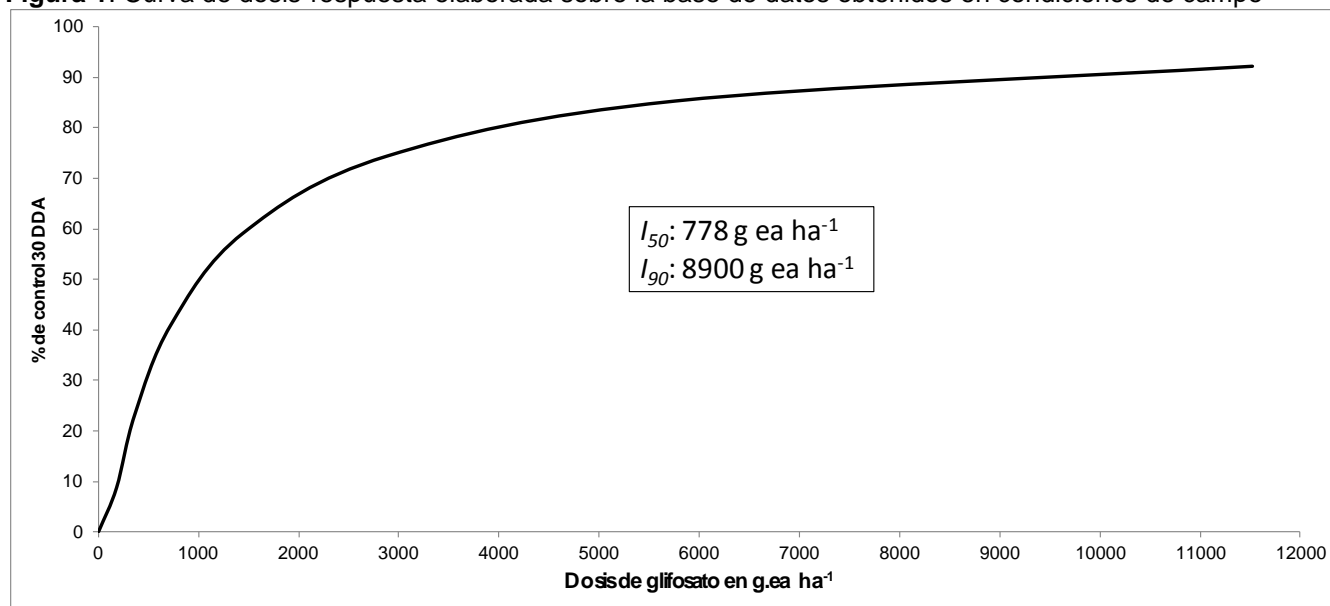
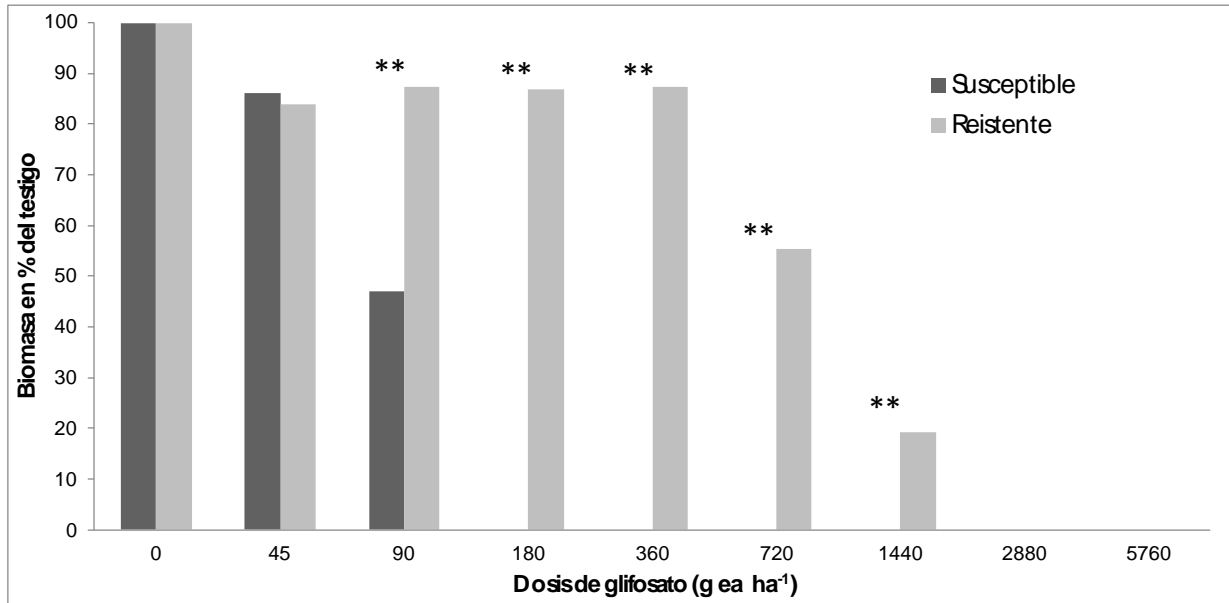


Figura 2. Biomasa de los biotipos de Rojas y Zavalla, en porcentaje respecto al testigo (100%) correspondiente a cada dosis



Los asteriscos ** indican que los biotipos difieren entre sí, para cada dosis de glifosato considerada, según una prueba de T a un nivel de $P < 0,05$.

Figura 3. Curvas de dosis-respuesta para los biotipos de Rojas y Zavalla

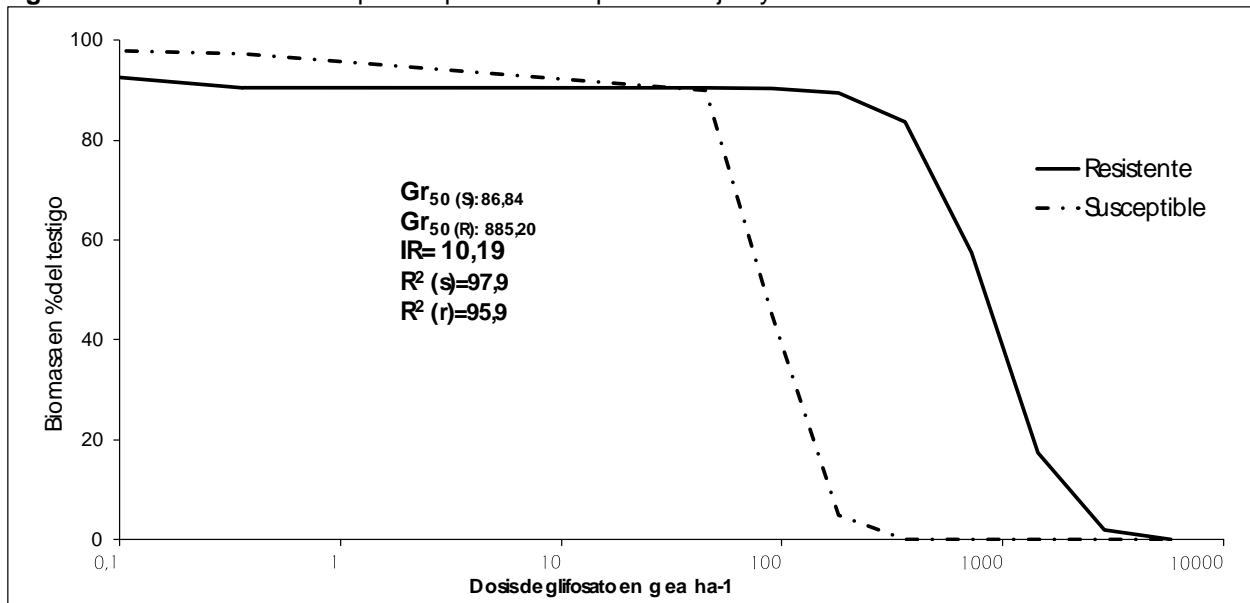
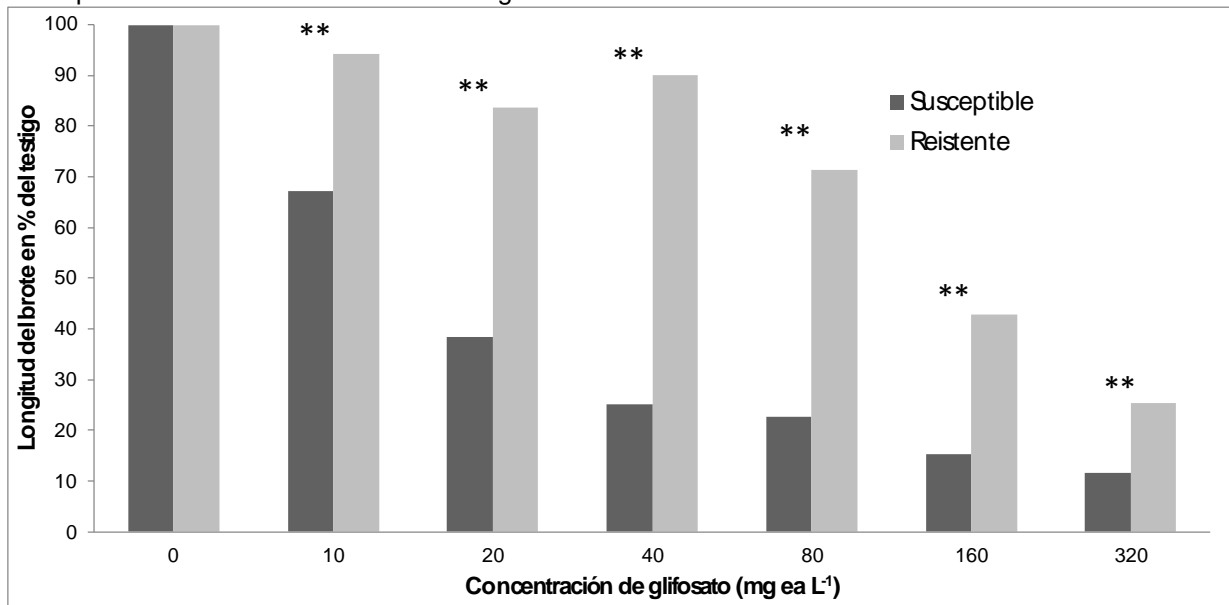


Figura 4: longitud del brote de los biotipos de Rojas y Oliveros, en porcentaje respecto al testigo (100%) correspondiente a cada concentración de glifosato.



Los asteriscos ** indican que los biotipos difieren entre sí, para cada concentración de glifosato considerada, según una prueba de T a un nivel de $P < 0,05$.

Figura 5: curva de dosis respuesta para los biotipos de Rojas y Oliveros

