

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD AL GLIFOSATO EN 7 POBLACIONES DE RAIGRÁS (*Lolium multiflorum* L.) DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS (ARGENTINA) Y SU RELACIÓN CON LA ACUMULACIÓN DE ÁCIDO SHIKIMICO

Muñiz Padilla, E.^{1,2}; Sequin, C.^{1,2}; Ayala, F.¹; Comas, E.¹; Vera, J.¹; Tuesca, D.³

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias UNER Ruta 11, Km 10,5 Oro Verde.

²Facultad de Ciencia y Tecnología UADER, ruta 11 km 10,6 Oro Verde.

³Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Rosario, Campo Experimental Villarino, Zavalla Santa Fe.

Autor para correspondencia: esteban.muniz@uner.edu.ar

RESUMEN

El raigrás es una maleza importante en los sistemas agrícolas. El uso masivo de glifosato, en los últimos años, produjo un incremento en la presión de selección, generando la aparición de poblaciones resistentes. El glifosato ejerce su acción herbicida mediante la inhibición de la enzima 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EC 2.5.1.19), conocida como EPSPS, lo que desencadena la acumulación de ácido shikímico en los tejidos afectados. Esto puede utilizarse como un método para detectar poblaciones resistentes. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar siete poblaciones de *Lolium multiflorum* en su comportamiento frente a un rango de dosis de glifosato a fin de estimar las curvas de dosis respuesta de cada una de ellas y relacionar estos resultados con el nivel de acumulación de ácido shikímico post aplicación. En el experimento de dosis respuesta se evaluaron 9 dosis (entre 67,5 y 17280 gea ha⁻¹). En cinco plantas de cada población se tomaron muestras de la lámina foliar de la última hoja expandida a las 72 y 110 horas después de la aplicación (HDA), en el testigo y en las dosis de 540, 1080 y 2160 gea.ha⁻¹. La determinación del ácido shikímico se realizó por espectrofotometría. Los valores de GR₅₀ presentaron diferencias entre las poblaciones resistentes y susceptibles. Los índices de resistencia calculados variaron entre 8,2 y 13,9. Los valores de ácido shikímico variaron entre las diferentes dosis y poblaciones analizadas en los dos momentos de evaluación. Los valores para el tratamiento testigo y la dosis de 540 gea ha⁻¹ no difirieron estadísticamente en ninguno de los momentos evaluados. Los contenidos de ácido shikímico a las 72 y 110 HDA en las poblaciones resistentes no difirieron estadísticamente en la dosis de 1080 gea ha⁻¹, pero si existieron diferencias estadísticas con respecto a las poblaciones susceptibles. A la dosis de 2160 gea ha⁻¹ existió una acumulación significativa de ácido shikímico en todos los biotipos, pero la acumulación en los biotipos susceptibles fue superior, difiriendo significativamente de los resistentes. Estos resultados muestran que existe una relación clara entre lo evidenciado en el experimento de dosis respuesta y los niveles de acumulación de ácido shikímico post aplicación y que la técnica propuesta es efectiva para diferenciar poblaciones de raigrás resistentes a glifosato.

Palabras clave: mecanismo de resistencia, ácido shikímico, glifosato, raigrás.

ABSTRACT

GLYPHOSATE SENSITIVITY IN RYEGRASS (*Lolium multiflorum* L.) POPULATIONS FROM ENTRE RIOS PROVINCE (Argentina) AND ITS RELATIONSHIP WITH SHIKIMIC ACID ACCUMULATION

Ryegrass is an important weed in agricultural systems. The massive use of glyphosate in recent years has produced an increase in selection pressure, generating the appearance of resistant populations. Glyphosate exerts its herbicidal action by inhibiting the enzyme 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthetase (EC 2.5.1.19), known as EPSPS, which triggers the accumulation of shikimic acid in affected tissues. This can be used as a method to detect resistant populations. The objective of this study was to characterize seven populations of *Lolium multiflorum* in their behavior at a range of glyphosate doses in order to estimate the characteristic dose-response curves of each one of them and relate these results to the level of post-application shikimic acid accumulation. In the dose-response experiment, 9 doses were evaluated (between 67.5 and 17,280 gae ha⁻¹). In five plants of each population, samples were taken from the leaf blade of the last expanded leaf at 72 and 110 hours after application (HDA), in the control and at doses of 540, 1080 and 2160 gae ha⁻¹. Shikimic acid was determined by spectrophotometry. The GR₅₀ values showed differences between the resistant and susceptible populations. The calculated resistance indices varied between 8.2 and 13.9. Shikimic acid values varied between the different doses and populations analyzed at the two evaluation times. The values for the control treatment and the dose of 540 gae ha⁻¹ did not differ statistically in any of the evaluated moments. Shikimic acid contents at 72 and 110 HDA in resistant populations did not differ statistically at the dose of 1080 gae ha⁻¹, but there were statistical differences with respect to susceptible populations. At the dose of 2160 gae ha⁻¹, there was a significant accumulation of shikimic acid in all biotypes, but the accumulation in the susceptible biotypes was higher, differing significantly from the resistant ones. These results show that there is a clear relationship between what was evidenced in the dose-response experiment and the levels of shikimic acid accumulation and that the proposed technique is effective in differentiating glyphosate-resistant ryegrass populations.

Keywords: ryegrass, glyphosate, resistance mechanism, shikimic acid

Introducción

Las malezas son especies que generan una competencia a los cultivos por luz, nutrientes, agua e interfiriendo con diversas actividades productivas (Fernandez *et al.*, 2014).

El raigrás anual (*Lolium multiflorum* L.) es una especie cultivada y también se la encuentra como maleza asociada a sistemas agrícolas (Marzocca, 1976). Esta especie es considerada una maleza muy importante en los sistemas agrícolas pampeanos que se destinan a la producción de trigo, cebada y avena, donde

el control químico es la principal estrategia empleada (Istilar y Yannicari, 2011). Es una especie del tipo "OIP" (crecimiento otoño-invierno-primaveral). Vegeta muy bien desde el otoño y durante el invierno. Su floración ocurre normalmente desde mediados de octubre a principios de noviembre, en la región pampeana. Por lo cual y dada su profusa producción de semillas, es capaz de mantenerse en el tapiz vegetal del suelo, por largo tiempo, a causa de una resiembra natural. Es una de las gramíneas

forrajeras, invernales y primaverales más importantes de los pastizales naturales de la provincia de Entre Ríos (Burkart, 1969). Se lo encuentra en todos los departamentos de la provincia, en campos sin cultivar, asociado a cultivos, praderas, en banquinas de rutas y caminos vecinales (Beltramino *et al.*, 2005). En Argentina las especies de raigrás más importantes agrónomicamente son *L. perenne* y *L. multiflorum*, tanto por sus características forrajeras como por ser componentes de céspedes y campos naturales. *Lolium multiflorum* es una especie diploide ($2n=2x=14$) alógama obligada (Brunharo y Streisfeld, 2021). Las especies alógamas del género *Lolium*, presentan alta variabilidad genética lo que les permite una rápida evolución de las poblaciones en condiciones de fuerte presión de selección (Matzrafi *et al.*, 2021) como la ejercida por los herbicidas.

Se ha demostrado que el uso repetitivo de herbicidas con el mismo modo de acción genera una alta presión de selección sobre las poblaciones, lo que puede generar rápidamente el aumento en la frecuencia de biotipos resistentes en las malezas (Vencill *et al.*, 2012).

La resistencia a herbicidas se define como la habilidad hereditaria que adquieren algunos biotipos dentro de una población para sobrevivir y reproducirse bajo la acción de determinadas dosis de un herbicida a las cuales la población original era susceptible (WSSA, 1998).

Esta especie ha desarrollado resistencia a muchos herbicidas con diferentes mecanismos moleculares (Suzukawa *et al.*, 2021). Al presente la especie tiene reportados más de 70 citas de resistencia alrededor del mundo (Heap, 2022).

El glifosato ejerce su acción herbicida mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS). Esta enzima es clave en la ruta biosintética del shikimato, que es necesaria para la producción de los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina), auxinas, fitoalexinas, ácido fólico, lignina, plastoquinonas y otros

metabolitos secundarios (Shaner, 2006; Baek *et al.*, 2021). La enzima es responsable de catalizar la reacción entre el shikimato-3-fosfato (S3P) y el fosfoenolpiruvato (PEP), produciendo enolpiruvilshikimato-3-fosfato y fosfato inorgánico (Arregui y Puricelli, 2013). El efecto inhibitorio de la EPSPS por parte del glifosato desencadena la acumulación de altos niveles de ácido shikímico en los tejidos afectados (Shaner *et al.*, 2005; Oliveira, 2011; Yannicari, 2014).

La alta presión de selección ejercida por el uso continuado de glifosato generó las bases para que la resistencia a este principio activo evolucionara (Preston *et al.*, 2009). Los diagnósticos de resistencia utilizando bioensayos proporcionan información sobre las respuestas de las plantas a los herbicidas. La caracterización inicial de la resistencia a herbicidas requiere un experimento de dosis respuesta detallado, en el que la respuesta del biotipo con sospecha de resistencia se compara con la de un biotipo susceptible al herbicida, en un rango de dosis que generalmente incluye múltiplos y submúltiplos de la dosis normal de uso (Heap, 1994; Beffa *et al.* 2012; Burgos *et al.*, 2013; Keshtkar *et al.*, 2021; Heap, 2022). La relación entre dosis y la respuesta se describe mediante diferentes modelos estadísticos, dentro de los que se destacan diversos modelos de regresión no lineal (Keshtkar *et al.*, 2021). La respuesta al herbicida de cada biotipo se basa en la evaluación visual, el análisis de la mortalidad o la inhibición del crecimiento producida en relación con las plantas testigo no tratadas (Beffa *et al.*, 2012). La resistencia se confirma si la respuesta de los biotipos resistente y susceptible es estadísticamente diferente y el biotipo resistente putativo no se controla a las dosis que controlan las plantas susceptibles, de acuerdo a las dosis de campo recomendadas. (Beckie *et al.*, 2000).

La comparación entre poblaciones se realiza comúnmente al determinar la dosis efectiva que causa el 50% de inhibición de crecimiento observada (GR_{50}) mediante reducción de biomasa y / o calificaciones visuales o la

dosis necesaria para matar el 50% de las plantas (DL_{50}). Para cuantificar la magnitud de la resistencia relativa a una población S predefinida se utiliza la relación $GR_{50}(R)/GR_{50}(S)$, conocida como índice de resistencia (IR) (Beffa *et al.*, 2012; Burgos *et al.*, 2013).

Otro método para comparar poblaciones resistentes consiste en medir la acumulación de ácido shikímico en tejidos jóvenes post aplicación de glifosato (Dayan *et al.*, 2015). Este método se basa en que la acumulación de ácido shikímico en poblaciones susceptibles es mayor que en poblaciones resistentes (Shaner *et al.*, 2005; Oliveira, 2011; Yannicari, 2014). La acumulación de ácido shikímico en tejidos vegetales tratados con glifosato puede ser una alternativa para la detección rápida de poblaciones resistentes a este herbicida (Bresnahan *et al.*, 2003). En este sentido, la magnitud del aumento en los niveles de ácido shikímico post aplicación se ha utilizado para identificar malezas con resistencia a este herbicida (Shaner *et al.*, 2005), en relación a un control susceptible y particularmente para evaluar poblaciones resistentes de *Lolium* (Ribeiro *et al.*, 2008; Yannicari, 2014; Yannicari *et al.*, 2017).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar siete poblaciones de *Lolium multiflorum* en su comportamiento frente a un rango de dosis de glifosato a fin de estimar las curvas de dosis respuesta características de cada una de ellas y relacionar estos resultados con el nivel de acumulación de ácido shikímico post aplicación.

Materiales y Métodos

Se analizaron siete poblaciones de *Lolium multiflorum* L., cinco de ellas con problemas de control con glifosato en condiciones de campo y dos susceptibles a dosis normales de uso (Tabla 1).

Las semillas de las poblaciones RG1, RG2, RG3, RG4 y RG5 fueron recolectadas de plantas sobrevivientes a tratamientos con glifosato en los diferentes sitios. Respecto de la población "Las Garzas" (I1) no se conocía con certeza su comportamiento frente al glifosato; las semillas se recolectaron de plantas presentes en las borduras de un lote con poca historia agrícola. Finalmente, la población Empalme (S1) ha sido caracterizada en estudios previos y es conocida su susceptibilidad a dosis normales de glifosato, por lo que fue incluida en este trabajo como testigo susceptible. Se sembraron semillas de las diferentes poblaciones en bandejas plásticas de 40 x 30 cm que contenían una mezcla de suelo/perlita en una proporción de 70/30. Cuando las plantas tuvieron 2 hojas se trasplantaron a macetas de 12 x 15 cm con la misma mezcla utilizada en las bandejas de siembra. Se utilizaron 6 réplicas por tratamiento. Los tratamientos químicos se realizaron en estado de macollaje (Z23-Z24) (Zadoks *et al.*, 1974). Se utilizó una formulación premium de glifosato de sal potásica al 66 % (54% de equivalente ácido (e.a)). La aplicación de los distintos tratamientos se realizó con una mochila con fuente de presión constante de CO_2 a una presión de 3,5 $kg.cm^{-2}$ provista de

Tabla 1. Sitios de recolección de las poblaciones evaluadas

Sitio/Población	Coordenadas Lat/Long	Depto.
Victoria (RG1)	32°35'36.61"S 60°10'28.87"O	Victoria
María Grande (RG2)	31°40'42.48"S 59°57'5.46"O	Paraná
La Providencia (RG3)	31°15'4.35"S 59°46'16.90"O	La Paz
Hernandarias (RG4)	31°18'22.71"S 59°47'54.42"O	La Paz
Palenque (RG5)	31°32'4.45"S 59°56'15.43"O	Paraná
Empalme (S1)	31°32'4.45"S 59°56'15.43"O	Paraná
Las Garzas(I1)	31°26'48.33"S 59°39'17.18"O	La Paz

boquillas abanico plano ultra baja deriva ULD 120015 y con un caudal de 150 l ha⁻¹. El rango de dosis evaluadas fue de 67,5 a 17280 gea ha⁻¹ (Tabla 2). La dosis normalmente utilizada en condiciones de campo para el control de *Lolium* susceptible es de aproximadamente 1350 gea. ha⁻¹ (CASAFE, 2001).

Tabla 2. Dosis de glifosato utilizadas

Dosis de glifosato (g.e.a ha ⁻¹)			
T0	Testigo	T5	1080
T1	67,5	T6	2160
T2	135	T7	4320
T3	270	T8	8640
T4	540	T9	17280

La cosecha del tejido verde remanente se realizó 45 días después de la aplicación, el material recolectado de cada maceta, se secó en estufa a 60°C por 72 hs hasta peso constante. Se calculó el porcentaje de materia seca de cada tratamiento de acuerdo a la siguiente expresión: %MS = (MS tratamiento/ MS testigo) x 100. El valor de GR₅₀ es el mejor estimador posible de la sensibilidad de una población a un herbicida y es útil para realizar comparaciones entre diferentes experimentos de dosis respuesta (Puricelli y Faccini, 2009). La estimación del GR₅₀ de cada población se realizó con el modelo log-logístico descrito por Seefeldt *et al.* (1995) y el modelo descripto por Brain-Cousens (1989) y reformulado por Schabenberger *et al.* (1999) en las poblaciones en las que aparece el fenómeno de hormesis. Con los valores de GR₅₀ obtenidos se calculó el índice de resistencia (R/S), como el cociente entre los GR₅₀ de los biotipos sospechosos de ser resistentes y el valor de GR50 del biotipo susceptible. Para cuantificar la acumulación de ácido shikímico en post-aplicación se tomaron muestras de cinco plantas en estado de macollaje de cada población en estudio siguiendo la metodología de Singh y Shaner (1998) con las modificaciones de Pérez-Jones *et al.* (2007). Las muestras se recolectaron en los tratamientos T0 (testigo), T2 (540 gea. ha⁻¹), T3 (1080 gea. ha⁻¹) y T4 (2160 gea. ha⁻¹).

De cada una de las cinco plantas se tomaron muestras de 0,05 g de peso fresco de la lámina foliar de la última hoja expandida a las 0, 72 y 110 horas después de la aplicación (HDA) de los tratamientos. Posteriormente, cada porción de tejido se colocó en 1 ml HCl (0,25 N) y se conservó a -20°C hasta su ensayo. A continuación, se llevó a 60°C durante 12 horas favoreciendo la digestión ácida con la finalidad de que las membranas celulares se desorganicen y se libere al medio el ácido shikímico. Se tomó una muestra de 100 µl del sobrenadante y se agregaron 800 µl de ácido periódico (1%) y se colocó en estufa a 37 °C durante 45 minutos. Luego de este tiempo de incubación, se incorporaron 800 µl de NaOH (1 N) / Na₂SO₃ (0,05 M). A continuación se midió la absorbancia a 382 nm (Cromartie y Polge, 2000; Gaitonde y Gordon, 1958). La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración, utilizando concentraciones conocidas de ácido shikímico (ácido 3α,4α,5β-trihidroxi-1-ciclohexano-1-carboxílico, 99 %. Sigma Aldrich, Inc.). Los resultados se expresaron en µg g⁻¹ de peso fresco. El análisis de datos se realizó con el módulo de modelos lineales generales y mixtos del software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018), la comparación de medias con el test DGC (Di Rienzo ., 2002) del mismo software, en tanto que el estudio de las curvas de dosis respuesta se realizó con los software GraphPad Prism (version 6.00 for Windows) y R análisis DRG.

Resultados y Discusión

Al analizar las curvas de dosis respuesta se observó que las poblaciones RG1, RG2, RG3, RG4 y RG5 tuvieron valores significativamente más altos de GR₅₀ en comparación con la población de reconocida susceptibilidad (S1). Estos resultados se correlacionan con la respuesta de estas poblaciones en condiciones de campo. Los GR₅₀ de las poblaciones RG1 a RG5 variaron entre 1347,78 y 1941,59 gea. ha⁻¹ (Tabla 3), lo que equivale aproximadamente a la dosis de uso de 2.5 a 3,6 l ha⁻¹ de glifosato de acuerdo a la formulación utilizada. Este rango de dosis, frecuentemente utilizado en condiciones prácticas de campo para el

manejo de poblaciones susceptibles, solo logró disminuciones del 50% en los valores de biomasa (GR_{50}). Para obtener un control del 90% (GR_{90}) los rangos de dosis de las poblaciones RG1 a RG5 variaron entre 4355,4 a 8977,78 gea. ha⁻¹ equivalentes a dosis de 8,06 a 16,6 l ha⁻¹ de la formulación utilizada, las que son muy superiores a las utilizadas para el control de poblaciones de raigrás susceptible en condiciones normales de campo. Paralelamente, el valor de GR_{50} de la población I1 tuvo valores similares a la población S1 (Figura 1 y Tabla 3), por lo que las poblaciones S1 e I1 fueron controladas con dosis equivalentes de glifosato de 1,84 y 2,03 l ha⁻¹, respectivamente, de la formulación empleada.

En trabajos realizados sobre biotipos no resistentes de la provincia de Buenos Aires, otros autores estimaron valores de GR_{50} de 135 a 270 gea. ha⁻¹ (Bentivegna *et al.*, 2017). En forma similar, Vigna *et al.* (2008), demostraron que el raigrás puede ser controlado con una dosis de 392 gea. ha⁻¹ de glifosato en etapas tempranas en tanto que en estado de floración se requieren de 600 a 1200 gea. ha⁻¹. En el presente estudio, las poblaciones

RG1 a RG5 superaron estos valores de referencia y requirieron dosis muy superiores a las que normalmente se utilizan para el control de raigrás en condiciones de campo, confirmando así la resistencia a glifosato de las mencionadas poblaciones, en tanto que la población I1 fue controlada a dosis normales de uso. Los índices de resistencia (IR_{50}) para las poblaciones RG1 a RG5 variaron entre 8,17 y 11,76 (Tabla 3).

Los niveles de resistencia (IR) observados en el experimento son algo superiores a los detallados en la bibliografía ya que, en general, la resistencia es del orden de 3-7 (Lorraine-Colwill *et al.*, 2002; Perez-Jones y Kogan, 2003; Wakelin *et al.*, 2004; Perez-Jones *et al.*, 2005 y 2007; Nandula *et al.*, 2008; Preston *et al.*, 2009; Vigna *et al.*, 2008; Diez de Ulzurrun y Leadon 2012; González-Torralva *et al.*, 2012; Gerakari *et al.*, 2021). Aunque existen citas con valores de resistencia superiores del orden de 7 a 15 veces (Preston *et al.*, 2009; Ghanizadeh *et al.*, 2013 y 2015; Cechin *et al.*, 2020).

Los valores de acumulación de ácido shikímico luego de la aplicación de glifosato variaron entre las diferentes dosis y poblaciones analizadas en los dos momentos

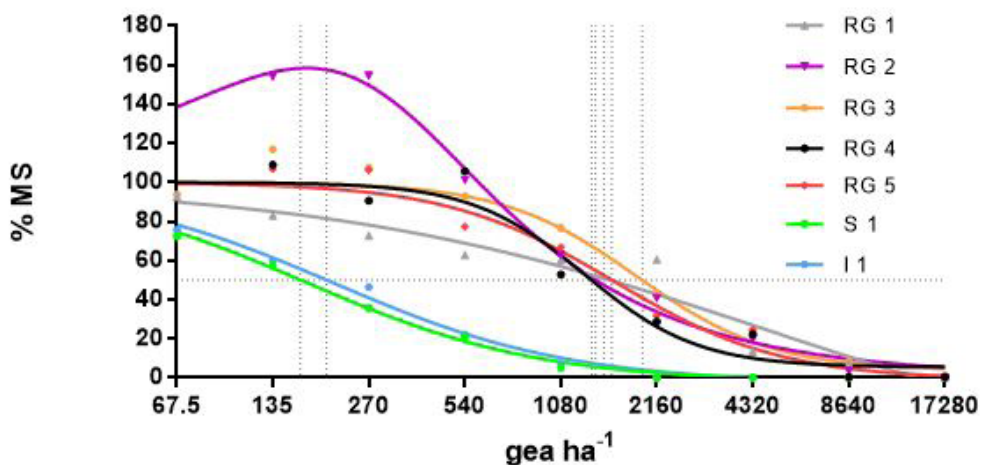


Figura 1. Curvas de dosis respuesta estimadas

Tabla 3. Resumen curvas dosis respuesta en condiciones semicontroladas. Valores de GR50, GR90 (gea ha⁻¹) e índices de resistencia estimados (IR50 e IR90).

Población	GR ₅₀	GR ₉₀	IR ₅₀	IR ₉₀
			GR ₅₀ R/GR ₅₀ S	GR ₉₀ R/GR ₉₀ S
RG 1	1633.99	9207.09	9.90	9.97
RG 2	1389.38	8398.03	8.42	9.09
RG 3	1941.59	6857.35	11.76	7.42
RG 4	1347.78	4355.43	8.17	4.72
RG 5	1562.35	6565.63	9.47	6.12
I 1	199.18	1098.48	1.21	1.19
S 1	165.04	923.72		

de evaluación (72 y 110 horas después de la aplicación (HDA)). Los valores de ácido shikímico detectados en las diferentes poblaciones para el tratamiento testigo no difirieron estadísticamente en ninguno de los momentos evaluados. En la evaluación realizada a las 72 HDA, la dosis más baja (540 gea. ha⁻¹) mostró diferencias entre las poblaciones, aunque las mismas no

discriminan correctamente a las poblaciones con resistencia. En las dosis de 1080 y 2160 gea. ha⁻¹ se diferencian estadísticamente las poblaciones con resistencia de las susceptibles (Figura 2).

Los contenidos de ácido shikímico a las 110 HDA no difirieron en la dosis más baja (540 gea. ha⁻¹) en las diferentes poblaciones, mientras que en las dosis de 1080 y 2160

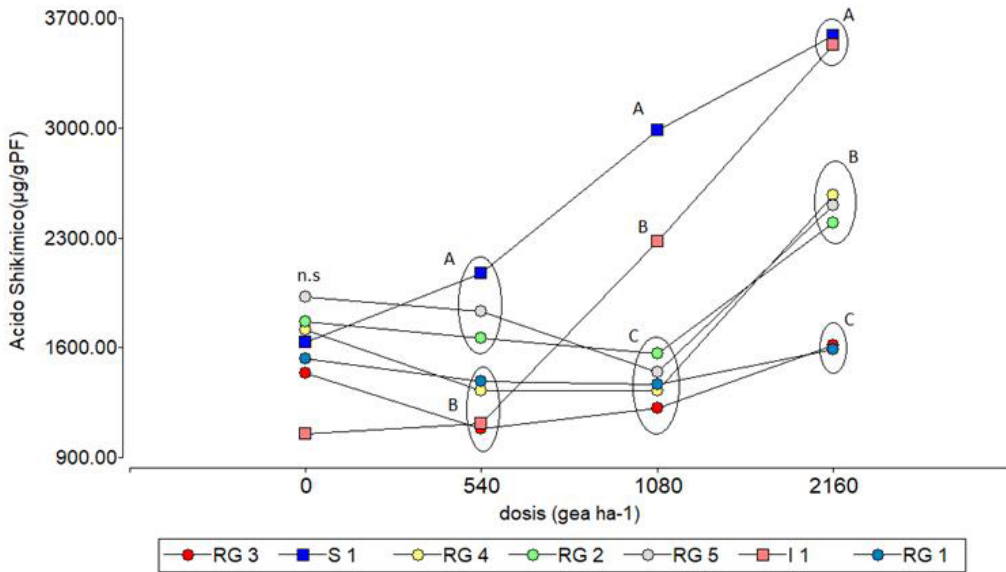


Figura 2. Curvas de acumulación de ácido shikímico a las 72 HDA. Para cada dosis, medias con letras iguales no son significativamente diferentes. Test DGC (p>0.05)

gea. ha⁻¹ se diferenciaron en forma clara las poblaciones resistentes de las susceptibles (Figura 3).

La escasa variación observada en los niveles de ácido shikímico en las poblaciones resistentes (RG1 a RG5) hasta la dosis de 1080 gea. ha⁻¹ indicaría un bajo efecto inhibitorio del herbicida sobre la enzima en estas condiciones. Por el contrario, la acumulación observada en las poblaciones S1 e I1 muestra la sensibilidad de la enzima presente en estos biotipos. A la dosis de 2160 g.e.a. ha⁻¹ se observó en general un mayor nivel de acumulación en todos los biotipos, pero el efecto sobre las poblaciones sensibles (S1 e I1) es significativamente más importante.

Finalmente cabe mencionar que los valores de GR₅₀ estimados en el ensayo de dosis respuesta tuvieron una fuerte correlación negativa con los registros de acumulación de ácido shikímico en ambos momentos de evaluación (Figura 4), en tanto que las

poblaciones que se evidenciaron como resistentes (RG1 a RG5) muestran bajos niveles de acumulación en comparación a las susceptibles (S1 e I1).

Al analizar los niveles de acumulación de ácido shikímico en los biotipos resistentes a las 72 HDA en la dosis de 2160 gea ha⁻¹ (Figura 2) se puede observar que los biotipos RG1 y RG3 son los que presentaron menores niveles de acumulación y a la vez son los de mayores valores de GR₅₀ (Tabla 3). Luego en el análisis de las 110 HDA si bien estos biotipos siguen siendo los de menor acumulación ya no se diferencian a nivel estadístico del resto de los biotipos resistentes (Figura 3). Los diferentes valores de acumulación de ácido shikímico dentro de los biotipos resistentes podrían atribuirse a diferencias fisiológicas y genéticas propias de cada población (Brunharo *et al.*, 2021).

En estudios similares, otros autores han encontrado comportamientos equivalentes.

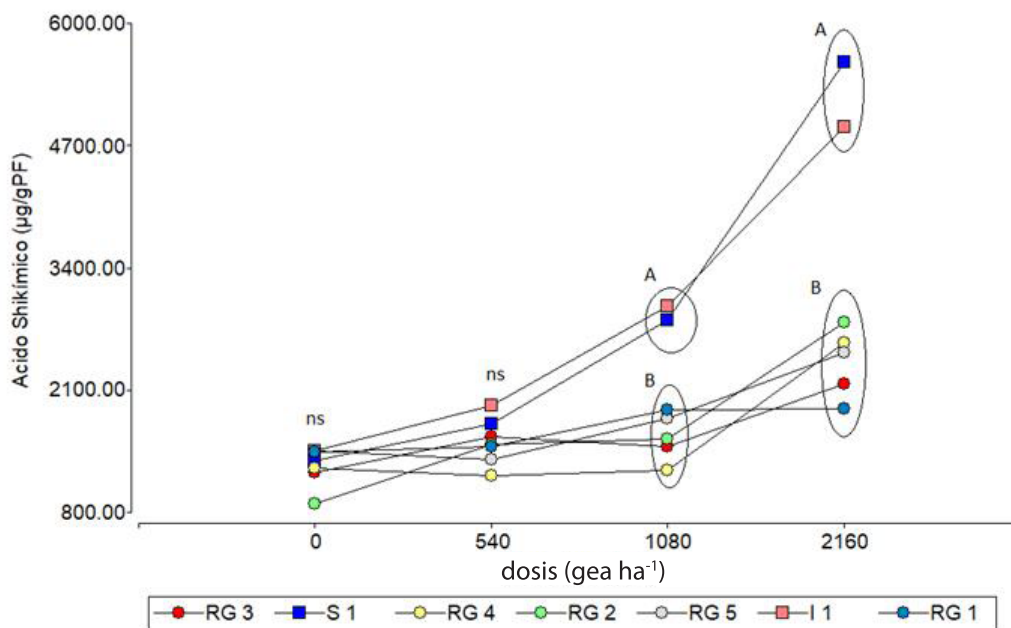


Figura 3. Curvas de acumulación de ácido shikímico a las 110 HDA. Para cada dosis, medias con letras iguales no son significativamente diferentes. Test DGC ($p > 0.05$)

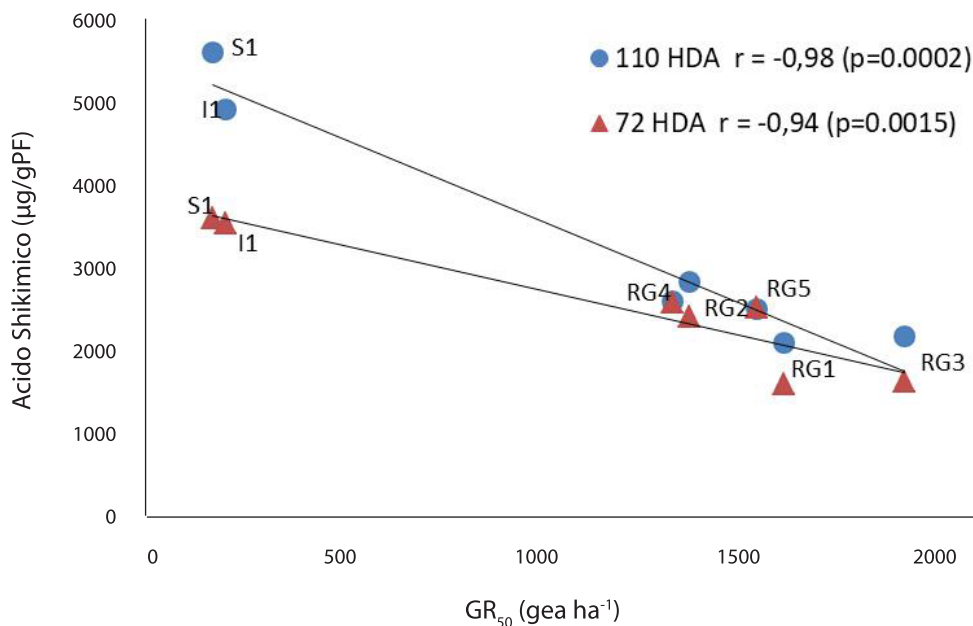


Figura 4. Correlación de los valores de acumulación de ácido shikímico a las 72 HDA y 110 HDA en la dosis de 2160 gea ha⁻¹ con los GR₅₀ estimados de cada biotipo

Por ejemplo, en biotipos de raigrás estudiados en Brasil a los que se les aplicó una misma dosis de glifosato se observaron valores de acumulación de ácido shikímico que fueron 20 a 45% más altos en los biotipos susceptibles que en el resistente (Vargas *et al.*, 2016). Trabajando con biotipos de raigrás de Chile y Estados Unidos Perez-Jones *et al.* (2007) encontraron incrementos entre 2 y 3 veces en los niveles de ácido shikímico al comparar biotipos susceptibles y resistentes.

Datos similares han sido obtenidos por Ribeiro *et al.* (2008) quien trabajó con varias especies de *Lolium* encontrando incrementos de entre 1,4 y 2,5 veces entre las poblaciones sin resistencia en comparación a las resistentes. En raigrás perenne también se encontraron diferencias significativas en los niveles de ácido shikímico acumulado en hojas post aplicación entre biotipos resistentes y susceptibles (Yannicari *et al.*, 2012 y 2017; Yannicari 2014), existiendo citas similares en *L. multiflorum* (Tehranchian *et al.*, 2018; Cechin *et al.*, 2020; Brunharo y

Streisfeld, 2021; Gerakari *et al.*, 2021). Referencias similares de la acumulación diferencial de éste compuesto luego de aplicaciones con glifosato entre biotipos sensibles y resistentes, también se han encontrado en géneros diferentes, *Conyza bonariensis* (Kaspary *et al.*, 2016); *Leptochloa virgata* (Alcantara de la Cruz *et al.* 2016); *Amaranthus palmeri* (Gaines *et al.* 2010; Mohseni-Moghadam *et al.*, 2013; Larran *et al.*, 2021); *Eleusine indica* (Chen *et al.*, 2015); *Echinochloa colona* (Alarcón-Reverte *et al.*, 2013), *Digitaria insularis* (De Carvalho *et al.*, 2011), *Brumus rubens* (Vásquez-García *et al.*, 2021).

En el presente trabajo se logró caracterizar adecuadamente el nivel de sensibilidad al glifosato de las 7 poblaciones estudiadas. Las poblaciones RG1, RG2, RG3, RG4 y RG5 se comportaron como resistentes y la población I1 fue susceptible. La acumulación de ácido shikímico post aplicación tuvo relación con el comportamiento al glifosato observado en las diferentes poblaciones.

Los resultados de este trabajo indican que el análisis de acumulación de ácido shikímico fue eficiente para diferenciar las poblaciones resistentes de las susceptibles. Si bien se mostraron diferencias en los dos momentos evaluados (72 y 110 HDA), la discriminación fue más clara a las 110 HDA en la dosis de 2160 gea. ha⁻¹.

Referencias bibliográficas

- Alarcón-Reverte, R.; García, A.; Urzúa, J.; Fischer, J. (2013). Resistance to Glyphosate in Junglerice (*Echinochloa colona*) from California Weed Science 2013 61:48–54.
- Alcántara de la Cruz, R.; Rojano-Delgado, A.; Giménez, M.; Cruz-Hipolito, H.; Domínguez-Valenzuela, J.; Barro, F.; De Prado, R. (2016). First Resistance Mechanisms Characterization in Glyphosate-Resistant *Leptochloa virgata*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1742. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.01742>.
- Arregui, M.; Puricelli, E. (2013). Mecanismos de acción de los plaguicidas. 1a Edición. Rosario: UNR Editora. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario, 2013. 268 p.
- Baek, Y.; Bobadilla, L.; Giacomini, D.; Montgomery, J.; Murphy, B.; Tranel, P. (2021). Evolution of Glyphosate-Resistant Weeds. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 255, (), -. doi:10.1007/398_2020_55
- Beffa, R.; Figge, A. Lorentz, L.; Hess, M.; Laber, B.; Ruiz-Santaella, J.; Streck, H. (2012). Weed resistance diagnostic technologies to detect herbicide resistance in cereal growing areas. A review. 25th German Conference on Weed Biology and Weed Control, March 13-15, 2012, Braunschweig, Germany
- Beckie, H.; Heap, I.; Smeda, R.; Hall, L. (2000). Screening for Herbicide Resistance in Weeds. *Weed Technology*, 14(2), pp. 428–445. doi:10.1614/0890-037X(2000)014[0428:SFHRIW]2.0.CO;2.
- Beltramino, H.; Medvecigh, J.; De Battista, J.; Costa, M. (2005). Efecto del hongo endófito *Neotyphodium occultans* en la producción de semilla de raigras anual. *Revista Científica Agropecuaria* 9(1): 25-3.
- Bentivegna, D.; Moyano, G.; Daddario, J.; Tucut, G. (2017). Determination of optimal doses of glyphosate for controlling weeds at several stages in southwestern Buenos Aires province (Argentina). *Journal of Plant Protection Research* 57 (4).
- Brain, P.; Cousens, R. (1989) An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 1989. Volume 29. 91-96
- Bresnahan, G.; Manthey, F.; Howalt, K.; Chakraborty, M. (2003). Glyphosate applied preharvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat (*Triticum aestivum*). *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, n. 14, p. 4004-4007.
- Brunharo, C. A. and Streisfeld, M. A. (2021) Multiple evolutionary origins of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Evolutionary Applications*. 2022;15:316–329. DOI: 10.1111/eva.13344
- Burgos, N.; Tranel, P.; Streibig, J.; Davis, D.; Shaner, D.; Norsworthy, J.; Ritz, C. (2013). Review: Confirmation of Resistance to Herbicides and Evaluation of Resistance Levels. *Weed Science* 2013 61:4–20.
- Burkart, A. (1969). Flora ilustrada de Entre Ríos. Colección Científica del INTA, Tomo IV, Parte II. Gramíneas. La familia botánica de los pastos. Bs. As. 1969. 551p.
- CASAFE, 2001. Guía de Productos Fitosanitarios, 10° Ed. Pag 310.
- Cechin, J.; Piasecki, C.; Benemann, D.P.; Kremer, F.S.; Galli, V.; Maia, L.C.; Agostinetto, D.; Vargas, L. (2020) Transcriptome Analysis Identifies Candidate Target Genes Involved in Glyphosate-Resistance Mechanism in *Lolium multiflorum*. *Plants* 2020, 9, 685. <https://doi.org/10.3390/plants9060685>
- Chen, J.; Huang, H.; Zhang, C.; Wei, S.; Huang, Z.; Chen, J. Wang, X. (2015). Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta*, Volume 242, 4 pp 859-868.

- Cromartie, T.; Polge, N. (2000). An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. *Proceedings of Weed Science Society of America* 40: 291.
- Dayan, F.; Owens, D.; Corniani, N.; Lima Silva, F.; Watson, S.; Howell, J.; Shaner, D. (2015). Biochemical Markers and Enzyme Assays for Herbicide Mode of Action and Resistance Studies. *Weed Science*, 63(sp1):23-63.
- De Carvalho, L.; Cruz-Hipolito, H.; González-Torralva, F.; da Costa Aguiar Alves, P.; Christoffoleti, P.; De Prado, R. (2011). Detection of Sourgrass (*Digitaria insularis*) Biotypes Resistant to Glyphosate in Brazil. *Weed Science*, 59(2), pp. 171–176. doi: 10.1614/WS-D-10-00113.1.
- Di Rienzo, J. ; Guzman, A. ; Casanoves, F. (2002) A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *JABES* 7, 129–142 (2002). <https://doi.org/10.1198/10857110260141193>
- Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez L.; Tablada M.; Robledo C. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Diez de Ulzurrun, P. y Leaden, M. (2012). Análisis de la sensibilidad de biotipos de *Lolium multiflorum* a herbicidas inhibidores de la enzima Als, Accasa y glifosato. *Planta Daninha, Viçosa-MG*, v. 30, n. 3, p. 667-673, 2012.
- Fernández, O. ; Leguizamón, E.; Acciaresi, H. (2014). Malezas e invasoras de la Argentina : ecología y manejo / Bahía Blanca : Editorial de la Universidad Nacional del Sur. Edición, 2014. ISBN 978-987-1907-70-0. 964 p
- Gaines, T.; Zhang, W.; Wang, D.; Bukun, B.; Chisholm, S.; Shaner, D.; Nissen, S.; Patzoldt, W.; Tranel, P.; Culpepper, S.; Grey, T.; Webster, T.; Vencill, W.; Sammons, D.; Jiang, J.; Preston, C.; Leach, J.; Westra, P. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 1029-1034.
- Gaitonde, M.; Gordon, M. (1958). A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 230: 1043-1050.
- Gerakari, M.; Cheimona, N.; Tani, E.; Travlos, I.; Chachalis, D.; Loddo, D.; Mathiassen, S.K.; Gitsopoulos, T.K.; Scarabel, L.; Panozzo, S.; Kristensen, M.; Kudsk, P.; Sattin, M. (2021) Biochemical and Rapid Molecular Analyses to Identify Glyphosate Resistance in *Lolium* spp. *Agronomy* 2022, 12, 40. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010040>
- Ghanizadeh, H.; Harrington, K.; James, T.; Woolley, D. (2013). Confirmation of glyphosate resistance in two species of ryegrass from New Zealand vineyards . *New Zealand Plant Protection* 66: 89-93(2013).
- Ghanizadeh, H.; Harrington, K.; James, T.; Woolley, D; Ellison, N. (2015). Mechanisms of glyphosate resistance in two perennial ryegrass (*Lolium perenne*) populations. *Pest Manag Sci* 2015; 71: 1617–1622
- González-Torralva, F.; Gil-Humanes, J.; Barro, F.; Brants, I.; De Prado, R. (2012). Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. *Plant Physiology and Biochemistry* 58 (2012) 16-22.
- Heap, I. (1994). Identification and documentation of herbicide resistance. *Phytoprotection* 75(Suppl.):85–90.
- Heap, I. (2022). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Thursday, February 24, 2022 . . Available www.weedscience.org.
- Istilart, C. y Yannicari, M. (2011). Análisis de la evolución de malezas en cereales de invierno durante 27 años en la zona sur de la pampa húmeda argentina. *Revista Técnica Especial (Aapresid)*, Malezas problema: 47-50 ISSN1850:0633.
- Kaspary, T.; Lamego, F.; Langaro, A.; Ruchel, Q.; Agostinetto, D. (2016). Investigation of the mechanism of resistance to glyphosate herbicide in Hairy fleabane. *Planta Daninha, Viçosa-MG*, v. 34, n. 3, p. 555-564, 2016.

- Keshtkar, E.; Kudskb, P.; Mesgaranc, M. (2021). Perspective: common errors in dose-response analysis and how to avoid them. *Pest Manag Sci* 2021; 77: 2599–2608
- Larran, A.S.; Palmieri, V.E.; Tuesca, D.; Permingeat, H.R.; Perotti, V.E. (2021). Coexistence of target-site and non-target-site mechanisms of glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri* populations from Argentina. *Acta Scientiarum*. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v44i1.55183>
- Lorraine-Colwill, D.; Powles, S.; Hawkes, T.; Hollinshead, P.; Warner, S.; Preston, C. (2002). Investigation into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 74, n. 2, p. 62-72, 2002.
- Marzocca, A. (1976). Manual de malezas. 3a ed. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Matzrafi, M., Preston, C. and Brunharo, C.A. (2021) Review: evolutionary drivers of agricultural adaptation in *Lolium* spp.. *Pest Manag Sci*, 77: 2209-2218. <https://doi.org/10.1002/ps.6219>
- Mohseni-Moghadam, M.; Schroeder, J.; Ashigh, J. (2013). Mechanism of resistance and inheritance in glyphosate resistance palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) populations from New Mexico, USA. *Weed Sci*.61:517-25.
- Nandula, V.; Reddy, K.; Poston, D.; Rimando, A.; Duke, S. (2008). Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. *Weed Sci.*, v. 56, n. 3, p. 344-49.
- Oliveira, R. (2011). Mecanismo de Acao de Herbicidas. *Biologia e manejo de plantas danninhas*. R.S Oliveira Jr. et al.(Eds).Cap 7. 51p.
- Perez-Jones. A. y Kogan, M. (2003). Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Research* 43:12-19.
- Perez-Jones, A.; Park, K.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C.; Shaner, D. (2005). Identification of Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Science*. Vol. 53, No. 6 (Nov.-Dec., 2005), pp. 775-779.
- Perez-Jones, A.; Park, K.; Polge, N.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C. (2007). Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226, 395–404. doi: 10.1007/s00425-007-0490-6.
- Preston, C.; Wakelin, A.; Dolman, F.; Bostamam, Y.; Boutsalis, P. (2009). A Decade of Glyphosate-Resistant *Lolium* around the World: Mechanisms, Genes, Fitness, and Agronomic Management. *Weed Science* 2009 57:435–441.
- Puricelli, E.; Faccini, D. (2009). Efecto de la dosis de glifosato sobre la biomasa de malezas de barbecho al estado vegetativo y reproductivo. *Planta Daninha, Viçosa-MG*, v. 27, n. 2, p. 303-307, 2009
- Ribeiro, D.; Gil, D.; Cruz-Hipólito, H.; Ruiz-Santaella, J.; Christoffoleti, P.; Vidal, R.; De Prado, R. (2008). Rapid assays for detection of glyphosate-resistant *Lolium* spp. *J. Plant Dis. Prot.* 21, 95-100.
- Schabenberger, O.; Tharp, B.; Kells, J.; Penner, D (1999). Statistical Tests for Hormesis and Effective Dosages in Herbicide Dose Response. Published in *Agron. J.* 91:713–721 (1999).
- Seefeldt, S.; Jensen, J.; Fuerst, E. (1995) Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technol* 9:218–225.
- Shaner, D. (2006). An overview of glyphosate mode of action: why is it such a great herbicide. *North Central Weed Science Society Proceedings* 61:94.
- Shaner, D.; Nadler-Hassar, T.; Brien Henry, W.; Koger, C. (2005). A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs *Weed Science*, 53:769–774. 2005.
- Singh, B.; Shaner, D. (1998). Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology* 12: 527-530.
- Suzukawa A. K.; Bobadilla L. K.; Mallory-Smith, C.; Brunharo, C. A. (2021) Non-target-Site Resistance in *Lolium* spp. Globally: A Review. *Front. Plant Sci.*, 22 January 2021 | <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.609209>
- Tehranchian, P.; Nandula, V.; Jugulam, M.; Puttacc, K.; Jasieniuk, M.; (2018). Multiple

- resistance to glyphosate, paraquat and ACCase-inhibiting herbicides in Italian ryegrass populations from California: confirmation and mechanisms of resistance. *Pest Manag Sci* 2018; 74: 868–877.
- Vargas, L.; Ruchel, Q.; Agostinetto, D.; Lamego, F.; Langaro, A.; Piesanti, S. (2016). Verification of the mechanism of glyphosate resistance in Italian ryegrass biotypes. *Planta Daninha, Viçosa-MG*, v. 34, n. 3, p. 565-573.
- Vázquez-García, J.G.; Castro, P.; Cruz-Hipólito, H.E.; Millan, T.; Palma-Bautista, C.; De Prado, R. (2021) Glyphosate Resistance Confirmation and Field Management of Red Brome (*Bromus rubens* L.) in Perennial Crops Grown in Southern Spain. *Agronomy* 2021, 11, 535. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030535>
- Vencill, W.; Nichols, R.; Webster, T.; Soteres, J.; Mallory-Smith, C.; Burgos, N.; Johnson, W.; McClelland, M. (2012). Herbicide Resistance: Toward an Understanding of Resistance Development and the Impact of Herbicide-Resistant Crops. *Weed Science* 2012 Special Issue: 2–30.
- 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.
- Wakelin, A.; Lorraine-Colwill, D.; Preston, C. (2004). Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Res.*, v. 44, n. 6, p. 453-459, 2004.
- Weed Science Society of America (1998), *Weed Technology*, vol. 12, issue 4 (October-December, 1998, p. 789)
- Yanniccari, M.; Istilart, C.; Giménez, D.; Castro, A. (2012). Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. *Crop Protection* 32 (2012) 12-16
- Yanniccari, M. (2014). Estudio fisiológico y genético de biotipos de *Lolium perenne* L. resistentes a glifosato. Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de La Plata. Tesis 229 p.
- Yanniccari, M.; Gómez-Lobato, M.; Istilart, C.; Natalucci, C.; Giménez, D.; Castro, A. (2017). Mechanism of Resistance to Glyphosate in *Lolium perenne* from Argentina. *Front. Ecol. Evol.* 5:123. doi: 10.3389/fevo.2017.00123.
- Zadoks, J.; Chang, T.; Konzak, C. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 1974, Volume 14. 415-421

Original recibido (18/03/22)
Original aceptado (31/10/22)