

MECANISMOS DE RESISTENCIA DE PAJA RUGOSA (*Ischaemum rugosum* Salisb.) AL HERBICIDA BISPIRIBAC-SODIO EN EL CULTIVO DE ARROZ

Sandra Torres¹ y Aída Ortiz¹

RESUMEN

La paja rugosa (*Ischaemum rugosum* Salisb) es una maleza difícil de controlar en arrozales venezolanos. El objetivo de este trabajo fue determinar el mecanismo de resistencia de accesiones de *I. rugosum* a bispiribac-sodio y su patrón de resistencia cruzada a otros herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintetasa (ALS). Se establecieron tres bioensayos referentes a: (1) sinergismo entre bispiribac-sodio y malatión, (2) actividad de ALS y (3) patrón de resistencia cruzada. En el primero se establecieron bioensayos de respuesta a dosis con las accesiones resistentes (R): IR90G, IR269P e IR301CO con dosis crecientes de bispiribac-sodio solo o con 1000 g·ha⁻¹ i.a. de malatión asperjado 24 horas antes (0; 5; 10; 20; 40; 80; 160 y 320 g·ha⁻¹ i.a.) y la accesión susceptible (S): IR143G (0; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 y 20 g·ha⁻¹ i.a.). En el segundo, se tomaron extractos de tejido de plantas R y S las cuales se incubaron en concentraciones de 0, 1, 10, 100, y 1000 nM de bispiribac-sodio. En el tercero se aplicó la dosis recomendada en la etiqueta de los herbicidas: bispiribac-sodio (PTB), imazetapir+imazapir (IMI); nicosulfuron (SU) y penoxsulam (TP) a razón de 40; 154; 30 y 60 g·ha⁻¹ a.i., respectivamente. Los resultados mostraron que la accesión IR269P tiene dos mecanismos de resistencia a bispiribac-sodio, uno por alteración del sitio activo y otro ajeno al sitio de acción por degradación metabólica mediada por la enzima P450. En IR90G e IR301CO se determinó que la resistencia a bispiribac-sodio es debida a la alteración del sitio de acción de la ALS.

Palabras clave adicionales: Actividad enzimática, inhibidor de ALS, malatión, *Oryza sativa*, pirimidiltiobenzoato

ABSTRACT

Mechanisms of bispyribac-sodium herbicide resistance in wrinklegrass weed (*Ischaemum rugosum* Salisb.) in rice
Wrinklegrass (*Ischaemum rugosum* Salisb), is a weed very difficult to control in Venezuelan rice fields. The purpose of this study was to assess the bispyribac-sodium mechanisms of resistance in accessions of *I. rugosum* and its pattern of cross-resistance with others ALS-inhibiting herbicides. Three experiments were established: (1) Bioassays on synergism between bispyribac-sodium and malathion, (2) ALS activity and (3) Cross-resistance patterns bioassays. The first experiment corresponded to dose response bioassays, using the resistant (R) accessions: IR90G, IR269P and IR301CO, exposed to increasing doses of bispyribac-sodium alone and 1000 g·ha⁻¹ a.i. of malathion applied 24 hours before (0; 5; 10; 20; 40; 80; 160 and 320 g·ha⁻¹ a.i.) and the susceptible (S) accession IR143G (0; 0.312; 0.625; 1.25; 2.5; 5; 10 and 20 g·ha⁻¹ a.i.). In the second experiment, plant tissue extracts from both R and S accessions were incubated with concentrations of 0, 1, 10, 100, and 1000 nM of bispyribac sodium, and in the third one were applied the recommended dosages indicated in the labels of the following herbicides; bispyribac-sodium (PTB), imazethapyr + imazapyr (IMI); nicosulfuron (SU) and penoxsulam (TP) at 40; 154; 30 and 60 g·ha⁻¹ a.i., respectively. The results showed that the IR269P accession has two bispyribac sodium resistance mechanisms; by the alteration of the herbicide active site and a mechanism outside the site of action, a metabolic degradation mediated by the enzyme P450. It was determined that the bispyribac-sodium resistance displayed by the accessions IR90G and IR301CO is due to the alteration of the site of action of ALS.

Additional key words: ALS inhibitor, enzymatic activity, malathion, *Oryza sativa*, pyrimidinylthiobenzoates

INTRODUCCIÓN

Entre las malezas que reducen el rendimiento del arroz en Venezuela está la paja rugosa (*Ischaemum rugosum* Salisb.) que tiene un ciclo similar al cultivo, produce acame afectando su cosecha y es hospedante de insectos plagas y patógenos económicamente importantes para el

cultivo de arroz. Se estima que los productores destinan del 10 al 30 % de los costos de producción de arroz al manejo de malezas. A mayor dificultad en el control por problemas de evolución de resistencia de la maleza mayor sería la necesidad de inversión, que incluso podría llevar a la pérdida total del cultivo.

La paja rugosa es originaria de Asia y se

Recibido: Agosto 31, 2016

Aceptado: Febrero 28, 2017

¹Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay, Venezuela.
e-mail: sandra.america.13@gmail.com; aidaortiz@gmail.com.

encuentra ampliamente distribuida en los trópicos (Holm, 1977); es una planta con metabolismo C_4 , razón por la cual ha podido adaptarse a ambientes calurosos, secos, húmedos y de alta intensidad lumínica mientras que el arroz es una planta C_3 con menor capacidad de adaptación (Baki y Nabi, 2003). *I. rugosum* crece y se reproduce más eficientemente en condiciones de anegamiento. La interferencia entre el cultivo de arroz e *I. rugosum* produce reducciones entre 68 % y 90 % del rendimiento (Pabón, 1982; Hernández et al., 1999). *I. rugosum* es muy prolífica y puede producir hasta 18.000 semillas por planta al año (Bakar y Ahmed, 2003).

La resistencia es la capacidad hereditaria natural que tienen algunos biotipos de una población de malezas para sobrevivir y reproducirse después de ser tratadas con un herbicida que aplicado en condiciones normales (de ambiente y operación), controlaría efectivamente esa población (Fischer y Valverde, 2010). Los herbicidas que inhiben la enzima acetolactato sintetasa (ALS) tienen el mayor número de biotipos con resistencia (Heap, 2016).

En Venezuela se ha encontrado resistencia de la paja rugosa a inhibidores de ALS como bispiribac-sodio (PTB) (Zambrano y Espinoza, 2005; Ortiz et al., 2013); imazetapir+imazapir (IMI) (Taccarelli, 2011) y pyribenzoxim (PTB) (Sifuentes, 2012); inhibidores de ACCasa: profoxidim (DIMs) (Ortiz et al., 2015) y fenoxaprop-etilo (FOPs) (Rodríguez, 2013); inhibidores del transporte de electrones en el fotosistema II: propanil (Medina, 2012) e inhibidores de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DOXP): clomazone (Palencia, 2012).

Hay dos mecanismos bioquímicos que confieren resistencia a los herbicidas, uno relacionado con la insensibilidad del sitio de acción y otro ajeno al sitio de acción vinculado con el metabolismo del herbicida (catabolismo). El metabolismo puede involucrar la descomposición del herbicida a metabolitos inactivos, el secuestro de los herbicidas (falta de acción debido a la separación física o temporal del herbicida de los tejidos sensibles o lugares objetivos) o una absorción reducida (Devine y Preston, 2000).

Bispiribac-sodio es un herbicida de la familia de los pirimidiniltiobenzoato (PTB) que inhiben la enzima acetolactato sintetasa (ALS) (Devine et al., 1993). El objetivo de este trabajo fue determinar

el mecanismo de resistencia de accesiones de *I. rugosum*, representativas de arrozales de tres estados de Venezuela, al herbicida bispiribac-sodio y su patrón de resistencia cruzada a otros herbicidas inhibidores de ALS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las accesiones utilizadas en los tres experimentos desarrollados en este trabajo pertenecen al germoplasma de malezas del Laboratorio de Malezas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Las semillas fueron recolectadas en fincas con un historial de más de diez años de aplicación de bispiribac-sodio y donde se observaron fallas en el control de *I. rugosum* por la aplicación de este herbicida, cuando se encontraron en madurez fisiológica en fincas productoras de arroz de los estados Guárico, Portuguesa y Cojedes. En este trabajo se realizaron tres tipos de bioensayos, uno de respuesta a dosis, con y sin malatión, el segundo de sensibilidad de la enzima acetolactato sintetasa (ALS) y el tercero de patrón de resistencia cruzada.

Bioensayos sobre sinergismo bispiribac-sodio y malatión. Se establecieron experimentos de respuesta a dosis en plantas completas con tres accesiones de *I. rugosum* resistentes (R) a bispiribac-sodio: IR90G (Parcela 532, municipio Francisco de Miranda, estado Guárico) (8° 46' N, 67° 40' W), IR269P (Agrícola Morrococoy, Santa Cruz, municipio Turén, estado Portuguesa) (9° 18' N, 68° 58' W) e IR301CO (Samán de Tigre, municipio Anzoátegui, estado Cojedes) (9° 36' N, 68° 48' W), y con una accesión susceptible (S) IR143G (Estación Experimental INIA, municipio Francisco de Miranda, estado Guárico) (8° 44' N, 67° 30' W) (Ortiz et al., 2013). A las accesiones R se les aplicaron ocho dosis crecientes de bispiribac-sodio (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 $g \cdot ha^{-1}$ i.a.) solo o con 1000 $g \cdot ha^{-1}$ i.a. malatión (insecticida organofosforado inhibidor de la enzima citocromo P450 monooxigenasa) asperjado 24 horas antes que el herbicida, mientras que a la accesión S se le asperjó un menor rango de dosis de bispiribac-sodio (0; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; 5; 10 y 20 $g \cdot ha^{-1}$ i.a.) solo y con malatión, tal como se señaló anteriormente.

Los experimentos se establecieron en un invernadero con condiciones de crecimiento de

temperatura 30 ± 5 °C, humedad relativa 80 ± 5 %, fotoperiodo de 12 horas e irradiancia natural de $1600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La duración del ensayo fue de dos meses.

A las semillas se les rompió latencia colocándolas en matraces con una solución de nitrato de potasio al 0,25 % e inyección de aire a través de una bomba de pecera; luego de tres días, las semillas germinadas se trasplantaron sobre la superficie de 500 g de suelo (serie Maracay, textura franca y pH = 6,54) contenido en potes de $638,39 \text{ cm}^3$. Los potes se ubicaron en una piscina bajo una lámina de agua constante de 10 cm de alto, la cual no sobrepasaba la superficie del suelo en los potes, manteniendo el suelo saturado. Los experimentos se fertilizaron 72 horas después de la aplicación del herbicida mediante la adición del fertilizante Energy 18-10-4, más micro-elementos, a razón de $5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con cinco repeticiones. El experimento se repitió dos veces para su validación. Los potes se rotaron cada tres días en las piscinas del invernadero. Cuando las plántulas se encontraban en el estadio fisiológico de tres a cuatro hojas se les aplicó los tratamientos con malatión y bispiribac-sodio. Tanto el insecticida como el herbicida se aplicaron utilizando una cámara de aspersión calibrada a una descarga de $100 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$, bajo una presión de 0,25 MPa y empleando una boquilla de abanico plano 8002E. Veinticuatro horas antes de la aspersión de bispiribac-sodio se aplicó el insecticida malatión a razón de $1000 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ i.a., posteriormente se asperjó el herbicida a dosis crecientes según lo señalado anteriormente. A la solución con herbicida se añadió el surfactante no iónico, siliconado, con regulador de pH (Break Thru) a razón de $40 \mu\text{L}$ en 200 mL de solución de herbicida.

Con los datos de peso fresco, expresados como porcentaje de crecimiento respecto al promedio del testigo sin herbicida, se calculó la dosis de efecto medio (ED_{50} , dosis para la cual se reduce el crecimiento de plantas tratadas a un 50 % del de plantas no tratadas) para cada accesión y el correspondiente índice de resistencia ($\text{IR} = \text{ED}_{50}\text{R}/\text{ED}_{50}\text{S}$).

La inhibición de la enzima citocromo P450 monooxigenasa se determinó usando la metodología para la detección de sinergismo, en la cual se cuantifica la modificación del ED_{50}

mediante curvas de respuesta a dosis. El sinergismo sucede cuando el efecto de dos xenobióticos mezclados es mayor que la suma de los efectos individuales de cada componente. Es importante resaltar que un sinergista puede no tener efecto herbicida, actuando sólo en la prevención del catabolismo del herbicida (o de sus metabolitos tóxicos) o simplemente facilitando la absorción o translocación del herbicida. La detección del sinergismo se comprueba por la reducción del ED_{50} lograda al mezclar dos herbicidas. Esto se detecta por un cambio significativo en el coeficiente de pendiente de la curva de regresión ajustada a los datos; el valor de la ED_{50} concomitantemente se reduce (Fischer, 2009).

Bioensayos de actividad de ALS. La inhibición de la enzima ALS en respuesta al herbicida bispiribac-sodio fue determinado *in vitro* utilizando extractos crudos de proteína de plantas 15 días después de la siembra de las accesiones IR90G(R), IR269P(R), IR301CO(R) y IR143G(S) de *I. rugosum*. Las condiciones de siembra y crecimiento fueron tal como se detalló en la sección anterior. Se tomaron dos gramos de tejido foliar de plantas de cada accesión y se aplicó el método de Osuna et al. (2002) para la extracción y medición de la actividad de la enzima ALS, la cual se estimó cuantificando la conversión del producto acetolactato a acetoina por descarboxilación en presencia de ácido (nmol de acetoina $\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}$ proteína $^{-1}$) (Ray, 1984). Las dosis de bispiribac-sodio usadas fueron 0, 1, 10, 100 y 1000 nM. Los datos se expresaron como porcentaje de la media del tratamiento control sin herbicida. El máximo de actividad se midió en ausencia del herbicida bispiribac-sodio. El experimento se realizó bajo un diseño experimental completamente aleatorizado con tres repeticiones y una duración de cuatro meses. Se calculó la dosis de efecto medio (I_{50}) en el punto de inflexión entre el efecto inhibitorio máximo y la actividad del control para cada accesión, y el índice de resistencia ($I_{50}\text{R}/I_{50}\text{S}$).

Bioensayos sobre patrón de resistencia cruzada. Este experimento se realizó con las accesiones R (IR90G, IR269P e IR301CO) y el testigo S (IR143G). Se trataron plántulas en el estadio fisiológico de tres a cuatro hojas con la dosis de etiqueta, en $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ i.a., de los herbicidas siguientes: bispiribac-sodio (40), imazapir (38,5) + imazetapir (115,5), nicosulfuron (30) y

penoxsulam (60). Se estableció un tratamiento testigo sin herbicida. A los 21 días luego de las aplicaciones se cosechó la parte aérea de las plantas. El diseño experimental fue completamente aleatorizado con cinco repeticiones. Tanto la aplicación del herbicida, las condiciones de crecimiento y la cosecha se realizaron como en los experimentos anteriores y los datos de peso fresco se expresaron como porcentaje de control con respecto al promedio del testigo sin herbicida. La duración del ensayo fue de dos meses.

Los datos de respuesta a dosis y actividad ALS provenientes de experimentos repetidos se juntaron para el análisis; su distribución normal se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilks y diagramas de distribución de los errores permitieron inferir homogeneidad de varianzas. Se efectuó un análisis de regresión ajustando modelos que describían adecuadamente las tendencias y minimizaban el cuadrado medio del error.

Se ajustó un modelo de regresión no lineal log-logístico de tres parámetros a la respuesta de plantas enteras a dosis del herbicida de las accesiones R y cuatro parámetros para la S (Streibig et al., 1993; Seefeldt et al., 1995), mientras que para la actividad de la enzima ALS se logró un buen ajuste con el modelo de tres parámetros para todas las accesiones analizadas.

Los modelos fueron los siguientes:

$$Y = d/[1 + (x/ED_{50})^b] \quad (R)$$

$$Y = c + (d-c)/[1 + (x/ED_{50})^b] \quad (S)$$

donde Y es el porcentaje de crecimiento, c es la respuesta media cuando la dosis de herbicida tiende a valores muy elevados, d es la respuesta media cuando la dosis de herbicida tiende a cero, b es la pendiente de la curva, ED_{50} es la dosis de herbicida en el punto de inflexión y x es la dosis de herbicida. El índice de resistencia (IR) fue determinado como la división del ED_{50} de IR90(R), IR269(R) e IR301(R) entre el susceptible (IR143).

El análisis de regresión se realizó utilizando el programa Sigma Plot v. 12 (Systat Software. San Jose, CA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo sobre sinergismo bispiribac-sodio y malatión. Las dosis de bispiribac-sodio solo o con malatión requeridas para inhibir el 50 % del crecimiento (ED_{50}) de las accesiones IR90G(R), IR269P(R), IR301CO(R) e IR143(S) de *I.*

rugosum en el bioensayo de respuesta a dosis en plantas completas y los parámetros de las ecuaciones usados para estimar esta dosis se presentan en el Cuadro 1.

IR269P mostró una reducción del ED_{50} cuando se aplicó malatión, por lo tanto se considera que el insecticida inhibió a la enzima P450 citocromo monooxigenasa y aceleró el catabolismo del bispiribac-sodio, demostrando que tiene un mecanismo de resistencia ajeno al sitio de acción (Cuadro 1).

Por el contrario, en IR90G e IR301CO de *I. rugosum*, tratadas con bispiribac-sodio solo y malatión, no se observaron reducciones en sus ED_{50} (Cuadro 1 y Figura 1), por lo que se infiere que no hubo sinergismo entre estos dos xenobióticos debido a que la dosis de 1000 g·ha⁻¹ i.a. de malatión no inhibió a la isoenzima citocromo P450 monooxigenasa. El mecanismo de resistencia ajeno al sitio de acción hasta ahora no pudo ser demostrado en ellas, por lo que se sugiere ser investigado más exhaustivamente con otros inhibidores del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa (amino-benzotriazol, butóxido de piperonilo, entre otros) o el inhibidor de glutatona S-transferasa (tridiphane).

Estos resultados muestran que de las accesiones evaluadas, IR90G e IR301CO poseen diferentes isoenzimas de P450 que la IR269P, producto quizás de diferentes procesos de selección de la resistencia a bispiribac-sodio debido al manejo de malezas aplicado.

No obstante, las accesiones IR90G, IR269P e IR301CO mostraron un alto grado de resistencia, dado que la máxima dosis de bispiribac-sodio usada en estos bioensayos de ocho veces la dosis recomendada en la etiqueta (320 g·ha⁻¹ i.a.) no redujo al 50 % del crecimiento, mientras que la accesión IR143G fue muy susceptible, ya que con sólo la quinceava parte de la dosis comercial de bispiribac-sodio (2,53 g·ha⁻¹ i.a.) se suprimió el 50 % de su crecimiento (Figura 1).

El mecanismo de resistencia ajeno al sitio de acción se ha reportado también en una maleza del cultivo de arroz, *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv., la cual es resistente a bispiribac-sodio e imazamox debido a la reducción del transporte de estos herbicidas hasta el plastidio donde se hace la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Riar et al., 2013) y a penoxsulam por degradación acelerada mediada por P450 (Riar et al., 2012), *Echinochloa colona* (L.) Link., a cihalofop-p-

butilo, fenoxaprop-p-etilo y bispiribac-sodio debido a la degradación acelerada mediada por el complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa (Zambrano et al., 2009). En *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koso-Pol. la

resistencia a bispiribac-sodio está regulada por siete genes que codifican la enzima P450, siendo los niveles de transcripción de CYP71AK2 y CYP72A254 mayormente en el biotipo resistente que en el susceptible (Iwakami et al., 2013).

Cuadro 1. Ecuaciones y parámetros de regresión utilizados para estimar la dosis de bispiribac-sodio requerida para reducir al 50 % la biomasa (ED_{50}) o la actividad ALS (I_{50}) en plantas de *I. rugosum* susceptibles (S) y resistentes (R) a este herbicida e índices de resistencia (R/S)

Accesión	Ecuación	Parámetros de regresión				R^2	P	IR
		b	c	d	ED_{50} (g·ha ⁻¹ i.a.)			
IR143G(S)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^{b^{\dagger}}]$	-3,50	0,67	93,98	2,53	0,88	P<0,0001	
IR143G(S) + malatión	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^{b^{\dagger}}]$	-2,63	0,29	96,23	1,32	0,9481	P<0,0001	
IR90G(R)	$Y = d / [1 + (x/ED_{50})^{b^{\dagger}}]$	0,89	-	102,63	>320	0,26	P<0,0001	No calculable ^a
IR90G(R) + malatión	$Y = d / [1 + (x/ED_{50})^{b^{\dagger}}]$	0,28	-	100,15	>320	0,28	P<0,0458	No calculable ^a
IR269P(R)	$Y = d / [1 + (x/ED_{50})^{b^{\dagger}}]$	1,47	-	118,19	1002,85	0,11	P<0,0108	396,38
IR269P(R) + malatión	$Y = d / [1 + (x/ED_{50})^{b^{\dagger}}]$	1,66	-	104,14	190,49	0,36	P<0,0001	75,29
IR301CO(R)	$Y = d / [1 + (x/ED_{50})^{b^{\dagger}}]$	1,65	-	104,14	>320	0,11	P<0,0001	No calculable ^a
IR301CO(R) + malatión	$Y = d / [1 + (x/ED_{50})^{b^{\dagger}}]$	3,41	-	177,59	>320	0,47	P<0,0001	No calculable ^a

Accesión	Ecuación	Parámetros de regresión				R^2	P	IR
		b	c	d	I_{50} (nM)			
IR143G(S)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/I_{50})^{b^{\dagger}}]$	-0,35	-1,48	100,00	0,02	0,62	P<0,0001	
IR90G(R)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/I_{50})^{b^{\dagger}}]$	-0,34	-11,16	99,70	113,89	0,96	P<0,0001	5694,50
IR269P(R)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/I_{50})^{b^{\dagger}}]$	-0,60	-4,22	99,38	270,75	0,89	P<0,0108	13.500,00
IR301CO(R)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/I_{50})^{b^{\dagger}}]$	-0,72	23,96	102,42	12,48	0,91	P<0,0108	624,00

[†]Y es el peso fresco o la actividad ALS específicos expresados como porcentaje sobre del testigo sin herbicida, x: variable independiente, c y d: coeficientes correspondientes a la asíntota inferior y superior, b: pendiente de la línea, ED_{50} e I_{50} : dosis o concentración de herbicida necesaria para reducir el crecimiento o la actividad ALS al 50%, respectivamente (Streibig et al., 1993), R^2 : estimación del coeficiente de determinación, P: nivel de significancia, IR: índice de resistencia (ED_{50} R/ ED_{50} S). a: Los valores de ED_{50} de las accesiones resistentes (IR90 e IR301) se encuentran fuera del rango de dosis estudiadas y los índices de resistencia (R/S) correspondientes no pueden ser calculados. Sufijos G, P y CO: denominación de las accesiones significan Guárico, Portuguesa y Cojedes, respectivamente

Contrariamente al efecto inhibitor del malatión de las P450 se ha encontrado que el 2,4 D aplicado antes del herbicida diclofop-metilo fue inductor de P450 por lo que la degradación del herbicida fue significativamente (1,8 veces) más rápida en plantas tratadas que en las no tratadas con este herbicida auxínico, efecto que puede ser revertido con malatión (Han et al., 2013).

Bioensayos de actividad de ALS. El bioensayo sobre actividad enzimática demostró que la ALS de las accesiones resistentes IR90G, IR269P e IR301CO es insensible a bispiribac-sodio dado que mostraron altos índices de resistencia, mientras que la ALS extraída de IR143G (S) fue inhibida por este herbicida (Figura 1).

Estos resultados comprueban que IR90G, IR269P e IR301CO poseen un mecanismo de resistencia a bispiribac-sodio por alteración en la enzima ALS que impide la biosíntesis de los

aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Esto pudiera deberse a una mutación en el gen que codifica la enzima ALS, tal como lo sugieren estudios que relacionan altos índices de resistencia en plantas completas con alteraciones en el sitio de acción de herbicidas inhibidores de la ALS, observados por ejemplo en *Fimbristylis miliaceae* (L.) Vahl con resistencia a pirazosulfurón (Ortiz et al., 2012), *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. Clayton a nicosulfuron (Gámez et al., 2013), *Mysoton aquaticum* (L.) a tribenuron (Liu et al., 2013) y *E. crus-galli* a imazamox, imazetapir, y penoxsulam (Riar et al., 2013).

La resistencia de sitio activo a sulfonilureas demostrada en *M. aquaticum* a tribenuron se debe a mutaciones en el gen que codifica la enzima ALS en la sustitución de la posición Pro197 que también muestra algunos patrones de resistencia cruzada a piritiobac-sodio, florasulam y piroxulam pero no

tuvo resistencia a imazapir (Liu et al., 2013); en *Poa annua* L., la mutación en Trp574 a Leu produjo resistencia cruzada a foramsulfurón, trifloxisulfurón, bispiribac-sodio e imazaquin (Scott et al., 2013). La sustitución de Ala122 a val y Ala122 a Thr en *E. crus-galli* a inhibidores de ALS (Riar et al., 2013). *Echinochloa oryzicola* Vasing., tiene resistencia cruzada a penoxsulam, bispiribac en sodio, imazamox, foramsulfurón, nicosulfurón y rimsulfurona debido a la sustitución de Trp574 por Leu (Kaloumenos et al., 2013). *E. phyllopogon* tiene resistencia a quinclorac por al menos dos mecanismos, falta de sensibilidad a lo largo de la

ruta de respuesta mediante el cual quinclorac induce la producción de etileno y una mayor actividad β -CAS, que deberían permitir una mayor desintoxicación HCN, después de la estimulación del quinclorac a biosíntesis de etileno (Yasuor et al., 2011).

Bioensayos sobre patrón de resistencia cruzada. IR90G, IR269P e IR301CO mostraron resistencia cruzada entre bispiribac-sodio (pimimidinil tiobenzato, PTB), imazapir + imazetapir (imidazolinonas, IMI) y nicosulfurón (sulfonilurea, SU), no obstante fueron tolerantes a penoxsulam triazolopirimidina (TP) (Cuadro 2).

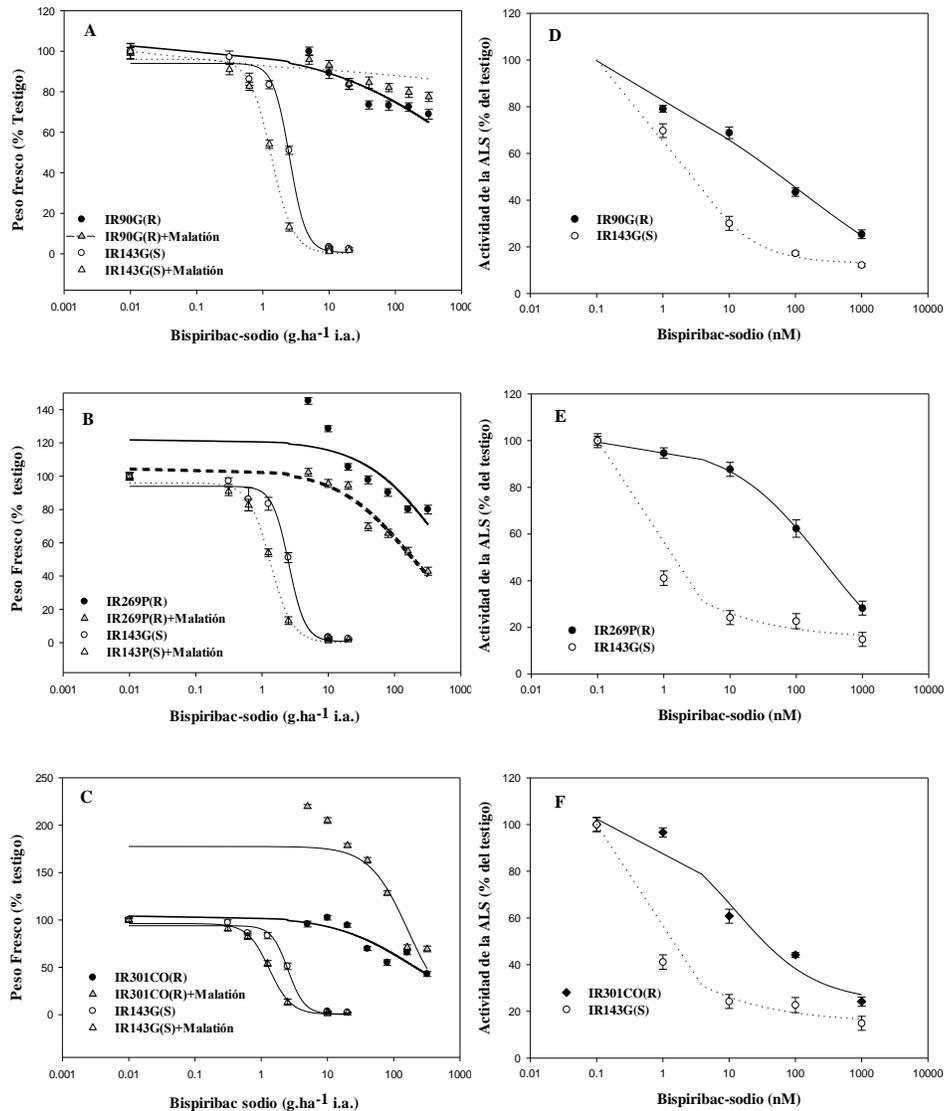


Figura 1. Peso fresco (A, B y C) y actividad específica de la enzima ALS (nmol de acetoina·h⁻¹·mg⁻¹ proteína) medida en extractos de plantas (D, E y F) de accesiones susceptibles y resistentes de *I. rugosum* como porcentaje del testigo susceptible IR143G, en respuesta a dosis crecientes de bispiribac-sodio. Los parámetros de las regresiones ajustadas se presentan en el Cuadro 1

Cuadro 2. Peso fresco como porcentaje del testigo sin tratar de accesiones de *I. rugosum* provenientes de arrozales de los estados Guárico y Portuguesa en respuesta a diferentes herbicidas

Accesiones	Bispiribac-sodio		Imazapir +imazetapir		Nicosulfuron		Penoxsulam		T
	40 g·ha ⁻¹ i.a.	R ó S	154 g·ha ⁻¹ i.a.	R ó S	30 g·ha ⁻¹ i.a.	R ó S	60 g·ha ⁻¹ i.a.		
IR90G	89,01 bc	R	53,94 c	R	55,38 b	R	98,31 ab	T	
IR269P	66,34 c	R	84,28 b	R	107,96 a	R	113,39 a	T	
IR301CO	98,56 ab	R	96,52 ab	R	97,52 a	R	35,34 c	T	
IR143G	5,12 d	S	3,78 d	S	4,82 c	S	84,81 b	T	
CV (%)	18,50		19,37		20,01		9,34		

R: resistente, S: Susceptible, T: Tolerante, Bispiribac-sodio: pirimidiniltiobenzoato (PTB), Imazapir + imazetapir: imidazolinona (IMI), nicosulfuron (sulfonilurea), Penoxsulam: triazolopirimidina (TP). Medias en columnas con letras iguales no difieren estadísticamente al 5 % según la prueba de Tukey. Sufijos G, P y CO en la denominación de las accesiones significan Guárico, Portuguesa y Cojedes, respectivamente

Han sido descritas en la página Web de la Sociedad Americana de Malezas (Heap, 2016) ocho mutaciones puntuales en dicho gen, seis de éstas implican sustituciones no sinónimas que han sido asociadas con la resistencia cruzada entre IMI, PTB y SU en diferentes especies de malezas, tal como Pro197Thr en *Chrysanthemum coronarium* L. [*Glebionis coronarium* (L.) Tzvelev] (Tal y Rubin, 2004); Pro197 Arg y Pro197Ala en *Papaver rhoeas* L. (Kaloumenos et al., 2011); Ala205Val en *Xanthium strumarium* L. (Woodworth et al., 1996); Asp376Glu en *Amaranthus powellii* S. Watson (Ashigh et al., 2009) y en *Conyza canadensis* (L.) Cronquist (Zheng et al., 2011); Trp574 Leu en *X. strumarium* (Bernasconi et al., 1995), en *P. annua* (Scott et al., 2013), en *Amaranthus blitoides* S.Watson (Sibony y Rubin, 2003), en *Schoenoplectus juncooides* (Roxb) Palla (sinonimia *Scirpus juncooides* Roxb. var. Ohwianus) (Uchino et al., 2007), en *Bidens subalternans* DC. (Lamego et al., 2009); en *S. mucronata* (Cruz-Hipólito et al., 2009), en *E. oryzicola* (Kaloumenos et al., 2013), en *E. crus-galli* (Panozzo et al., 2013); Ser653Ile y Ser653Asn en *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (Laplanche et al., 2009).

Cualquiera de las seis sustituciones señaladas anteriormente pudiese estar causando el patrón de resistencia cruzada de *I. rugosum* a bispiribac-sodio, imazapir + imazetapir y nicosulfuron. Dado que no se encontró en la literatura información sobre el origen de la resistencia a herbicidas en esta maleza, este estudio previo tiene la intención de orientar la futura investigación del Laboratorio de Malezas de FAGRO-UCV en el uso de técnicas en bioinformática para el alineamiento de secuencias de ADN y así diseñar los oligonucleótidos adecuados para la amplificación de los dominios

conservados de la ALS mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a través del análisis de sus secuencias nucleotídicas se determinaría la presencia de mutaciones asociadas a esta resistencia y a estos tres herbicidas. No obstante, solamente tres sustituciones (Trp574Leu, Ser653Ile y Ser653Asn) han sido relacionadas con resistencia cruzada a IMI, PTB y SU en especies de la familia Poaceae (*E. oryzicola*, *E. crus-galli* y *S. viridis*) (Laplanche et al., 2009; Kaloumenos et al., 2013; Panozzo et al., 2013).

Las poblaciones resistentes a herbicidas por alteración del sitio de acción se pueden manejar usando herbicidas con otros mecanismos de acción, lo que incluye herbicidas no selectivos usados en presiembrta tales como glifosato y paraquat. No obstante, IR90G de *I. rugosum* también tiene resistencia a propanil (inhibidor del transporte de electrones en el Fotosistema II) (Medina, 2012), profoxidim y fenoxaprop (inhibidores de la enzima ACCasa) (Ortiz et al., 2015, Rodríguez, 2013), clomazone (Palencia, 2012) y pendimetalin (datos no publicados), implicando que esta accesión ha evolucionado en resistencia a los únicos herbicidas postemergentes y dos preemergentes selectivos al arroz, complicando notoriamente su manejo. Sin embargo, se ha encontrado un control eficaz de esta accesión R con los herbicidas preemergentes oxadiazón (Bernales, 2012), butacloro y oxifluorfen, así como con uno no selectivo (glifosato) (datos no publicados), por lo cual se podrían incluir en un programa de mitigación de la resistencia de *I. rugosum* en el país.

CONCLUSIONES

IR269P tiene dos mecanismos de resistencia a

bispiribac-sodio, uno por alteración del sitio activo y otro ajeno al sitio de acción por degradación metabólica mediada por la enzima P450.

Se comprobó que el mecanismo de resistencia de IR90G e IR301CO a bispiribac-sodio se debe a una modificación en el lugar de acople del herbicida en su sitio activo.

IR90G, IR269P e IR301CO mostraron resistencia cruzada a bispiribac-sodio (PTB), imazapir+imazetapir (IMI) y nicosulfuron (SU), y fueron tolerantes a penoxsulam (TP), lo que permitirá monitorear la posible mutación de la ALS a nivel de cambios en tres sustituciones (Trp574Leu, Ser653Ile y Ser653Asn) que han sido relacionadas con resistencia cruzada a IMI, PTB y SU, lo que significa un gran aporte para futuras líneas de investigación.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación ha sido posible gracias al aporte financiero y logístico del Vicerrectorado Académico de la UCV, Consejo de Desarrollo Científico y humanístico-UCV, FONTAGRO-FTG-0608-RG-Arroz, AGROISLEÑA y AGROTEBOR, C.A Proyecto manejo Integrado de Malezas en Arroz (MIMA)-LOCTI y Universidad de California, Davis.

LITERATURA CITADA

- Ashigh, J., C.L. Corbett, P.J. Smith, J. Laplante y F.J. Tardif. 2009. Characterization and diagnostic tests of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors due to an Asp376Glu substitution in *Amaranthus powellii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95: 38-46.
- Bakar, B. y L. Ahmed. 2003. Seed germination, seedling establishment and growth patterns of wrinklegrass (*Ischaemum rugosum* Salisb.). *Weed Biology and Management* 3: 8-14.
- Baki, B.B., L.A. Nabi. 2003. The population biology of wrinklegrass (*Ischaemum rugosum* Salisb.) seed and seedling dynamics. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 31: 53-66.
- Bernales, S. 2012. Evaluación del efecto del herbicida oxadiazón en el control de accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb., resistentes a propanil, bispiribac-sodio y/o profloridim, provenientes de arrozales en Venezuela. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 31 p.
- Bernasconi, P., A.R. Woodworth, B.A. Rosen, M.V. Subramanian y D.L. Siehl. 1995. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *Journal of Biological Chemistry* 270: 17381-17385.
- Cruz-Hipólito, H., M. Osuna, A. Vidal, I. Ribas y R. Prado. 2009. Resistance mechanism to bensulfuron-methyl in biotypes of *Scirpus mucronatus* L. collected in chilean rice fields. *J. Agric. Food Chem.* 57(10):4273-4278.
- Devine, M. D. and C. Preston. 2000. The molecular basis of herbicide resistance. *In: A.H. Cobb y R.C. Kirkwood (eds.). Herbicides and Their Mechanisms of Action* CRC Press. Boca Raton, FL, USA. pp. 71-104.
- Devine, M.D., S.O. Duke y C. Fedtke. 1993. *Physiology of Herbicide Action*. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA. 441 p.
- Fischer, A.J. 2009. Evaluación de mezclas de herbicidas. *In: A. Anzalone y A. Ortiz (eds.). Actualización en Metodologías para la Investigación y el Desarrollo Tecnológico en las Ciencias de las Malezas*. Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas (SOVECOM). Barquisimeto. Venezuela. 100-107.
- Fischer A. y B. Valverde. 2010. Resistencia a herbicidas en malezas asociadas al arroz. *In: B. Degiovanni, V. Degiovanni, C. Martínez y O. Motta (eds.). Producción Eco-eficiente del Arroz en América Latina*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia. pp. 447-487.
- Gámez, A., C. Zambrano y C. Ramis. 2013. Caracterización metabólica y enzimática de la resistencia al herbicida nicosulfuron en biotipos de *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. Clayton. *Bioagro* 25(1): 3-10.
- Han, H., Q. Yu, G.R. Cawthray y S.B. Powles. 2013. Enhanced herbicide

- metabolism induced by 2,4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl. *Pest. Manag. Sci.* 69(9): 996-1000
13. Heap, I. 2016. International survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org/summary/SOASummary.aspx> (consulta del 29/09/2016).
 14. Hernández, W., H. Bastidas y J. Castro. 1999. Efecto de la competencia de *Ischaemum rugosum* sobre los componentes de rendimiento en el cultivo de arroz en Colombia. In: Compendio de Resultados. Tecnología para el Arroz en los 90. Fedearroz-Fondo Nacional del Arroz. Bogotá DC. Colombia. pp. 66-73.
 15. Holm, L, J. Plucnett y J. Herberg. 1977. The world's worst weed. Distribution and biology. The East-West Food Institute, University Press of Hawaii Honolulu.
 16. Iwakami S., A. Uchino, Y. Kataoka, H. Shibaike, H. Watanabe y T. Inamura. 2013. Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 57 (10): 4273-4278
 17. Kaloumenos, N.S., V.N. Adamouli, C.A. Dordas e I.G. Eleftherohorinos. 2011. Corn poppy (*Papaver rhoeas*) cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Pest management science* 67: 574-585.
 18. Kaloumenos, N.S., S.L. Chatzilazaridou, P. V. Mylona, A. N. Polidoros y I. G. Eleftherohorinos. 2013. Target-site mutation associated with cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides in late watergrass (*Echinochloa oryzicola* Vasing.). *Pest. Manag. Sci.* 69: 865-873.
 19. Lamego, F.P, D. Charlson, C.A. Delatorre, N. R. Burgos y R.A. Vidal. 2009. Molecular basis of resistance to als-inhibitor herbicides in greater beggarticks. *Weed Science* 57: 474-481.
 20. Laplante, J., I. Rajcan y F. J. Tardif. 2009. Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in *Setaria viridis*. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 577-585.
 21. Medina. B. 2012. Evaluación de la resistencia de *Ischaemum rugosum* Salisb. al herbicida propanil utilizado en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) en Venezuela. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 56 p.
 22. Ortiz A., L. Villarreal, S. Torres, M. Osuna, L. López, R. Figueroa, C. Zambrano, M. Cásares y A.J. Fischer. 2012. Resistencia de *Fimbristylis miliacea* al herbicida pirazosulfurón-etilo en campos de arroz del estado Guárico-Venezuela. *Interciencia* 37(3): 209-214.
 23. Ortiz, A., S. Blanco, G. Arana, L. López, S. Torres, Y. Quintana, P. Pérez, C. Zambrano y A. Fischer. 2013. Estado actual de la resistencia de *Ischaemum rugosum* Salisb. al herbicida Bispiribac-Sodio en Venezuela. *Bioagro* 25(2): 79-89.
 24. Ortiz, A., J.P. Moreno, R. Matheus, R., L. López-Méndez, S. Torres, C. Zambrano y A.J. Fischer. 2015. Estado actual de la resistencia de *Ischaemum rugosum* Salisb. al herbicida profoxidim en Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía-LUZ* 32(1): 21-40.
 25. Osuna, M. D., F. Vidotto, A. J. Fischer, D. E. Bayer, R. De Prado y A. Ferrero. 2002. Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73(1): 9-17.
 26. Palencia D. 2012. Evaluación de la resistencia de algunas accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb., al herbicida Clomazone (480 g·L⁻¹) recolectadas en arrozales de Venezuela. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 31 p.
 27. Pabón, H. 1982. Algunos aspectos biológicos de la maleza falsa caminadora *Ischaemum rugosum* en los Llanos Orientales. *Revista COMALFI*. 17:28-36.
 28. Panozzo, S., L. Scarabel, P. Tranel y M. Sattin. 2013. Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105(2): 93-101.
 29. Zambrano, C., D. Pérez y J. Lazo. 2009. Evaluación de la posible resistencia metabólica de poblaciones de *Echinochloa*

- colona* (L.) Link a los herbicidas Cyhalofop-Butyl, Clefoxydim, Fenoxaprop P-etil y Bispiribac sodio. In: *Herbología e Biodiversidade Numa Agricultura Sustentável*. Universidade Tecnica de Lisboa. Lisboa. pp. 511-515.
30. Ray, T. 1984. Site of action of chlorsulfuron-inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plan physiol.* 75: 827-831.
31. Riar, D.S., J.K. Norsworthy, J.A. Bond, M.T. Bararpour, M.J. Wilson y R.C. Scott. 2012. Resistance of *Echinochloa crus-galli* populations to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Agronomy Volume 2012, Article ID 893953, 8 pages doi:10.1155/2012/893953.
32. Riar D., J.K. Norsworthy, V. Srivastava, V. Nandula, J.A. Bond y R.C. Scott. 2013. Physiological and Molecular Basis of Acetolactate Synthase inhibiting Herbicide Resistance in Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *J. Agric. Food Chem.* 61(2): 278-289.
33. Rodríguez, J. 2013. Evaluación del control con el herbicida fenoxaprop-p-etil de algunas accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb., provenientes de arrozales de Venezuela. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 45 p.
34. Scott J., M. Flessner, Z. Wang, F. Dane, R. Walker y G. Wehtje. 2013. A Trp₅₇₄ to leu amino acid substitution in the ALS gene of annual bluegrass (*Poa annua*) is associated with resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Weed Science* 61(1): 21-25.
35. Seefeldt, S., J. Jensen y P. Fuerst. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose response relationships. *Weeds Technology* 9: 218-227.
36. Sibony, M. y B. Rubin. 2003. Molecular basis for multiple resistances to acetolactate synthase-inhibiting herbicides and atrazine in *Amaranthus blitoides* (prostrate pigweed). *Planta* 216: 1022-1027.
37. Sifuentes, R. 2012. Evaluación de la resistencia al herbicida pyribenzoxim en accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb., provenientes de arrozales venezolanos. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 32 p.
38. Streibig, J., M. Rudemo, M. y J. Jensen. 1993. Dose-response curves and statistical models. In: J. Streibig y P. Kudsk (eds.). *Herbicide Bioassays*. CRC. Boca Raton, FL. pp. 29-55.
39. Taccarelli, A. 2011. Evaluación de la resistencia de algunas poblaciones de *Ischaemum rugosum* Salisb al herbicida imazapir + imazetapir recolectadas en arrozales de Venezuela. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 41 p.
40. Tal, A. y B. Rubin. 2004. Occurrence of resistant *Chrysanthemum coronarium* to ALS inhibiting herbicides in Israel. *Resistant Pest Management Newsletter* 13: 31-33.
41. Uchino, A., S. Ogata, H. Kohara, S. Yoshida, T. Yoshioka y H. Watanabe. 2007. Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea-resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*. *Weed Biology and Management* 7: 89-96.
42. Woodworth, A., P. Bernasconi, M. Subramanian y B. Rosen. 1996. A second naturally occurring point mutation confers broad-based tolerance to acetolactate synthase inhibitors. *Plant Physiology* 111: S105.
43. Yasuor, H., M. Milan, J. W. Eckert y A. J. Fischer. 2011. Quinclorac resistance: a concerted hormonal and enzymatic effort in *Echinochloa phyllopogon*. *Pest. Manag. Sci.* 68: 108-115.
44. Zambrano, C. y H. Espinoza. 2005. Evaluación de la resistencia de biotipos de *Ischaemum rugosum* Salisb., al herbicida bispiribac sodio provenientes de campos arroceros de los estados Portuguesa y Guárico. *Anales de Botánica Agrícola* 12: 5-12.
45. Zheng, D., G.R. Kruger, S. Singh, V.M. Davis, P.J. Tranel, S. C. Weller y W.G. Johnson. 2011. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. *Pest. Manag. Sci.* 67: 1486-1492.