

CARACTERIZACIÓN METABÓLICA Y ENZIMÁTICA DE LA RESISTENCIA AL HERBICIDA NICOSULFURON EN BIOTIPOS DE *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. CLAYTON

Arnaldo Gámez¹, Castor Zambrano² y Catalina Ramis²

RESUMEN

Rottboellia cochinchinensis es una maleza de gran importancia y su control químico se basa principalmente en el uso del herbicida nicosulfuron; sin embargo, se ha observado una disminución del efecto del herbicida en el control de la maleza, la cual ha mostrado algunos índices de resistencia. Con la finalidad de caracterizar metabólicamente la resistencia de poblaciones de *R. cochinchinensis* al herbicida se hicieron una serie de experimentos que consistieron en la confirmación de la resistencia del biotipo seleccionado, a través de un análisis de regresión log-logística que permitió determinar el índice de resistencia (IR). El estudio de la naturaleza de la resistencia se realizó a través de una prueba de inhibición del complejo P₄₅₀ monooxigenasas con el uso de malatión, y una prueba enzimática *in vivo* donde se midió por colorimetría la acumulación de acetoina, como una medida indirecta de la inhibición de la acetolactato sintetasa (ALS). El bioensayo de respuesta a dosis permitió confirmar la resistencia del biotipo (IR = 3,87). No se observó una reducción de la biomasa aérea fresca de las plantas resistentes tratadas con malatión con respecto a las no tratadas, indicando que las isoenzimas citocromo P₄₅₀ monooxigenasas que podrían ser inhibidas por el malatión no participaron en la degradación del nicosulfuron en este bioensayo. En la prueba enzimática *in vivo* se demostró la insensibilidad de la enzima ALS del biotipo resistente al herbicida nicosulfuron, lo que permitió concluir que el mecanismo de resistencia de este biotipo es por el sitio de acción del herbicida.

Palabras clave adicionales: Mecanismos de resistencia, acetolactato sintetasa, P₄₅₀ monooxigenasas

ABSTRACT

Metabolic and enzymatic characterization of nicosulfuron resistance in biotypes of *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) WD Clayton

Rottboellia cochinchinensis is a major weed and its chemical control is mainly based on the use of the herbicide nicosulfuron; however, there has been a decrease in the effect of the herbicide on the weed which has showed some levels of resistance. In order to perform a metabolic and enzymatic characterization of the resistance of *R. cochinchinensis* to nicosulfuron, some experiments were conducted to confirm the selected biotype resistance through an analysis of log-logistic regression and determine the resistance index (IR). The study of the resistance nature was done through inhibition tests of the P₄₅₀ monooxygenases complex by the use of malathion, and *in vivo* enzymatic assay where acetoin accumulation was measured by colorimetry as an indirect measure of the inhibition of ALS. The dose-response bioassay confirmed the resistance (IR = 3.87). There was no reduction in fresh biomass of resistant plants treated with malathion compared to the untreated ones, indicating that cytochrome P₄₅₀ monooxygenase isozymes that could be inhibited by malathion were not involved in the degradation of nicosulfuron in this bioassay. With the *in vivo* enzymatic assay, we demonstrated the insensitivity of the ALS enzyme of the resistant biotype to nicosulfuron, therefore it is concluded that the resistance mechanism of this biotype is in the action site of the herbicide.

Additional key words: Biotype, resistance mechanism, P₄₅₀ monooxygenase, acetolactate synthase

INTRODUCCIÓN

Rottboellia cochinchinensis, conocida comúnmente como paja peluda o paja rolito, constituye una maleza de gran importancia por los daños directos e indirectos que ocasiona, tanto en áreas cultivadas

como en no cultivadas. Debido a su agresividad, amplia distribución y difícil control, es considerada en Venezuela y otras partes del mundo la maleza más importante en el cultivo del maíz, donde puede ocasionar la merma del rendimiento de hasta el 80 % (Anzalone et al., 2006).

Recibido: Abril 2, 2012

Aceptado: Enero 21, 2013

¹ INIA-Estación Experimental Valle de La Pascua. Apdo. 2350. Estado Guárico. Venezuela.

² Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 2301. Maracay. Venezuela
e-mail: agamez@inia.gob.ve; zambranoc@agr.ucv.ve; ramis.catalina@gmail.com

El control químico de esta maleza en la mayoría de las zonas productoras de maíz en Venezuela se basa principalmente en el uso del herbicida nicosulfuron (conocido comercialmente como Accent y Sanson y perteneciente al grupo químico de las sulfonilureas); sin embargo, desde hace unos años los agricultores han observado una importante disminución en los niveles de control de esta maleza por el herbicida. Delgado (2004) encontró que 11 de 13 poblaciones de *R. cochinchinensis* recolectadas en diferentes áreas maiceras del estado Portuguesa mostraron resistencia al nicosulfuron con diferentes índices de resistencia (IR).

La resistencia a herbicidas es un fenómeno mundial que se atribuye a dos mecanismos básicos: el primero está referido al sitio de acción por pérdida de afinidad entre la proteína de enlace y el herbicida o por una sobre-expresión de esa proteína; el segundo corresponde a un mecanismo donde no está involucrado el sitio de acción del herbicida, también llamado mecanismo por exclusión, principalmente debido a un incremento de la detoxificación metabólica del herbicida en productos no tóxicos (resistencia por metabolismo) o en una falta de absorción/ penetración y posterior pérdida de transporte del herbicida a la proteína de enlace (De Prado et al., 2009).

La mayoría de los casos de resistencia han sido reportados en los grupos de herbicidas inhibidores de la acetolactato sintetasa (ALS), encontrándose 108 biotipos resistentes (Heap, 2011). La inhibición de la enzima ALS por estos herbicidas parece suceder por una unión herbicida-enzima en un sitio diferente del sitio activo de la enzima y como resultado de la inhibición se produce, entre otros efectos, interrupción de la mitosis y del metabolismo de aminoácidos (Anzalone, 2008), así como paralización del crecimiento (Ray, 1984).

Las estrategias de manejo de la resistencia a los herbicidas deben comenzar con la caracterización y evaluación de los tipos de mecanismos de resistencia que poseen estas malezas. Tal como lo señalan Corbett y Tardif (2006), muchas técnicas de diagnóstico han sido desarrolladas con la finalidad de confirmar la resistencia a herbicidas y ayudar a los productores a adoptar las mejores estrategias de manejo.

Entre los grupos de enzimas implicadas en resistencia basada en metabolismo, las citocromo

P₄₅₀ monooxigenasas representan el grupo más común (Mallory-Smith y Namuth, 1999). La evidencia se ha obtenido de experimentos *in vivo*, utilizando inhibidores, tales como el malatión (Gressel, 1990; Christopher et al., 1994; Tardif y Powles, 1999), en donde el insecticida en presencia de la P₄₅₀ genera un reactivo intermedio que inhibe a la enzima (Kreuz y Fonné-Pfister, 1992; Yu et al., 2004). En estas condiciones, la afectación de una maleza resistente ante la aplicación de determinado herbicida sugeriría la existencia de un mecanismo de resistencia basado en la detoxificación metabólica del herbicida.

Asimismo, a través de bioensayos se puede detectar la actividad de la enzima ALS, ya sea *in vitro* o *in vivo*, mediante el seguimiento a la acumulación de acetoína. En condiciones naturales, la ALS cataliza la condensación de dos moléculas de piruvato para formar una molécula de acetolactato; la nueva enzima en la ruta es la ketoácido reductoisomerasa (KARI), la cual reduce la acetolactato a dihidroxisoalerato. En el bioensayo, al utilizar CPCA (ácido 1,1 ciclopropanodicarboxílico) como inhibidor de la KARI el acetolactato no puede ser convertido en dihidroxisoalerato y en su lugar se forma acetoína, en presencia de un ácido fuerte. Por lo tanto, en ausencia de herbicida, tanto el biotipo susceptible como el resistente acumulan acetoína; sin embargo, cuando se aplica herbicida la cantidad de acetoína es mínima o poca para el biotipo susceptible y máxima para el biotipo resistente. La acetoína absorbe luz en un rango de 525-540 nm y puede ser cuantificada con un espectrofotómetro (Hall et al., 1998; Ray, 1984; Chaleff y Mauvais, 1984).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar metabólica y enzimáticamente la resistencia al herbicida nicosulfuron en poblaciones de *R. cochinchinensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron conducidos en invernaderos del Instituto de Agronomía, Laboratorio de Malezas y en el Laboratorio de Genética Molecular-CIBA (Centro de Investigaciones Biotecnológicas Agrícolas) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

El biotipo resistente de *R. cochinchinensis*

denominado Gómez (RG) y utilizado en este estudio provino de semillas de plantas recolectadas por Delgado (2004), quien en su estudio realizó un muestreo en las zonas maiceras del estado Portuguesa y posteriormente estimó el índice de resistencia. El biotipo susceptible se colectó en diferentes áreas de la Facultad de Agronomía, donde no se ha usado nicosulfuron.

Las semillas se escarificaron y desinfectaron con cloro al 2 % durante 2 minutos. Luego fueron sembradas en cápsulas de Petri con papel absorbente humedecido con KNO_3 al 0,2 % y colocadas en un cuarto de crecimiento. Después de la emergencia se realizó el trasplante en sustrato colocado en envases plásticos de 480 mL.

Prueba de respuesta a dosis. Como prueba de respuesta a varias dosis del herbicida y con la finalidad de confirmar la resistencia del biotipo RG se llevó a cabo un ensayo usando dosis crecientes de nicosulfuron aplicadas tanto en el biotipo resistente como el susceptible (Cuadro 1) de acuerdo a la metodología Beckie et al. (2000).

Cuadro 1. Dosis de nicosulfuron aplicadas a los biotipos resistente y susceptible de *R. cochinchinensis*

Tratamientos	Biotipo	
	Resistente	Susceptible
	Dosis ($\text{g i} \cdot \text{a} \cdot \text{ha}^{-1}$)	
1	0	0
2	3	1,5
3	9	3
4	18	4,5
5	30	6
6	60	12
7	120	18
8	240	24
9	300	30
10	600	-
11	750	-

Cuando las plantas tenían tres hojas se procedió a aplicar los tratamientos utilizando una asperjadora dotada con boquillas de abanico 110-02. Las aplicaciones estuvieron acompañadas con surfactante no iónico Exit al 0,4 %.

Se usó un diseño experimental completamente al azar con 11 y 9 tratamientos para los biotipos resistentes y susceptibles, respectivamente, y cuatro repeticiones. Cada planta representó una repetición y en la prueba se evaluaron las siguientes variables:

- Peso fresco de la biomasa aérea, a los 14 días después de aplicados los tratamientos.

- ED_{50} , es decir, la dosis de herbicida que reduce el 50 % del crecimiento. Para la determinación de los valores de ED_{50} se generó la regresión de respuesta a la dosis, utilizando el modelo logístico descrito por Seefeldt et al. (1995), usando la siguiente ecuación (la biomasa fresca expresada como porcentaje del control y de la dosis del herbicida):

$$U_{ij} = C_i + \{D - C_i(1 + \exp [b_i (\log (j_i) - \log \text{ED}_{50}))]\}^{-1}$$
 ; donde U_{ij} es la respuesta a la dosis j del herbicida i ; D es el límite superior, es decir, representa la respuesta del testigo sin tratar; C_i es el límite inferior, el cual se aproxima a cero cuando las dosis del herbicida i son muy altas; ED_{50} es la dosis requerida del herbicida i para reducir el crecimiento de la planta a la mitad del valor entre D y C_i ; y b_i es la pendiente de la curva cerca de la ED_{50} . Se realizó el análisis de regresión con todos los puntos de los datos y las curvas de respuesta a dosis utilizando el programa estadístico Sigma Plot 2001.

- Índice de resistencia (IR), el cual se calculó como la razón entre el valor de ED_{50} de la población de interés sobre el valor ED_{50} de la población susceptible. Cuando el valor de IR calculado fue mayor a 2 se consideró que la población en cuestión era resistente (Valverde, 2000).

Prueba de inhibición de la P_{450} monooxigenasa (resistencia por metabolismo acelerado). Con el propósito de detectar la resistencia al herbicida basada en el metabolismo, se llevó a cabo un ensayo aplicando malatión (insecticida organofosforado) como un inhibidor del citocromo P_{450} monooxigenasas, de manera de afectar la resistencia a estos herbicidas. A la población resistente se le aplicó el insecticida a razón de $1000 \text{ g i} \cdot \text{a} \cdot \text{ha}^{-1}$ y a las 6 horas se aplicó el herbicida nicosulfuron (Albert Fischer, Universidad de California, Davis. Comunicación personal) a las diferentes dosis señaladas en el Cuadro 1. Este experimento se realizó de forma simultánea a la prueba de respuesta a dosis.

La aplicación del herbicida y del insecticida se realizó en condiciones similares al ensayo anterior. Se utilizó en un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones y las 11 dosis del herbicida señaladas en el Cuadro 1.

A los 14 días después de aplicados los

tratamientos se evaluó el peso de la biomasa luego de cortar las plantas a nivel del cuello. Con estos datos se generó la curva de respuesta a dosis, de acuerdo a la metodología propuesta por Seefeldt et al. (1995).

Se hizo una comparación entre la curva de respuesta a dosis en donde se aplicó sólo el nicosulfuron (N) y en la que se aplicó el malatión más el nicosulfuron (M+N). Cuando el ED_{50} del tratamiento con malatión fue menor que el ED_{50} sin malatión, se consideró que el malatión había inhibido a la enzima citocromo P_{450} monooxigenasa con lo que se habría reducido la resistencia de la maleza.

Prueba enzimática *in vivo* (resistencia por cambios en el sitio de acción del herbicida). En este ensayo se aplicó la metodología de Simpson et al. (1995) y se determinó la acumulación de acetoina mediante espectrofotometría.

El diseño del experimento fue completamente al azar con seis tratamientos (Cuadro 2) y cuatro repeticiones. Dependiendo de la germinación de las semillas, en algunos casos sólo se contó con tres repeticiones. Se colocó una planta por maceta y cada planta representó una repetición. Se utilizaron dos biotipos de maleza: resistente (RG) y susceptible.

Cada biotipo recibió aplicación de CPCA (inhibidor de la KARI) solamente, o CPCA + nicosulfuron (Cuadro 2). En este caso, se aplicó el nicosulfuron y 24 horas después el CPCA. El herbicida y el inhibidor se aplicaron en una cámara de plaguicidas, calibrado para $212 \text{ L} \cdot \text{ha}^{-1}$ de cada producto. Como surfactante se utilizó Exit al 0,4 %.

A las 24 horas de aplicado el inhibidor, se cosecharon la tercera y cuarta hoja de las plantas, las cuales fueron cortadas en pequeños cuadros y se colocaron en tubos de ensayos con tapas en un refrigerador. Aproximadamente a las 48 horas cada muestra fue macerada con 6 mL del surfactante; el macerado se filtró y a una alícuota de 4 mL del filtrado se le añadió 50 μL de H_2SO_4 5,3 N y se incubó a 60°C durante 20 min. Después, a cada muestra se le adicionó una alícuota de 1 mL de una solución de naphthol y creatina (0,09 y 0,009 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente) en NaOH 2,5 N, se agitó por 10 s y se incubó a 60°C por 30 min. Se tomaron aproximadamente 2 mL de cada muestra y se centrifugó durante 5 min a 15000 rpm, y al sobrenadante se le midió

la absorbancia usando un espectrofotómetro, modelo Génesis 20, a 530 nm.

Los valores de absorbancia obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de medias LSD utilizando el programa estadístico MSTATC versión 2.0.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados a los biotipos resistente y susceptible de *R. cochinchinensis* para la caracterización enzimática de la resistencia

Tratamientos	Biotipo	n
No tratadas	Resistente	4
No tratadas	Susceptible	4
Con CPCA ($766 \text{ g i} \cdot \text{a} \cdot \text{ha}^{-1}$)	Resistente	3
Con CPCA ($766 \text{ g i} \cdot \text{a} \cdot \text{ha}^{-1}$)	Susceptible	3
Con nicosulfuron ($30 \text{ g i} \cdot \text{a} \cdot \text{ha}^{-1}$) + CPCA ($766 \text{ g i} \cdot \text{a} \cdot \text{ha}^{-1}$)	Resistente	4
Con nicosulfuron ($30 \text{ g i} \cdot \text{a} \cdot \text{ha}^{-1}$) + CPCA ($766 \text{ g i} \cdot \text{a} \cdot \text{ha}^{-1}$)	Susceptible	4

CPCA= ácido 1,1-ciclopropanodicarboxílico; n: número de repeticiones

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta a dosis. El Cuadro 3 muestra los parámetros obtenidos para el modelo log-logístico de respuesta a dosis de ambos biotipos (susceptible y resistente). El ED_{50} para el biotipo resistente fue 3,87 veces mayor que para el biotipo susceptible, lo cual demuestra que el biotipo RG es resistente al nicosulfuron. Es de destacar que al momento de la evaluación las plantas resistentes tratadas con altas dosis del herbicida, si bien mostraron pérdida de biomasa aérea fresca (y reducción drástica de la altura), no estaban muertas y se observó nueva brotación de tallos.

Estos resultados confirman lo señalado por Delgado (2004), quien inicialmente reportó al biotipo RG como resistente. Así mismo, este biotipo, al igual que los biotipos P. Haller, García, Cedeño, Luchi y Esteger, presenta resistencia cruzada a la mezcla de herbicida foramsulfuron + iodosulfuron (Delgado et al., 2008). Igualmente *Sorghum halepense* ha mostrado resistencia al herbicida nicosulfuron y a la mezcla foramsulfuron + iodosulfuron (Martínez, 2009).

En otros reportes se han detectado casos de resistencia de esta maleza al herbicida fluazifop-P-butil (inhibidor de la enzima acetil coenzima A carboxilasa) (Heap, 2005). También se han

encontrado biotipos de esta maleza resistentes a los herbicidas haloxifop-R-metil y setoxidim, con IR de 33,4 y 44,3, respectivamente (Ávila et al., 2007).

Cuadro 3. Parámetros del modelo log-logístico de respuesta a dosis del herbicida nicosulfuron de los biotipos resistente y susceptible de *R. cochinchinensis*

Parámetro	Biotipo	
	S	RG
Asintota Superior	94,775	96,043
Asintota Inferior	-2,491	-4,101
ED ₅₀	12,894	49,894
Pendiente (bi)	2,343	0,976
r ²	0,887	0,987
P	<0,001	<00001
IR	1	3,87

Algunos autores han señalado que la resistencia a ALS es debida a alteraciones en el sitio de acción (Corbett y Tardif, 2006; Devine y Shukla, 2000). Indican que este cambio en la enzima impide su interacción con el herbicida, por lo que no se manifiesta el mecanismo de acción del mismo y se debe a la sustitución de un solo nucleótido en el gen de la ALS. La sustitución modifica la secuencia de aminoácidos en la enzima ALS (Guttieri et al., 1992; Boutsalis y Powles, 1995; Bernasconi et al., 1995).

Inhibición de la P₄₅₀ monooxigenasa. En la Figura 1 se muestran las curvas de respuesta a dosis generadas tanto con el tratamiento de solo la aplicación de nicosulfuron (N) como del tratamiento de malatión seguido de nicosulfuron (M+N). Se pueden observar las diferentes tendencias de ambas curvas: los tratamientos con malatión tuvieron una tendencia a mayor peso fresco que con el nicosulfuron solo, lo que podría sugerir que este insecticida actuó como antagonista del herbicida. El hecho de que la ED₅₀ (47,52) del tratamiento con la mezcla de malatión más nicosulfuron no es menor a la ED₅₀ (19,19) del tratamiento con sólo nicosulfuron parece descartar la existencia de resistencia basada en el metabolismo acelerado del biotipo RG dado que la inhibición de la P₄₅₀ monooxigenasa no disminuyó su resistencia al herbicida.

Resultados similares a los de esta investigación han sido reportados por Ávila et al. (2007), quienes no detectaron resistencia al herbicida setoxidim por metabolismo acelerado en biotipos

de *R. cochinchinensis*.

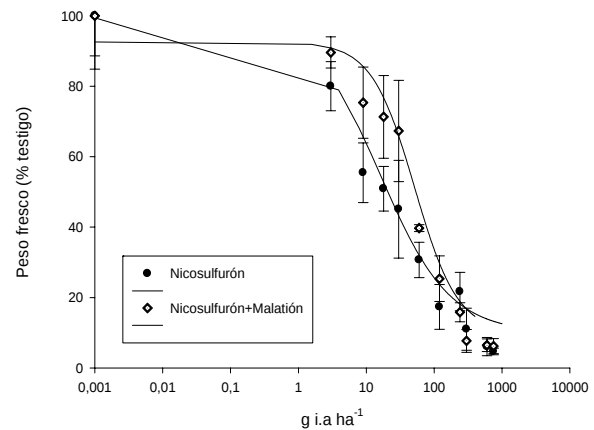


Figura 1. Efecto de dosis crecientes de nicosulfuron y una mezcla de nicosulfuron+malatión sobre el biotipo resistente (RG) de *R. cochinchinensis*

Autores como Corbett y Tardif (2006) señalan que la resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS debida al metabolismo acelerado o degradación incremental no es muy común, y solamente se han reportado cinco especies de malezas con este tipo de mecanismo de resistencia: *Lolium rigidum* Gaud., *Digitaria sanguinalis* (L) Scop., *Echinochloa phyllopogon* (Stapf.) Kossenko, *Sinapsis arvensis* L. y *Alopecurus myosuroides* Huds. Por ejemplo, Osuna et al. (2002) encontraron que la resistencia de *E. phyllopogon* al herbicida bispyribac-sodio es por la actividad de las P₄₅₀ monooxigenasas, debido a que la aplicación de malatión y piperonil butóxido (PBO) inhibió drásticamente el desarrollo de las plantas. En lo que respecta a los resultados reportados por Pérez y Zambrano (2008), en donde se logró una disminución del peso fresco en poblaciones resistentes de *E. colona* a los herbicidas clefoxydim, cyhalofop-butyl, fenoxaprop (inhibidores de acetyl CoA carboxilasa) y bispiribac sodio (inhibidor de ALS), después de la aplicación de un inhibidor del complejo enzimático citocromo P₄₅₀ (malatión), los autores sugieren una posible resistencia metabólica vía este complejo enzimático.

Prueba enzimática. Los valores de absorbancia obtenidos en la prueba enzimática *in vivo* evidenciaron diferencias altamente significativa entre los tratamientos (Cuadro 4). Se puede observar que los tratamientos con CPCA pero sin herbicida presentan los mayores valores

de absorbancia, mientras que las menores absorbancias fueron obtenidas en el biotipo susceptible con aplicación de CPCA más herbicida, así como en los biotipos testigos (no tratados).

Cuadro 4. Valores promedio de absorbancia de los tratamientos aplicados en los biotipos resistente y susceptible de *R. cochinchinensis* para la caracterización enzimática de la resistencia

Tratamiento	Biotipo	Absorbancia
No tratadas	Resistente	0,1227 c
No tratadas	Susceptible	0,1243 c
Con CPCA (766 g i.a.ha ⁻¹)	Resistente	0,3283 a
Con CPCA (766 g i.a.ha ⁻¹)	Susceptible	0,2795 ab
Con nicosulfuron (30 g i.a.ha ⁻¹) + CPCA (766 g i.a.ha ⁻¹)	Resistente	0,2335 b
Con nicosulfuron (30 g i.a.ha ⁻¹) + CPCA (766 g i.a.ha ⁻¹)	Susceptible	0,1363 c

CPCA= ácido 1,1-ciclopropanodicarboxílico. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD ($P \leq 0,05$)

Se aprecia que en las plantas no tratadas los valores de absorbancia son bastante similares y bajos, atribuido a la no inhibición de la KARI en ambos biotipos, lo que no permitió la acumulación de acetolactato y habría generado poca o ninguna cantidad de acetoína. En los tratamientos con CPA pero sin herbicida, la inhibición de la KARI pero no de la ALS produjo en ambos biotipos acumulación de acetolactato (por la inhibición de la KARI) el cual fue luego convertido en acetoína; por eso se observan los mayores valores de absorbancia en este tratamiento. En los tratamientos que recibieron tanto CPCA como herbicida, se observan mayores valores de absorbancia del biotipo resistente con relación al susceptible, lo que indica que en el biotipo resistente hubo una mayor acumulación de acetolactato que en el susceptible, evidenciándose que la resistencia de *R. cochinchinensis* al nicosulfuron se debe a que la enzima ALS es insensible al herbicida, quizás producto de cambios estructurales de la enzima que no permite al herbicida unirse a su sitio de acción.

En este estudio los valores de absorbancia permitieron diferenciar biotipos resistentes y susceptible, destacándose el uso del inhibidor de la KARI para los ensayos *in vitro* o *in vivo* de la

actividad de la ALS. En estudios previos llevados a cabo por Gerwick et al. (1993) se encontró que el imazaquin (inhibidor de la ALS) previno la acumulación de acetoína en el biotipo susceptible pero no fue así para el biotipo resistente de la especie *Xanthium strumarium*. Por su parte, Simpson et al. (1995) al comparar la actividad de la ALS con la aplicación de thifensulfuron seguida de CPCA en dos cultivares de soya, observaron que el cultivar resistente Asgrow 3200 acumuló mayor cantidad de acetolactato que el cultivar susceptible Williams 82. Igualmente, Taylor et al. (1996) lograron diferenciar los biotipos resistente y susceptible de las especies de *Kochia scoparia* y *X. strumarium* mediante el uso de un ensayo *in vivo* de la ALS. También Monqueiro et al. (2003) reportaron que los biotipos resistentes de las especies *Bidens pilosa* y *Amaranthus quitensis*, a los herbicida chlorimuron e imazethapyr mostraron mayor cantidad de acetoína que los biotipos susceptibles, demostrando de esta forma que la resistencia se relaciona a la falta de sensibilidad a la ALS de estos herbicidas. Los experimentos *in vivo* de la ALS de Hanson et al. (2004) indicaron respuestas diferenciales a la actividad de la ALS al herbicida chlorsulfuron, en biotipos de la especie *Camelina microcarpa*, en las que el biotipo susceptible mostró menos actividad de ALS que el biotipo resistente.

CONCLUSIONES

Se confirmó la resistencia del biotipo Gómez de *R. cochinchinensis* al herbicida nicosulfuron.

Se descartó la existencia de resistencia basada en el metabolismo acelerado de nicosulfuron en este biotipo.

Se comprobó la insensibilidad de la enzima ALS al nicosulfuron en el biotipo Gómez, lo que sugiere que el mecanismo de resistencia de este biotipo ocurre por cambios en el sitio de acción del herbicida.

LITERATURA CITADA

1. Anzalone, A. 2008. Herbicidas: modos y mecanismo de acción en plantas. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto. Venezuela. 144 p.
2. Anzalone, A., A. Gámez y L. Meléndez. 2006.

- Evaluación de la interferencia de *Rottboellia cochinchinensis* sobre el maíz (*Zea mays* L.) a través de un método aditivo. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 23: 373-383.
3. Ávila, W., A. Bolaños y B. Valverde. 2007. Characterization of the cross-resistance mechanism to herbicides inhibiting acetyl coenzyme-A carboxylase in itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) biotypes from Bolivia. Crop Protection 26: 342-348.
 4. Beckie, H., I. Heap, R. Smeda y L. Hall. 2000. Screening for herbicide resistance in weeds. Weed Technology 14: 428-445.
 5. Bernasconi, P., A. Woodworth, B. Rosen, M. Subramanian y D. Siehl. 1995. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. Journal Biology Chemistry 270: 17381-17385.
 6. Boutsalis, P. y S. Powles. 1995. Inheritance and mechanism of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Sonchus oleraceus* L. Theoretical Applied Genetics 91: 242-247.
 7. Chaleff, R. y C. Mauvais. 1984. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. Science 224: 1443-1445.
 8. Christopher, J., C. Preston y S. Powles. 1994. Malathion antagonizes metabolism-based chlorsulfuron resistance in *Lolium rigidum*. Pesticide Biochemistry Physiology 49: 172-182.
 9. Corbett, C. y F. Tardif. 2006. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. Pest Management Science 62: 584-597.
 10. De Prado, J., H. Cruz-Hipolito y R. De Prado. 2009. Mecanismo de resistencia de malezas a herbicidas. In: Seminario Internacional: Diagnostico y manejo de la resistencia a herbicidas. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Serie Actas N° 44. Carillanca-Chile. 19 p.
 11. Delgado, M. 2004. Resistencia de *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. Clayton al herbicida nicosulfuron. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. 55 p.
 12. Delgado, M., A. Ortiz y C. Zambrano. 2008. Poblaciones de *Rottboellia cochinchinensis* (Lour) W.D. Clayton con resistencia cruzada al foramsulfuron + Iodosulfuron. Agronomía Tropical 58(2): 175-180.
 13. Devine, M. y A. Shukla. 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. Crop Protection 19: 881-889.
 14. Gerwick, B., L. Mireles y R. Eilers. 1993. Rapid diagnosis of ALS/AHAS-resistant weeds. Weed Technology 7: 519-524.
 15. Gressel, J. 1990. Synergizing herbicides. Rev. Weed Sci. 5: 49-82.
 16. Guttieri, M., C. Eberlin, C. Mallory-Smith, D. Thill y D. Hoffman. 1992. DNA sequence variation in Domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and susceptible weed biotypes. Weed Science 40: 670-676.
 17. Hall, L., K. Stromme, G. Horsman y M. Devine. 1998. Resistance to acetolactate synthase inhibitors y quinclorac in biotype of false cleavers (*Galium spurium*). Weed Science 46: 390-396.
 18. Hanson, B., K. Park, C. Mallory-Smith y D. Thill. 2004. Resistance of *Camelina microcarpa* to acetolactate synthase inhibiting herbicides. Weed Research 44 (3): 187-194.
 19. Heap, I. 2005. Criteria for Confirmation of Herbicide-Resistant Weeds - with specific emphasis on confirming low level resistance. Disponible en: <http://www.weedscience.org>. (Consulta del 21/05/2007).
 20. Heap, I. 2011. International survey of herbicide resistant weeds. Disponible en: <http://www.weedscience.org>. (Consulta de 11/06/2011).
 21. Kreuz, K. y R. Fonné-Pfister. 1992. Herbicide-insecticide interaction in maize: malathion inhibits cytochrome P₄₅₀-dependent primisulfuron metabolism. Pesticide Biochemistry Physiology 43: 232-240.
 22. Mallory-Smith, C. y D. Namuth. 1999. Herbicide Resistance: Mechanisms, Inheritance, and Molecular Genetics. Overview & Objectives of Herbicide Resistance: Mechanisms, Inheritance & Molecular Genetics. Disponible en: <http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationm>

- odule=998688941&topicorder=1&maxto=7&minto=1. (Consulta del 10/08/2006).
23. Martínez, M. 2009. Evaluación de la resistencia cruzada del *Sorghum halapense* L. (Pers.) a los herbicidas nicosulfuron y foramsulfuron+iodosulfuron. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 48 p.
 24. Monqueiro, P., P. Christoffoleti y H. Carrer. 2003. Biology, Management and Biochemical/Genetic characterization of weed biotypes resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides. *Scientia Agrícola* 60(3): 495-503.
 25. Osuna, M., F. Vidotto, A. Fischer, D. 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: 9-17.
 26. Pérez, D. y C. Zambrano. 2008. Evaluación de la posible resistencia metabólica de poblaciones de paja americana (*Echinochloa colona*) provenientes de diferentes localidades del estado Portuguesa al herbicidas cyhafof-butyl (Chincher) y clefoxidym (Aura) en arroz (*Oryza sativa*). XII Congreso de la Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas. Maracay. Venezuela. 10 p.
 27. Ray, T. 1984. Site of action of chlorsulfuron. Inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiology* 75: 827-831.
 28. Seefeldt, S., J. Jensen y P. Fuerst. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9: 218-227.
 29. Simpson, D., E. Stoller y L. Wax. 1995. An in vivo acetolactate synthase assay. *Weed Technology* 9: 17-22.
 30. Tardif, F. y S. Powles. 1999. Effect of malathion on resistance to soil-applied herbicides in a population of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science* 47: 258-261.
 31. Taylor, S., L. Wax, D. Simpson y M. McGlamery. 1996. Using the in vivo acetolactate synthase assay for identifying herbicide-resistance weeds. *Weed Technology* 10: 936-942.
 32. Valverde, B. 2000. Respuesta de la población de malezas al uso continuo de herbicidas. In: Memorias del Curso de actualización en biología y combate de malezas. Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas. Maracaibo. pp. 75-95.
 33. Yu, Q., L. Shane Friesen, X. Zhang y B. Powles. 2004. Tolerance to acetolactate synthase and acetyl-coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Vulpia bromoides* is conferred by two co-existing resistance mechanisms. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 78: 21-30.