



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSTGRADO EN AGRONOMÍA
TRABAJO DE GRADO



**EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA DE ALGUNAS
ACCESIONES DE *Ischaemum rugosum* Salisb. AL HERBICIDA **bispiribac-
sodio****

Ing. Agr Sandra América Torres Meza

Tutora: Dra Aida Ortiz Domínguez

Maracay, Julio 2013

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSTGRADO EN AGRONOMÍA
TRABAJO DE GRADO

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de *Magister Scientiarum* en Agronomía, orientación Producción Vegetal

Dra. Aida Ortiz Domínguez

Tutora

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los días del mes de del año 2013, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinadora del jurado la Dra. Aida Ortiz

Dra. Catalina Ramis
C.I. 5.614.038

Dra. María Dolores Osuna
Pasaporte N° X489607

Dra. Aída Ortiz Domínguez
C.I.V- 5.872.557

DEDICATORIA

A Dios, todo poderoso por iluminar mi camino y encontrarme de nuevo con mi ALMA MATER “Universidad Central de Venezuela” y lograr otra nueva meta.

A toda mi familia en especial a mis padres (Gladys y Amado) y hermanos (Thaidee, Mileivis, Domenica, Yajaira, Carolina y Amado) por brindarme todo su apoyo incondicional en los momentos buenos y malos de mi vida.

A la memoria de mis seres queridos que hoy no pueden estar conmigo y que significaron mucho para mí pero que siempre me cuidan y acompañan.

AGRADECIMIENTO

A Dios por iluminarme y orientarme en todas y cada una de las metas y éxitos alcanzados hasta al momento.

Agradezco especialmente a mi tutora, Jefa y amiga la profesora Aída Ortiz por brindarme esta gran oportunidad de trabajar, estudiar y compartir nuevamente en mi casa de estudio UCV.

Ingeniero Agrónomo Luis López, por sus orientaciones y consejos a la hora de realizar cada fase de mi trabajo de grado.

A mis compañeros de trabajo que prestaron su colaboración para la realización de mi tesis los Ingenieros(a) Agrónomos Ángelo Tacarelli, Alfredis, Yinerby Quintana y Pedro Pérez y a los bachilleres McLaughlin Mellado, y Roberto Hernández,

A todo el personal que labora en el laboratorio de Genética: profesora Catalina Ramis, y el profesor Luis Angulo, a la Técnico de Laboratorio Katuska Bolívar, Ingeniero Gino Campos, y Arnaldo Gámez.

Al postgrado en Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

Al Proyecto MIMA por brindarme la oportunidad de trabajar al mismo tiempo de estudiar y poder costear mis gastos generados en el postgrado.

RESUMEN

La paja rugosa (*Ischaemum rugosum* Salisb.), es reportada como la maleza más difícil de controlar en arrozales de Venezuela. El objetivo de este trabajo fue determinar el mecanismo de resistencia de algunas accesiones de *I. rugosum* al herbicida bispiribac-sodio provenientes de arrozales venezolanos. Se establecieron tres experimentos: (1) bioensayo de determinación indirecta del mecanismo de resistencia metabólica, (2) Prueba de sensibilidad de la enzima acetolactato sintasa (ALS) y (3) Patrón de resistencia cruzada. El primer estudio sobre respuesta a dosis con bispiribac solo y con malatión (inhibidor de P450) se hizo en las accesiones resistentes R (IR75G, IR82G, IR90G, IR269P e IR301CO) y un testigo susceptible (S) (IR143G), usando 0; 5; 10; 20; 40; 80; 160 y 320 g i.a. ha⁻¹ de bispiribac-sodio para las accesiones R y 0; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 y 20 g i.a. ha⁻¹ para la S. El malatión se aplicó 24 horas antes de la aplicación de bispiribac-sodio. En la prueba de sensibilidad de la ALS donde los extractos de tejido de plantas R y S se incubaron con concentraciones 0, 1, 10, 100, y 1000 nM de bispiribac-sodio. Para detectar resistencia cruzada en las mismas accesiones del primer bioensayo, se las trató con 40; 154; 30 y 60 g i.a. ha⁻¹ de bispiribac-sodio (PTB), imazetapir+imazapir (IMI); nicosulfuron (SU) y penoxsulam (TP), 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 las otras accesiones evaluadas no se encontró respuesta sinérgica entre el herbicida y el malatión. La concentración de bispiribac-sodio (I₅₀) necesaria para reducir a la mitad la actividad de la enzima acetolactato sintasa (ALS) fueron muy altos para IR82G e IR269P y altos para IR90G e IR301CO, mostrando un gradiente de sensibilidad y comprobando que el mecanismo de resistencia de estas cuatro accesiones de *I. rugosum* a bispiribac-sodio fue por alteración del sitio de acción. Las accesiones de *I. rugosum*, IR75G, IR82G, IR90G, IR269P e IR301CO mostraron resistencia cruzada a herbicidas pertenecientes a tres familias químicas de inhibidores de ALS: bispiribac-sodio (PTB), imazapir+imazetapir (IMI) y nicosulfuron (SU). *I. rugosum* es tolerante a penoxsulam (TP).

Nomenclatura: bispiribac-sodio [Sodium 2,6-bis[(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)oxy]benzoate], *Oryza sativa* (L.), arroz, *Ischaemum rugosum* Salisb (Paja rugosa).

Palabras claves: *Oryza sativa*/ *Ischaemum rugosum*/ mecanismo de resistencia/ bispiribac.sodio / ALS

ABSTRACT

Wrinklegrass (*Ischaemum rugosum* Salisb.), is reported as the most difficult to control weeds in rice fields of Venezuela. The objective of this study was to determine the mechanism of resistance in some accessions of *I. rugosum* to bispyribac-sodium from Venezuelan paddies. Three experiments were established: (1) indirect determination bioassay metabolic resistance mechanism, (2) test sensitivity of the enzyme acetolactate synthase (ALS) and (3) cross-resistance pattern. The dose response study with bispyribac-sodium alone and with malathion was realized with resistant accessions (R) (IR75G, IR82G, IR90G, IR269P and IR301CO) and a control subject (S) (IR143G). We used: 0, 5, 10, 20; 40, 80, 160 and 320 g a.i. ha⁻¹ bispyribac-sodium for accessions R and 0, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 g a.i. ha⁻¹ for S. Malathion was applied 24 hours before applying sodium bispyribac-sodium. In testing the sensitivity of ALS where plant tissue extracts R and S concentrations were incubated with 0, 10, 100, 1000 and 10000 nM bispyribac-sodium. To detect cross-resistance in the same accessions of the first trial, We treated with 40, 154, 30 and 60 g a.i. ha⁻¹ bispyribac-sodium (PTB), imazethapyr + imazapyr (imidazolinonas, IMI), nicosulfuron (sulfonylurea, SU) and penoxsulam (triazolopyrimidine, TP), respectively. The results showed that IR269P accession has two mechanisms of resistance to bispyribac-sodium, one by altering the active site and another site of action unrelated to metabolic degradation mediated by the enzyme P450. In the other accessions tested synergistic response was not found between the herbicide and malathion. The concentration of bispyribac-sodium (I₅₀) needed to reduces the activity of the enzyme acetolactate synthase (ALS) were too high to high IR82G e IR269P and for IR90G e IR301CO, showing a gradient of sensitivity and checking mechanism resistance of these four accessions of *I. rugosum* to bispyribac-sodium was by altering the site of action. The accessions of *I. rugosum*: IR75G, IR82G, IR90G, IR269P and IR301CO showed cross-resistance to herbicides belonging to three chemical families of ALS inhibitors: bispyribac-sodium (PTB), imazapyr + imazethapyr (IMI) and nicosulfuron (SU). *I. rugosum* is tolerant to penoxsulam (TP).

Nomenclature: Bispyribac-sodium [Sodium 2,6-bis [(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl) oxy] benzoate], *Oryza sativa* (L.), rice, *Ischaemum rugosum* Salisb. (wrinklegrass, ribbed murainagrass).

Keywords: *Oryza sativa* / *Ischaemum rugosum* / mechanism of resistance / bispyribac.sodio / ALS

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
TABLA DE CONTENIDO.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
Objetivo General	2
Objetivos específicos.....	2
ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
Generalidades	3
Resistencia y Tolerancia a herbicidas.....	3
Cultivos resistentes a herbicidas por modificación genética.....	4
Situación mundial de la Resistencia a Herbicidas.....	4
Evolución de Resistencia a Herbicidas.....	5
Enzima acetolactato sintetasa (ALS).....	7
Casos de Resistencia a herbicidas en Venezuela.....	9
Características morfofisiológicas de la paja rugosa	10
Características del herbicida bispiribac- sodio.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. Peso fresco de la parte aérea (g).....	14
2. Determinación de la dosis de efecto medio (ED50).....	14
3. Índice de resistencia (IR).....	14
BIOENSAYO DE ACTIVIDAD DE ALS.....	15

BIOENSAYO DE PATRÓN DE RESISTENCIA CRUZADA	16
Análisis estadístico	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
EXPERIMENTO DE ACTIVIDAD DE ALS	22
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXOS.....	39

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb., y ubicación geográfica de las fincas donde se recolectaron sus semillas, utilizadas en esta investigación. 12
- Cuadro 2. Ámbito creciente de dosis del herbicida bispiribac-sodio aplicado a las accesiones resistentes de *I. rugosum* (IR75G, IR90G, IR82, IR269P y IR301CO) y la susceptible (IR143G), cuando las plantas se encontraron en el estadio fisiológico de tres a cuatro hojas..... 14
- Cuadro 3. Parámetros de las ecuaciones de regresión utilizadas para estimar la dosis de bispiribac-sodio requerida para reducir al 50% (ED₅₀) la biomasa de plantas de *I. rugosum* susceptibles y resistentes a este herbicida, coeficientes de regresión e índices de resistencia. 20
- Cuadro 4. Parámetros de las ecuaciones de regresión utilizadas para estimar la dosis de bispiribac-sodio requerida para reducir la actividad ALS (*I*₅₀) en plantas *I. rugosum* susceptible y resistentes a este herbicida, coeficientes de regresión e índices de resistencia. 23
- Cuadro 5. Patrón de resistencia a herbicidas inhibidores de ALS por comparación del peso fresco como porcentaje del testigo sin tratar de algunas accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb., provenientes de arrozales de los estados Guárico, Portuguesa y Cojedes en respuesta a 40 g i.a. ha⁻¹ de bispiribac-sodio; 154 g i.a. ha⁻¹ de imazapir+imazetapir; 30 g i.a. ha⁻¹ de nicosulfuron y 60 g i.a. ha⁻¹ de penoxsulam, aplicados sobre plantas al estado de tres a cuatro hojas..... 26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta de las accesiones de *I. rugosum* (A) IR75G(R) e IR143G(S); (B) IR82G e IR143G(S); (C) IR82G(R) e IR143G(S); (D) IR90G(R) e IR143G(S); (E) IR269P(R) e IR143G(S) y (F) IR301CO(R) en relación con IR143G(S) a dosis crecientes de bispiribac-sodio con y sin malatión. Cada punto es la media y la desviación estándar de diez observaciones provenientes de dos experimentos. El herbicida fue aplicado cuando las plantas tenían de tres a cuatro hojas y el peso fresco fue determinado a los 21 días después de la aplicación. La dosis comercial de bispiribac-sodio fue 40 g i.a. ha⁻¹. Se aplicó malatión 24 horas antes de bispiribac a razón de 100 g i.a. ha⁻¹. Parámetros de las regresiones ajustadas se presentan en el Cuadro 3..... 21

Figura 2. Actividad específica de la enzima ALS (nmol de acetoína h⁻¹ mg⁻¹ proteína) medida en extractos de plantas susceptibles y resistentes de *I. rugosum*, (A) IR82G e IR143G(S); (B) IR90G(R) e IR143G(S); (E) IR269P(R) e IR143G(S) y (F) IR301CO(R) en relación con IR143G(S); los datos se presentan como porcentajes de la media del testigo sin herbicida. Cada punto es la media y la desviación estándar de seis observaciones provenientes de dos experimentos. Los parámetros de las regresiones ajustadas se presentan en el Cuadro 4..... 24

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Composición del Tampón de Extracción	40
Anexo 2. Composición del Tampón de Elución	40
Anexo 3. Composición del Tampón de Ensayo.....	40
Anexo 4. Mezclas de ensayo (los volúmenes están en μ l).....	41
Anexo 5 .Cámara de aplicación de plaguicidas utilizada en los experimentos de respuesta a dosis con y sin malatión.	42
Anexo 6 .Método utilizado para pre germinar la semilla de <i>I. rugosum</i> , mediante una bomba de pecera y una solución compuesta por (KNO_3 al 2% +agua).	42
Anexo 7. Bioensayo de Respuesta a dosis para la accesión IR82G con el herbicida bispiribac-sodio.	43
Anexo 8. Bioensayo de Respuesta a dosis para la accesión IR75G con el herbicida bispiribac-sodio.	43

INTRODUCCIÓN

Las malezas en el mundo representan una de las más importantes limitantes bióticas para el incremento de la productividad del arroz. Se estima que la tercera parte de los costos directos de producción se invierten en el control químico de malezas, lo cual además de crear problemas de resistencia, hace que su uso inadecuado ocasione impactos indeseables al ambiente y problemas de salud pública (Ortiz, 2011).

Aunado a esto, la alta dependencia del control químico de malezas y el uso repetido de un mismo tipo de herbicidas, han conducido a la ocurrencia y desarrollo de resistencia en las accesiones de malezas causando pérdidas de rendimiento, incremento de los costos y riesgo ambiental (Fischer y Valverde, 2005).

En consecuencia, si bien es cierto que los herbicidas representan una herramienta esencial, su empleo debe racionalizarse, ya que las aplicaciones repetidas seleccionan genotipos capaces de sobrevivir y reproducirse luego de un tratamiento herbicida que normalmente controlaba esa maleza. Entre algunas características de los herbicidas destacan, entre otras, su eficacia sobre las malezas y son agrónomicamente flexibles, de fácil manejo y bajo costo. Sin embargo, su uso intensivo ha generado accesiones de malezas resistentes (Powles and Howad, 1990).

Se ha demostrado que existen dos mecanismos bases que confieren resistencia a los herbicidas, uno relacionados con la insensibilidad del sitio de acción y otro ajeno al sitio afín con el fortalecimiento del metabolismo del herbicida, la descomposición a metabolitos inactivos, o al secuestro de los herbicidas (o su falta de acción debido a la separación física o temporal del herbicida de los tejidos sensibles o lugares-objetivos) o a una absorción reducida (Devine y Preston, 2000).

Con base en lo que representa la resistencia de malezas a herbicidas y el efecto negativo que producen en los campos de producción de arroz, la Facultad de Agronomía UCV, conjuntamente con la asesoría del Dr. Albert Fischer, del Colegio de Agricultura y Ciencias Ambientales de la Universidad de California-Davis, se propuso desarrollar este proyecto de

investigación del cual forma parte este trabajo de maestría, para dar respuesta al sector arrocero en materia del manejo de *I. rugosum* con resistencia a herbicidas .

El presente trabajo, se orienta a profundizar el estudio sobre los mecanismos que estarían involucrados en la resistencia al herbicida bispiribac-sodio en accesiones de *Ischaemun rugosum*. Salisb, recolectadas en campos de arroz en Venezuela.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el mecanismo de resistencia de algunas accesiones de *I. rugosum* al herbicida bispiribac-sodio provenientes de arrozales venezolanos.

Objetivos específicos

1. Cuantificar la dosis del herbicida bispiribac-sodio que reduce a la mitad el crecimiento de accesiones de *I. rugosum* resistentes y susceptibles, a través de un bioensayo de respuesta a dosis, con o sin malatión, como inhibidor de la enzima citocromo P450 monooxigenasa.
2. Determinar la concentración de bispiribac-sodio necesario para reducir a la mitad la actividad de la enzima acetolactato sintetasa (ALS) de accesiones resistentes y susceptibles de *I. rugosum*.
3. Determinar el patrón de resistencia cruzada en accesiones de *I. rugosum* entre los herbicidas inhibidores de ALS, bispiribac-sodio, nicosulfuron, imazetapir+imazapir y penoxsulam

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Generalidades

En el medio agrícola la palabra plaga se refiere a cualquier organismo que afecte o perturbe el desarrollo y el crecimiento de un cultivo. Son plagas, por ejemplo, las malezas, microorganismos y artrópodos que lo atacan. Las malezas compiten con el cultivo por agua, luz, nutrimentos, y posiblemente CO₂, disminuyendo los rendimientos, la calidad e interferencia con la cosecha. A nivel mundial las plagas destruyen el 35% de la producción. Varios autores coinciden en cuanto a estimar las pérdidas directas, debido a malezas son del 10%, por insectos 12%, por enfermedades 12% y 1% debido a invertebrados que se alimentan del grano (Pantoja *et al.*; 2010).

En el caso concreto de las malezas, los herbicidas constituyen una de las herramientas más eficaces con que cuenta el productor en su lucha por combatirlas y el uso de estos agroquímicos se incrementa año tras año, especialmente en los países con sistemas agrícolas más avanzados. Su uso casi exclusivo y repetido ha conllevado a la aparición de accesiones de malezas resistentes a herbicidas que anteriormente las controlaban eficazmente y ello constituye un motivo de preocupación para la industria que hace esfuerzos urgentes para buscar soluciones rápidas, eficaces y de bajo costo, a dicho problema (Powles and Howat, 1990).

Resistencia y Tolerancia a herbicidas

La resistencia se define como la capacidad hereditaria natural de un biotipo, dentro de una población, que le permite sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con un herbicida que, bajo condiciones normales de utilización, controla efectivamente todos los demás individuos de la misma población (Powles *et al.*, 1997).

Existen varios tipos de resistencia: (1) **Resistencia cruzada** que se manifiesta cuando ciertos biotipos de una maleza presentan un mecanismo que la vuelve resistente a varios herbicidas que comparten el mismo mecanismo de acción, (2) **Resistencia múltiple**, puede

verificarse cuando un biotipo resistente presenta dos o más mecanismos que lo hacen resistente a otros tantos herbicidas, aunque estos productos no compartan el mismo mecanismo de acción, (3) **Resistencia cruzada negativa**, se puede observar en ciertos biotipos que, al tiempo que muestran resistencia a un tipo de herbicida, adquieren mayor susceptibilidad a otro que tiene distinto modo de acción o degradación (Fischer y Valverde, 2005).

Tolerancia, es la capacidad hereditaria natural que tienen los individuos de todas las poblaciones de una determinada maleza para sobrevivir sin resultar afectadas y reproducirse normalmente después del tratamiento con herbicida (Powles *et al.*, 1997).

Cultivos resistentes a herbicidas por modificación genética

Son cultivos que poseen genes insertos que les confieren resistencia a cierto herbicida al que habían sido previamente susceptibles (Valverde *et al.*, 2000), por ejemplo la soya transgénica resistente a glifosato.

Situación mundial de la Resistencia a Herbicidas

El primer caso de resistencia de una maleza al herbicida 2,4-D fue reportado por Hilton (1957), sin embargo como tal la resistencia de malezas a herbicidas comenzó a ser reconocida solamente después que Ryan, 1970, en EE.UU, informó sobre el primer caso de resistencia a triazinas en *Senecio vulgaris* L. (Valverde, 2005).

En el mundo se han confirmado 400 biotipos resistentes a herbicidas pertenecientes a 217 especies de malezas, de las cuales 129 son dicotiledóneas y 88 monocotiledóneas. Los herbicidas que inhiben la enzima acetolactato sintasa (ALS) tienen el mayor número de biotipos con resistencia (131), este grupo incluye cinco familias químicas: sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), sulfonilaminocarbonil triazolinonas (SCT) y pirimidiltiobenzoato (PTB) (Heap, 2013).

En Chile se han descrito cinco biotipos de malezas resistentes a herbicidas específicamente en ballica (*Lolium rigidum* Gaud. y *L. multiflorum* Lam.) y avenilla (*Avena fatua* L.), las

cuales son las malezas gramíneas más comunes en la principal zona productora de trigo, cebada, avena y lupino. Estos biotipos presentaron resistencia a los herbicidas de los grupos: inhibidores de la ACCasa, ALS, y a la enzima 5-enolpiruvil shikimato 3- fosfato sintetasa (EPSPS) (Espinoza y Díaz, 2010). En Costa Rica, accesiones de *Ixophorus unisetus* L. seleccionadas por su resistencia a imazapir, también tuvieron resistencia cruzada con otros herbicidas del grupo imidazolinonas y sulfonilureas (Heap, 2001).

Diversas especies de *Echinochloa colona* (L.) Link, y *Echinochloa crus-galli* L. engrosan la lista de casos de resistencia. Ambas especies luego de ser expuestas por muchos años al propanil dejaron de ser controlados eficazmente por dicho herbicida en varias regiones del mundo (Valverde *et al.*, 2000).

Evolución de Resistencia a Herbicidas

Existen factores que determinan la tasa de evolución de resistencia como son: la proporción original de individuos (mutantes), su fecundidad, y persistencia en el banco de semillas del suelo, su adaptabilidad ecológica, el sistema de reproducción, la base genética de la resistencia y su modo de herencia, la toxicidad y residualidad del herbicida, así como la dosis empleada y su frecuencia de uso (Fischer y Valverde, 2005).

El factor más importante que condiciona la evolución de la resistencia a un herbicida es la presión de selección que impone el herbicida (Jasienuk *et al.*, 1996). La mayor presión de selección ocurre cuando se usan altas dosis de herbicidas de compuestos altamente efectivos y/o persistentes y cuando su aplicación es frecuente (Reznick y Cameron, 2001).

La presión de selección es el resultado de la mortalidad efectiva, es decir, la tasa de mortalidad en términos de propágulos presentes al final del periodo de crecimiento no inmediatamente del tratamiento con herbicida. Si en una población se encuentran genes de resistencia, cuanto mayor sea la mortalidad efectiva, mayor serán las probabilidad de seleccionar individuos resistentes (Valverde *et al.*, 2000). Una característica muy importante de los mecanismos de resistencia ajeno al sitio de acción, es que son controlados por varios genes; por lo tanto, ocasionan la resistencia a una gran gama de herbicidas (De Prado y Cruz-Hipolito, 2005).

En un estudio realizado por Tan *et al.*, 2007 sobre la resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa en *L. rigidum* en Australia, se analizó la ampliación y la secuencia de la ALS de genes de esta especie utilizando cebadores diseñados a partir de información de la secuencia de los taxones relacionados. Esto permitió que, por primera vez, se determinara con éxito la mutación en el sistema de genes de esta especie que proporcionaba resistencia a los herbicidas inhibidores de ALS. Esta mutación es la sustitución del aminoácido **Trp574Leu**, confiriendo un alto nivel de resistencia a todas las familias químicas de herbicidas inhibidores de ALS.

Echinochloa phyllopogon (Stapf) Koss en California, EE.UU con resistencia a múltiples herbicidas (molinato, tiobencarbo, y fenoxaprop-etil), fue evaluada con el herbicida bispiribac-sodio, encontrándose que el mecanismo de resistencia a este herbicida es ajeno al sitio de acción, demostrado porque el peso fresco del biotipo resistente, con aplicación de malation o piperonil butoxido (inhibidores de la enzima citocromo P450 monooxigenasa) fue menor que el mismo tratamiento pero sin los inhibidores de esta enzima. Esto refleja una medida indirecta de los procesos de degradación del herbicida en malezas resistentes (Fischer *et al.*, 2000).

En *Cyperus difformis* L., también proveniente de California (EE.UU) se encontró resistencia cruzada a bispiribac-sodio y bensulfuron-metil. Adicionalmente, el mecanismo de resistencia reportado para esta maleza, fue de sitio de acción, dado que la enzima ALS, requirió 138,87 y 6724 nM de bispiribac-sodio y bensulfuron-metil, respectivamente, para reducir 50% la actividad de esta enzima, mientras que el biotipo susceptible necesitó 7,94 g 0,20 n M para los mismos herbicidas, respectivamente (Osuna *et al.*, 2000).

En Chile se evaluó la resistencia de la ciperácea *Schoenoplectiella mucronata* (L.) J. Jung & H. K. Choi (sinonimia *Scirpus mucronatus* L.) al herbicida bensulfuron-metil encontrándose que dos biotipos resistentes R1 y R2 mostraron que la dosis para reducir el 50% del crecimiento (ED_{50}) fue de 319,55 y 302,53 g i.a. ha⁻¹, respectivamente mientras que para el susceptible fue de 0,19 g i.a. ha⁻¹. Cuando se le calculó el índice de resistencia se halló altos valores para ambos biotipos (1718,9 y 1627,4). Así mismo, cuando se evaluó el biotipo R1 con otros herbicidas inhibidores de la enzima ALS, se evidenció que este

biotipo tuvo resistencia cruzada a los herbicidas sulfonilureas (cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, imazosulfuron y pirazosulfuron-etil) y la imidazolinona imazamox, mientras que fue susceptible a bispiribac- sodio. Cuando se evaluó R2, este biotipo mostró resistencia a todos los herbicidas mencionados anteriormente. La resistencia cruzada encontrada en los biotipos R1 Y R2 corresponde al mecanismo de sitio de acción, mostrando la enzima insensibilidad a los herbicidas. Por otro lado está pérdida de sensibilidad enzimática pudiera explicarse por un cambio del aminoácido Pro197His (Cruz-Hipolito *et al.*, 2009).

Se establecieron unos bioensayos sobre la evaluación de la resistencia de ocho biotipos de rábano silvestre resistentes a herbicidas inhibidores de ALS y tres susceptibles, se encontró una alta resistencia al herbicida sulfonilureas chlorsulfuron (20-160 veces) y a la triazolopirimidina metsulam (10- 40 veces) y moderadamente resistente a metsulfuron-metil (tres a ocho veces). Asimismo, se halló susceptibilidad a las imidazolinonas, imazapir e imazetapir. El fragmento del dominio donde se consideraba que estaría la mutación, fue amplificado, secuenciado y comparado entre los distintos biotipos, mostrando que los ocho biotipos resistentes tuvieron una mutación en el codón del residuo de prolina en el dominio A; sin embargo el punto de mutación varió y codificaron cuatro diferentes sustituciones de histidina, treonina, alanina y serina. Por otro lado, en los dominios C y D se observaron sustituciones de aminoácidos entre los biotipos resistentes y los susceptibles (Yu *et al.*, 2003).

Enzima acetolactato sintetasa (ALS)

La enzima acetolactato sintetasa (ALS) o acetohidroxiácido sintetasa (AHAS, EC 2.2.1.6), tiene dos funciones metabólicas distintas; la AHAS cataliza la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina en plantas y la ALS en bacterias en la síntesis de butanodiol (Duggleby *et al.*; 2000; McCour *et al.*, 2006; Devine *et al.*, 1993), sin embargo es común llamar ALS a la enzima de las plantas tal como se puede observar en la mayoría de los trabajos de investigación publicados actualmente.

La acción catalizada por la ALS consiste en la condensación de dos moléculas de piruvato para formar α -acetolactato, el precursor de la leucina y valina. La enzima también puede llevar a cabo la misma reacción con piruvato y α -ketobutirato para formar α -aceto- α -hidroxibutilato, el precursor de la isoleucina. Cuando esta enzima es inhibida, la mayoría de las plantas se ven afectadas directamente por la inhibición en la síntesis de los aminoácidos antes mencionados y se produce la muerte progresiva de la planta (Anzalone, 2008; Mentaberry, 2008).

La regulación de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada es compleja y controlada. Esta regulación es esencial, no sólo para garantizar una oferta equilibrada de los aminoácidos en las células, sino también por intermedio interactuar con otras vías metabólicas celulares (Duggleby *et al*, 2000).

Se hizo un estudio en 3D de la estructura enzimática de la enzima acetohidroxiácido sintasa en la especie de menor número de cromosomas, *Arabidopsis thaliana* L. Este trabajo mostró que cuando la ALS forma un complejo con sulfonilurea (2,5 Å de resolución) y imidazolinona Imazaquin (2,8 Å), ninguno de los herbicidas estudiados se mimetiza con el sustrato de esta enzima pero si bloquean el canal a través del cual se llega al sitio activo de ella. Las sulfonilureas se aproximan a 5 Å del sitio catalítico de la enzima en el cual está el carbono dos unido al cofactor difosfato tiamina, mientras que el imazaquin está al menos a 7 Å de este átomo de carbono, diez de los aminoácidos residuales que se unen a la sulfonilurea también se pegan al imazaquin. Seis aminoácidos residuales solo se unen a la sulfonilurea, mientras que dos aminoácidos residuales se unen al imazaquin y no a las sulfonilureas. Entonces las dos clases de inhibidores de ALS ocupan parcialmente el dominio donde se sobrelapan pero adoptan diferentes modos de uniones. El incremento de la evolución de la resistencia a malezas es debido a la aparición de mutaciones que interfieren con la inhibición de ALS, esto es un problema mundial (McCourt *et al.*, 2006).

Se han descrito alrededor de 15 familias de herbicidas como inhibidores de esta enzima; sin embargo, solo 5 han sido comercializadas como tal. Estas son: sulfonilurea, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinilbenzoatos (Saari *et al.*, 1994), y más recientemente sulfunilaminocarboniltriazolinonas (Heap, 2013).

El rápido incremento de la resistencia a los herbicidas ALS es atribuida en parte a la alta frecuencia de mutación sobre el sitio de acción de la enzima y la existencia de varias mutaciones que le confieren resistencia (Devine y Preston, 2000). Preston y Powles, 2002, determinaron la frecuencia de los individuos resistentes a los herbicidas inhibidores de la ALS sobre accesiones de *L. rigidum* que anteriormente nunca habían sido expuestas a esos herbicidas. La frecuencia de los individuos resistentes a sulfometuron-methyl e imazapyr varió de $2,2 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4}$ y de 1×10^{-5} a $5,8 \times 10^{-5}$, respectivamente, dependiendo de la accesión. Estos altos valores en la frecuencia ayudan a explicar la rápida evolución de la resistencia una vez que las accesiones son sujetas a la selección impuesta por los herbicidas inhibidores de ALS.

Casos de Resistencia a herbicidas en Venezuela

Se reportó un trabajo de investigación sobre *Echinochloa colona* (L.) Link, donde se recolectaron 228 accesiones de *E. colona* (L.) Link, en fincas con más de 20 años aplicando propanil [N-(3,4-dichlorophenyl) propamide] y una accesión susceptible. De las 228 accesiones de la maleza, 113 sobrevivieron a las dosis comerciales de propanil y de estas se seleccionaron 49 que se sometieron a la prueba de resistencia utilizando cuatro dosis del herbicida: 1440; 2880; 5760; 11520 g i.a.ha⁻¹. De las 49 accesiones evaluadas se encontraron 19 biotipos resistentes a propanil, correspondiendo a zonas arroceras de los estados Portuguesa y Guárico. De estos 19 biotipos se seleccionaron 11 para realizar un ensayo con anilofos y se encontró que este herbicida mostró un efecto sinérgico con el propanil y que los mejores controles correspondieron a las dosis mayores de propanil (2 888 g i.a.ha⁻¹) combinado con la dosis media y alta de anilofos 450 y 675 g i.a.ha⁻¹, respectivamente (Ortiz, *et al.*, 2000). También en el país, se ha encontrado que *E. colona* tiene resistencia a fenoxaprop-etilo (Zambrano y Espinosa, 2004) y a profoxidim, cyhalofop-p-butyl, fenoxaprop y bispiribac-sodio por un mecanismo ajeno al sitio de acción mediada por la P450 (Pérez *et al.*, 2009) y bispiribac-sodio (Gil, 2010).

En *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. Clayton, se evaluaron 13 accesiones recolectadas en fincas maiceras del estado Portuguesa con nicosulfuron y se encontró que 11 son resistentes y 2 susceptibles a este herbicida. Las accesiones presentaron diferentes índices de resistencia Randal (19,7), Phaller (17,4), Esteger (30,7), Gómez (600,1), Luchi (34,4), Cedeño (8,6), Gaester (9,4), Hhaller (2,1), Giacobucci (6,6), Jiménez (39,8) y García (2,5) (Delgado *et al.*, 2006). Asimismo, se demostró que estas accesiones tuvieron resistencia cruzada entre los herbicidas sulfonilureas, nicosulfuron y foramsulfuron+iodosulfuron (Delgado *et al.*, 2008).

En fincas arroceras de Venezuela se ha encontrado resistencia de *I. rugosum* a inhibidores de ALS: bispiribac-sodio (Zambrano y Espinoza, 2005; Blanco, 2010, Arana, 2010); imzetapir+imazapir (Taccarelli, 2011) y pyribenzoxim (Sifuentes, 2012); inhibidores de ACCasa: profoxidim (Moreno, 2010; Matheus, 2010) y fenoxaprop-etilo (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)

En *Fimbristylis milacea* L. Vahl provenientes de fincas productoras de arroz en Calabozo, Estado Guárico, con un historial de aplicación de pirazosulfuron-etil de más de quince años, se encontró que ocho accesiones fueron resistentes y dos susceptibles (Villareal, 2010). Se demostró que la resistencia de la accesión de *F. miliaceae* FM9 a bispiribac-sodio fue por alteración del sitio de acción de la ALS (Ortiz *et al.*, 2012).

Características morfofisiológicas de la paja rugosa

La paja rugosa (*I. rugosum*) es originaria de Asia y se encuentra ampliamente distribuida en los trópicos. Es una gramínea anual, que crece desde el nivel del mar hasta los 2000 m.s.n.m. Posee tallos de 50-80 cm, con nudos pubescentes, inicialmente erecto, pero débil, hojas pubescentes con lígulas alargadas, la inflorescencia está conformada por dos racimos apareados y adheridos, las espiguillas son aristadas y sésiles y se propaga por semillas (Sánchez, 1993; Kissmann y Groth, 1997).

Esta maleza es una planta C₄, razón por la cual ha podido adaptarse a ambientes calurosos, secos, húmedos y de alta intensidad lumínica especialmente en los trópicos, mientras que, el arroz es una planta C₃ (Nabi, 1999).

La paja rugosa crece y se reproduce más eficientemente en condiciones de anegamiento. Bajo los ambientes de los llanos orientales de Colombia la producción de artículos de paja rugosa viables se inicia de 100-140 días a floración alcanzando cerca de 25000 artículos. Es una maleza muy agresiva que ocasiona una reducción aproximada del 33% del rendimiento y acame del cultivo de arroz (Clavijo y Medina, 2004).

Características del herbicida bispiribac- sodio

El bispiribac- sodio es un herbicida post-emergente sistémico, selectivo, para el control de malezas gramíneas, ciperáceas y de hoja ancha en el cultivo de arroz. Es de absorción foliar y radical, inhibe la actividad de la enzima ALS, esencial para la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada, leucina, isoleucina y valina. El herbicida de nombre comercial Nomine 400 SC, contiene el ingrediente activo bispiribac-sodio, y está formulado como suspensión concentrada a razón de 400 gramos de ingrediente activo por litro de producto formulado (Inquiport, 2011). El nombre químico del bispiribac- sodio 2,6-bis (4,6-dimetoxipirimidin-2-iloxi) benzoato de sodio, formula molecular C₁₉H₁₇N₄NaO₈, posee una densidad específica de 1,16 g.cm³ a 20°C; 452,36 de peso molecular, pka de 3.05; log del KOW igual a -1,03 (23°C); solubilidad de 73,39 g/L (20°C) es de color blanco, LD₅₀ común en (rata) de >5000 mg.kg⁻¹, dermal aguda: LD₅₀ (rata) de >4000 mg/kg, por inhalación: LC₅₀ (rata) de >3,99 mg/l (Bayer Cropscience, 2011; Ahrens, 1984).

El herbicida bispiribac-sodio controla malezas gramíneas tan importantes en el cultivo del arroz como la paja americana y la paja rugosa además de malezas de hojas anchas y ciperáceas, es completamente selectivo al cultivo del arroz y la dosis recomendada es de 100 ml ha⁻¹. Su momento óptimo de aplicación es cuando las malezas gramíneas tengan entre 3 y 4 hojas verdaderas (Inquiport, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado en este experimento pertenece a la colección del “Proyecto UCV- Sociedad: Manejo integrado de Malezas en arroz” que se lleva a cabo en la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (Cuadro 1). Dicho material se obtuvo a través de un muestreo de semillas fisiológicamente maduras de diferentes accesiones de paja rugosa realizado en diferentes fincas productoras de arroz de los estados Guárico, Portuguesa y Cojedes que mostraron un historial de aplicación de bispiribac-sodio de más de 10 años. En este trabajo de investigación se realizaron tres tipos de bioensayos, uno de respuesta a dosis, con y sin malatión, y el segundo de sensibilidad de la enzima acetolactato sintetasa (ALS) y el tercero de Patrón de resistencia cruzada.

Cuadro 1. Accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb., y ubicación geográfica de las fincas donde se recolectaron sus semillas, utilizadas en esta investigación.

Accesiones	Ubicación geográfica
IR82G	Parcela N° 178. Del Sistema de Riego de Rio Guárico, Municipio Francisco de Miranda. Guárico
IR90G	Parcela N° 532.del Sistema de Riego de Rio Guárico Municipio Francisco de Miranda Guárico.
IR 143G	Sistema de Riego de Rio Guárico, Municipio Miranda Guárico. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Calabozo
IR269P	Agrícola Morrocroy. Santa Cruz Turen. Portuguesa
IR301CO	Samán de Tigre. Cojedes. Lote 25 ha.

BIOENSAYO DE DETERMINACIÓN INDIRECTA DEL MECANISMO DE RESISTENCIA METABÓLICA

Se establecieron experimentos de respuesta a dosis en plantas completas para las accesiones de *I. rugosum*, IR75G, IR82G, IR90G, IR269P e IR301CO resistentes a bispiribac-sodio y como accesión susceptible se usó la IR143G (Ortiz *et al.*, 2013; Ortiz, 2011) (Cuadro 1),

usando bispiribac-sodio solo y bispiribac-sodio con malatión asperjado 24 horas antes, bajo condiciones de invernadero, en el Instituto de Agronomía de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela en Maracay. Aragua.

Las condiciones de crecimiento en invernadero fueron: 30 a 35°C, 80% humedad relativa y fotoperiodo de 12 horas bajo irradiancia natural de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 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, Fluventic haplustolls, Francosa gruesa isohipertérmico, formación Mercedes; 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 con fórmula completa (Energy[®]), cuyo contenido fue de 180; 100; 40; 12,20; 16,50; 0,21; 0,32; 2,30; 1,35; 2,70; 7,80; 0,09 y 0,03 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de N, P₂O₅, K₂O, MgO, S, CaO, Fe, Mn, B, Cu, Zn, Mo y Co, respectivamente. La dosis utilizada fue de 50 ml de Energy[®] en 10 L de agua. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con cinco replicaciones. 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 el herbicida bispiribac-sodio. El herbicida se aplicó utilizando una cámara de aspersión asperjadora de cámara con una descarga de 100 L ha^{-1} , bajo una presión de 250 kPa y empleando una boquilla de abanico plano 8002E. A la solución con herbicida se añadió el surfactante no iónico, siliconado, con regulador de pH (Break Thru[®]) a razón de 40 μl en 200 ml de solución de herbicida. Veinticuatro horas antes de la aspersión de bispiribac-sodio se aplicó el insecticida malatión (inhibidor de la enzima citocromo P450 monooxigenasa) a razón de 100 g i.a. ha^{-1} , posteriormente se asperjó el herbicida a dosis crecientes según lo señalado en el Cuadro 2.

A los 21 días después de la aplicación la biomasa correspondiente a la parte aérea de las plantas se cortó al ras del suelo y se pesó en una balanza digital. Los datos de peso fresco se expresaron como porcentaje de crecimiento (peso fresco del tratamiento con herbicida expresado como porcentaje del promedio del tratamiento control sin herbicida).

Cuadro 2. Ámbito creciente de dosis del herbicida bispiribac-sodio aplicado a las accesiones resistentes de *I. rugosum* (IR75G, IR90G, IR82, IR269P y IR301CO) y la susceptible (IR143G), cuando las plantas se encontraron en el estadio fisiológico de tres a cuatro hojas.

Accesiones Resistentes				Accesión Susceptible			
T	Dosis en X	Dosis P.C. (g p.c ha ⁻¹)	Dosis (g i.a. ha ⁻¹)	T	Dosis en X	Dosis P.C. (g p.c ha ⁻¹)	Dosis (g i.a. ha ⁻¹)
T1	0X	0	0	T1	0X	0	0
T2	1/8X	12,5	5	T2	1/128X	0,7531	0,312
T3	1/4X	25,0	10	T3	1/64X	1,562	0,625
T4	1/2X	50,0	20	T4	1/32X	3,125	1,25
T5	1X	100,0	40	T5	1/16X	6,25	2,5
T6	2X	200,0	80	T6	1/8X	12,5	5
T7	4X	400,0	160	T7	1/4X	25	10
T8	8X	800,0	320	T8	1/2X	50	20

T: tratamiento. X es la dosis comercial del producto. Dosis en g i.a. ha⁻¹: gramos de ingrediente activo por hectárea. Dosis en g p.c. ha⁻¹: gramos de producto comercial por hectárea. Previamente, 24 horas antes de la aplicación de bispiribac-sodio se asperjó 100 g i.a. ha⁻¹ de malatión (inhibidor de citocromo P450 monooxigenasa).

Variables evaluadas:

- 1. Peso fresco de la parte aérea (g):** Se determinó el peso fresco de las plantas, 21 días después de la aplicación del herbicida. Los datos de peso fresco se expresaron como porcentaje de crecimiento con respecto al testigo sin tratar.
- 2. Determinación de la dosis de efecto medio (ED50):** Los valores de la dosis del herbicida que inhibió el 50% del crecimiento se calculó con base al modelo estadístico que se ajustó a la respuesta a dosis usando el modelo logístico descrito por Streibig *et al.*, 1993.
- 3. Índice de resistencia (IR):** se calculó como la razón entre el valor de ED₅₀ de cada accesión resistente sobre el valor de ED₅₀ de la accesión susceptible. Cuando el valor del ED₅₀R/ED₅₀S sea mayor de 2, la accesión bajo estudio se consideró resistente (Valverde *et al.*, 2000).

La premisa considerada **en este estudio fue** que si el índice de resistencia del tratamiento con bispiribac-sodio y malatión es inferior al de bispiribac-sodio solo se estableció una interacción sinérgica entre ambos xenobióticos, por lo que se considera que **existe una degradación acelerada** del herbicida mediada por la citocromo P450 monooxigenasa. Si por el contrario el índice de resistencia del tratamiento con bispiribac-sodio y malatión es superior al de bispiribac-sodio solo se estableció una interacción antagónica, por lo cual no se puede explicar la degradación metabólica del herbicida. Cuando el IR de la interacción es igual en ambos tratamientos se considera que no hubo ni sinergismo ni antagonismo, de manera que el malatión no inhibió a la enzima citocromo P450 monooxigenasa (Fischer, 2010)

BIOENSAYO DE ACTIVIDAD DE ALS

Las accesiones IR82G(R), IR90G(R), IR269P(R) e IR301CO(R) fueron utilizadas para la realización del experimento de actividad de la enzima acetohidroxiácido sintasa. La accesión IR75G no se seleccionó porque presenta el mismo patrón de resistencia que la IR90G, a todos los herbicidas postemergente que se usan en el cultivo del arroz (Ortiz *et al.*, 2013). Se pesaron 2 g de material fresco vegetal de cada accesión cuando las plantas se encontraban en el estadio fisiológico de una a tres hojas, se puso en un mortero para macerar con nitrógeno líquido en un cuarto frío (4°C). El macerado se vertió en un vaso de precipitado y se le agregaron 3 ml g⁻¹ de tampón de extracción (Anexo 2), se colocó en una plancha de agitación durante 5 minutos para homogeneizar la muestra. Posteriormente la muestra se filtró en un embudo de vidrio con cuatro capas de gasa en tubos para centrifuga a baja temperatura. El filtrado se llevó a centrifugar a 27.000 r.p.m durante 20 minutos, simultáneamente se lavaron con tres veces las columnas de sephadex con agua destilada y a su vez tres veces más con la solución tampón de elución (Ray, 1984) (Anexo 3).

Una vez centrifugada la muestra se midió el volumen del sobrenadante con una micropipeta y se transfirió a otro tubo plástico de centrifuga. Se calculó la cantidad de sulfato de amonio

que se utilizó a razón $0,3 \text{ ml g}^{-1}$ y se le agregó al tubo, se llevó a un agitador ATR por 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se usó el pellet, al cual se le agregaron 500 microlitros de tampón de extracción lentamente sin hacer espuma, y se desaló utilizando una columna de sephadex G-25 (10ml) previamente equilibrada con tampón de elución (Anexo 3), poco a poco se fue eluyendo ml a ml descartando los 2 primeros mililitros. Las fracciones que contuvieron la proteína (mililitros 3 y 4) se reunieron en unos ependorf de 2 ml y se utilizaron inmediatamente para el bioensayo de actividad ALS (Ray, 1984).

Se hicieron mezclas de ensayo por triplicado en un ependorf de 1,5ml (Anexo 5) en un volumen total de 0,22ml de tampón de ensayo (Anexo 4), se agregó 100 microlitros del extracto y diferentes concentraciones de herbicidas en grado técnico. Se dejó como control la misma mezcla de reacción añadiendo 100 microlitros de H_2SO_4 6 N, antes de añadir el extracto. Los ependorf se llevaron a incubar a 37°C en un baño de maría durante una hora. Posteriormente se detuvo la reacción añadiendo 100 microlitros de H_2SO_4 , en todos los tubos excepto en los controles donde ya se había aplicado con antelación e incubando 15 minutos a 60°C , esto para facilitar la descarboxilación de acetolactato a acetoína, luego se agregaron 250 microlitros de creatina (5 g L^{-1} preparado en agua al momento de utilizarlo) y 250 microlitros de alfa naftol (5 g L^{-1} preparado en NaOH 2,5 N, se incubó a 60°C durante 15 minutos (para detectar la acetoína un complejo coloreado a 520 nm). Se realizó la lectura de absorbancia usando un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como la concentración de herbicida necesaria para reducir la actividad ALS en un 50% (I_{50}) con respecto al control sin herbicida (Ray, 1984). Las dosis de bispiribac usada fueron 0, 1, 10, 100 y 1000 nM de bispiribac-sodio

BIOENSAYO DE PATRÓN DE RESISTENCIA CRUZADA

Este experimento se realizó con las mismas accesiones R (IR75G, IR82G, IR90G, IR269P e IR301CO) y el testigo S (IR143G) usadas en los experimentos anteriores. Se trataron plántulas de estas accesiones con los siguientes herbicidas a sus dosis comercial (en g i.a. ha^{-1}) de bispiribac-sodio (40), imazapir (38,5) + imazetapir (115,5), nicosulfuron (30) y penoxsulam (60), aplicados sobre plantas al estado de tres a cuatro hojas. Se contó con un

tratamiento testigo sin herbicida. 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.

Análisis estadístico

Los datos de respuesta a dosis en plantas completas, provenientes de los experimentos repetidos con bispiribac solo y con malatión y actividad ALS provenientes de experimentos, se juntaron para su análisis; su distribución normal se verificó mediante la prueba de Wilks Shapiro. Se hicieron diagramas de distribución de los errores los cuales permitieron inferir si existía homogeneidad de varianzas. Se efectuó un análisis de regresión ajustando modelos que describían adecuadamente las tendencias y minimizaban el cuadrado medio del error.

A los datos de peso fresco de las accesiones resistentes IR75G, IR82G, IR90G, IR269P e IR301CO en el experimento de respuesta a dosis se les ajustó un modelo de regresión no lineal log-logístico de tres parámetros [ec. 1], mientras que para la susceptible IR143G se ajustó el modelo con cuatro parámetros [ec. 2]. A los datos de actividad de la enzima AHAS se utilizó el modelo de cuatro parámetros [ec. 2] para las accesiones IR82G, IR90G, IR269P e IR301CO (Streibig *et al.*, 1993; Seefeldt *et al.*, 1995):

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

[ec. 1]

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

[ec. 2]

Donde Y es el porcentaje de crecimiento, d es la respuesta media cuando la dosis de herbicida tiende a valores muy elevados, c 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. A las accesiones IR75G, IR82G, IR90G e IR301CO no se les pudo determinar su ED_{50} pues ésta correspondería a una dosis mayor

que la mayor dosis ensayada y así quedaría ubicada fuera del ámbito de observaciones. El análisis de regresión se realizó utilizando el programa Sigma Plot v. 11 (2009).

Los datos del experimento sobre patrón de resistencia cruzada se sometieron al análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5%. La distribución normal de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y diagramas de distribución de los errores permitieron inferir homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La dosis de herbicida requerida para inhibir el 50% del crecimiento (ED_{50}) de *I. rugosum* en el experimento de respuesta a dosis en plantas completas y los parámetros de las ecuaciones usados para estimar esta dosis se presentan en el Cuadro 3. Como en las accesiones de *I. rugosum* evaluadas en este estudio (IR75G, IR82G IR90G e IR301CO), se observa que el índice de resistencia (ED_{50R}/ED_{50S}) del tratamiento con bispiribac-sodio solo y bispiribac-sodio + malatión no pudieron ser calculados, se infiere que no hubo interacción entre estos dos xenobióticos debido a que el malatión no inhibió a la isoenzima citocromo P450 monooxigenasa, por lo que no se puede explicar de manera indirecta el mecanismos de resistencia de estas accesiones por degradación acelerada del herbicida, lo que debe ser investigado con otros inhibidores del complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa (aminobenzotriazol, butóxido de piperonilo, entre otros) o el inhibidor de glutathione S-transferasa (triphane) (Cuadro 3 y Figura 1). Sin embargo, la accesión IR269P mostró una reducción del IR cuando se aplicó malatión, por lo que se considera que el insecticida pudo haber inhibido a la P450 y acelerar la degradación del bispiribac-sodio (Cuadro 1). Estos resultados muestran que de las accesiones evaluadas la IR75G, IR82G IR90G e IR301CO poseen diferentes isoenzimas de P450 que la IR269P, producto quizás de que fueron objeto de un manejo diferentes en cada finca de origen. Por otra parte, las accesiones IR75G, IR82G IR90G, IR269P e IR301CO mostraron un alto grado de resistencia ya que la máxima dosis ($320 \text{ g i.a. ha}^{-1}$) de bispiribac-sodio no redujo al 50% de sus crecimientos y la

accesión IR143G fue muy susceptible debido a que con una dosis de tan sólo 10 g i.a. ha⁻¹ de bispiribac-sodio se suprimió completamente su crecimiento.

Resistencia por sitio ajeno de acción se ha reportado en *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv., a bispiribac sodio e imazamox debida a la reducción del transporte de estos herbicidas (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 degradación acelerada mediada quizás por el complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa (Pérez *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),

Contrariamente al efecto inhibidor 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).

Cuadro 3. Parámetros de las ecuaciones de regresión utilizadas para estimar la dosis de bispiribac-sodio requerida para reducir al 50% (ED_{50}) la biomasa de plantas de *I. rugosum* susceptibles y resistentes a este herbicida, coeficientes de regresión e índices de resistencia.

Accesión	Ecuación	Parámetros de regresión						
		<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	ED_{50} (g a.i. ha ⁻¹)	R^2	<i>P</i>	IR
IR143G(S)	$Y = c + (d - c) / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	-3,50(1,75)	0,67 (6,95)	93,98(5,70)	2,53	0,88	P<0,0001	
IR143G(S)+Malatión	$Y = c + (d - c) / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	-2,63(0,33)	0,29 (2,00)	96,23 (2,39)	1,32	0,9481	P<0,0001	
IR75G(R)	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	2,13(1,58)	-	98,53(6,93)	>320	0,32	P<0,0001	No calculable ^a
IR75G(R)+ Malatión	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	2,84(2,06)	-	102,05(6,23)	>320	0,33	P<0,0001	No calculable ^a
IR82G(R)	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	3,78(1,28)	-	106,67(3,48)	>320	0,38	P<0,0001	No calculable ^a
IR82G(R)+ Malatión	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	3,61(29,75)	-	98,20(3,90)	>320	0,0048	P<0,83	No calculable ^a
IR90G(R)	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	0,89(0,65)	-	102,63(5,95)	>320	0,26	P<0,0001	No calculable ^a
IR90G(R)+Malatión	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	0,28(0,61)	-	100,15(8,74)	>320	0,28	P<0,0001	No calculable ^a
IR269P(R)	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	1,47(1,97)	-	118,19(19,07)	1002,85	0,11	P<0,0108	396.38
IR269P(R)+ Malatión	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	1,66(7,63)	-	104,14(15,20)	190,49	0,36	P<0,0001	75.29
IR301CO(R)	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	1,65(0,99)	-	104,14(19,07)	>320	0,11	P<0,0108	No calculable ^a
IR301CO(R)+ Malatión	$Y = d / [1 + (x / ED_{50})^b]^{\dagger}$	3,41(1,79)	-	177,59(16,95)	>320	0,47	P<0,0001	No calculable ^a

[†]Y es el peso fresco expresado como porcentaje sobre el control (no tratado), *x* es la variable independiente, *c* y *d* son los coeficientes correspondientes a la asíntota inferior y superior, *b* es la pendiente de la línea, ED_{50} es la dosis de herbicida que se requiere para reducir el 50% del crecimiento (Streibig *et al.*, 1993), valores entre paréntesis son intervalos de confianza al 95%, R^2 es una estimación del coeficiente de determinación (Schabenberger *et al.*, 1999), *P* es el nivel de significancia, e IR es el índice de resistencia ($ED_{50} R / ED_{50} S$). Como las ED_{50} de las accesiones R IR75G, IR82G, IR90G e IR301CO se encuentran fuera del rango de dosis estudiadas (> 320 g·ha⁻¹ i.a.), el IR tiende a un valor muy elevado que no puede ser calculado. Sufijos G, P y CO en la denominación de las accesiones significan Guárico, Portuguesa y Cojedes, respectivamente.

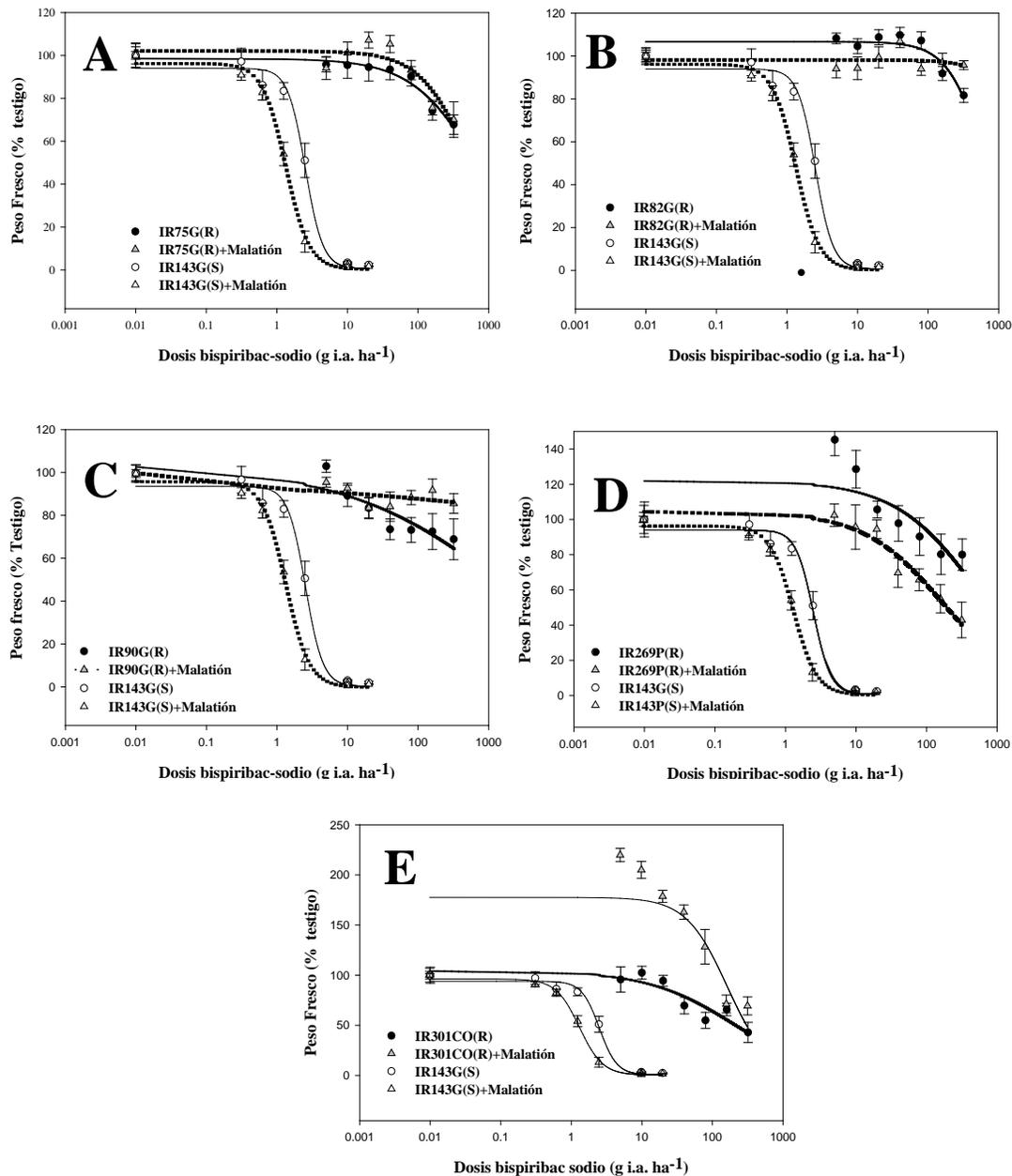


Figura 1. Respuesta de las accesiones de *I. rugosum* (A) IR75G(R) e IR143G(S); (B) IR82G e IR143G(S); (C) IR82G(R) e IR143G(S); (D) IR90G(R) e IR143G(S); (E) IR269P(R) e IR143G(S) y (F) IR301CO(R) en relación con IR143G(S) a dosis crecientes de bispiribac-sodio con y sin malatión. Cada punto es la media y la desviación estándar de diez observaciones provenientes de dos experimentos. El herbicida fue aplicado cuando las plantas tenían de tres a cuatro hojas y el peso fresco fue determinado a los 21 días después de la aplicación. La dosis comercial de bispiribac-sodio fue 40 g i.a. ha⁻¹. Se aplicó

malatión 24 horas antes de bispiribac a razón de 100 g i.a. ha⁻¹ Parámetros de las regresiones ajustadas se presentan en el Cuadro 3.

EXPERIMENTO DE ACTIVIDAD DE ALS

El experimento sobre actividad enzimática demostró que la ALS de las accesiones resistentes IR75G, IR82G IR90G, IR269P e IR301CO es casi insensible a bispiribac-sodio, mientras que la ALS extraída de IR143G (S) fue drásticamente inhibida a concentraciones de bispiribac-sodio superiores a 100 nM (Figura 2). Los índices de resistencia fueron muy altos para IR82G e IR269P y altos para IR90G e IR301CO (Cuadro 4), mostrando un gradiente de sensibilidad en la enzima lo que pudiera indicar que se trata de mutaciones distintas en el dominio conservado de la enzima ALS. Con estos resultados se comprueba que el mecanismo de resistencia de *I. rugosum* a bispiribac-sodio se debe a una modificación en el lugar de acople del herbicida en su sitio activo. 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 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. cruss-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 piroxsulam 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. cruss-galli* a inhibidores de ALS (Riar *et al.*, 2013). *Echinochloa oryzicola* Vasing., tiene resistencia cruzada a penoxsulam, bispiribac en sodio, imazamox, foramsulfuron, nicosulfuron y rimsulfurona debido 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.*, 2012)

Cuadro 4. Parámetros de las ecuaciones de regresión utilizadas para estimar la dosis de bispiribac-sodio requerida para reducir la actividad ALS (I_{50}) en plantas *I. rugosum* susceptible y resistentes a este herbicida, coeficientes de regresión e índices de resistencia.

Accesión	Ecuación	Parámetros de regresión						
		<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	I_{50} (nM)	R^2	<i>P</i>	IR
IR143G(S)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^b]^{\dagger}$	-0,35(2,46)	-1,48(340,71)	100 (37,78)	0,02 (0,33)	0,62	P<0,0001	
IR82G(R)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^b]^{\dagger}$	-2,09(6,11)	53,97 (28,12)	104,66 (19,63)	38,63 (124,88)	0,60	P<0,0001	2088,11
IR143G(S)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^b]^{\dagger}$	-0,86(0,36)	12,84 (7,23)	100,05 (8,05)	2,05 (1,09)	0,97	P<0,0001	
IR90G(R)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^b]^{\dagger}$	-0,34 (0,26)	-11,16 (91,35)	99,70 (8,21)	113,89 (615,10)	0,96	P<0,0001	55,45
IR143G(S)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^b]^{\dagger}$	-0,36 (0,78)	15,36 (16,33)	100,02 (10,68)	0,16 (0,47)	0,94	P<0,83	
IR269G(R)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^b]^{\dagger}$	-0,60 (0,79)	-4,22 (150,17)	99,38 (12,82)	270,75	0,89	P<0,0108	1664,08
IR143G(S)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^b]^{\dagger}$	-0,36 (0,78)	15,36 (16,33)	100,02 (10,68)	0,16 (0,47)	0,94	P<0,83	
IR301CO(R)	$Y = c + (d-c) / [1 + (x/ED_{50})^b]^{\dagger}$	-0,72 (0,62)	23,96 (21,59)	102,42 (13,63)	12,48 (17,41)	0,91	P<0,0108	76,68

[†]Y es el peso fresco expresado como porcentaje sobre el control (no tratado), x es la variable independiente, c y d son los coeficientes correspondientes a la asíntota inferior y superior, b es la pendiente de la línea, I_{50} es la concentración de herbicida necesaria para reducir la actividad de ALS al 50%, respectivamente (Streibig *et al.*, 1993), valores entre paréntesis son intervalos de confianza al 95%, R^2 es una estimación del coeficiente de determinación (Schabenberger *et al.*, 1999), P es el nivel de significancia, e IR es el índice de resistencia (ED_{50} R/ ED_{50} S). Sufijos G, P y CO en la denominación de las accesiones significan Guárico, Portuguesa y Cojedes, respectivamente.

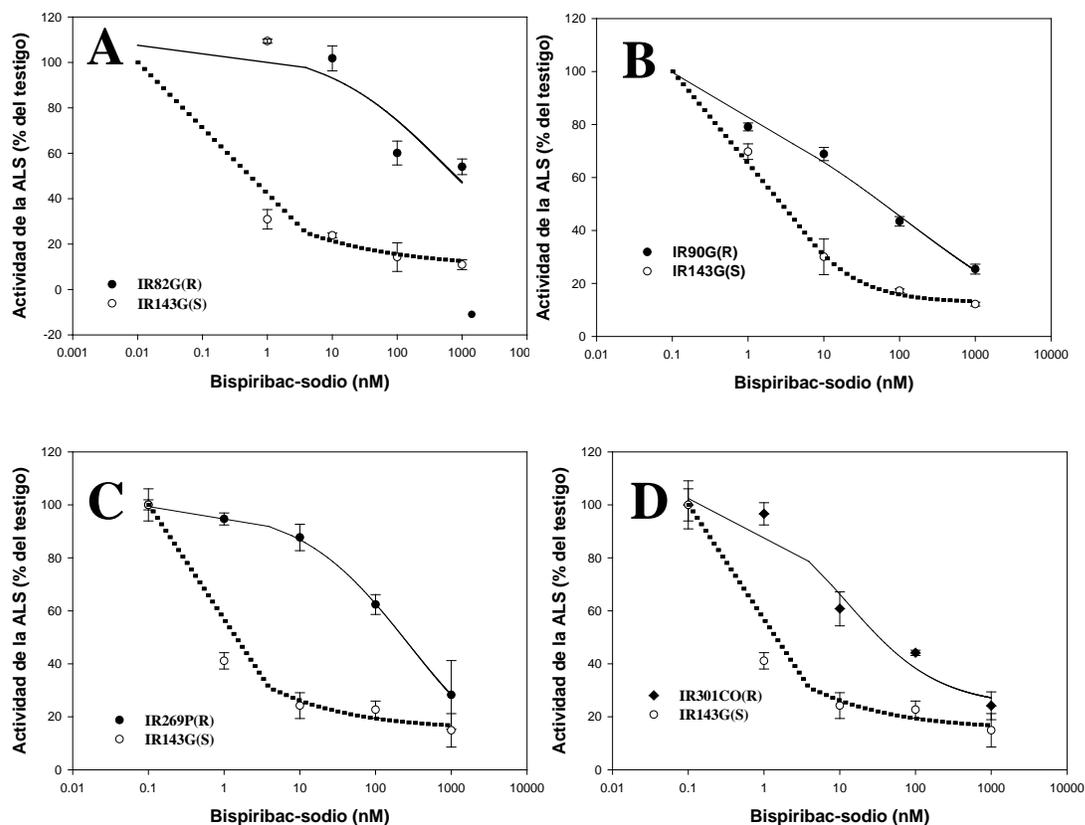


Figura 2. Actividad específica de la enzima ALS ($\text{nmol de acetoína h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$) medida en extractos de plantas susceptibles y resistentes de *I. rugosum*, (A) IR82G e IR143G(S); (B) IR90G(R) e IR143G(S); (C) IR269P(R) e IR143G(S) y (D) IR301CO(R) en relación con IR143G(S); los datos se presentan como porcentajes de la media del testigo sin herbicida. Cada punto es la media y la desviación estándar de seis observaciones provenientes de dos experimentos. Los parámetros de las regresiones ajustadas se presentan en el Cuadro 4.

Las accesiones de *I. rugosum* IR75G, IR82G, IR90G, IR269P e IR301CO mostraron resistencia cruzada a herbicidas pertenecientes a tres familias químicas de inhibidores de ALS: bispiribac-sodio (pimimidinil tiobenzoato, **PTB**), imazapir+imazetapir (imidazolinonas, **IMI**) y nicosulfuron (sulfonilurea, **SU**). Sin embargo, como las accesiones resistentes y la susceptible no fueron controladas con penoxsulam, se consideran que son tolerantes a este herbicida de la familia triazolopirimidina (**TP**) (Cuadro 4).

Este experimento se realizó con la finalidad de indagar, en cuál dominio conservado de la ALS se encontraría la posible modificación en el gen que codifica para ésta enzima en *I. rugosum*, la cual sería responsable del patrón de resistencia antes mencionado. Han sido

descritas en la página Web de la Sociedad Americana de Malezas (Heap, 2013) ocho mutaciones puntuales en dicho gen, seis de estas 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); **Pro197Arg** 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); **Trp574Leu** 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* (Scarabel *et al.*, 2010), en *E. oryzicola* (Kaloumenos *et al.*, 2013), en *E. cruss-galli* (Panozzo *et al.*, 2013); **Ser653Ile** y **Ser653Asn** en *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (Laplante *et al.*, 2009).

Cualquiera de las seis sustituciones señaladas anteriormente, pudiese estar causando el espectro de resistencia cruzada de *I. rugosum* a bispiribac-sodio, imazapir+imazetapir y nicosulfuron. Dado a que no existe en la literatura información sobre el origen de la resistencia a herbicidas en ésta 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 determinarán la presencia de mutaciones asociadas a esta resistencia 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 poaceas (*E. oryzicola*, *E. cruss-galli* y *S. viridis*) (Laplante *et al.*, 2009; Kaloumenos *et al.*, 2013, Panozzo *et al.*, 2013), por ello éstas serán las primeras que se incluirán en la búsqueda en los futuros trabajos de investigación del Laboratorio de Malezas.

Cuadro 5. Patrón de resistencia a herbicidas inhibidores de ALS por comparación del peso fresco como porcentaje del testigo sin tratar de algunas accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb., provenientes de arrozales de los estados Guárico, Portuguesa y Cojedes en respuesta a 40 g i.a. ha⁻¹ de bispiribac-sodio; 154 g i.a. ha⁻¹ de imazapir+imazetapir; 30 g i.a. ha⁻¹ de nicosulfuron y 60 g i.a. ha⁻¹ de penoxsulam, aplicados sobre plantas al estado de tres a cuatro hojas.

Accesiones	Bispiribac sodio	R ó S	Imazapir+imazetapir	R ó S	Nicosulfuron	R ó S	Penoxulam	T
IR75G	105,36 ab	R	91,34 ab	R	98,39 a	R	99,85 ab	T
IR82G	125,17 a	R	113,26 a	R	93,10 a	R	91,66 b	T
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). Promedios 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.

I. rugosum es una maleza muy competitiva con el arroz, su resistencia a varios de los grupos de herbicidas más usados para el control de gramíneas relevantes de este cultivo se ha convertido en uno de los más serios problemas en campos de arroz en el país. La resistencia permitió que *I. rugosum* incrementase su importancia dentro de la flora de malezas en el cultivo del arroz en Venezuela, debido a que en la medida que las especies de malezas susceptibles se desplazan bajo la selección por uso repetido de ciertos herbicidas a resistentes, adquieren mayor peligrosidad para el cultivo en el futuro (Culpepper, 2006).

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 presembrado. No obstante, las accesiones IR75G e IR90G de *I. rugosum* muestran resistencia a propanil (inhibidor del transporte de electrones en el Fotosistema II) (Medina, 2012), profoxidim (inhibidor de la enzima ACCasa) (Matheus, 2010) y solamente los herbicidas oxadiazón (Bernal, 2012) y butacloro (Ortiz, 2011) pudieron controlarlas eficazmente, pudiéndose considerar a estos dos últimos herbicidas en los programas de mitigación de la resistencia de *I. rugosum* en el país. También pueden emplearse prácticas culturales para el control de la paja rugosa como la falsa siembra que consiste en humedecer el suelo para, luego de emerger las malezas, aplicar un herbicida no selectivo como glifosato. Igualmente se puede implementar la inundación temprana de los

lotes de arroz ya que las semillas de *I. rugosum* no germinan sumergidas en agua (IRRI, 2012). Asimismo pueden emplearse pases de rastra o efectuar batido del suelo para evitar la producción de semillas de estas malezas. También se puede nivelar el suelo a pendiente natural de manera de hacer pequeños camellones de 10 a 15 cm de altura (taipas) y construir canales de drenaje para rotar con cultivos como maíz y sorgo, de esta manera usar herbicidas con otros mecanismos de acción y promover un cambio en la dinámica y composición de malezas.

CONCLUSIONES

De acuerdo con las condiciones de esta investigación se puede concluir que:

1. A las accesiones de *I. rugosum*, IR75G, IR82G IR90G e IR301CO, no se les pudo calcular la dosis media de bispiribac-sodio (ED_{50}) para reducir la mitad de su crecimiento ni cuando se hizo el experimento solo con herbicida ni con malatión, lo que demostró que el malatión no inhibió a la isoenzima citocromo P450 monooxigenasa, por lo que no se puede explicar de manera indirecta el mecanismos de resistencia de estas accesiones por degradación acelerada del herbicida
2. En la accesión IR269P si se pudo determinar la dosis media de bispiribac sodio que resultó mayor en el tratamiento con herbicida solo que cuando se utilizó malatión, lo cual confirma que hubo sinergismo entre estos dos xenobiótico por lo que se redujo el índice de resistencia en el experimento con malatión demostrándose que el insecticida pudo haber inhibido a la P450 y acelerar la degradación del bispiribac-sodio en esta accesión.
3. La concentración de bispiribac-sodio (I_{50}) necesaria para reducir a la mitad la actividad de la enzima acetolactato sintasa (ALS) fueron muy altos para IR82G e IR269P y altos para IR90G e IR301CO, mostrando un gradiente de sensibilidad y comprobando que el mecanismo de resistencia de estas cuatro accesiones de *I. rugosum* a bispiribac-sodio fue por alteración del sitio de acción.
4. 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.

5. Las accesiones de *I. rugosum* IR75G, IR82G, IR90G, IR269P e IR301CO mostraron resistencia cruzada a herbicidas pertenecientes a tres familias químicas de inhibidores de ALS: bispiribac-sodio (**PTB**), imazapir+imazetapir (**IMI**) y nicosulfuron (**SU**).
6. *I. rugosum* es tolerante a penoxsulam (familiatriazolopirimidina, **TP**)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahrens, W. 1994. Herbicide Handbook. Illinois U.S.A Weed Science Society of America. 350 p.

Arana, G. 2010. Evaluación de la resistencia de accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb, provenientes del estado Guárico al herbicida bispiribac- sodio en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Trabajo de Grado .Facultad de Agronomía.Universidad Central de Venezuela. 35 p.

Ashigh, J., C. L. Corbett, P. J. Smith, J. Laplante, And 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.

Anzalone, A. 2008. Herbicidas. Modos y mecanismos de acción en plantas. Barquisimeto, Venezuela. Fondo Editorial de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. 140 p.

Bayer CropScience Venezuela. 2011. Información sobre productos, herbicidas. [Documento en línea], Disponible: essttp://www.bayercropscience.com.ve/webapp/CropDes/productos/venezuela/agro_ps_ven_productosX.jsp?tipoProducto=HERBICIDAS&prodIdProducto=185. [Consulta: 2010, septiembre]

Bernales, S. 2012. Evaluación del efecto del herbicida oxadiazón en el control de accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb., resistentes a propanil, bispiribac sódio y/o profoxidim, 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, And D. L. Siehl. 1995. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to

herbicides that target acetolactate synthase. *Journal of Biological Chemistry* 270 : 17381-1738

Blanco, S. 2010. Evaluación de la resistencia de algunas accesiones de *Ischaemum rugosum* Salisb al herbicida Bispiribac- sodio, recolectadas en arrozales del estado Portuguesa. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 57 p.

Clavijo, J. y Medina, H. 2004. Impacto socioeconómico de las malezas en el cultivo de arroz en Colombia. *Revista Comalfi* 31(1):13-23

Cruz-Hipolito H, M. Osuna. A. Vidal, A 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

Culpepper, A.S. 2006. Glyphosate-Induced Weed Shifts. *Weed Technology* 20:277-281.

Delgado. M., A. Ortiz y C. Zambrano. 2006. Resistencia de *Rottboellia cochinchinensis* (Lour). W.D. Clayton al herbicida Nicosulfuron en cultivos de maíz *Agronomía Tropical*. 56(2): 171-183.

Delgado, M.; A. Ortiz y C. Zambrano. 2008. Poblaciones de *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. Clayton con resistencia Cruzada al foramsulfuron + iodosulfuron. *Agronomía Trop.* 58(2):175-180.

De Prado R. y H. Cruz-Hipolito. 2005. Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas. [Revista en línea] Disponible en http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/webseminariomalezas/articulos/depradorafael.pdf [Consulta Diciembre, 2008].

Devine, M y C. Preston. 2000. Herbicides and their mechanisms of action. Edited by Cobb, A. and R. Kirkwood. Sheffield Academic Press. 77-79 p

Duggleby R. y S. Pang. 2000. Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 33(1):1-36.

Espinoza N. y J. Díaz. 2010. Situación de la resistencia de malezas a Herbicidas en Cultivos Anuales en Chile. [Documento en línea]. Disponible :[http:// www.resistencia.cl/seminario](http://www.resistencia.cl/seminario/index.php?option=comcontentview=article id) lindexphpoption=comcontentview=article id[Consulta: 2010, Septiembre]

Fischer A; D. Bayer; M. Carriere; C. Ateh and K. Yim.. 2000. Mechanisms of resistance to bispyribac-sodium in an *Echinochloa phyllopogon* Accession. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 68: 156–165

Fischer, A. y B. Valverde. 2005. Evolución de resistencia a herbicidas, diagnóstico y manejo en malezas del arroz. [Documento en línea]. Disponible:http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/webseminariomalezas/articulos/fischeralbert.pdf. [Consulta: 2010, Abril]

Fischer, A.J. 2010. Capítulo 7: Evaluación de mezclas de herbicidas. EN: *Curso de actualización en metodologías para la investigación y el desarrollo tecnológico en las ciencias de las malezas y XIII Congreso de la Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas (SOVECOM)*”, A. Anzalone y A. Ortiz. Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas (SOVECOM). Barquisimeto. Estado Lara.

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. *Biogro* 25(1):3-10.

Gil, R. 2010. Evaluación de la resistencia de algunas accesiones de *Echinochloa colona* (L) Link recolectadas en el Sistema de Riego Río Guárico (SRRG), estado Guárico al herbicida bispyribac- sodio. Trabajo de Grado Facultad de Agronomía.Universidad Central de Venezuela. 40 p.

Han, H., Q. Yu, G.R. Cawthray, and 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.* doi: 10.1002/ps.3552

Heap, I. 2013. Internacional survey of herbicide resistantweeds. (Documento en línea) Disponible:<http://www.weedscience.org/in.asp> [Consulta: 2013, julio].

Heap, I and H. Lebaron. 2001. Introduction and Overview of Resistance. In: *Herbicide Resistance and World Grains*. Stephen Powles and Dale Shaner, Eds. Washington. DC. 1-22 p.

Inquiport. 2011. Herbicidas, Nominee 400 SC. Bispiribac- sodio. Documento en línea. Disponible en <http://www.inquiport.com/productos/herbicidas/nominee.php>. Consulta [Enero 2011]

International Research Rice Institute. IRRI. 2012. Weed Management. Rice Knowledge Bank. Disponible in <http://www.knowledgebank.irri.org/ipm/index.php/the-dirty-dozen/ischaemum-rugosum-salisb>. [Consulta: Marzo 2012]

Iwakami S, A. Uchino, Y. Kataoka, H. Shibaike, H. Watanabe, 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

Jasienuk, M., A. L. Brûlé-Babel, and I. N. Morrison. 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science* 44:176–193.

Kaloumenos, Nikolaos S; Adamouli, Vasiliki N; Dordas, Christos A; Eleftherohorinos, Ilias G. 2011. Corn poppy (*Papaver rhoeas*) cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Pest management science* 67 : 574 – 585

Kaloumenos, N. S., S. L. Chatzilazaridou, P. V. Mylona, A. N. Polidoros and 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.

Kissmann, G, y D. Groth, 1997. *Plantas Infestantes e Nocivas*. BASF Brasileira. 2a Edicion. Tomo I, Brasil. 259,261 p.

Laplante, J., I. Rajcan, And 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.

Lamego F. P, D. Charlson, C. A. Delatorre, N. R. Burgos, and R. A. Vidal. 2009. Molecular Basis of Resistance to ALS-Inhibitor Herbicides in Greater Beggarticks. *Weed Science* 57: 474 - 481.

Liu W, Y. Bi, L. Li, G. Yuan, L. Du, and J. Wang. 2013. Target-site basis for resistance to acetolactate synthase inhibitor in Water chickweed (*Myosoton aquaticum* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. In Press, corrected proof, available online 14 may 2013. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/aip/00483575>

Matheus, R. 2010. Evaluación de la resistencia de poblaciones de *Ischaemum rugosum* Salisb., al herbicida profoxidim, provenientes del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), del Sistema de Riego Río Guárico (SRRG) y sus adyacencias. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad central de Venezuela. 40 p.

McCourt J; S. Pang; J. Scott L. Guddat; and R. Duggleby. 2006. Bindin sites to herbicides is revealed in the structure synthase of plants acetohydroxyacid. *School of Molecular and Microbial Sciences*. 103(3): 569–573.

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.

Mentaberry, A. 2008. Agrobiotecnología. Tolerancia a herbicidas por Ingeniería Genética. Universidad de Buenos Aires. (53-59) 74 p. [Documento en línea]http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~232007/8_AGBT08%20Control%20de%20malezas.pdf. [Consulta: 2011, enero]

Moreno, J. 2010. “Evaluación del índice de resistencia de poblaciones de *Ischaemum rugosum* Salisb., al herbicida profoxidim, recolectadas en arrozales del estado Portuguesa. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 44 p.

Nabi, L 1999. The population biology of wrinklegrass (*Ischaemum rugosum*. Salisb). Tesis PhD. University of Malaya. Kuala Lumpur. 130 p.

Ortiz, A. 2011. Informe de avance sobre el proyecto manejo integrado de malezas en arroz (MIMA). Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 61 p.

Ortiz A.; L. Villarreal; S. Torres; M. Osuna; L. López, R. Figueroa; C. Zambrano; M. Cásares; 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

Ortiz, A., S. Blanco, G. Arana, L. López, S. Torres, Y. Quintana, P. Pérez, C. Zambrano y A. Fischer. 2013. Resistencia de *Ischaemum rugosum* al herbicida bispiribac-sodio en Venezuela. Bioagro. En prensa.

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 *Cyperusdifformis*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 73(1): 9-17.

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.

Panozzo, S., L. Scarabel, P. J. Tranel, and M. Sattin.. 2013. Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*.. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105 : 93-101

Pantoja A, A. Ramirez, L. Sanit. 2010. Producción de arroz en América Latina: Área sembrada y Costos [Documento en línea] Disponible. http://webapp.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/primer_a_parte.pdf. [Consulta: 2010, Noviembre]

Powles S, and P.Howat. 1990. Herbicide resistant weed in Australia. *Weed Technol.* 4:178-185

Powles, S., C. Preston; I. Bryan and A. Jutsum. 1997. Herbicide resistance: Impact and management. *Adv. agron.* 58: 57-93

Preston, C y S. Powles. 2002. Evolution of herbicide resistance in Weeds: initial frequency of target site- based resistance to acetolactate synthase- inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. *Heredity* 88: 8-13

Ray, T. 1984. Site of action of chlorsulfuron –inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plan physiol.* 75: 827-831.

Reznick, D. N. y K.G. Cameron. 2001. The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica* 112-113: 183-198.

Riar, D. S., J. K. Norsworthy, J. A. Bond, M. T. Bararpour, M. J. Wilson, and 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.

Riar D. , J.K. Norsworthy, V. Srivastava, V. Nandula, J. A. Bond, and 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.

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. 45p.

Saari, L. L., J. C. Cottelman, and D. C. Thill. 1994. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: *Herbicide Resistance in Plants* (eds. SB Powles y JAM Holtum), , CRC Press, Boca Raton. 83-140p.

Sánchez P. 1993. *Plantas indeseables*. Editorial científico- Técnico. Ciudad de la Habana, Cuba. 19-20p.

Scarabel, L., A. Locascio, A. Furini, M. Sattin, S. Varotto. 2010. Characterisation of ALS genes in the polyploid species *Schoenoplectus mucronatus* and implications for resistance management. *Pest management science* 66 : 337 - 344.

Scott J., M. L. Flessner, Z. Wang, F. Dane, R. H. Walker, and G.R. 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.

Sibony, M. and B. Rubin. 2003. Molecular basis for multiple resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides and atrazine in *Amaranthus blitoides* (prostrate pigweed). *Planta* 216 : 1022-1027.

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. 32p.

Streibig, J., Rudemo, M., Jensen, J. 1993. Dose- response curves and statical models, in: J: C: Streibig, P. Kudsk (Eds), *Herbicide Bioassays*, CRC, Boca Raton, FL. 29-55p.

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.

Tal, A. and B. Rubin. 2004. Occurrence of resistant *Chrysanthemum coronarium* to ALS inhibiting herbicides in Israel. *Resistant Pest Management Newsletter* 13 : 31-33.

Tan M.; C. Preston; and X. Wang. 2007. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-inhibiting and ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. *Weed Research Society* 47: 534–541

Uchino, A., S. Ogata, H. Kohara, S. Yoshida, T. Yoshioka, And 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.

Valverde, B.; C. Riches y J. Caseley. 2000. Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona* L. Link. San José, Costa Rica, Cámara de Insumos Agropecuarios. 138 p.

Valverde, B. 2005. Manejo de la resistencia a los herbicidas en los países en desarrollo. FAO. Roma Italia. Documento en línea. Disponible: <http://www.fao.org/documents/showcdr.asp?urlfile=/docrep/007/y5031s/y5031s0h.htm>. [Consulta Septiembre, 2010].

Villareal, L. 2010. Evaluación de la resistencia de accesiones de *Fimbristylis miliacea* L. Vahl al herbicida pirazosulfuron-etil recolectadas en campos de arroz del Sistema de Riego

Río Guárico, Calabozo, Estado Guárico. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 67 p.

Woodworth, A. P., P. Bernasconi, M. Subramanian, and B. Rosen. 1996. A second naturally occurring point mutation confers broad-based tolerance to acetolactate synthase inhibitors. *Plant Physiology* 111 : S105.

Yasuor, H., Milan, M., Eckert, J. W. and Fischer, A. J. 2012. Quinclorac resistance: a concerted hormonal and enzymatic effort in *Echinochloa phyllopogon*. *Pest. Manag. Sci.* 68: 108–115.

Yu Q.; X. Zhang, A. Hashem; M. Walsh, and S. Powles. 2003. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *WeedScience* 51:831-838

Yun M. S., Y. Yogo, Y. Yamasue, A.J. Fischer. 2005. Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 83: 107-114

Zambrano, C. and 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.

Zambrano, C. y H. Espinoza, 2004. Evaluación de la resistencia de accesiones de *Echinochloa colona* (L.) Link al fenoxaprop-p-etil en arroz (*Oryza sativa* L.) provenientes de diferentes localidades del estado Portuguesa. *Memorias XI Congreso de Malezas*. UNET. Táchira. Venezuela. 131 p.

Zheng, D., G. R. Kruger, S. Singh, V.M. Davis, P.J. Tranel, S. C. Weller and W.G. Johnson. 2011. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. *Pest. Manag. Sci.* 67: 1486–1492.

ANEXOS

Anexo 1. Composición del Tampón de Extracción

SOLUCIONES MADRE	5 ml	10 ml	15 ml
1,0 M Fosfato de potasio, pH 7,5	0,5 ml	1 ml	1,5 ml
10 mM Piruvato de sodio	0,5 ml	1 ml	1,5 ml
5 mM MgCl ₂	0,5 ml	1 ml	1,5 ml
50 mM TPP	50 µl	0,1 ml	0,15 ml
100 µM FAD	0,5 ml	1 ml	1,5 ml
Glicerol	0,5 ml	1 ml	1,5 ml
Agua (destilada/desionizada)	2,45 ml	4,9 ml	7,35 ml
DTT	10 mg	20 mg	30 mg

Anexo 2. Composición del Tampón de Elución

SOLUCIONES MADRE	125 ml	250 ml	500 ml
1,0 M Fosfato de Potasio, pH 7.5	12,5 ml	25 ml	50 ml
0,5 M Piruvato de sodio	5 ml	10 ml	20 ml
0,1 M mM MgCl ₂	0,625 ml	1,25 ml	2,5 ml
Agua (destilada/desionizada)	106,875 ml	213,75 ml	427,5 ml

Anexo 3. Composición del Tampón de Ensayo.

SOLUCIONES MADRE	7.5 ml	15 ml
1.0 M Fosfato de potasio, pH 7.0	0.625 ml	1.25 ml
0.5 M Piruvato de sodio	2.5 ml	5.0 ml
0.1 M MgCl ₂	1.25 ml	2.5 ml
50 mM TPP	0.25 ml	0.5 ml
1000 µM FAD	1.25 ml	2.5 ml
Agua (destilada/desionizada)	1.625 ml	3.25 ml

Anexo 4. Mezclas de ensayo (los volúmenes están en μl)

	B*	X	1nM	10nM	100nM	1000 nM
T. ensayo	100	100	100	100	100	100
Herbicida	-	-	2(2)	20(2)	2(1)	20(1)
DMSO**	20	20	18	-	18	-
Extracto	100	100	100	100	100	100

* B= control (se detiene al principio la reacción añadiendo H_2SO_4 antes de poner el extracto); X= sin herbicida; 1-1000 nM= diferentes concentraciones de herbicida



Anexo 5 .Cámara de aplicación de plaguicidas utilizada en los experimentos de respuesta a dosis con y sin malatión.



Anexo 6 .Método utilizado para pre germinar la semilla de *I. rugosum*, mediante una bomba de pecera y una solución compuesta por (KNO_3 al 2% +agua).



Anexo 7. Bioensayo de Respuesta a dosis para la accesión IR82G con el herbicida bispiribac-sodio.



Anexo 8. Bioensayo de Respuesta a dosis para la accesión IR75G con el herbicida bispiribac-sodio.