

Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de La Plata



*“Estudio fisiológico y genético de biotipos
de Lolium perenne L. resistentes a
glifosato”*



Marcos Yannicari

Directora: Prof. Dra. Ana María Castro
Co-director: Prof. Ing. Agr. Daniel O. Giménez
Asesora Académica: Prof. Dra Claudia Natalucci

Año 2014

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado el soporte económico, a través de sus becas, para la realización de este trabajo. Asimismo, a la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, por permitirme realizar mi formación de postgrado. Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por el financiamiento de varias de las actividades de la tesis.

El presente trabajo no habría sido posible sin el acompañamiento y apoyo de numerosas personas a las cuales estaré agradecido durante toda mi vida:

- A mis directores por la confianza que han depositado en mí, por generar un ambiente que me ha permitido trabajar y discutir libremente. A la Dra. Ana María Castro y al Ing. Agr. Daniel O. Giménez quienes han guiado mi trabajo y me han formado con paternal incondicionalidad, despertando mi interés por la investigación.
- A la Ing. Agr. Carolina Istilart de la Chacra Experimental Integrada Barrow, quien ha confiado en mí desde el primer día, me ha integrado a la comunidad de malezólogos y al problema de la resistencia a herbicidas.
- A la Dra. Claudia Natalucci, quien en el LIProVe me ha brindado su conocimiento y experiencia para formarme y desarrollar las tareas que no habrían sido posible sin su participación ni su calidez humana.
- Al LIProVe, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, por brindarme acceso a sus instalaciones y equipamiento para realizar las experiencias químicas y bioquímicas de esta tesis.
- A mis compañeras del Laboratorio de Genética, con quienes he compartido el quehacer diario, intercambiando experiencias y haciendo amena cada jornada.

- A mis compañeros del INFIVE y de la Cátedra de Fisiología Vegetal (FCAyF – UNLP), becarios, técnicos y docentes que desinteresadamente me han brindado su compañerismo a diario.
- A los doctores Juan José Guiamet y Eduardo Tambussi, quienes han colaborado generosamente, discutiendo resultados y compartiendo sus conocimientos y experiencias.
- Al Dr. Horacio Acciaresi por la confianza que ha depositado en mí, por todo lo que me ha enseñado de malezas y por compartir conmigo sus trabajos y desafíos tan amistosamente.
- A mis amigos por la compañía constante, apoyándome en los fracasos y festejando mis alegrías.
- A mi familia, por darme la oportunidad de estudiar, por estar presente en todo momento, brindándome su cariño y enseñándome con el ejemplo a vivir la vida con alegría y dedicación.
- A Valentina, por todo su amor, su respeto y su compañía constante, sosteniéndome en las caídas, perdonando mis ausencias y compartiendo mi felicidad.

Índice

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
<i>Los cambios florísticos en las comunidades de malezas de la región pampeana</i>	7
<i>El glifosato como herbicida</i>	9
<i>Glifosato en el ambiente</i>	13
<i>Glifosato y la resistencia de las malezas</i>	14
<i>Factores condicionantes de la resistencia a herbicidas</i>	15
<i>Los mecanismos de resistencia: ¿Por qué la planta sobrevive a la aplicación de un herbicida?</i>	17
<i>Importancia y biología del género Lolium spp.</i>	20
<i>Interferencia ryegrass-cultivo</i>	23
<i>La población de Lolium perenne presumiblemente resistente a glifosato en el sur bonaerense</i>	25
<i>¿Por qué este trabajo?</i>	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Detección de la resistencia a glifosato.....	30
<i>Ensayos de evaluación de la sensibilidad a glifosato</i>	30
<i>Material vegetal</i>	30
<i>Bioensayo de dosis-respuesta de germinación</i>	30
<i>Bioensayo de dosis-respuesta de crecimiento y supervivencia de plantas</i>	31
<i>Acumulación de ácido shikímico en tejidos foliares de plantas tratadas con glifosato</i>	32
<i>Evaluación de la relación entre la acumulación de shikimato y la sensibilidad a glifosato en hojas incubadas in vitro</i>	33
<i>Evaluación de la sensibilidad a glifosato empleando plantas en macollaje multiplicadas vegetativamente</i>	35
<i>Ensayo de evaluación a campo de un principio activo alternativo de diferente mecanismo de acción respecto a glifosato</i>	37
<i>Análisis estadístico</i>	38
Bases fisiológicas y bioquímicas de la resistencia a glifosato.....	40
<i>Efectos sobre el crecimiento</i>	40
<i>Efectos sobre la acumulación de azúcares libres</i>	41
<i>Preparación del extracto</i>	41
<i>Determinación de azúcares totales</i>	42
<i>Determinación de azúcares reductores</i>	42
<i>Estimación de azúcares no reductores</i>	43
<i>Efectos del glifosato en el traslado de asimilados</i>	43

<i>Material vegetal y condiciones de cultivo</i>	43
<i>Patrón de absorción de glucosa-C¹⁴ y traslado de C¹⁴</i>	44
<i>Absorción de glucosa-C¹⁴ y traslado de C¹⁴ en post-aplicación de glifosato</i>	45
<i>Liberación de C¹⁴ desde las raíces durante post-aplicación de glifosato</i>	46
<i>Efectos del glifosato sobre la fotosíntesis</i>	46
<i>Material vegetal</i>	46
<i>Tratamiento con glifosato</i>	47
<i>Medición del intercambio gaseoso durante post-aplicación de glifosato</i>	47
<i>Respuesta del intercambio gaseoso a la concentración de CO₂</i>	48
<i>Mediciones de fluorescencia de la clorofila durante post-aplicación de glifosato</i>	48
<i>Efectos del glifosato sobre la actividad de peroxidasas y la integridad de las membranas celulares en plantas susceptibles y resistentes</i>	49
<i>Material vegetal y preparación del extracto</i>	49
<i>Medición de la actividad de peroxidasas totales</i>	50
<i>Efectos del glifosato sobre la integridad de las membranas celulares</i>	51
<i>Evaluación de la actividad in vitro de la enzima EPSPs</i>	52
<i>Material vegetal</i>	52
<i>Extracción de la enzima EPSPs</i>	52
<i>Purificación y concentración de EPSPs</i>	53
<i>Ensayo de actividad de EPSPs bajo concentraciones crecientes de glifosato</i>	54
<i>Análisis estadísticos</i>	55
Bases genéticas de la resistencia a glifosato	57
<i>Recuento cromosómico y cuantificación del contenido de ADN nuclear en biotipos resistentes y susceptibles</i>	57
<i>Material vegetal</i>	57
<i>Recuento cromosómico</i>	57
<i>Estimación de ADN nuclear por citometría de flujo</i>	58
<i>Análisis estadístico</i>	58
<i>Cruzamientos dirigidos entre plantas susceptibles y resistentes de Lolium perenne</i>	59
<i>Metodología de castración y cruzamiento</i>	60
<i>Metodología para forzar la autofecundación</i>	62
<i>Cruzamientos dirigidos y autofecundaciones</i>	62
<i>Hibridación de Lolium multiflorum x Lolium perenne</i>	63
<i>Evaluación de la sensibilidad a glifosato de la descendencia</i>	63
<i>Modelo evaluado y análisis estadístico</i>	64
<i>Estudio del flujo de genes de resistencia</i>	65
<i>Material vegetal y experimento a campo</i>	65
<i>Evaluación de la sensibilidad a glifosato de la descendencia</i>	68
<i>Bioensayo de germinación en presencia de glifosato</i>	68
<i>Evaluación del crecimiento de las plantas bajo efecto del glifosato</i>	69
<i>Evaluación de la supervivencia de plantas en macollaje</i>	69
<i>Análisis estadístico</i>	70

Implicancias adaptativas de la resistencia.....	72
<i>Material vegetal y control del fondo genético</i>	72
<i>Ensayos de campo</i>	73
<i>Estudio de parámetros relacionados a la eficacia biológica</i>	73
<i>Estimación del estatus de nitrógeno y fósforo</i>	75
<i>Estudio de la germinación en el periodo post-cosecha</i>	75
<i>Análisis estadístico</i>	76
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
Detección de la resistencia a glifosato	78
<i>Bioensayo de dosis-respuesta de germinación</i>	79
<i>Bioensayo de dosis-respuesta de crecimiento y supervivencia de plantas</i>	82
<i>Contenido de clorofila</i>	82
<i>Supervivencia de plantas</i>	83
<i>Acumulación de ácido shikímico en tejidos foliares de plantas tratadas con glifosato</i>	87
<i>Evaluación de la relación entre la acumulación de shikimato y la sensibilidad a glifosato en hojas incubadas in vitro</i>	88
<i>Ensayo de evaluación a campo de un principio activo alternativo de diferente mecanismo de acción respecto a glifosato</i>	91
Bases fisiológicas y bioquímicas de la resistencia a glifosato	93
<i>Efectos sobre el crecimiento</i>	94
<i>Efectos sobre la acumulación de azúcares libres</i>	96
<i>Determinación de azúcares totales</i>	96
<i>Determinación de azúcares reductores</i>	99
<i>Estimación de azúcares no reductores</i>	100
<i>Efectos del glifosato en el traslado de asimilados</i>	102
<i>Patrón de absorción de glucosa y transporte de C¹⁴</i>	102
<i>Absorción de glucosa y localización de C¹⁴ luego del tratamiento con glifosato</i>	106
<i>Liberación de C¹⁴ desde la raíces luego del tratamiento con glifosato</i>	113
<i>Efectos del glifosato sobre la fotosíntesis</i>	115
<i>Efectos del glifosato sobre la etapa bioquímica de la fotosíntesis: intercambio gaseoso foliar durante post-aplicación del herbicida</i>	116
<i>Intercambio gaseoso foliar en función de la concentración de CO₂</i>	119
<i>Efectos del glifosato sobre la etapa lumínica de la fotosíntesis: variaciones en la fluorescencia de la clorofila durante post-aplicación</i>	122
<i>Efectos del glifosato sobre la actividad de peroxidasas y la integridad de las membranas celulares en plantas susceptibles y resistentes</i>	133
<i>Efectos del glifosato sobre la actividad de peroxidasas totales</i>	134
<i>Efectos del glifosato sobre la integridad de las membranas celulares</i>	136
<i>Evaluación de la actividad in vitro de la enzima EPSPs</i>	138

Bases genéticas de la resistencia a glifosato.....	142
<i>Recuento cromosómico y estimación de diferencias en el contenido de ADN nuclear en biotipos resistentes y susceptibles a glifosato.....</i>	142
<i>Dotación cromosómica de plantas susceptibles y resistentes a glifosato.....</i>	143
<i>Estimación del contenido de ADN nuclear de plantas susceptibles y resistentes.....</i>	144
<i>Cruzamientos dirigidos entre plantas susceptibles y resistentes de Lolium perenne.....</i>	146
<i>Auto-incompatibilidad y auto-fertilidad en Lolium perenne.....</i>	146
<i>Herencia de la resistencia a glifosato.....</i>	148
<i>Herencia de la resistencia en híbridos de Lolium multiflorum x Lolium perenne.....</i>	157
<i>Estudio del flujo de genes de resistencia.....</i>	161
<i>Sensibilidad a glifosato de la progenie germinando en presencia del herbicida.....</i>	163
<i>Sensibilidad a glifosato de la progenie en macollaje: efecto del herbicida sobre el crecimiento longitudinal de las hojas.....</i>	167
<i>Sensibilidad a glifosato de la progenie en macollaje: efecto del herbicida sobre el porcentaje de control.....</i>	169
Implicancias adaptativas de la resistencia.....	179
<i>Fenología y hábito de crecimiento.....</i>	180
<i>Caracteres adaptativos: análisis de parámetros de crecimiento vegetativo.....</i>	181
<i>Estatus de nitrógeno y fósforo en la hoja bandera.....</i>	185
<i>Caracteres adaptativos: componentes del rendimiento y producción de semillas.....</i>	187
<i>Porcentaje de germinación y dormición de las semillas producidas.....</i>	189
CONCLUSIONES.....	196
BIBLIOGRAFÍA.....	202

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis se han realizado las siguientes publicaciones:

YANNICCARI, M.; ISTILART, C.; GIMÉNEZ, D. & CASTRO, A.M. 2012. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. *Crop Protection*, (ISSN: 0261-2194) 32: 12-16.

YANNICCARI, M.; ISTILART, C.; GIMÉNEZ, D.; ACCIARESI, H. & CASTRO, A.M. 2012. Efecto del glifosato sobre el crecimiento y acumulación de azúcares libres en dos biotipos de *Lolium perenne* L. de distinta sensibilidad al herbicida. *Planta Daninha* (ISSN: 0100-8358) 30(1): 155-164.

YANNICCARI, M.; ISTILART, C.; GIMÉNEZ, D. & CASTRO, A. 2012. Effects of glyphosate on the movement of assimilates of two *Lolium perenne* L. populations with differential herbicide sensitivity. *Environmental and Experimental Botany* (ISSN: 0098-8472) 82: 14-19.

YANNICCARI, M.; TAMBUSI, E.; ISTILART, C. & CASTRO, A. 2012. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* (ISSN: 0981-9428) 57: 210-217.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
A_{max}	Tasa fotosintética máxima a saturación de CO ₂ .
A_{sat}	Tasa de asimilación neta de carbono a saturación de luz.
C_a	Concentración de CO ₂ ambiental.
C_i	Concentración intercelular de CO ₂ .
DL ₅₀	Dosis letal media.
ϵ	Coefficiente de extinción molar
ea	Equivalente ácido.
ED ₅₀	Dosis efectiva media.
ED ₉₀	Dosis efectiva capaz de inhibir la respuesta en un 90 %.
EPSPs	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa.
ETR	Tasa de transporte fotosintético de electrones.
F_0	Señal de fluorescencia mínima.
F_m	Señal de fluorescencia máxima de hojas aclimatadas a la oscuridad.
F_m'	Señal de fluorescencia máxima de hojas iluminadas.
FSII	Fotosistema II.
F_s'	Señal de fluorescencia bajo un nivel de irradiancia estable.
F_v/F_m	Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II.
F_v'/F_m'	Rendimiento intrínseco del fotosistema II.
Γ_{CO_2}	Punto de compensación lumínico.
GR ₅₀	Dosis de inhibición del crecimiento al 50 %.
g_s	Conductancia estomática.
I ₅₀	Concentración o dosis de inhibición media.
IC	Intervalo de confianza (95%).
IR	Índice ó factor de resistencia.
J_{max}	Tasa potencial de transporte de electrones que participa de la regeneración de ribulosa 1,5-bifosfato.
p/v	Peso en volumen.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
Pi	Fósforo inorgánico.
qP	Atenuación fotoquímica.

Rubisco	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa.
RuBP	Ribulosa-1,5-bifosfato.
v/v	Volumen en volumen.
V_{max}	Tasa máxima de carboxilación de ribulosa 1,5-bifosfato.
χ^2	Chi-cuadrado.

Introducción

“Después de miles de años de labranza y deshierbe manual, todavía tenemos malezas en los campos agrícolas. Después de 50 años de control químico, todavía tenemos malezas en los campos que hemos realizado aplicaciones. En todos los campos, a cada año, no logramos controlar algunas malezas.”

Dekker, 1997.

Las malezas son aquellas plantas que interfieren con la actividad humana en áreas cultivables y no cultivables (Labrada y Parker, 1996). Si por alguna razón la vida humana desapareciera de la tierra, en ese mismo momento desaparecerían las malezas. Aunque el reino vegetal permanecería, las malas hierbas como tales dejarían de existir porque indisolublemente el concepto de “maleza” está unido a la actividad humana (Moss, 2008). Esta perspectiva antropocéntrica proporciona poca información acerca de la evolución de las malezas, sus características ecológicas o cómo interaccionan con los cultivos (Radosevich *et al.*, 1997). Sin duda, el éxito de una maleza se basa en su habilidad para invadir, dominar y persistir en el sistema (Cousens y Mortimer, 1995).

En los agroecosistemas, las malezas interactúan con los cultivos de distintas maneras. Éstas pueden interferir mediante la competencia por recursos ambientales que limitan el crecimiento de las plantas (Zimdahl, 2007). También, las malezas pueden interferir con los cultivos a través de efectos alelopáticos, debido a la liberación de compuestos químicos que inhiben el crecimiento del cultivo (Bhowmik e Inderjit, 2003). Por otra parte, las malezas pueden servir como hospederos para nemátodos (Singh *et al.*, 2010), plagas y agentes patógenos, pero también pueden actuar como refugio para organismos benéficos (Capinera, 2005).

En los sistemas productivos, el impacto de las malezas ha sido relacionado a perjuicios económicos asociados a dos niveles de daño: pérdidas de rendimiento y daño sobre el valor del producto (Cousens y Mortimer, 1995). Estas pérdidas económicas han motivado las prácticas de control de malezas desde el origen de la agricultura, las cuales han progresado desde el deshierbe manual y el empleo de herramientas como métodos mecánicos, el uso de sales y ácidos inorgánicos como primeros métodos químicos, hacia las aplicaciones de compuestos orgánicos de síntesis como los actuales herbicidas (Radosevich *et al.*, 1995). Sin embargo, las malezas siguen presentes en todos los agroecosistemas y la causa más importante de las fallas en el control de malas hierbas es su biodiversidad (Dekker, 1997).

Las especies de plantas estarían pre-adaptadas para ser malezas, es decir, una especie posee características que le otorgan la capacidad de crecer poblacionalmente en hábitats particulares, creados y mantenidos por las actividades humanas (Cousens y Mortimer, 1995). En este sentido, las malezas presentan distintos atributos que explican la adaptación a prácticas agrícolas y su trascendencia agroecológica, entre estos: similitud morfológica y fisiológica con los cultivos, abundante y amplia producción de semillas, las cuales a menudo presentan diferentes mecanismos de dormición, adaptación a la dispersión, capacidad de regeneración a partir de diferentes propágulos, tolerancia y adaptación a ambientes variables, entre otros (Baker, 1974).

La variación inter-específica como intra-específica de la vegetación espontánea hace que las malezas de un mismo ambiente presenten distintos atributos (Harper, 1977). Las comunidades están integradas por diferentes especies de distintos ciclos de vida y con variables requerimientos ecológicos (Silvertown y Charlesworth, 2001). A su vez, dentro de una misma especie, los individuos que conforman la población también presentan variación, no son genéticamente homogéneos y, por lo tanto, muestran una amplia diversidad de caracteres en distintas frecuencias (Radosevich *et al.*, 2007).

Cualquier método de control genera un disturbio en la comunidad de malezas, provocando una modificación de la composición y estructura funcional y, dentro de la diversidad de individuos, serán exitosos aquellos mejor adaptados a ese disturbio (Swanton *et al.*, 1993; Clements *et al.*, 1994). Estas plantas serán las que contribuirán en mayor medida a la generación siguiente. Por ende, la frecuencia de aquel o aquellos caracteres que le dieron a esas plantas “exitosas” su ventaja adaptativa, se incrementará con las generaciones subsiguientes (Silvertown y Charlestown, 2001). Luego de aplicar sucesivamente un mismo disturbio, la abundancia de aquellos individuos adaptados al disturbio podrá ser tan elevada de forma que ese método de control se vuelva ineficaz sobre la nueva comunidad de malezas (Harker y Clayton, 2004).

Las prácticas agrícolas cambian constantemente y nuevas tecnologías tienden a afectar el éxito de las diferentes malezas por influir sobre las características del hábitat y la posibilidad de dispersión de las plantas (De Wet y Harlan, 1975). En este sentido, la dinámica poblacional de las malezas, entendida como los cambios en la abundancia, distribución y estructura genética de las poblaciones, responde a las prácticas agrícolas (Cousens y Mortimer, 1995). Los cambios en los sistemas de labranza, en la rotación de cultivos, en el patrón de herbicidas empleados y otras prácticas de manejo afectan a las poblaciones de la comunidad de malas hierbas (Johnson *et al.*, 2009).

Ciertos hitos tecnológicos han modificado los sistemas agrícolas argentinos desde mediados de la década de los noventa. La adopción de cultivos transgénicos, principalmente soja, ha motorizado una significativa transformación de la agricultura (Pengue, 2005). Conjuntamente, la innovación de la siembra directa o labranza cero se ha difundido en los agroecosistemas pampeanos aparejando ventajosos efectos para la agricultura (Trigo *et al.*, 2009). Entre estos, la reducción del laboreo del suelo disminuye las pérdidas por erosión hídrica y eólica, mejora su estructura física, favorece la conservación de agua en el perfil, incrementa los niveles de materia orgánica y reduce el consumo de combustible asociado a las tareas de labranza (Bonari *et al.*, 1995; Grandy *et al.*, 2006). En este contexto, el control de malezas se

basó en el uso de un herbicida total y sistémico: glifosato; resultando ser el producto fitosanitario más comercializado en el país (Kleffmann y Partner, 2008).

Difícilmente se podría establecer una relación de causa-efecto entre el lanzamiento de los cultivos resistentes a glifosato, la difusión de la siembra directa y el amplio uso del mencionado herbicida. Como explican Obschatko y Piñeiro (1986), el cambio tecnológico en el sector agropecuario debería interpretarse considerando que la incorporación de innovaciones provoca sucesivos re-acomodamientos que generan estructuras más complejas y cualitativamente diferentes, resultado de efectos multi-causales. Ciertamente, la difusión del mencionado paquete tecnológico ha aparejado relevantes transformaciones ambientales y sociales (Pengue, 2005).

Los cambios florísticos en las comunidades de malezas de la región pampeana

La transformación de la agricultura tuvo sus efectos sobre la dinámica poblacional de las malezas. Ya a comienzos de la adopción masiva de los sistemas de labranza cero, la comunidad de malezas del cultivo de soja respondió a los efectos del uso de la tierra y a las prácticas de labranza en la región pampeana (de la Fuente *et al.*, 1999). Luego de varios años, al comparar censos florísticos de 1995 respecto a 2003, se encontró que unas pocas especies que dominaban la comunidad de malezas en el pasado, mantenían su constancia resultando bien adaptadas al “nuevo” ambiente; otras especies que fueron dominantes en el pasado, disminuyeron su constancia. También, nuevos componentes de la comunidad fueron detectados, entre ellos varias especies perennes e incluso leñosas que en el pasado eran características de zonas no cultivadas (de la Fuente *et al.*, 2006).

Por otra parte, Puricelli y Tuesca (2005) evaluaron el efecto del uso exclusivo y continuo de glifosato sobre la composición, constancia y diversidad de malas hierbas en el sur de la provincia de Santa Fe. Los autores concluyen que los cambios en la comunidad de malezas de cultivos estivales son explicados, principalmente, por el empleo frecuente de glifosato. En este sentido, Rainero (2008) también indicó que en

varias y vastas regiones, durante los últimos años, se han producido cambios importantes en las poblaciones de malezas en los diferentes sistemas de producción. Las principales causas a las que responsabiliza por esto son la extensa superficie sembrada con soja, la gran difusión de la siembra directa, el uso masivo de glifosato, el desinterés por la rotación de cultivos, la escasa diversidad de productos químicos aplicados, la ocupación de tierras menos aptas para la agricultura y el intenso desmonte.

Es conocido que las especies de malezas reaccionan de diferentes formas a los disturbios (Radosevich *et al.*, 1997). Así, el uso repetido de herbicidas de un mismo tipo fisiológico de acción, fácilmente lleva a esa desfavorable selección inter-específica de malezas (Hakansson, 2003). Como se indicó previamente, se advierte que, como resultado de las “nuevas” prácticas agrícolas, algunas especies han prosperado incrementando su constancia, mientras que otras han sido reemplazadas. Sin embargo, ciertas especies se han adaptado manteniendo su frecuencia. Comparando censos florísticos del sur de la provincia de Buenos Aires, se encontró que el género *Lolium spp.*, mantuvo su nivel de constancia por encima del 50 % en áreas cultivadas durante el período 1981-2008 (Istilart y Yanniccari, 2012).

Además de la mencionada selección inter-específica, la repercusión de la selección intra-específica ha cobrado gran relevancia debido a que ésta puede conllevar al aumento de la frecuencia de genotipos resistentes al herbicida comúnmente empleado (Hakansson, 2003). La Sociedad Americana de Ciencias de las Malezas denominó “tolerancia” a la capacidad de una especie de sobrevivir y reproducirse luego de aplicar un herbicida; mientras que el término “resistencia” se asignó a la capacidad de una planta de sobrevivir y reproducirse luego de la aplicación de un herbicida a una dosis normalmente letal para el tipo (WSSA, 1998). Este último concepto se ha asociado a los procesos de selección intra-específica mediante la aplicación frecuente de un mismo principio activo (Hakansson, 2003).

La problemática de malezas resistentes a herbicidas ha comenzado a nivel mundial en 1970, cuando se comunicó el primer caso de *Senecio vulgaris* resistente a

triazinas (Ryan, 1970). Posteriormente, la detección de nuevas malezas resistentes a otros principios activos de amplia difusión, incrementó la importancia del problema (Le Baron y Gressel, 1982; Powles y Holtum, 1994).

En la diversidad de una comunidad de malezas es posible seleccionar positivamente aquellos individuos que sobreviven a cierto método de control (Mortimer y Cousens, 1995). Con la aplicación repetida de un mismo principio activo (o diferentes principios activos que comparten el mismo mecanismo de acción), se puede estar seleccionando a todos los individuos de una misma especie, que por sus características biológicas presentan baja sensibilidad a ese herbicida y, por tanto, la comunidad se verá “enriquecida” con esa **especie tolerante** (Radosevich *et al.*, 2007). O bien, puede que se seleccione un determinado biotipo dentro de una población y al cabo de varios años la frecuencia de **individuos resistentes** al herbicida conduzca a la disminución de la eficacia de ese método de control (Gressel y Segel, 1978).

El glifosato como herbicida

La molécula de glifosato (N-(fosfometil) glicina) fue sintetizada por primera vez en 1950 por el técnico de una compañía farmacéutica suiza, sin embargo su utilidad como herbicida fue descubierta y patentada en 1970 por el doctor John E. Franz, investigador de Monsanto (Baird *et al.*, 1971). Rápidamente, esta empresa lo introdujo en el mercado para ser comercializado como herbicida y en 1974 lo lanzó bajo el nombre de Roundup® (Franz *et al.*, 1997). Desde entonces, este principio activo ha sido aprobado para su uso en más de 130 países y actualmente alcanza un consumo mundial de 600 mil toneladas por año (Dill *et al.*, 2010). En el año 2012, la comercialización de herbicidas representó el 64 % del mercado total de productos fitosanitarios en Argentina, donde el principal principio activo vendido fue glifosato (CASAFE, 2013).

Inicialmente, el alto costo relativo de glifosato, comparado a otros principios activos, y el hecho de ser un herbicida no selectivo, hicieron que su uso se limitara a

áreas no cultivadas o a aplicaciones dirigidas. Con la expiración de su patente se inició la comercialización de productos genéricos, se expandió la oferta del herbicida y el precio experimentó una abrupta caída (Woodburn, 2000). Sumado a esto, la introducción de los cultivos transgénicos de soja, algodón y maíz resistentes a glifosato (Roundup Ready®) redujo el mercado de otros herbicidas, comúnmente empleados hasta el momento, y permitió que el glifosato alcanzara el volumen relativo de venta previamente citado. Desde entonces se ha incrementado el consumo de este herbicida, empleado exitosamente en pre-siembra y en post-emergencia para el control de un amplio espectro de malezas (Grossbard y Atkinson, 1985; Kleffmann y Partner, 2008; Dill *et al.*, 2010).

El glifosato es un potente herbicida debido a su acción sistémica, éste es absorbido por las plantas a través del follaje y se traslada en la sección longitudinal de tallos y raíces por vía floemática (Sprankle *et al.*, 1975; Amrhein *et al.*, 1980). Cuando el producto se deposita sobre la superficie foliar, se inicia el proceso de absorción (Kirkwood, 1993). En primer lugar, el herbicida debe penetrar una capa de cera epicuticular y posteriormente la cutícula, atravesada por ectodesmos que también constituyen vías importantes para la penetración de pesticidas en la hoja (Schönherr y Riederer, 1989; Cobb y Reade, 2010). Luego, el herbicida atraviesa la laminilla media, la pared celular y el plasmalema para ingresar a las células epidérmicas (Hull, 1970). Aunque el mecanismo por el cual el herbicida ingresa a la célula aún está en discusión, se estima que al menos dos vías están involucradas: una de ingreso activo mediada por fosfato-transportadores y otra pasiva por difusión (Shaner, 2009). Una vez que el glifosato ingresa en el mesófilo de la hoja, debido a que su metabolización es despreciable, comienza a transportarse por vía simplástica hasta acumularse en órganos subterráneos, hojas jóvenes y meristemas (Martin y Edgington, 1981).

El sitio de acción del herbicida es la enzima 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (EC 2.5.1.19), ampliamente citada bajo su sinónimo 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPs); responsable de catalizar la reacción entre el shikimato-3-fosfato y el fosfoenolpiruvato (PEP), generando un producto precursor de aminoácidos aromáticos: triptófano, tirosina y fenilalanina

(Figura 1) (Amrhein *et al.*, 1980). Los genes de EPSPs se expresan principalmente en meristemas y flores, seguidos en términos de decreciente magnitud, por el tallo y finalmente por las hojas maduras (Weaver y Hermann, 1997). Dentro de la célula, la enzima blanco se encuentra principalmente en plástidos, aunque también existen formas citoplásmicas (Baylis, 2000). El efecto del glifosato en el metabolismo de la planta se traduce en la inhibición de la acción de la enzima blanco por competir con el PEP por el sitio de unión a la EPSPs (Schönbrunn *et al.*, 2002), desencadenando la acumulación de ácido shikímico (Pline *et al.*, 2002b) y afectando varios procesos fisiológicos (Cole, 1985).

A pesar de las evidencias que sugieren a la EPSPs como el único sitio de acción del herbicida, la manera exacta de cómo el glifosato mata la planta es aún discutida (Siehl, 1997; Senseman, 2007). Dentro de los efectos provocados por el herbicida sobre el metabolismo de la planta, la inhibición de la biosíntesis de triptófano, tirosina y fenilalanina, y su consecuente repercusión en el metabolismo proteico, parece ser el factor desencadenante de la muerte de la planta. En este sentido, varios trabajos sustentan esta hipótesis demostrando que aplicaciones exógenas de los mencionados aminoácidos han prevenido los síntomas fitotóxicos (Duke y Hoagland, 1978; Lee, 1981), sin embargo otras investigaciones en diferentes especies no han podido confirmarlo (Siehl, 1997).

Desde el momento de la aplicación de glifosato, la aparición de los primeros síntomas visibles de fitotoxicidad, clorosis y marchitamiento, ocurre a los 4-7 días post-aplicación en aquellas plantas altamente susceptibles, mientras que en las menos sensibles los síntomas se evidencian entre los 10-20 días de realizado el tratamiento. Finalmente, la clorosis progresa hasta alcanzar una coloración pardo-rojiza evidenciando la muerte de la planta (Senseman, 2007).

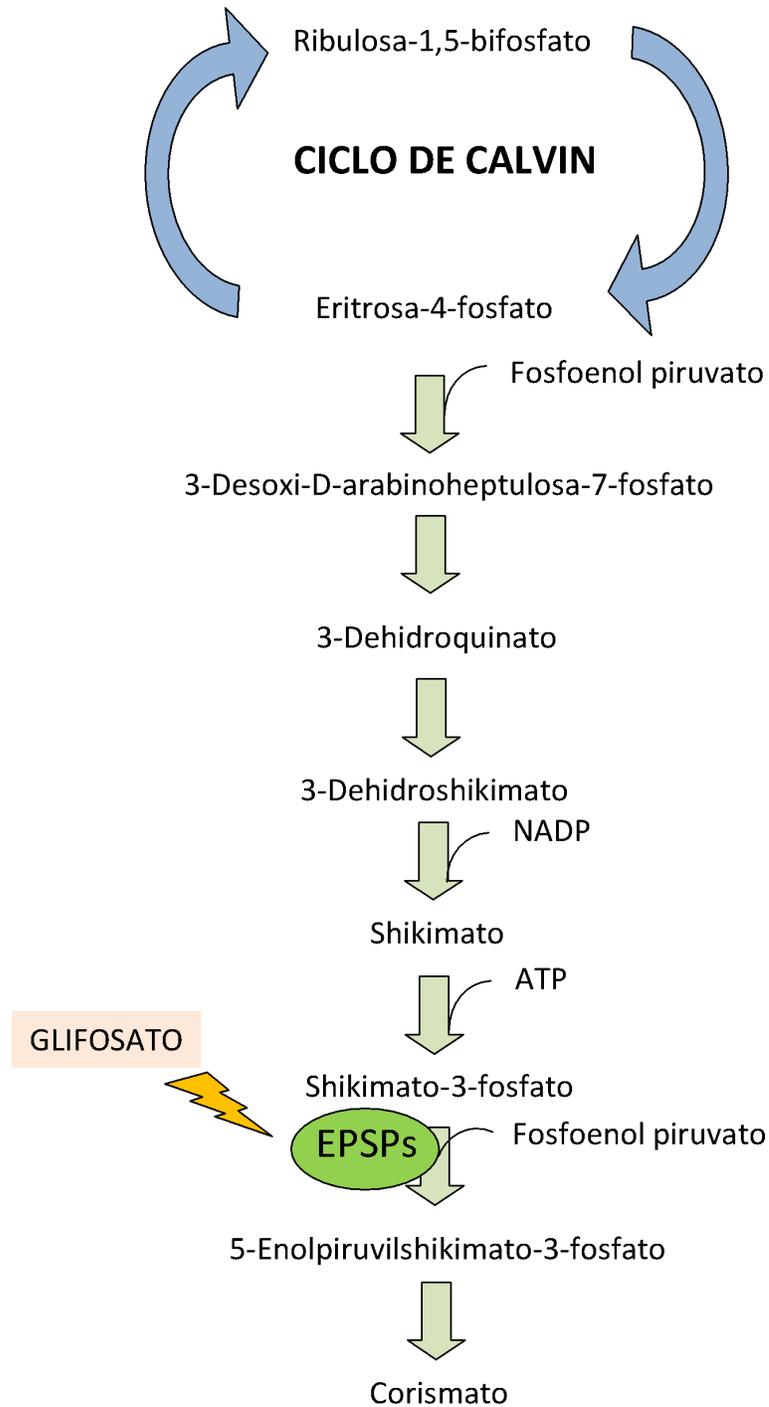


Figura 1. Ruta del ácido shikímico. Se representa la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPs), blanco del herbicida glifosato.

Glifosato en el ambiente

Cuando el glifosato impacta en el suelo, éste es adsorbido en los coloides dependiendo de la cantidad de sitios libres de adsorción de fosfatos disponibles (Cheah *et al.*, 1997). En relación a esto, se ha documentado que el glifosato adsorbido puede ser liberado por competencia con fosfatos inorgánicos (Prata *et al.*, 2003) y provocar efectos fitotóxicos sobre plantas altamente sensibles (Bott *et al.*, 2011; Clúa *et al.*, 2012).

Abordando la dinámica del glifosato en el suelo, la degradación microbiana ha sido considerada como la principal vía de descomposición del herbicida (Souza *et al.*, 1999). En este sentido, la persistencia del glifosato en el suelo sería moderada, pues se ha determinado que la molécula tiene una vida media de 45 a 60 días (Wauchope *et al.*, 1992; Vereecken, 2005).

En la región pampeana, Peruzzo *et al.* (2008) han encontrado niveles de glifosato de 0,5 a 5 ppm en suelos agrícolas. Los investigadores demuestran que los valores están relacionados directamente al momento de muestreo, previo o posterior a las aplicaciones del herbicida, y a la ocurrencia e intensidad de las precipitaciones. Recientemente, en suelos de uso agrícola del sudeste bonaerense se han detectado concentraciones de glifosato de 0,035 a 1,5 ppm. Asimismo, se ha hallado ácido aminometilfosfónico en niveles de 0,2 a 2,2 ppm, producto de la biodegradación del herbicida (Aparicio *et al.*, 2013).

Si bien esos valores estarían por debajo de los niveles -al momento conocidos- que afectarían la vida silvestre (Senseman, 2007), los antecedentes precedentes muestran el riesgo potencial de contaminación con glifosato. No obstante, comparado a otros pesticidas, el mencionado herbicida se encuentra entre los principios activos de menor toxicidad (Hassan *et al.*, 1988; Senseman, 2007).

Bajo condiciones de campo, se ha demostrado que las aplicaciones de glifosato provocan alteraciones sobre la fauna benéfica (Sullivan, 1985). Estos efectos podrían ser una consecuencia toxicológica directa del herbicida sobre el organismo o

atribuible a la muerte de la vegetación asociada a esa fauna (Nakamura *et al.*, 2008). Asimismo, el impacto del glifosato sobre parámetros de dinámica poblacional de insectos predadores puede ser mediado por el consumo de plagas “contaminadas” con este herbicida, lo cual podría ser exacerbado si se mantiene el uso masivo y continuo de glifosato (Schneider *et al.*, 2009).

Glifosato y la resistencia de las malezas

A diferencia de otros principios activos, recién luego de 22 años del lanzamiento del glifosato se registró el primer caso de una maleza resistente (Powles *et al.*, 1998), estableciéndose a este principio activo dentro de los herbicidas menos propensos al desarrollo de resistencia. Hasta ese momento, se aseguraba que las mutaciones en la enzima EPSPs capaces de proveer baja sensibilidad a glifosato también conducirían a una baja supervivencia de la planta (Bradshaw *et al.*, 1997).

Actualmente, a nivel mundial, más de veinte especies han presentado biotipos aptos para sobrevivir y reproducirse luego de aplicar una dosis normalmente letal de glifosato (Heap, 2013). En Argentina, se detectó el primer caso de resistencia a glifosato en una población de *Sorghum halepense* de la provincia de Salta (Vila-Aiub *et al.*, 2007). Luego, se denunciaron focos de biotipos resistentes en provincias vecinas hasta alcanzar un gran impacto regional (Olea, 2013). Posteriormente, Norsworthy y Scott denunciaron la presencia de biotipos resistentes de *Sorghum halepense* en Estados Unidos (Heap, 2013).

En el sur de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) los problemas de poblaciones de ryegrass (*Lolium spp.*) de baja sensibilidad a glifosato han mantenido la atención de los productores agropecuarios y los profesionales del área. Vigna *et al.* (2008) comunicaron la resistencia a glifosato de poblaciones espontáneas de *Lolium multiflorum*. En la misma región y dentro del género, la resistencia a glifosato de *Lolium perenne*, fue sospechada y estudiada desde el año 2008 (Yanniccari *et al.*, 2009). También, en los últimos años otras especies de malezas han presentado

biotipos resistentes a glifosato en Argentina, tal es el caso de *Echinochloa colona*, *Eleusine indica* y *Cynodon hirsutus* (Heap, 2013).

Según Cousens y Mortimer (1995), la dinámica de la evolución de resistencia puede ser considerada en dos escalas: una en término de reemplazo de fenotipos susceptibles por resistentes dentro de una población, como ha ocurrido en varios de los casos “pioneros” mencionados previamente, o a escala regional a partir de la emergencia de nuevas poblaciones resistentes ya sean relacionadas o independientes de las poblaciones pioneras. En consideración, la problemática de *Lolium spp.* resistente a glifosato ha alcanzado una importante escala regional que ha motivado su investigación en respuesta a distintas demandas productivas (Vigna *et al.*, 2008; Diez de Ulzurrun *et al.*, 2011; Diez de Ulzurrun y Leaden, 2012; Yanniccari *et al.*, 2012).

Factores condicionantes de la resistencia a herbicidas

La resistencia de malezas a herbicidas es un proceso evolutivo y, según Powles y Yu (2010), su dinámica e impacto depende de los factores resumidos en la Figura 2. En este sentido, existen aspectos inherentes a la genética poblacional que conforman la comunidad de malezas de un determinado ambiente. Entre estos, la frecuencia, el número y la dominancia de los genes de resistencia, pre-existentes a las aplicaciones de un herbicida, condicionarán el tiempo en que éstos se vuelvan “relevantes” en la población aparejando un nuevo caso de resistencia. Así también, los costos biológicos, penalidades o efecto sobre la capacidad reproductiva neta que puedan conllevar estos genes para las plantas resistentes impactarán en la adaptabilidad de éstas al sistema (Vila-Aiub *et al.*, 2009). Esto se ha sustentado en que si las plantas resistentes se encuentran, al inicio del proceso selectivo con el herbicida, en una frecuencia muy baja en la población, esas plantas estarían desfavorecidas evolutivamente en ausencia de la presión del herbicida. Esa menor adaptabilidad a condiciones ambientales sin herbicida, está relacionada al costo biológico que conlleva la resistencia (Neve *et al.*, 2003).

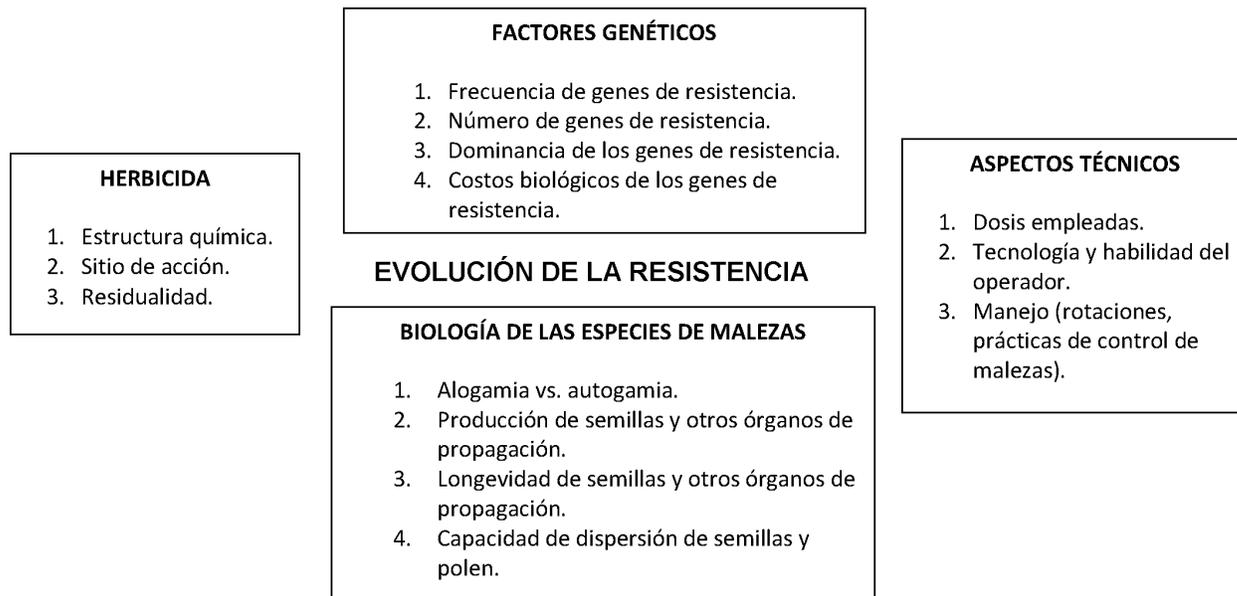


Figura 2. Resumen de los factores que influyen en la evolución de malezas resistentes a herbicidas. Adaptado de Powles y Yu (2010).

La biología de las especies de malezas condiciona la difusión de la resistencia en la población. El porcentaje de alogamia y autogamia, la producción de semillas y su longevidad en el banco de semillas del suelo, como el flujo génico por medio de semillas y polen, cobran trascendencia al considerar los efectos de estos aspectos en la dispersión y frecuencia de genes de resistencia (Jasieniuk *et al.*, 1996; Busi *et al.*, 2008).

Además, el herbicida utilizado y el tipo de acción fisiológica son factores importantes a ser considerados. La estructura química de la molécula, así como la analogía con otros principios activos y la acción residual del herbicida, modulan la probabilidad con que los genes de resistencia incrementan su frecuencia, pues son aspectos condicionantes de la presión de selección (Holt *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1997; Tranel y Wright, 2002). La rotación de herbicidas de igual modo de acción, como ocurre entre principios activos de una misma familia química, favorece la selección de

plantas en un mismo sentido (Holt y Le Baron, 1990). Asimismo, la elevada actividad residual de un herbicida, incrementa la presión de selección de forma comparable a la aplicación continua de un producto sin residualidad (Le Baron y McFarland, 1990).

Finalmente, existen aspectos operativos de campo que desde el punto de vista técnico condicionan la evolución de la resistencia. Entre estos, las dosis empleadas, la tecnología y la habilidad del productor para llevar a cabo la tarea de control químico, junto a otros factores de manejo agronómico como el uso de prácticas alternativas de control de malezas, rotación de cultivos y principios activos, son aspectos de considerable importancia (Jasieniuk *et al.*, 1996). Estos factores son los primeros sobre los que se puede actuar para minimizar los riesgos de aparición de malezas resistentes (Norsworthy *et al.*, 2012).

Los mecanismos de resistencia: ¿Por qué la planta sobrevive a la aplicación de un herbicida?

Los mecanismos involucrados en la resistencia de malezas a herbicidas han sido clasificados por Dekker y Duke (1995), estos autores los agrupan en dos categorías principales:

1. Mecanismos de resistencia por exclusión

Dentro de este primer grupo, se distinguen cuatro posibles mecanismos diferenciables:

a) **Deficiente absorción:** el herbicida no es eficientemente absorbido por la planta debido a características morfológicas como reducida área foliar, superproducción de ceras, mayor espesor de la cutícula, entre otros (Nandula *et al.*, 2008; Michitte *et al.*, 2007).

b) **Traslocación diferencial del herbicida:** tanto por modificaciones a nivel del apoplasto o de la membrana plasmática, el principio activo no llega al sitio blanco. Una condición necesaria para lograr la efectividad de un herbicida es que éste alcance su

sitio de acción en una concentración suficiente como para que su efecto sea letal. La falta de movimiento de un herbicida dentro de la planta va a limitar su concentración en el sitio de acción, lo que permitirá mantener su funcionalidad (Feng *et al.*, 2004; Wakelin *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2009).

c) **Compartimentalización:** el herbicida es secuestrado en la vacuola y se limita la llegada al sitio de acción (Ge *et al.*, 2010).

d) **Detoxificación metabólica:** el herbicida es metabolizado hasta perder su carácter fitotóxico lo suficientemente rápido como para que la planta no muera (Reade *et al.*, 2004).

2. Mecanismos de resistencia por modificaciones en el sitio de acción

En esta gran categoría se distinguen dos mecanismos resistencia:

a) **Alteración del sitio de acción** por mutaciones en el sitio diana, impidiendo el acople del herbicida a la enzima blanco. Bien pueden haberse generado mutaciones en el sitio activo de la proteína o en regiones que condicionan su afinidad por el herbicida (Patzoldt y Tranel, 2007; Yu *et al.*, 2007; Délye *et al.*, 2008).

b) **Superproducción del sitio de acción** de manera que los efectos del herbicida se “diluyen” y la planta mantiene su actividad metabólica. Esto se puede generar por amplificación génica, el número de copias del gen es mayor en plantas resistentes, o alteraciones en el promotor que favorecen el incremento en la síntesis de la enzima blanco (Gaines *et al.*, 2010).

En malezas resistentes a más de un herbicida, se han establecido clasificaciones en función de los mecanismos implicados. Cuando la planta posee más de un mecanismo de resistencia a más de un principio activo, se ha acuñado el término “resistencia múltiple” (Patzoldt y Tranel, 2007; Yu *et al.*, 2007). En cambio, si la planta es resistente a dos o más herbicidas debido a un solo mecanismo de resistencia se trata de “resistencia cruzada”, y frecuentemente involucra a herbicidas que tienen el mismo modo de acción (Hall *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 1997). A su vez, De Prado *et al.*

(1992) sugieren una distinción: llamando “resistencia cruzada negativa” a aquellos casos en que un biotipo resistente a un herbicida exhibe un aumento en la sensibilidad a otros herbicidas con distinto modo de acción.

De todas las especies de malezas que han desarrollado biotipos resistentes a glifosato, sólo para unos pocos casos se han podido identificar los mecanismos que expliquen la resistencia al herbicida. Entre estos, se encontró en *Eleusine indica* y en un caso de *Lolium spp.*, una sustitución puntual (prolina por serina o treonina) en una determinada posición (106) de la secuencia de aminoácidos de la enzima EPSPs que sería la responsable de disminuir la afinidad de ésta por el herbicida sin alterar la unión con el PEP (Yu *et al.*, 2007).

Más recientemente, en *Amaranthus palmeri* resistente a glifosato en Estados Unidos, se encontró que el biotipo resistente no presentaba diferencias en la sensibilidad de la enzima blanco respecto al susceptible. Sin embargo, se conoció el mecanismo de resistencia a partir de la detección de la amplificación del número de copias del gen de la enzima blanco, esto confería una expresión de la EPSPs cuarenta veces mayor en plantas resistentes respecto a susceptibles (Gaines *et al.*, 2010). También, Salas *et al.* (2012) arribaron a resultados similares estudiando una población estadounidense de ryegrass resistente a glifosato.

En otros casos, se observó en plantas de *Lolium spp.* resistentes a glifosato una mayor acumulación de herbicida en la porción apical de hojas, indicando que la resistencia se debería a una deficiente carga del principio activo al floema, promoviendo el traslado del glifosato por la corriente xilemática (Lorraine-Colwill *et al.*, 2003; Wakelin *et al.*, 2004).

La penetración y/o translocación deficiente de glifosato en la planta ha sido determinada como el factor responsable de la resistencia en biotipos de *Sorghum halepense* (Vila Aiub *et al.*, 2012) y *Conyza canadensis* (Feng *et al.*, 2004). Además, en esta última especie, el secuestro de glifosato en la vacuola como mecanismo de compartimentalización del herbicida, ha sido comunicado por Ge *et al.* (2010; 2011). No obstante, pese a los valorables esfuerzos de numerosos grupos en hallar los

mecanismos de resistencia involucrados en ciertas poblaciones de malezas, aún quedan muchos casos por dilucidar.

Debido a que los herbicidas empleados como única herramienta de control de malas hierbas no han permitido resolver el problema de las malas hierbas y, más aún, han aparejado otros efectos negativos previamente citados, es que se ha comenzado a desarrollar un enfoque integrado de la problemática de las malezas (Altieri, 1999). Entonces, el manejo integrado de malezas emplea un enfoque holístico que integra diferentes métodos de control para brindar al cultivo una ventaja sobre las malezas (Harker y O'donovan, 2013).

El manejo integrado de malezas requiere abordar el rol de la labranza cero y las rotaciones de cultivos, profundizar el estudio de la interacción cultivo-maleza, evaluar métodos alternativos de control, optimizar la competencia del cultivo frente a las malezas, conocer la biología de las malas hierbas, todo esto en un contexto de educación y extensión que garantice el intercambio de conocimientos (Blair y Parochetti, 1982; Swanton y Murphy, 1996). La finalidad de la estrategia de manejo es mantener el crecimiento de las malas hierbas a un nivel ecológica, agronómica y económicamente aceptable (Altieri, 1999).

Importancia y biología del género Lolium spp.

Considerando al complejo *Lolium spp.*, las poblaciones naturalizadas de ryegrass se extienden por toda la región pampeana formando parte de las comunidades de malezas o praderas (Cabrera y Zardini, 1978). En el sur de la provincia de Buenos Aires, el ryegrass resulta ser una maleza frecuente en cultivos invernales (Catullo, 1982; Istilart, 1991; Istilart y Yanniccari, 2011).

Las especies de *Lolium* son nativas de Europa, áreas templadas de Asia y norte de África, aunque se han dispersado por regiones templadas de todo el mundo (Balfourier *et al.*, 2000). Dentro del género *Lolium*, se distinguen claramente dos grupos basados en caracteres morfológicos y fenológicos. Un grupo, comprende dos

especies autógamas: *L. temulentum* y *L. persicum*, mientras que las especies alógamas constituyen el otro grupo: *L. perenne*, *L. rigidum* y *L. multiflorum* (Loos, 1993). Estas especies alógamas, de polinización anemófila, pueden cruzarse generando híbridos fértiles, por lo tanto, algunos autores sugieren que *L. perenne*, *L. rigidum* y *L. multiflorum* deberían ser consideradas una única especie (Bulinska-Radomska y Lester, 1985).

Las especies de ryegrass más importantes agrónomicamente son *L. perenne* y *L. multiflorum*, tanto por sus características forrajeras como por ser componentes de céspedes. Sin embargo, esas mismas especies son trascendentes malezas cuando “escapan” de las áreas cultivadas (Polok, 2007).

Durante varias décadas, el ryegrass fue ampliamente cultivado en sistemas agropecuarios o netamente ganaderos de la provincia de Buenos Aires (Cabrera, 1970). A partir del crecimiento de la agricultura y el proceso de cambio en el uso de la tierra, la actividad ganadera fue reemplazada por la producción agrícola (de las Carreras, 2010). Desde 1985 a la actualidad, en el sur bonaerense la superficie asignada a cultivos de cosecha se ha incrementado en un 30 %, mientras que la ganadería ha sido desplazada a suelos menos productivos (Duhalde *et al.*, 2012). En este nuevo contexto, el *Lolium spp.* resulta ser una importante maleza en cultivos de cebada y trigo (Istilart y Yanniccari, 2011).

Frecuentemente, *L. perenne* y *L. multiflorum* se encuentran formando parte de la comunidad de malezas de la región. Aunque su estrecha relación dificulta la determinación, varias diferencias permiten distinguir *L. perenne* de *L. multiflorum*: prefoliación conduplicada, perennidad, requerimientos de vernalización y espiguillas con 2 a 10 flores (Cabrera y Zardini, 1978; Jung *et al.*, 1996; Inda Aramendía, 2005).

El ryegrass perenne es una planta de hasta 80 cm de altura, sus hojas presentan láminas de 20-30 cm de largo y hasta 6 mm de ancho. Forma rizomas cortos a partir del enraizamiento de nudos basales. Las inflorescencias, normalmente, no presentan ramificaciones, alcanzando hasta 20 cm de largo. En ellas portan entre 20 y 30 espiguillas de hasta diez flores cada una, cuyas lemmas no tienen aristas. El largo

de las espiguillas sobrepasa en un tercio el largo de la gluma. Durante la etapa reproductiva, la planta sigue produciendo macollos que rodean a los culmos florecidos. La elevada plasticidad de la especie hace que estos parámetros estén afectados por las condiciones de crecimiento (Cabrera y Zardini, 1978; Jung *et al.*, 1996; Inda Aramendía, 2005).

En el sur de la provincia de Buenos Aires, el ryegrass germina y emerge con las primeras lluvias otoñales (Figura 3a), pero previamente las semillas requieren haber perdido la dormición condicionada por el tiempo térmico post-maduración (Steadman *et al.*, 2003a). Por esto, una proporción del banco de semillas del suelo permanece sin germinar, aún después de las primeras lluvias.

La tasa de crecimiento de las plántulas es inicialmente baja, pero cuando la planta expande su cuarta hoja, se inicia el período de macollaje y la tasa de crecimiento se incrementa (Figura 3b) (Yanniccari y Acciaresi, 2013). Esta especie presenta requerimientos de vernalización y día largo para el desarrollo de la inflorescencia (MacMillan *et al.*, 2005), posteriormente comienza la encañazón (Figura 3c). La floración ocurre en primavera prologándose entre octubre y noviembre (Figura 3d), en tanto la producción de macollos, como se indicó antes, continúa durante este período.

La antesis se inicia en las espiguillas centrales y continúa hacia el extremo basal y apical. Mientras que las flores basales de cada espiguilla son las primeras en llegar a antesis. Su frecuente auto-incompatibilidad hace que la alogamia sea el hábito reproductivo dominante (Thorogood y Hayward, 1991). Hacia el fin de la primavera, conjuntamente con el incremento de las temperaturas, los granos maduran y comienza la dispersión de las semillas. Potencialmente, la producción por planta puede llegar hasta las 12 mil semillas (Pop *et al.*, 2010). Las semillas entran en el banco de propágulos del suelo, aunque su persistencia es efímera (hasta dos años). La longevidad de las semillas en el suelo luego de un año, es relativamente baja cuando éstas quedan en superficie al menos un mes antes de realizar laboreos que favorezcan su incorporación al suelo (Jensen, 2010).

En el verano, las tasas de crecimiento de *L. perenne* descienden y la senescencia avanza en los órganos aéreos, mientras que los órganos subterráneos se mantienen en latencia (Yanniccari y Acciaresi, 2013). Hacia la nueva estación, con las primeras lluvias esas plantas rebrotan vigorosamente (Figura 3e) y nuevas semillas germinan para continuar el ciclo (Yanniccari y Acciaresi, 2013).



Figura 3. Estados de *Lolium perenne* durante su ciclo: a) emergencia; b) macollaje; c) encañazón, se muestran los nudos basales enraizados; d) floración; e) rebrote otoñal.

Interferencia ryegrass-cultivo

El ryegrass es considerado una importante maleza en los sistemas agrícolas pampeanos destinados a la producción de trigo, cebada y avena, donde el control químico es la principal estrategia empleada (Istilar y Yanniccari, 2011). En el caso de la interferencia con trigo, las pérdidas de rendimiento del cultivo pueden alcanzar el 50 % de la producción debido a la competencia (Acciaresi *et al.*, 2003).

Los efectos competitivos de *L. multiflorum* sobre el trigo son variables según las características morfo-fisiológicas (vigor inicial, capacidad de macollaje, tamaño y disposición de las hojas, altura en espigazón) y la densidad de la maleza (Acciaresi *et al.*, 2001). En este sentido, Hashem y colaboradores (1998) han encontrado que el trigo presenta elevada capacidad competitiva durante el estado vegetativo, debido a que sus hojas dominan en el estrato superior del canopeo, por su parte, el ryegrass se vuelve más competitivo en el estado reproductivo, cuando sus órganos se vuelven predominantes en el canopeo.

En el caso de *L. rigidum*, si bien ha sido identificada como adventicia en la provincia de Buenos Aires (Cabrera y Zardini, 1978), no llega a cobrar la importancia que tiene como maleza en países trasatlánticos, asumiendo pérdidas de hasta el 50 % de la producción de trigo y cebada (Taberner Palou, 1996; Lemerle *et al.*, 1996; Cousens y Mokhtari, 1998).

Las reducciones significativas en biomasa aérea y rendimiento en grano del trigo provocadas por la interferencia con ryegrass, se han explicado debido a fenómenos de competencia y alelopatía. Acciaresi *et al.* (2003) han distinguido la competencia radical y aérea, donde encuentran que la competencia generada a nivel subterráneo provoca mayores pérdidas en la producción de trigo comparado a la competencia aérea. El crecimiento radical se ha asociado positivamente a la capacidad competitiva del *Lolium perenne* (Baan Hofman y Ennik, 1980).

El ácido bencenopropanoico ha sido identificado como uno de los compuestos activos responsables de la actividad alelopática de ryegrass sobre el crecimiento radical de plántulas de arroz (Guoxi *et al.*, 2008). Además, el efecto inhibitorio del ryegrass sobre el trigo es atribuido a efectos alelopáticos provocados por exudados radicales que afectan el crecimiento de raíces y biomasa aérea (Amini *et al.*, 2009). También, Gussin y Lynch (1981) han comunicado la alelopatía de los residuos de ryegrass perenne. Esta maleza puede inhibir la germinación y el crecimiento de *Cynodon dactylon* cuando se realizan enmiendas con su biomasa aérea (McCarty *et al.*, 2010).

Estos efectos inhibitorios sobre el crecimiento de trigo y cebada que conducen a la pérdida de rendimiento, han motivado el empleo de herbicidas selectivos para el cultivo pero que controlan el ryegrass: pinoxaden, clodinafop-propargil, diclofop-metil y flucarbazone-sódico (Senseman, 2007). Sin embargo, han sido comunicados varios casos de poblaciones de *L. perenne*, *L. multiflorum* y *L. rigidum* resistentes a uno o más de estos gramínicos en varios países (Heap, 2013). En tanto, en Australia el estudio de cultivares de trigo de alta capacidad competitiva ha avanzado a fin de emplear estratégicamente la interferencia trigo-ryegrass (Lemerle *et al.*, 2001).

La población de *Lolium perenne* presumiblemente resistente a glifosato en el sur bonaerense

Desde el año 2005, la Chacra Experimental Integrada Barrow (Ministerio de Asuntos Agrarios – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) recibió consultas de productores y técnicos de su zona de influencia frente al problema de sobrevivencia de *Lolium spp.*, luego de aplicaciones normalmente letales de glifosato. En la campaña 2007-2008, se advirtió en el establecimiento “La Fe” del partido de Coronel Dorrego, Provincia de Buenos Aires, la presencia de una población de *Lolium perenne* L. que habría sobrevivido al control químico con glifosato en los trabajos de barbecho previo a la siembra de trigo (Istilart, com. pers.) (Figura 4; Figura 5).

El lote donde se encontró la población presumiblemente resistente tenía una historia de doce años de trabajo bajo el sistema de labranza cero. Allí, el control de malezas se llevaba a cabo mediante tres aplicaciones de glifosato al año a dosis de entre 360 a 720 g equivalente ácido (ea) ha⁻¹. Otros principios activos habían sido aplicados en el pasado: metsulfurón-metil y dicamba, clodinafop-propargil, fenoxaprop-P-etil, iodosulfurón-metil-Na y metsulfurón-metil en el cultivo de trigo, y 2,4-D durante el barbecho (Yanniccari *et al.*, 2009).

Sin distinciones con el manejo característico de la zona, el planteo de rotación de cultivos consistía en trigo-soja de segunda (*i. e.* continuado a la cosecha del cultivo

invernal se siembra el cultivo estival durante la misma campaña) y girasol-soja. En todos los casos, para el cultivo de soja se empleaban cultivares resistentes a glifosato.



Figura 4. Localización de la población problema de *Lolium perenne* resistente a glifosato (•).



Figura 5. Población problema de *Lolium perenne* resistente a glifosato del partido de Coronel Dorrego (Pcia. de Buenos Aires).

¿Por qué este trabajo?

En el contexto desarrollado, el presente trabajo se llevó a cabo con el objetivo de abordar el problema de la resistencia a glifosato de *Lolium perenne* desde una perspectiva sistémica, estudiando las bases fisiológicas y genéticas que permitan contribuir al manejo de esta problemática de creciente importancia.

Según Bachelard (2000), para el espíritu científico todo conocimiento es una respuesta a una pregunta. En este trabajo se pretende dar respuesta a ciertas cuestiones que permitan aportar conocimientos de impacto para la actividad productiva, en tanto se buscará responder:

¿El deficiente control de *Lolium perenne* con glifosato en el sur bonaerense es un caso de resistencia? ¿Cómo afecta el glifosato a los procesos fisiológicos de biotipos presumiblemente resistentes y susceptibles hasta conducir a la muerte de la planta?

¿Por qué las plantas resistentes tolerarían al glifosato? ¿Cuál es el mecanismo de herencia de la resistencia? ¿El polen podría ser un medio para el flujo de genes de resistencia en la región? ¿El carácter *resistencia* está asociado con costos biológicos que puedan condicionar la dinámica de las poblaciones resistentes?

Para ello se propuso cumplir con los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar las características fisiológicas y bioquímicas que provocan la baja sensibilidad a glifosato de los biotipos problema.
- Estudiar las bases genéticas de la resistencia a glifosato.
- Caracterizar el/los mecanismo/s de resistencia de los biotipos problema.
- Determinar los costos biológicos de la resistencia a glifosato.

La hipótesis de este trabajo es que la baja sensibilidad a glifosato del biotipo resistente de Lolium perenne L. se explica mediante diferencias génico-fisiológicas que pueden ser caracterizadas y que tienen un costo en la eficacia biológica de estos materiales.

Materiales y métodos

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE, Universidad Nacional de La Plata – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), en el Laboratorio de Investigaciones en Proteínas Vegetales (LIProVe, Facultad de Ciencias Exactas – Universidad Nacional de La Plata), en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP) y en la Chacra Experimental Integrada Barrow (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Ministerio de Asuntos Agrarios) entre los años 2009 y 2013.

Detección de la resistencia a glifosato

Ensayos de evaluación de la sensibilidad a glifosato

Material vegetal

Las plantas presumiblemente resistentes fueron identificadas como *Lolium perenne* L. por el Dr. Néstor Bayón en el Jardín Botánico y Arboretum “Carlos Spegazzini” (LPAG). Muestras herborizadas se prepararon y depositaron (Yanniccari1-2). En 2007 se cosecharon semillas de las plantas presumiblemente resistentes a glifosato y de una población de ryegrass perenne de una pradera vecina (sin historia de aplicación de glifosato). Siete plantas de cada tipo, elegidas al azar, se cosecharon individualmente.

Bioensayo de dosis-respuesta de germinación

Este bioensayo se basó en la evaluación porcentual de la germinación de las semillas en presencia de diferentes concentraciones de glifosato. Treinta semillas se pusieron a prueba en placas de Petri (9 cm de diámetro) conteniendo una hoja de papel de filtro y 5 ml de una solución de glifosato (Roundup®, 360 g equivalente ácido (ea) L⁻¹ de Monsanto Argentina) por cada tratamiento. Se probaron las siguientes

concentraciones de glifosato: 0, 10, 20, 40, 80 y 160 mg (ea) L⁻¹ (Pérez y Kogan, 2003) empleando tres repeticiones en un diseño completamente al azar.

Este experimento se llevó a cabo en una cámara de crecimiento con 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa con un período de luz/oscuridad de 12/12 horas y un régimen de temperatura de 25°C/15°C durante el día y la noche, respectivamente. Después de 7 días, se registró el porcentaje de semillas germinadas. Además, sobre aquellas que germinaron, se evaluó el crecimiento de la plúmula en longitud, medido desde el punto de unión del coleoptilo a la semilla hasta la punta de la plúmula.

Bioensayo de dosis-respuesta de crecimiento y supervivencia de plantas

Las poblaciones susceptibles y resistentes fueron comparadas después del tratamiento con diferentes dosis de glifosato. Semillas de cada población fueron sembradas en macetas de 100 cm³ (contenidas en bandejas plásticas) con tierra estéril. Del total de las plántulas emergidas se ralearon manteniendo dos por maceta. Éstas fueron cultivadas en un invernadero, regadas diariamente a capacidad de campo y fertilizadas cada 15 días con N, P y K a razón de 2 g de fertilizante (12:10:20, Nitrofoska®, Compo Argentina) por litro de solución de riego.

Para cada tratamiento se realizaron siete repeticiones (15 macetas por repetición) en un diseño completamente al azar, donde cada maceta fue la unidad de muestreo. Las aplicaciones del herbicida se llevaron a cabo en plantas con dos a tres macollos (Figura 6). Cada tratamiento consistió en una aspersión de glifosato con un pulverizador manual de laboratorio calibrado para liberar 200 L ha⁻¹ en las siguientes dosis: 0, 360, 720, 1440 y 2880 g (ea) ha⁻¹.

El contenido de clorofila se registró con un medidor portátil de clorofila (SPAD 502®, Minolta, Konica Minolta Sensing, Inc.). Siendo el valor de clorofila por planta, el promedio de tres mediciones tomadas en el tercio medio de la penúltima hoja expandida (tercera hoja), realizando 30 repeticiones por tratamiento.



Figura 6. Estado de la plantas al inicio de los tratamientos.

La supervivencia de las plantas se evaluó mediante el registro del número de plantas no controladas en cada réplica a los 15 y 30 días post-aplicación. Las plantas detectadas visualmente como severamente dañadas (mostrando síntomas de marchitez, clorosis de las hojas jóvenes y una coloración marrón-rojiza generalizada) se registraron, y se refirió a ellas como “plantas controladas” siguiendo la metodología señalada por Zelaya *et al.* (2004) para determinar el porcentaje de mortalidad.

Acumulación de ácido shikímico en tejidos foliares de plantas tratadas con glifosato

Doce plantas de la población problema y de la población susceptible, en estado de macollaje, fueron tratadas con 1440 g (ea) de glifosato ha⁻¹ y se emplearon para cuantificar la acumulación de ácido shikímico en post-aplicación siguiendo la metodología de Singh y Shaner (1998) con las modificaciones de Pérez-Jones *et al.* (2007).

Se emplearon tres plantas de cada población para tomar muestras de 0,05 g de peso fresco de la lámina foliar y de la vaina de la última hoja expandida a 0, 24, 48 y 72 horas post-aplicación. Posteriormente, cada porción de tejido se colocó en un microtubo de 1,5 ml con 1 ml HCl (0,25 N). El material vegetal contenido en el tubo se conservó a -20°C. Posteriormente, se llevó a 60°C durante 12 horas favoreciendo la digestión ácida con la finalidad de que las membranas celulares se desorganicen y se libere al medio el shikimato.

Se tomó 100 µl del sobrenadante y se colocó en otro tubo con 0,8 ml de ácido periódico (1 %). En este paso, el ácido shikímico fue oxidado para generar ácido trans-aconítico y dialdehído, para que se produzca la reacción se mantuvo por 45 minutos a 37 °C. Luego de este tiempo de incubación, se incorporó 0,8 ml de una solución de NaOH (1 N) / Na₂SO₃ (0,05 M). El proceso de oxidación del paso anterior finalizó al adicionar la base fuerte, así el exceso de ácido periódico fue neutralizado. Al generar un medio alcalino el producto de la oxidación del shikimato genera un cromóforo poco estable pero el sulfito de sodio actúa como estabilizador (Cromartie y Polge, 2000).

Se cuantificó el cromóforo por espectrofotometría el cual está relacionado directamente (1:1) al contenido de shikimato de la solución (Gaitonde y Gordon, 1957). Para esto, se tomó 1 ml del tubo de reacción y se determinó la absorbancia a 382 nm con un espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A). La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración, utilizando concentraciones conocidas de ácido shikímico (ácido 3α,4α,5β-trihidroxi-1-ciclohexano-1-carboxílico, 99 %. Sigma Aldrich, Inc.). Finalmente, se calculó la concentración de shikimato por unidad de peso fresco.

Evaluación de la relación entre la acumulación de shikimato y la sensibilidad a glifosato en hojas incubadas in vitro

Este experimento se desarrolló con el objetivo de evaluar la sensibilidad a glifosato de una planta, sin provocar un daño al vegetal que impida cumplir con su

ciclo de vida. Para ello, se trabajó con 23 plantas descendientes de la población problema, cultivadas en macetas de 250 cm³ en invernáculo, como se describió en experimentos previos. Cuando las plantas alcanzaron el estado de macollaje, se multiplicaron por separación de macollos de manera de obtener cuatro plantas genéticamente idénticas por clon. Los materiales se cultivaron hasta que tuvieron, nuevamente, al menos dos macollos por planta. Posteriormente, sobre dos plantas de cada clon se empleó una dosis de glifosato de 500 g (ea) ha⁻¹, asperjada con un pulverizador manual calibrado para liberar 200 L ha⁻¹, con la finalidad de caracterizar los materiales según su sensibilidad al herbicida a 21 días post-aplicación. En este sentido, diez plantas fueron susceptibles a esta dosis mientras que las restantes sobrevivieron.

En el laboratorio, a partir de las plantas sin tratar, se cortaron 8 láminas por clon correspondientes a la última hoja expandida de cada macollo. Los cortes se realizaron a 5 mm de la lígula. Inmediatamente, las hojas se colocaron verticalmente sobre una gradilla metálica de manera que ambas caras estén expuestas a la aplicación del herbicida por aspersión (Figura 7a). Sobre dos hojas de cada clon, se realizaron los siguientes tratamientos: aplicación de una dosis de glifosato de 0, 500, 1000 y 3000 g (ea) ha⁻¹ empleando un pulverizador manual de laboratorio (volumen de aplicación de 200 L ha⁻¹). Luego de diez minutos, cuando las gotas de la aplicación dejaron de ser visibles sobre la superficie foliar, cada hoja fue colocada verticalmente (con el extremo del corte hacia abajo) dentro de un tubo de ensayo de vidrio de 20 ml, conteniendo 1 ml de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Snyder, 1933) diluida con agua bidestilada en una relación 1:3, respectivamente. Se aseguró que el extremo basal de cada hoja esté en contacto con la solución. Los tubos se cerraron con láminas de termoplástico flexible (Parafilm®). Sobre ese material se realizó una perforación de un milímetro de diámetro para propiciar el intercambio de gases entre la atmósfera confinada en el tubo y el exterior. Los tubos se llevaron a incubación a 20 ± 3°C y 300 μmoles m⁻² s⁻¹ de radiación fotosintéticamente activa continua durante 72 horas (Figura 7b).

Finalmente, se tomó una muestra de 0,05 g a partir del tercio medio de las hojas, se sumergió en microtubos con 1 ml de HCl (0,25 N) y se continuó con el protocolo de determinación de shikimato como se detalló en la experiencia previa. Para cada clon, se cuantificó la concentración de ácido shikímico por gramo de peso fresco promediando los valores de ambas réplicas.

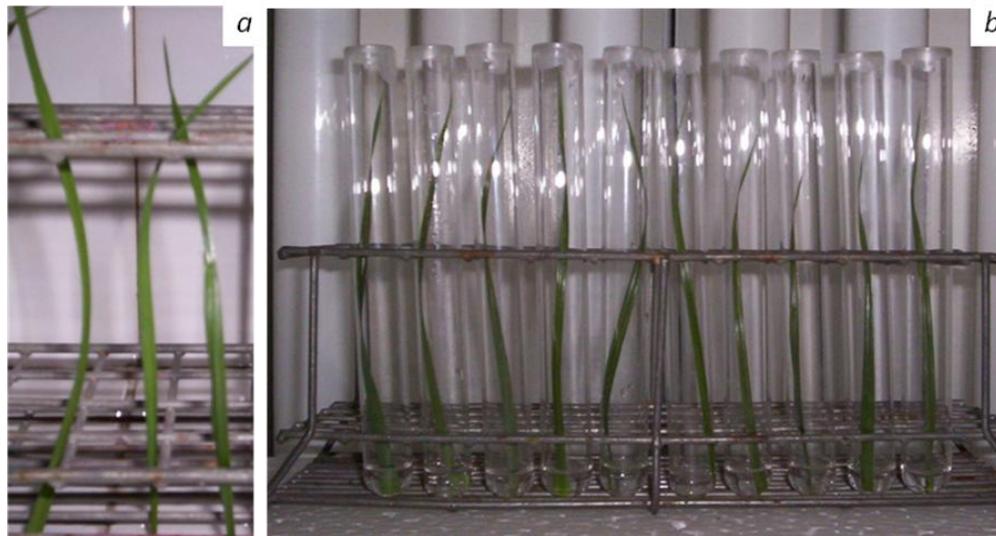


Figura 7. Experimento para la evaluación de la acumulación de shikimato en tejidos foliares tratados con glifosato e incubados *in vitro*: *a)* láminas soportadas en una gradilla metálica para favorecer la exposición de ambas caras a la aplicación de glifosato por aspersión; *b)* tejidos foliares en incubación durante post-aplicación.

Evaluación de la sensibilidad a glifosato empleando plantas en macollaje multiplicadas vegetativamente

Al igual que en el experimento previo, se empleó una metodología que permita caracterizar las plantas de *Lolium perenne* respecto a su sensibilidad a glifosato previniendo la muerte de los materiales susceptibles.

Se empleó la metodología descrita por Baerson *et al.* (2002) con modificaciones. Semillas de *Lolium perenne* se pusieron a germinar en placas de Petri

sobre papel de filtro humedecido con agua destilada y se mantuvieron en una cámara de crecimiento con 75 μmoles de fotones de radiación fotosintéticamente activa $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un régimen de 12/12 horas de luz/oscuridad y temperaturas de 25°C/15°C, respectivamente. Luego de 7 días, cada plántula fue transferida a macetas de 250 cm^3 con una mezcla de tierra y arena (3:1) y se cultivaron en invernáculo manteniendo las condiciones hídricas a capacidad de campo.

Cuando las plantas llegaron al estado de macollaje (al menos cuatro macollos por planta), éstas fueron multiplicadas vegetativamente por separación de macollos mediante cortes a nivel del nudo de ahijamiento de la planta. Estos propágulos fueron plantados en macetas y cultivados en invernáculo en las mismas condiciones a las descritas antes. De esta manera, se lograron obtener réplicas de una misma planta (clon) (Figura 8a).

Al momento en el que los materiales multiplicados llegaron a tener 3-4 macollos (Figura 8b), se realizaron aplicaciones de glifosato a distintas dosis (posteriormente, en cada experimento se especifica qué dosis fueron probadas) a fin de caracterizar cada clon respecto a su sensibilidad al herbicida. Luego, a 21 y 30 días post-aplicación se realizó la evaluación de supervivencia de plantas clasificando visualmente cada planta tratada como “controlada” (clorosis general, tanto en las hojas maduras como jóvenes) o “sobreviviente” (sin síntomas cloróticos o limitados a hojas maduras con hojas en expansión). Una vez determinada la sensibilidad a glifosato, los clones fueron seleccionados según su sensibilidad para llevar a cabo varios experimentos descritos posteriormente. Oportunamente, se indica la sensibilidad de los biotipos utilizados al describir la metodología empleada en cada experimento.

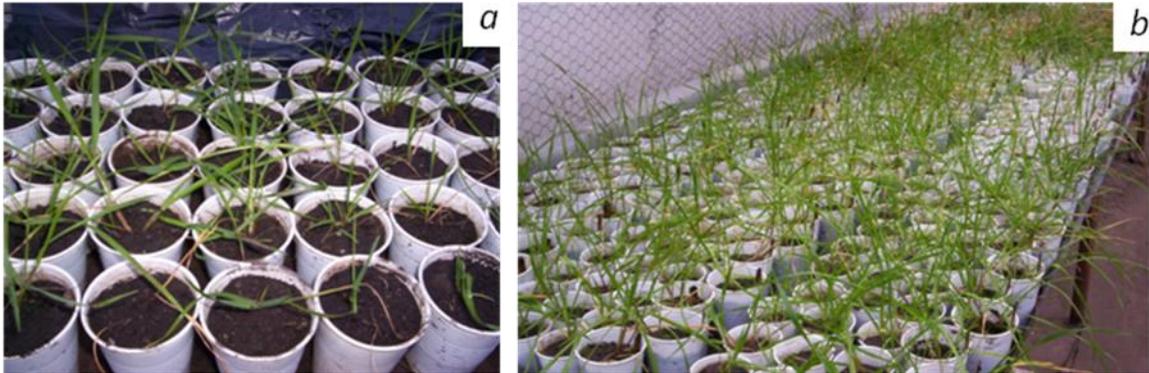


Figura 8. Clones de *Lolium perenne* para la determinación de la sensibilidad a glifosato: *a)* clones luego de la separación de los macollos y trasplante; *b)* estado de las plantas al momento de realizar las aplicaciones de glifosato para su caracterización.

Ensayo de evaluación a campo de un principio activo alternativo de diferente mecanismo de acción respecto a glifosato

Este experimento se estableció en un lote con *Lolium perenne* resistente a glifosato, al estado de macollaje, en agosto de 2010 situado en el partido de Coronel Dorrego, (38° 44' 21" S y 61° 15' 35" W), provincia de Buenos Aires.

Los tratamientos del ensayo consistieron en la aplicación de siete dosis de haloxifop-R-metil (Galant® LPU C.E 3 %): 0, 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 g de ingrediente activo ha⁻¹. El herbicida se aplicó con un pulverizador experimental de aire comprimido (CO₂), a presión constante, equipado con pastillas 10002, calibrado para un volumen de aplicación de 140 L ha⁻¹. En todos los casos, se empleó 2 L ha⁻¹ de aceite mineral como coadyuvante.

Se llevó a cabo un diseño al azar con tres repeticiones, con un tamaño de parcela aplicada de 16 m². La cobertura de la maleza en todas las parcelas fue homogénea y superior al 95 %. A los 40 días post-aplicación, se realizó el muestreo por parcela efectuando el corte de las plantas a 2 cm del suelo en una superficie de 0,25 m². Este material se secó en una estufa a 60°C hasta peso constante y se

determinó el peso en materia seca (MS) de cada muestra empleando una balanza analítica (Sartorius® 2354). Finalmente, se calculó el porcentaje de control:

$$\text{Control (\%)} = \left(\frac{MS \text{ testigo} - MS \text{ tratamiento}}{MS \text{ testigo}} \right) \cdot 100$$

Análisis estadístico

A partir de los datos de germinación, supervivencia de plantas y control a campo con haloxifop-R-metil se construyeron curvas de dosis-respuesta empleando un modelo de regresión log-logístico no lineal según lo descrito por Streibig *et al.* (1993):

$$y = C + \frac{D - C}{1 + (x/I_{50})^b}$$

En esta ecuación, y representa el porcentaje de respuesta a la concentración de herbicida o dosis de x , C es la asíntota inferior o respuesta a una concentración de herbicida infinitamente alta; D representa la asíntota superior o respuesta media cuando la concentración o dosis de herbicida es cero, b es la pendiente de la recta en el punto I_{50} (inhibición media). Éste último parámetro indica la concentración o dosis de herbicida que provoca una reducción del 50 % en la respuesta máxima. I_{50} fue nombrado DL_{50} (dosis letal media) para ensayos de inhibición de la germinación. En el caso del ensayo de longitud de la plúmula, la concentración de herbicida necesaria para provocar la reducción del 50 % en el crecimiento fue llamada GR_{50} . En bioensayos de supervivencia, el mencionado parámetro se llamó ED_{50} (dosis efectiva media). Para evaluar el ajuste del modelo, se realizó la prueba de Fisher, se estudió la varianza de los errores y se calculó el coeficiente de determinación (R^2). En todos los casos, se calculó el índice de resistencia (IR) como la relación de la DL_{50} , GR_{50} o ED_{50} de las plantas resistentes en comparación con las susceptibles.

En el caso de la evaluación a campo del control de la población problema con haloxifop-R-metil, a partir del modelo se calculó la dosis de herbicida capaz de inhibir el crecimiento de las plantas en un 90 % comparado al testigo sin herbicida (ED₉₀).

Con los datos de los contenidos de clorofila y de shikimato, se realizaron los correspondientes análisis de la varianza para evaluar las diferencias entre poblaciones y tratamientos a lo largo del tiempo post-aplicación. Las diferencias entre los valores medios de clorofila y de contenido de ácido shikímico se compararon con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Los intervalos de confianza (95 %) se calcularon para el contenido de clorofila y la evaluación del rebrote.

A partir de los datos de acumulación de shikimato en hojas incubadas *in vitro*, se realizó un análisis de la varianza multifactorial donde las fuentes de variación fueron la resistencia o susceptibilidad, la dosis probada y la interacción doble. A partir de la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher ($P < 0,05$), se contrastaron las medias y se determinaron los intervalos de confianza (95 %). Se comprobó el cumplimiento de los supuestos del análisis mediante el estudio de los residuales.

Para los análisis se utilizaron dos programas estadísticos Statistica® v7.1 (Stat Soft, Inc.) y GraphPad Prism® v5.00 (Graphpad Software, Inc.).

Bases fisiológicas y bioquímicas de la resistencia a glifosato

Efectos sobre el crecimiento

A partir de la descendencia de una planta segregante de la población problema, se obtuvieron plantas medio hermanas. Empleando la metodología descrita antes de multiplicación vegetativa y caracterización de la sensibilidad a glifosato, se identificaron dos biotipos, uno susceptible al herbicida (controlado a dosis de 500 g (ea) ha⁻¹) y otro resistente (superviviente a dosis de 1500 g (ea) ha⁻¹). Los mencionados biotipos fueron multiplicados vegetativamente por división de macollos a fin de obtener el número de réplicas necesario para cada experimento. Las plantas fueron cultivadas en invernáculo, en macetas de 500 cm³ con tierra tamizada y mantenidas a capacidad de campo antes y durante los experimentos.

Se trabajó con clones en pleno macollaje (cinco a siete macollos por planta). Un grupo de cinco plantas de cada biotipo fue asperjado con una dosis de glifosato de 1440 g (ea) ha⁻¹ empleando un volumen de aplicación 100 litros ha⁻¹. Otro lote similar de plantas fue empleado como control y tratado con agua bidestilada más 0,01 % de polioxietilensorbitano monolaureato (Anedra®) como tensioactivo. Estos tratamientos se realizaron a las 8:00 am (Figura 9).

A las 3 horas de realizados los tratamientos, las plantas fueron cortadas a 2,5 cm del cuello o nudo de ahijamiento (Figura 9). Esto se realizó con el fin de independizar los efectos del herbicida sobre la fotosíntesis y el traslado de asimilados desde la parte aérea, respecto a los efectos del glifosato sobre el crecimiento de hojas. Luego de efectuado el corte, se midió la longitud del rebrote de las hojas por sobre el nivel del corte a las 4, 6, 9, 25, 30 y 50 horas post-aplicación, estimando así la actividad de los meristemas intercalares de la base de la lámina y de la vaina (Figura 9). Se empleó un calibre Panorama SS® de 1/10 mm de precisión y se realizaron las mediciones para todos los macollos de cada planta (Figura 9). Luego, estos valores se promediaron obteniendo un único valor por planta.

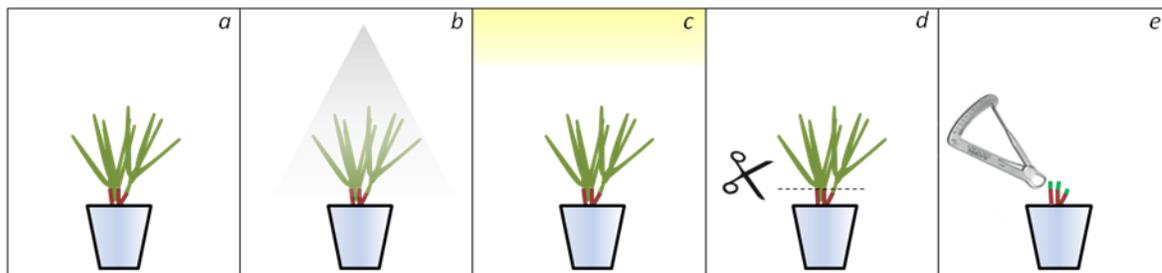


Figura 9. Metodología para la evaluación del efecto del glifosato sobre el crecimiento: *a)* planta al inicio del ensayo; *b)* aplicación del herbicida (1440 g (ea) ha⁻¹); *c)* incubación durante tres horas en invernáculo para propiciar el traslado de glifosato; *d)* corte de los órganos aéreos; *e)* medición del crecimiento de las hojas a distintas horas post-aplicación.

Efectos sobre la acumulación de azúcares libres

Veinte plantas con cinco macollos de cada uno de los dos biotipos fueron tratadas con una dosis de glifosato de 1440 g (ea) ha⁻¹, bajo las mismas condiciones que el experimento previo. Otras veinte plantas de cada biotipo se emplearon como control tratándolas con agua bidestilada más el tensioactivo, como fue descrito anteriormente. Cinco plantas por cada tratamiento y biotipo fueron cosechadas, tomando 0,5 g de las últimas hojas expandidas a 1, 2, 3 y 5 días post-aplicación, conservando el material a -20°C.

Preparación del extracto

Se agregó a cada muestra 5 ml de etanol (85 % v/v) y se calentó a 100 °C durante 5 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se conservó, luego al tubo con la muestra, se le agregó nuevamente 5 ml de etanol y se calentó a 100 °C durante 5 minutos. Este proceso se repitió tres veces en total. A partir de la colección del sobrenadante se obtuvo un extracto que fue enrasado a 10 ml por evaporación del etanol a 80 °C.

Determinación de azúcares totales

Del extracto de cada muestra se realizaron cuatro repeticiones tomando 250 μ l en cada una. Luego, se le agregó 1 ml de agua bidestilada y 0,5 ml de HCl (0,1 M) a cada una, se agitó suavemente y se llevó a 100 °C durante 5 minutos. Después de dejarlo enfriar a temperatura ambiente, se incorporó 1 ml del reactivo cúprico (tartrato de potasio y sodio 1,2 % p/v; Na₂CO₃ 2,4 % p/v; CuSO₄·5H₂O 0,4 % p/v; NaHCO₃ 1,2 % p/v y Na₂SO₄ 18 % p/v) y se calentó a 100 °C durante 10 minutos. Se dejó enfriar y se agregó 0,5 ml del reactivo arsenomolibdato ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 5 % p/v; H₂SO₄ 4,2 % v/v y Na₂HAsO₄·7H₂O 0,6 % p/v) y se agitó suavemente durante 10 segundos. Finalmente, se enrasó a 25 ml con agua bidestilada y se midió la absorbancia a 520nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

Determinación de azúcares reductores

Se realizaron cuatro repeticiones por muestra tomando en cada una 250 μ l del extracto. Se le agregó 1 ml del reactivo cúprico y se calentó a 100 °C durante 10 minutos. Luego, se agregó 0,5 ml del reactivo arsenomolibdato y se agitó suavemente durante 10 segundos. Al igual que en la determinación anterior, se enrasó a 25 ml con agua bidestilada y se midió la absorbancia a 520 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

En ambas determinaciones se empleó como blanco 250 μ l de agua bidestilada tratada según el correspondiente protocolo. La concentración de azúcares se estimó a partir de una curva patrón realizada con diferentes concentraciones de sacarosa (0 a 500 μ g ml⁻¹, B.D.H.®). Finalmente, los valores de las cuatro repeticiones de cada muestra fueron promediados.

Estimación de azúcares no reductores

Los azúcares no reductores fueron estimados por diferencia entre la concentración de azúcares totales y azúcares reductores.

Efectos del glifosato en el traslado de asimilados

Material vegetal y condiciones de cultivo

Semillas de *Lolium perenne* caracterizadas como resistentes a glifosato y otras susceptibles al herbicida, se pusieron a germinar sobre papel de filtro humedecido con agua destilada en placas de petri. Éstas placas se mantuvieron en una cámara de crecimiento con 75 μmol de fotones de radiación fotosintéticamente activa $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un régimen de 12/12 horas de luz/oscuridad y temperaturas de 25 °C/15 °C, respectivamente. Luego de 7 días, cada plántula de cada población fue transferida a potes de 500 cm^3 conteniendo solución Hoagland (Hoagland y Snyder, 1933) y se mantuvieron en invernáculo. Durante el día, haciendo uso de una bomba de acuario, se aplicó burbujeo durante 5 minutos cada una hora. La solución nutritiva fue reemplazada semanalmente y el pH fue ajustado a 5,5-6,0 con H_2SO_4 (0,1 M). Cuando las plantas alcanzaron el estado de macollaje, 45 días después de la germinación, se iniciaron los ensayos descritos seguidamente (Figura 10).



Figura 10. Sistema de hidroponia empleado para el cultivo de las plantas en solución nutritiva con suplementación periódica de aire. Planta en macollaje al inicio de los tratamientos.

Patrón de absorción de glucosa- C^{14} y traslado de C^{14}

Antes de evaluar los efectos del glifosato, se estudió la absorción de glucosa- C^{14} y distribución de C^{14} en diferentes tejidos de plantas susceptibles y resistentes sin tratar con herbicidas.

Un volumen de 5 μ l de D-glucosa- C^{14} (U) (5,5 kBq; NEN®, 9,6 GBq mmol^{-1}) fue aplicada puntualmente con una microjeringa (Hamilton®) en la cara adaxial, en el centro de la lámina foliar del macollo principal. Veinte plantas de cada población fueron marcadas y, posteriormente, se cosecharon cuatro plantas susceptibles y cuatro resistentes a las 3, 6, 12, 24 y 72 horas post-marcación. A estos tiempos, la glucosa no absorbida fue extraída del área marcada a partir del lavado con 10 ml de etanol (10 % v/v) durante 5 minutos. Inmediatamente después, las plantas fueron seccionadas en las siguientes partes: área marcada, resto de la hoja marcada, hojas

expandidas y no expandidas y meristema apical del macollo marcado, macollos no marcados y raíces. Este material se llevó a estufa a 80 °C hasta peso constante.

Cada muestra fue digerida con NaOH (9 N) en una relación de 1 ml por cada 100 mg de peso seco durante 24 horas. Seguidamente, se procesó la muestra empleando un homogeneizador manual. Una alícuota de 0,5 ml de la suspensión obtenida fue incorporada a 3 ml de la solución Bray de centelleo líquido con 5 % de sílice pirogénica (Cab-O-Sil®) y se determinó la radioactividad con un contador de centelleo líquido (Beckman Coulter® LS 100C). En todos los experimentos, los valores de C¹⁴ detectados fueron expresados como porcentaje del total de C¹⁴ encontrado en la planta.

Absorción de glucosa-C¹⁴ y traslado de C¹⁴ en post-aplicación de glifosato

Las dos poblaciones de *Lolium perenne* fueron comparadas durante post-aplicación de glifosato. Veinte plantas de cada población fueron asperjadas con 1080 g (ea) ha⁻¹ de glifosato (Roundup® 360 g (ea) L⁻¹, Monsanto Argentina). Se emplearon plantas testigos de cada población, las que fueron tratadas con una solución de agua destilada y polioxietilensorbitano monolaureato (Anedra®) al 0,01 % v/v como tensioactivo. Cada una de las plantas, tratadas con el herbicida y testigos de ambas poblaciones, fueron marcadas con glucosa-C¹⁴ a 1, 3 y 6 días post-aplicación de glifosato. Las condiciones en que se realizó el marcado fueron las mismas que las descriptas antes. A las 24 horas post-marcación, cuatro plantas de cada tratamiento y de cada población fueron cosechadas, disectadas y procesadas como se describió en el experimento previo.

Liberación de C¹⁴ desde las raíces durante post-aplicación de glifosato

Plantas susceptibles y resistentes cultivadas en hidroponia en condiciones similares a las descritas previamente, fueron empleadas para estudiar la liberación de C¹⁴ desde las raíces a la solución nutritiva.

Cuatro plantas de cada población fueron asperjadas con 1080 g (ea) ha⁻¹ de glifosato, mientras que otras cuatro se usaron como testigo a partir de la aplicación de agua bidestilada y tensioactivo (polioxietilensorbitano monolaureato) como se indicó antes. Treinta minutos después, las plantas fueron marcadas con glucosa-C¹⁴ como en los experimentos previos.

Un volumen de 0,5 ml de solución nutritiva fue colectado a 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-marcación. Cada muestra fue contenida en tubos con 3 ml de solución Bray de centelleo líquido y 5 % de sílice pirogénica, a los cuales previamente se evaluó su radioactividad. Posteriormente, se volvió a determinar la radioactividad de los tubos y por diferencia entre las dos lecturas, se estimó el C¹⁴ liberado por las raíces.

Efectos del glifosato sobre la fotosíntesis

Material vegetal

A partir de semillas provenientes de la población de *Lolium perenne* resistente a glifosato, se obtuvo una veintena de plantas de al menos cuatro macollos cada una, cultivadas en invernáculo en macetas de 250 cm³ empleando tierra fértil tamizada como sustrato. En el mencionado estado, cada planta fue multiplicada vegetativamente por separación de macollos de forma de obtener, al menos, cuatro plantas de cada clon.

Cuando los propágulos tenían 3-4 macollos, éstos fueron empleados para tratar cada clon con 0, 700, 1400 y 2800 g (ea) ha⁻¹ de glifosato siguiendo la metodología descrita antes. A los 21 días de realizada la aplicación, los clones fueron caracterizados como “susceptibles” cuando fueron controlados a la dosis de 700 g (ea)

ha⁻¹ y “resistentes” cuando sobrevivieron a 2800 g (ea) ha⁻¹ y dosis más bajas. Un clon de cada biotipo fue seleccionado, mientras que el resto de los clones de sensibilidad intermedia fueron descartados.

A partir de las plantas del tratamiento con 0 g (ea) ha⁻¹ (testigos) de los clones selectos (resistentes y susceptibles), se obtuvieron nuevos propágulos que fueron cultivados en macetas de 500 cm³ en las mismas condiciones a las descritas antes. Las plantas se mantuvieron en invernáculo y fueron regadas diariamente. Cada 15 días, se fertilizó con nitrógeno, fósforo y potasio (12:10:20, Nitrofoska®, Compo Argentina).

Tratamiento con glifosato

Cuando las plantas alcanzaron el estado de 3-4 macollos, cinco plantas de cada biotipo fueron tratadas con 1080 g (ea) ha⁻¹ de glifosato empleando un aspersor manual calibrado para liberar 200 L ha⁻¹. Cinco plantas de cada biotipo se emplearon como testigos tratándolas con una aspersion de agua destilada.

Medición del intercambio gaseoso durante post-aplicación de glifosato

Se comparó el intercambio gaseoso del biotipo susceptible y resistente a distintos tiempos post-aplicación de glifosato. Se determinó la tasa de asimilación neta de carbono a saturación de luz (A_{sat}) y la conductancia estomática (g_s) utilizando un analizador infrarrojo de gases portátil (CIRAS-2®, PP Systems). La irradiancia a la cual las plantas alcanzaban la saturación lumínica fue determinada en plantas controles a partir de la construcción de una curva de asimilación de CO₂ *versus* la densidad de flujo fotónico fotosintético (0 a 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La tasa de asimilación alcanzó la saturación a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, esto es consistente con especies de metabolismo C₃ (Medrano *et al.*, 2008).

Las mediciones fueron realizadas a 25°C con una concentración de CO₂ externo de 360 ppm, 1000 μmol m⁻² s⁻¹ (densidad de flujo fotónico fotosintético saturante) entre las 10:00 am y 3:00 pm. Las lecturas se efectuaron sobre la última hoja expandida de cada planta a 1, 2, 3, 5 y 7 días post-aplicación. Las mediciones fueron alternadas entre biotipos y tratamientos.

Respuesta del intercambio gaseoso a la concentración de CO₂

Se determinó la tasa de asimilación de CO₂ y la g_s como respuesta a diferentes concentraciones de CO₂ ambiental (C_a; 50, 100, 250, 360, 500, 600, 700, 800 y 900 ppm) a una radiación fotosintéticamente activa saturante de 1000 μmol m⁻² s⁻¹ a 2 días post-aplicación. Para cada medición, se registró la concentración intercelular de CO₂ (C_i) y se determinó la evolución de la tasa de asimilación de CO₂ y g_s como función de la C_i. La relación C_i/C_a fue calculada para cada medición. El equipamiento y las condiciones fueron similares a las descritas en el experimento previo, asimismo se emplearon cinco repeticiones por tratamiento.

A partir de las curvas asimilación de CO₂ en función de C_i, se calculó la tasa máxima de carboxilación de ribulosa 1,5-bifosfato (V_{cmax}), la tasa potencial de transporte de electrones que participa de la regeneración de ribulosa 1,5-bifosfato (J_{max}), A_{sat} y la tasa fotosintética máxima a saturación de CO₂ (A_{max}) a partir del estimador propuesto por McMurtrie y Wang (1993).

Mediciones de fluorescencia de la clorofila durante post-aplicación de glifosato

La actividad fotoquímica de los tejidos fotosintéticos fue medida periódicamente sobre la última hoja expandida de ambos biotipos empleando cinco repeticiones de cada tratamiento. Se realizaron mediciones de la fluorescencia modulada para lo cual se utilizó un fluorímetro (FMS 1®, Hansatech) empleando el método del pulso saturante (Schreiber *et al.*, 1994).

Con el fin de adaptar las plantas a la irradiancia a la cual se realizaron las mediciones, éstas fueron mantenidas durante 30 minutos a una densidad de flujo fotónico fotosintético de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ utilizando una lámpara alógena. Posteriormente, se realizaron mediciones de la señal de fluorescencia máxima (F_m') y fluorescencia a estado estable a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (F_s').

Luego, las plantas fueron adaptadas a la oscuridad durante 30 minutos y, en estas condiciones, se midió la señal de fluorescencia máxima (F_m) y mínima (F_0). A partir de estas lecturas sobre plantas aclimatadas a la luz y a la oscuridad, se estimaron las siguientes variables de acuerdo a Rosenqvist y van Kooten (2003):

- F_v/F_m : Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (FSII).
- ETR: Tasa de transporte fotosintético de electrones, donde fue asumido que el 50 % de la energía de excitación fue distribuida al FSII y el coeficiente de 0,84 representó la fracción de luz absorbida por la hoja.
- qP: Atenuación fotoquímica.
- F_v'/F_m' : Rendimiento intrínseco del FSII

Finalmente, se determinó el contenido de clorofila con el medidor portátil SPAD 502® en el tercio medio de la última hoja expandida, sección similar a la empleada para realizar las mediciones de fluorescencia de la clorofila e intercambio gaseoso.

Efectos del glifosato sobre la actividad de peroxidasas y la integridad de las membranas celulares en plantas susceptibles y resistentes

Material vegetal y preparación del extracto

Se cultivaron 16 plantas resistentes y 16 susceptibles a glifosato, previamente caracterizadas por su sensibilidad a glifosato mediante la metodología de multiplicación por separación de macollos. Se realizó una aplicación de glifosato de

1080 g (ea) ha⁻¹ empleando un aspersor manual calibrado para liberar un volumen de aplicación de 200 L ha⁻¹ sobre cuatro plantas de cada biotipo en macollaje. A los 0, 1, 2 y 3 días post-aplicación, se tomó 0,3 g de peso fresco de las últimas hojas expandidas de cada planta, se trituro el material en un mortero empleando N₂ líquido. Inmediatamente, se agregó 1 ml de una solución tampón fosfatos (50 mM; pH 6,5) a 4°C. Luego, el extracto se colocó en microtubos de 1,5 ml y se centrifugó a 400 x *g* durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, se separó el sobrenadante de cada tubo y se lo conservó a -20 °C hasta el día siguiente.

Medición de la actividad de peroxidasas totales

La actividad de peroxidasas fue determinada a partir de la capacidad de éstas de oxidar el ácido pirogálico formando purpurogalina ($\epsilon=2,47 \text{ cm}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$), un compuesto coloreado (Puntarulo *et al.*, 1988) (Figura 11). Esto se llevó a cabo en 1 ml de la siguiente mezcla de reacción: solución tampón fosfatos (50 mM; pH 6,5), ácido pirogálico (45 mM) y H₂O₂ (8 mM). A este medio se le incorporó 30 μ l del extracto crudo obtenido previamente. La actividad enzimática se midió a 20 °C realizando un seguimiento espectrofotométrico a 430 nm durante un minuto empleando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible.

Finalmente, se expresó la actividad de peroxidasas como milimoles de purpurogalina producidos por minuto y por gramo de peso fresco de hoja.

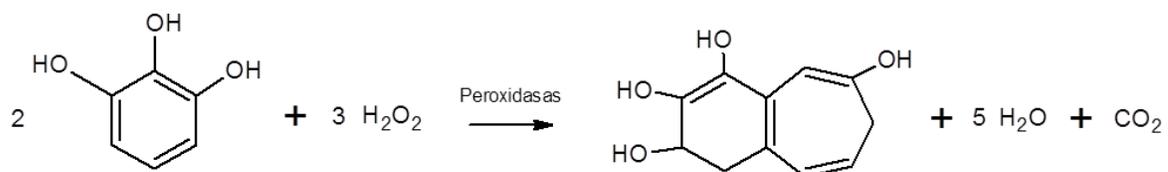


Figura 11. Reacción de formación de purpurogalina a partir de pirogalol por la actividad de peroxidasas.

Efectos del glifosato sobre la integridad de las membranas celulares

A partir de 20 plantas resistentes y 20 susceptibles a glifosato, previamente caracterizadas por su sensibilidad al herbicida según la metodología indicada antes de multiplicación vegetativa y evaluación de susceptibilidad, se evaluó el efecto del glifosato sobre la estabilidad de membranas celulares al quinto y décimo día post-aplicación siguiendo a Sullivan (1972).

Diez plantas de cada biotipo fueron tratadas con una dosis de glifosato de 1080 g (ea) ha⁻¹, mientras que otras 10 plantas, empleadas como testigo, fueron asperjadas con agua bidestilada más 0,01 % v/v de polioxietilensorbitano monolaureato. Al término de 5 días, se tomaron muestras de 0,05 g de la lámina de la última hoja expandida de cinco plantas tratadas y testigos de cada biotipo. Sobre otras cinco plantas, se llevó a cabo el mismo procedimiento a los 7 días post-aplicación.

Inmediatamente después a cada muestreo, los tejidos foliares se lavaron tres veces con agua bidestilada durante 15 segundos, para eliminar los electrolitos adheridos a la superficie y aquellos liberados por las heridas producidas por el corte. Posteriormente, cada muestra se sumergió en un tubo con 10 ml de agua bidestilada donde permanecieron durante cuatro horas a temperatura ambiente. Seguido a esto, se determinó la conductividad eléctrica (dS m⁻¹) empleando un conductímetro Jenco® modelo 3173.

Luego, los tubos se taparon y se llevaron a una autoclave dónde se mantuvieron por 20 minutos a una presión de una atmósfera, con el objetivo de afectar totalmente la integridad de las membranas. Finalmente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se volvió a medir la conductividad eléctrica del medio.

En base a los datos obtenidos, se estimó el daño sobre las membranas celulares a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Daño (\%)} = \left(1 - \frac{1 - \frac{G_1}{G_2}}{1 - \frac{T_1}{T_2}} \right) \cdot 100$$

Donde, G y T son los valores de conductancia eléctrica de las plantas tratadas con glifosato y control respectivamente y los subíndices 1 y 2 hacen referencia a la medición inicial y final (luego de someter las muestras al tratamiento en la autoclave), respectivamente.

Evaluación de la actividad in vitro de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPs)

Material vegetal

Empleando la metodología descrita de multiplicación de las plantas por separación de macollos y posterior determinación de la sensibilidad a glifosato de cada clon, se seleccionaron tres clones resistentes y tres susceptibles a partir de la descendencia de una planta segregante de la población problema. Los tres clones resistentes sobrevivieron a dosis de glifosato de 1500 g (ea) ha⁻¹, mientras que los tres susceptibles fueron controlados a dosis de 500 g (ea) ha⁻¹. Plantas sin tratar de cada clon, se volvieron a multiplicar vegetativamente y se cultivaron hasta alcanzar suficiente volumen de tejido foliar para realizar los extractivos como se describe seguidamente.

Extracción de la enzima EPSPs

Se cosecharon 40 g (peso fresco) de hojas en expansión y se conservaron, inmediatamente, en recipientes refrigerados con hielo. Luego, se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de la extracción. Todo el protocolo se llevó a cabo manteniendo la temperatura entre 1-6 °C.

Empleando N₂ líquido, se trituro el material vegetal en un mortero hasta lograr un estado de polvo. Se agregaron 8 g de polivinilpirrolidona por muestra y se continuó con la trituración con más N₂ líquido. En todo momento, se evitó que el material llegara a descongelarse. Posteriormente, se adicionaron 200 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 7,0; EDTA 5 mM; Glicerina 10 % v/v; KCl 50 mM) al cual se le agregó inmediatamente 2-mercaptoetanol (10 mM), benzamidina (2 mM), fenilmetanosulfonilfluoruro (0,5 mM) y leupeptina (10 µM).

Seguidamente, se realizó la homogeneización del extracto en vasos de precipitado de 500 ml en hielo empleando un micromotor manual provisto con un eje vertical portando dos cuchillas de acero (Gillette platino plus®). La homogeneización se llevó a cabo a 1000 rpm durante cinco minutos. Luego, se transfirió el extracto a recipientes de 500 ml y se centrifugó a 800 x g durante 45 minutos a 4 °C. Finalmente, se filtró el sobrenadante con *voile* para separar los restos de tejidos vegetales.

Purificación y concentración de EPSPs

Determinado el volumen de extracto obtenido, se agregó gradualmente sulfato de amonio para realizar un corte al 45 % siguiendo la tabla de saturación (England y Seifter, 1990) y manteniendo el extracto en suave agitación. Luego de la disolución completa de la sal, se mantuvo en agitación suave por 30 minutos más. Se transfirió el extracto a recipientes enfriados en hielo y se centrifugó a 800 x g durante una hora a 4 °C, logrando obtener un pellet consistente y un sobrenadante homogéneo. El pellet obtenido se conservó para la posterior cuantificación de proteínas.

Se determinó el volumen del sobrenadante y se repitió la adición de sulfato de amonio con el fin de realizar un nuevo corte al 70 %. En este sentido, se procedió de la misma forma descrita previamente. Una vez disuelta la sal, el extracto se dividió en tubos de 50 ml y se mantuvo toda la noche a 4 °C. En la mañana siguiente, se centrifugaron los tubos a 20000 x g durante 45 minutos a 4 °C, con el fin de obtener un pellet consistente. El sobrenadante se conservó para la cuantificación de proteínas.

Posteriormente, el pellet obtenido (en ese momento dividido en cuatro tubos), se disolvió en 2-3 ml del tampón de extracción, procurando emplear el mínimo volumen necesario. Finalmente, realizando una centrifugación a 4 °C, el extracto crudo fue desalado haciendo uso de columnas de sephadex G-25 (PD-10, GE®) previamente equilibradas con el tampón de extracción, según las recomendaciones del fabricante. El eluato se conservó a -20 °C y se empleó como extracto crudo para estudiar la actividad de la enzima EPSPs.

Para la cuantificación de proteínas totales en cada una de las fracciones se empleó la metodología de Bradford (1976). A una alícuota de cada fracción se agregó 1 ml del reactivo de Bradford y, luego de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se estimó utilizando albúmina de suero bovino (>98 %) como patrón para construir una curva de calibración (0-15 µg de proteínas).

Ensayo de actividad de EPSPs bajo concentraciones crecientes de glifosato

La reacción se llevó a cabo en microtubos estériles de 1,5 ml, empleando 25 µl de extracto crudo en un volumen final de 100 µl del siguiente buffer de reacción: HEPES 100 mM, pH 7,0; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 2 mM, KF 10 mM, MgCl₂ 1 mM, glicerina 10 % v/v, shikimato-3-fosfato (0,5 mM), fosfoenolpiruvato (1,25 mM), se empleó agua ultra pura (Milli-Q®). Se evaluó la actividad de la EPSPs de plantas susceptibles y resistentes bajo las siguientes concentraciones de glifosato (N-(fosfometil) glicina 96 %, Sigma Aldrich®) 0, 1, 5, 25, 50, 500, 1000, 10000 µM. La reacción se inició con el agregado de shikimato-3-fosfato y se llevó a cabo a 25 °C (Figura 12). Previamente, todos los reactivos fueron termostatizados durante 15 minutos a la mencionada temperatura. Como controles negativos, se emplearon las correspondientes reacciones a tiempo cero. Para estimar la actividad de la enzima EPSPs se cuantificó la liberación de fosfato empleando la metodología propuesta por Lanzetta *et al.* (1979) como indicaron Eschenburg *et al.* (2002) y Nandula (2010).

La reacción se detuvo a los 20 minutos con el agregado de 800 μl del reactivo de Lanzetta (HCl 1 N, verde de malaquita 0,033 % p/v, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 1,05 % p/v). Luego de un minuto, se incorporó a cada tubo 100 μl de citrato de sodio (34 % p/v) y a los 20 minutos se midió la absorbancia a 630 nm empleando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible. Para estimar la concentración de fosfatos liberados, se emplearon como patrón soluciones de KH_2PO_4 (0-100 μM). Finalmente, se definió la unidad de actividad enzimática (U) como nanomoles de fosfato liberados por minuto, en tanto que la actividad específica resulta ser U por miligramo de proteína (U mg^{-1}).

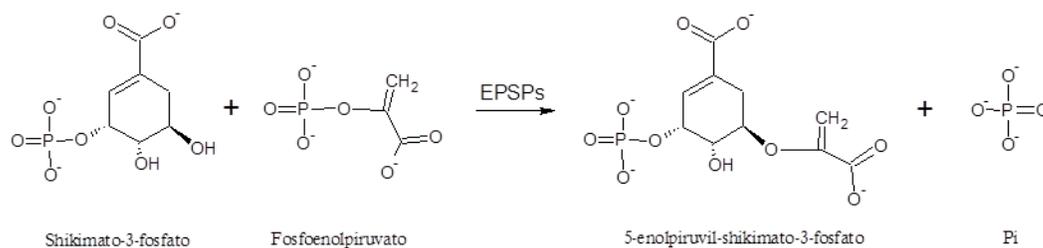


Figura 12. Reacción catalizada por la enzima EPSPs. La actividad enzimática se determinó a partir de la cuantificación del fosfato inorgánico (Pi) formado como producto de la reacción.

Análisis estadísticos

A partir de los datos obtenidos en los experimentos de evaluación del efecto del glifosato sobre el crecimiento, la acumulación de azúcares libres, el transporte de asimilados y sobre la fotosíntesis, se realizaron los correspondientes análisis de la varianza para diseños multifactoriales, donde las fuentes de variación fueron: *biotipo* (susceptible y resistente), *tiempo post-aplicación*, *tratamiento* (control y aplicación de glifosato) y las correspondientes interacciones dobles y/o triples. A partir de los datos de daño de membranas celulares y de actividad de peroxidasas se llevaron a cabo análisis de la varianza a una vía donde la fuente de variación fue el biotipo.

Se realizaron los estudios de residuales para corroborar el cumplimiento de los supuestos del análisis de la varianza de independencia y normalidad de los errores. Empleando el test de Bartlett se determinó la homogeneidad de la varianza y, en base a esto, fue necesario transformar los datos porcentuales del experimento de traslado de asimilados en el arcoseno de la raíz cuadrada, antes de realizar los análisis de la varianza (Lison, 1976). Finalmente, las medias fueron comparadas mediante el test de Fisher de diferencias mínimas significativas ($P < 0,05$). Se empleó el programa estadístico Statistica® v7.1 (Stat Soft, Inc.).

A partir de los datos obtenidos en el experimento de evaluación de la actividad de la EPSPs en diferentes concentraciones de glifosato, se construyó una curva de dosis-respuesta empleando un modelo de regresión no lineal log-logístico de pendiente estándar:

$$y = C + \frac{D - C}{1 + \frac{x}{I_{50}}}$$

Donde y representa la actividad específica de la enzima en $U\ mg^{-1}$ a la concentración x de glifosato (μM), C es la asíntota inferior, D representa la asíntota superior o respuesta media cuando la concentración de herbicida es cero y el parámetro I_{50} representa la concentración del herbicida necesaria para inhibir al 50 % la actividad de la enzima. Para evaluar el ajuste del modelo, se realizó una prueba de F, se estudió la varianza de los errores y se calculó el coeficiente de determinación (R^2). Además, se realizaron pruebas de F ($P < 0,05$) para comparar los parámetros de los modelos ajustados del biotipo susceptible y del resistente a glifosato. Para estos análisis se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism® v5.00 (Graphpad Software, Inc.).

Bases genéticas de la resistencia a glifosato

Recuento cromosómico y cuantificación del contenido de ADN nuclear en biotipos resistentes y susceptibles

Material vegetal

A partir de la descendencia de una planta de la población problema, mediante la metodología descrita de multiplicación vegetativa y posterior evaluación de sensibilidad a glifosato, se obtuvieron seis plantas medio hermanas. Tres de estas fueron seleccionadas por ser resistentes a glifosato (sobrevivientes a dosis de 1500 g (ea) ha⁻¹) y otras tres susceptibles al herbicida (controladas a 500 g (ea) ha⁻¹). Estos materiales se volvieron a multiplicar por división de matas a fin de obtener tres clones de cada material. Al estado de 3-4 macollos, las plantas fueron cosechadas para la comparación del contenido de ADN mediante citometría de flujo.

Recuento cromosómico

Sobre estos biotipos contrastantes respecto a la sensibilidad a glifosato se realizó el recuento cromosómico de células en mitosis. A partir de fitómeros enraizados en agua, se obtuvieron raicillas de 0,5 a 1 cm de longitud que se emplearon para realizar los preparados.

Inicialmente se estudió la hora del día en el que se registraba la mayor tasa de división celular, comenzando el análisis desde las 10:00 am hasta las 3:00 pm. En función de esto, para el presente ensayo las raicillas se cortaron a las 1:00 pm debido al mayor número de células en división encontrado. Las raicillas se colocaron en una caja de Petri con papel de filtro embebido en 8-hidroxiquilonia (0,02 % v/v) durante 3

horas. Posteriormente, las raíces se pasaron por tres lavados de agua destilada durante cinco minutos cada uno. Luego, el material se fijó colocándolo en tubos con solución de Carnoy (etanol:acetato, 3:1), cada dos horas, en un término de tres veces, se realizó el recambio de la solución. Finalmente, el material fue conservado a 4 °C (durante un plazo no mayor a una semana) hasta realizar los preparados. En ese momento, las raicillas se llevaron a tres baños secuenciales de agua destilada durante cinco minutos en cada uno, a fin de extraer el fijador. Después se procedió a realizar la digestión de las paredes celulares con HCl (1 N) en estufa a 45 °C durante 30 minutos. Finalmente, los ápices radicales se tiñeron con fucsina básica durante cinco minutos y se montaron en ácido acético (45 %) realizando la técnica de “squash”.

Estimación de ADN nuclear por citometría de flujo

Para la extracción de los núcleos vegetales se cortaron las muestras en 0,5 ml del buffer de Otto I (ácido cítrico monohidratado 0,1 M y polisorbato 20 0,5 % v/v). Posteriormente las suspensiones de núcleos fueron pasadas por un filtro de membrana de 30 µm de poro y vertidas sobre tubos receptores de plástico, a los cuales se les adicionó 2 ml de buffer de tinción Otto II ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1 M) con 4',6-diamidino-2-fenilindol (4 mg ml^{-1}) como fluorocromo con absorción en 350 nm (Johnston *et al.* 1999) y una emisión a 450 nm (Otto, 1990). Se empleó un equipo de citometría de flujo Modelo Partec PA (software Partec GmbH Alemania) con una lámpara HBO 100 W/2. El protocolo y las mediciones se realizaron en el Instituto de Floricultura de INTA Castelar.

Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos del citómetro se realizaron dos análisis de la varianza a una vía. En un caso la fuente de variación fue la planta evaluada (seis clones) y en otro el biotipo (resistente/susceptible). Se realizaron los estudios de los residuales para corroborar el cumplimiento de los supuestos del análisis.

Cruzamientos dirigidos entre plantas susceptibles y resistentes de Lolium perenne

Las plantas empleadas en los cruzamientos dirigidos fueron fenotipadas según su sensibilidad a glifosato. Los materiales se multiplicaron por división de matas, obteniendo al menos cuatro clones de cada planta. Posteriormente, al estado de 3-4 macollos, se realizó una prueba de sensibilidad a glifosato mediante la aplicación de las siguientes dosis de glifosato 0, 750, 1000 y 3000 g (ea) ha⁻¹. Luego de seguir la evolución de las plantas durante post-aplicación, a los 30 días se caracterizaron los materiales según su sensibilidad como: “susceptibles” controladas a 750 g (ea) ha⁻¹ (y dosis superiores), “moderadamente resistentes” sobrevivientes hasta 1000 g (ea) ha⁻¹ (controladas a 3000 g (ea) ha⁻¹) y “resistentes” sobrevivientes a 3000 g (ea) ha⁻¹. En la Tabla 1 se muestran los materiales empleados en todos los cruzamientos dirigidos y sus características.

Tabla 1. Plantas empleadas para realizar cruzamientos dirigidos y autofecundaciones. Se detalla la sensibilidad a glifosato, el origen de cada material y el año de obtención.

Planta	Sensibilidad a glifosato	Origen	Año
Ri10-1	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Población problema	2009
Ri10-3	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Población problema	2009
Ri10-5	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Población problema	2009
Ri10-7	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Población problema	2009
Ri11-1	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Población problema	2010
Ri11-2	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Población problema	2010
Sb11	Controlada a 750 g (ea) ha ⁻¹	Población problema	2010
Ra11	Sobrevivió hasta 3000 g (ea) ha ⁻¹	Ri10-5 x Ri10-5	2010
Sa11	Controlada a 750 g (ea) ha ⁻¹	Ri10-1 x Ri10-1	2010
Re12	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Ri11-1 (polinización abierta)	2011
Sc12	Controlada a 750 g (ea) ha ⁻¹	Ri11-1 (polinización abierta)	2011
Ri13-1	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Re12 x Sc12	2012
Ri13-2	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Re12 x Sc12	2012
Ri13-3	Sobrevivió hasta 1000 g (ea) ha ⁻¹	Re12 x Sc12	2012
Sc13-1	Controlada a 750 g (ea) ha ⁻¹	Re12 x Sc12	2012
Sc13-2	Controlada a 750 g (ea) ha ⁻¹	Re12 x Sc12	2012
Re13	Sobrevivió hasta 3000 g (ea) ha ⁻¹	Re12 x Re12	2012

Metodología de castración y cruzamiento

Luego de caracterizar las plantas, los clones sin tratar con glifosato fueron trasplantados a macetas de cinco litros donde fueron cultivados durante todo el ciclo. Al estado de espigazón, aproximadamente 7 días antes del comienzo de la antesis, se llevó a cabo la castración manual de las plantas madres (Figura 13a). En primer lugar se seleccionaron entre 10 y 12 espiguillas del centro de la espiga, mientras que las

espiguillas restantes se cortaron. A su vez, se eligieron entre 3 y 5 flores de cada espiguilla seleccionada, cortando las flores apicales debido a su reducido tamaño y a su desarrollo relativamente retrasado.

Empleando una pinza de punta fina, se procedió a abrir cada una de las flores selectas por separación de las glumas y emascularlas retirando cuidadosamente sus tres estambres. Posteriormente, las espigas con todas las flores emasculadas se encapucharon, usando sobres de papel satinado de 10 cm x 5 cm, junto a una espiga no emasculada de otra planta empleada como padre (Figura 13b). En todos los casos, los sobres utilizados como capuchas se mantuvieron sostenidos en forma vertical mediante tutores (Figura 13b) y durante los 15 días posteriores al encapuchado se agitaron suavemente, en forma manual, dos veces al día para propiciar la liberación del polen en el interior.

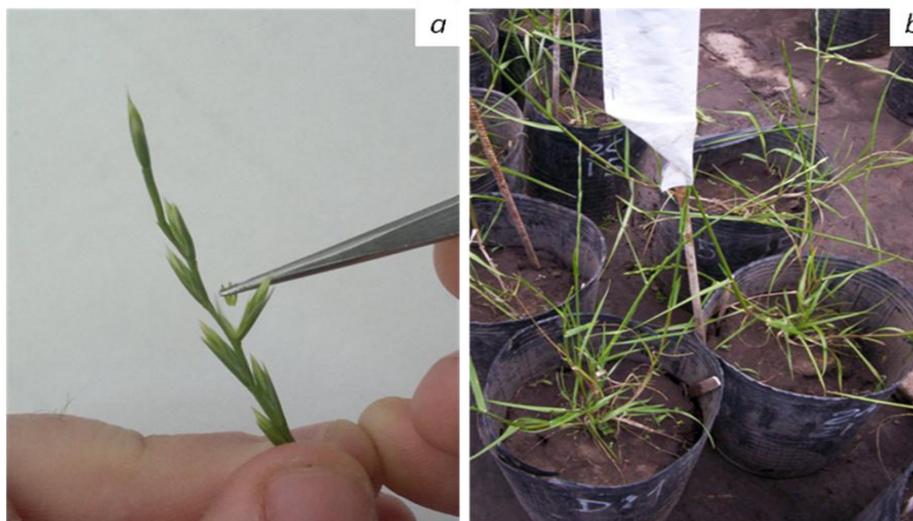


Figura 13. Cruzamientos dirigidos: *a)* procedimiento de castración, retirando los tres estambres de cada flor; *b)* encapuchado de espigas.

Luego de 20 días de realizadas las castraciones, se abrieron los sobres y se comprobó en cada caso el cuajado de granos o el fracaso del cruzamiento. En ambas situaciones, se continuó con el cultivo de las plantas hasta madurez de cosecha cuando

se cortaron e individualizaron todas las espigas tratadas. Éstas se acondicionaron en sobres de papel a temperatura ambiente hasta el año siguiente.

Metodología para forzar la autofecundación

Se forzó la autofecundación de materiales de distinta sensibilidad a glifosato. Para ello, se eligió al menos una espiga de cada planta, previo al inicio de la antesis. Sobre esa espiga, se seleccionaron 10-12 espiguillas del centro, mientras que las apicales y basales fueron cortadas. Posteriormente, las espigas se encapucharon dentro de sobres de papel satinado. A partir de este paso, se procedió hasta su cosecha en forma similar a lo detallado en la metodología de cruzamientos forzados.

Cruzamientos dirigidos y autofecundaciones

En primer lugar, durante el año 2009 y 2010, se forzó la autofecundación de plantas resistentes a 1000 g (ea) ha⁻¹, descendientes de la población problema (Ri10-1; Ri10-3; Ri10-5; Ri10-7; R11-1 y R11-2; Tabla 1).

A partir de la descendencia de plantas autofecundadas, en el año 2010 se seleccionó y cruzó una planta resistente a dosis de hasta 3000 g (ea) ha⁻¹ (“Ra11” descendiente de *Ri10-5 x Ri10-5*; Tabla 1) y una susceptible (“Sa11” descendiente de *Ri10-1 x Ri10-1*, controlada a 750 g (ea) ha⁻¹). Además, durante esa misma campaña, se cruzaron entre sí plantas resistentes a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹ (“Ri11-1” y “Ri11-2”; Tabla 1) y, también, plantas susceptibles (“Sa11” y “Sb11”, controladas a 750 g (ea) ha⁻¹).

En el año 2011, se seleccionó una planta resistente a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹ (“Re12”, Tabla 1) y otra susceptible (“Sc12”, Tabla 1), ambas descendientes de una misma planta madre (“Ri11-1”, Tabla 1) sometida a polinización abierta. Los materiales selectos se multiplicaron vegetativamente con el fin de incrementar el número de cruzamientos y el tamaño de la progenie. A partir de estas plantas, se

realizaron los cruzamientos susceptible x resistente, el recíproco y, en otros casos, se forzó la autofecundación.

Finalmente, a partir de la descendencia del cruzamiento resistente x susceptible, se seleccionaron plantas susceptibles (“Sc13-1” y “Sc13-2” controladas a 750 g (ea) ha⁻¹, Tabla 1) y resistentes (“Re13”, “Ri13-1”, “Ri13-2” y “Ri13-3”, Tabla 1). Se realizaron cruzamientos entre susceptibles y resistentes y, también, se forzó la autofecundación.

Hibridación de Lolium multiflorum x Lolium perenne

Se colectaron cinco plantas de *Lolium multiflorum*, en estado de macollaje, creciendo en forma espontánea en los jardines de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP). Se multiplicaron vegetativamente por separación de macollos, se cultivaron en macetas de 250 cm³ en invernáculo, y se evaluó la sensibilidad a glifosato, determinando su susceptibilidad a dosis de 500 g (ea) ha⁻¹.

Cuando las plantas llegaron a espigazón, antes de la antesis, 10-12 espiguillas del centro de una espiga fueron emasculadas. Siguiendo la metodología descrita antes, se realizaron cruzamientos inter-específicos empleando como padre *Lolium perenne* resistente a glifosato (Re13, Tabla 1). También se encapucharon de a dos espigas de las diferentes plantas de *Lolium multiflorum*, esta descendencia sería empleada luego como control susceptible.

Evaluación de la sensibilidad a glifosato de la descendencia

En todos los casos (en cruzamientos, autofecundaciones e hibridaciones), al año siguiente a la cosecha las espigas fueron cuidadosamente trilladas en forma manual, discriminando entre semillas vanas y semillas de desarrollo normal. Durante el mes de mayo, habiendo cumplido el tiempo post-cosecha necesario para que se minimice el porcentaje de semillas en dormición, se realizaron las siembras de las

semillas en cajas de petri. La progenie se mantuvo agrupada e identificada según la espiga de procedencia. Las condiciones de germinación fueron las mismas que las descritas en experimentos previos.

Las plántulas fueron trasplantadas en macetas individuales de 250 cm³, empleando tierra como sustrato. Al estado de 4-5 macollos, se multiplicó vegetativamente cada planta por división de macollos obteniendo al menos cuatro propágulos de cada una como se describió anteriormente. Cuando los clones presentaron 3-4 macollos se evaluó la sensibilidad a glifosato empleando las siguientes dosis 0, 750, 1000 y 3000 g (ea) ha⁻¹ usando la metodología descrita antes. Durante el período post-aplicación se llevaron registros semanales describiendo la sensibilidad de la planta por evaluación visual de síntomas (clorosis) categorizando cada planta como “controlada” cuando mostraban clorosis general, en órganos jóvenes y hojas expandidas, o “sobreviviente” cuando no presentaban síntomas cloróticos ni marchitamiento.

Finalmente, se consideró que presentaban “resistencia elevada” aquellas plantas sobrevivientes a 3000 g (ea) ha⁻¹, “resistencia intermedia” las que sobrevivieron a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹, mientras que se contabilizaron como “susceptibles” las plantas que fueron controladas a 750 g (ea) ha⁻¹. Esta clasificación se realizó a partir de los registros de control a los 21 días post-aplicación.

Modelos evaluados y análisis estadístico

A partir del análisis de la segregación de la descendencia se evaluó un modelo de herencia donde la resistencia se explica por la interacción de dos genes (epistasia recesiva, epistasia dominante y epistasia doble dominante con efecto acumulativo) y, además, se planteó un modelo de dominancia incompleta en el cual un gen mayor “R” controla la resistencia a glifosato. En este último caso, las plantas homocigotas $R'R'$ presentan elevada resistencia al herbicida, mientras que las plantas heterocigotas RR' muestran resistencia intermedia y aquellas homocigotas RR son susceptibles. Para

evaluar el ajuste de cada modelo se empleó la prueba de chi-cuadrado (χ^2) para contrastar las frecuencias observadas con las esperadas ($P > 0,05$), donde la hipótesis nula fue que las frecuencias observadas son iguales a las frecuencias esperadas a partir del modelo planteado y las diferencias entre éstas frecuencias se deben al azar. En contra parte, la hipótesis alternativa fue que las diferencias en las frecuencias observadas en relación a las esperadas no se deben al azar.

Estudio del flujo de genes de resistencia

Material vegetal y experimento a campo

En el año 2009, se cosecharon plantas de *Lolium perenne* de la población resistente estudiada. Empleando esas semillas, en marzo de 2010 en la Chacra Experimental Integrada Barrow se sembró una parcela de 10 m x 20 m utilizando una densidad de 10 kg de semilla ha⁻¹. La siembra se realizó luego del laboreo con rastra de disco, se empleó una sembradora experimental de seis líneas, distanciadas a 20 cm.

En similares condiciones, en marzo de 2011 se sembró ryegrass perenne, susceptible a glifosato (en plantas en macollaje la dosis de inhibición media fue de 102,6 g (ea) ha⁻¹), siguiendo el contorno de la parcela del material resistente utilizando 1,2 m de ancho de parcela. Además, con el objeto de disponer de plantas susceptibles de ryegrass establecidas a distancias crecientes de la población resistente, se realizó la siembra del material susceptible en una parcela de 1,2 m de ancho y 90 m de largo como se muestra en la Figura 14. Teniendo en cuenta la polinización anemófila de *Lolium perenne*, la mencionada parcela de ryegrass susceptible fue orientada en sentido SO-NE, de acuerdo a la dirección de los vientos predominantes en la CEI Barrow durante el mes de noviembre como se muestra en la Figura 15.



Figura 14. Imagen satelital del experimento de flujo génico: parcela de *Lolium perenne* resistente a glifosato (R) y parcelas de *Lolium perenne* susceptible (indicadas en amarillo). Se presentan las dimensiones expresadas en metros.

El día 12 de agosto de 2011, previo a la floración, se instalaron sobre la parcela susceptible, cinco jaulas de 0,5 m x 0,5 m de lado y 0,8 m de altura, cubiertas con doble *voile* para evitar el ingreso de polen (Figura 16). De esta manera, en el interior de la jaula se mantuvieron aisladas plantas de ryegrass susceptible hasta finalizada la floración. El 1 de diciembre se retiraron las jaulas y se individualizaron las plantas que estuvieron aisladas.

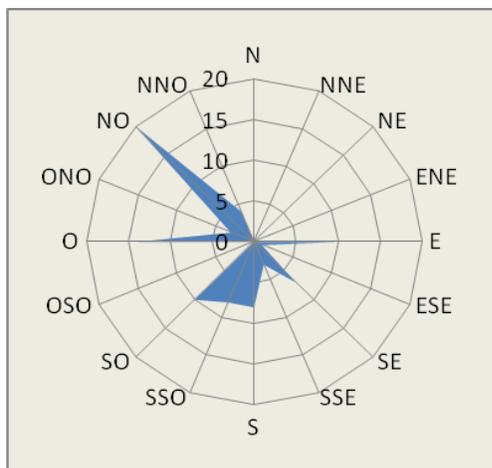


Figura 15. Distribución promedio de la dirección del viento (%) durante el mes de noviembre en la Chacra Experimental Integrada Barrow (2008-2012). Elaboración propia a partir de datos de *Windfinder*® (<http://www.es.windfinder.com>).

Posteriormente, a partir de la parcela de ryegrass susceptible, el día 27 de diciembre se cosecharon 10 plantas de cada uno de los siguientes sectores: distanciados a 0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 y 85 m de la parcela de ryegrass resistente. También se cosecharon las plantas que previamente se habían aislado con las jaulas y 10 plantas de la parcela resistente. Las semillas provenientes de las plantas aisladas se emplearon como controles negativos (susceptibles) y aquellas descendientes de las plantas resistentes como controles positivos para la resistencia a glifosato.



Figura 16. Jaula para el aislamiento de plantas susceptibles durante el período de floración.

Evaluación de la sensibilidad a glifosato de la descendencia

Bioensayo de germinación en presencia de glifosato

Este ensayo se basó en la evaluación porcentual de la germinación de las semillas y el crecimiento plumular en presencia de una concentración de glifosato de 42 mg (ea) L⁻¹ (dosis letal media estimada sobre la población susceptible). Cincuenta semillas se pusieron a prueba en placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo una hoja de papel de filtro y 5 ml de una solución de glifosato de 42 mg (ea) L⁻¹. Se emplearon tres repeticiones en un diseño completamente al azar.

Este experimento se realizó en condiciones similares al bioensayo de dosis-respuesta en germinación descrito antes. Se empleó una cámara de crecimiento con 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa con un período de luz/oscuridad de 12/12 horas y un régimen de temperatura de 25/15 °C durante el día y la noche, respectivamente. Después de 7 días, se registró el porcentaje de

semillas germinadas y el crecimiento de la plúmula en longitud, medido desde el punto de unión del coleoptilo a la semilla hasta el ápice de la plúmula.

Evaluación del crecimiento de las plantas bajo efecto del glifosato

El crecimiento de la progenie de las plantas susceptibles cosechadas a diferentes distancias de la parcela resistente, fue evaluado en post-aplicación de glifosato. Con este fin se empleó la metodología descrita antes para la evaluación de la inhibición del crecimiento provocada por el glifosato.

A partir de la descendencia de las plantas cosechadas sobre cada sector (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 y 85 m de la parcela de ryegrass resistente), de las plantas de la población resistente y de aquellas susceptibles aisladas, se emplearon diez semillas pre-germinadas en cajas de Petri para ser trasplantadas en macetas de 250 cm³ con tierra fértil. Estas plántulas se cultivaron en invernadero y fueron regadas diariamente manteniéndolas a capacidad de campo hasta que alcanzaron el estado de macollaje.

En ese estado fenológico, las plantas fueron asperjadas con una dosis de glifosato de 1000 g (ea) ha⁻¹ empleando un volumen de aplicación 200 litros ha⁻¹. A las 3 horas, las plantas fueron cortadas a 2,5 cm del cuello o nudo de ahijamiento. Luego, se midió la longitud del rebrote de las hojas por sobre el corte a las 72 horas post-aplicación.

Evaluación de la supervivencia de plantas en macollaje

Fue evaluada la supervivencia de la descendencia de las plantas cosechadas a los mencionados sectores distantes de la parcela resistente, luego de la aplicación de glifosato. Para esto, en invernadero se cultivaron 50 plantas descendientes de cada uno de los sectores, de las plantas susceptibles aisladas y de la población resistente. Se

emplearon cinco macetas de 1000 cm³ con tierra por tratamiento (10 plantas por maceta).

Cuando las plantas tuvieron 2-3 macollos, se realizó una pulverización con una dosis de glifosato 1000 g (ea) ha⁻¹, empleando un pulverizador manual de laboratorio calibrado para liberar 200 L ha⁻¹. Finalmente, se evaluó visualmente el número de plantas sobrevivientes a 10 y 20 días post-aplicación.

Empleando condiciones similares a las descritas, en otro ensayo se evaluó el control de plantas empleando glifosato a razón de 500, 1000 y 2000 g (ea) ha⁻¹. Se utilizaron tres repeticiones (10 plantas por maceta) y se determinó el número de plantas sobrevivientes a los 20 días post-aplicación.

Análisis estadístico

Los datos del ensayo de germinación y crecimiento plumular de la progenie bajo efecto del glifosato, del ensayo de inhibición del crecimiento y los de supervivencia de plantas en macollaje, se emplearon para realizar los correspondientes análisis de la varianza a una vía donde la fuente de variación fue la progenie (descendencia de plantas cosechadas a 0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75 y 85 m de la parcela de ryegrass resistente, de las plantas de la población resistente y de aquellas susceptibles aisladas durante la floración). Se realizó el estudio de residuales para corroborar el cumplimiento de los supuestos del análisis de la varianza. Las medias fueron comparadas mediante el test de Fisher de diferencias mínimas significativas ($P < 0,05$). Se empleó el programa estadístico Statistica® v7.1 (Stat Soft, Inc.).

Asimismo, se estudió la distribución de frecuencias para el crecimiento plumular de la progenie de los distintos tratamientos y mediante pruebas de χ^2 ($P > 0,05$) se contrastaron las frecuencias observadas de cada tratamiento con las esperadas (correspondiente a la descendencia de plantas susceptibles en aislamiento), donde la hipótesis nula fue que las frecuencias observadas en cada tratamiento son

iguales a la distribución de frecuencias de la progenie de plantas susceptibles en aislamiento (esperadas) y los desvíos se deben al azar. En contraste, la hipótesis alternativa fue que los desvíos entre las frecuencias observadas y las esperadas no se deben al azar.

Implicancias adaptativas de la resistencia

Material vegetal y control del fondo genético

De la descendencia de plantas de la población problema de Coronel Dorrego, se identificaron biotipos susceptibles y resistentes caracterizados según la metodología descrita de multiplicación vegetativa de plantas y prueba de sensibilidad a distintas dosis de glifosato. En este sentido, los días 15 de marzo de 2011 y 2012, se sembraron en cajas de petri alrededor de cien semillas descendientes de la población problema y se mantuvieron en una cámara de crecimiento en las condiciones descritas en experimentos previos. Luego de cinco días, las semillas que germinaron se repicaron en macetas de 250 cm³ con tierra fértil como sustrato y se cultivaron en invernáculo. Cuando las plantas presentaron más de cuatro macollos, se multiplicaron por división de matas, obteniendo al menos cuatro clones por planta. Éstos se cultivaron en macetas de 250 cm³ con tierra fértil en invernáculo.

A fines del mes de mayo, cuando los propágulos tenían 2-3 macollos, se realizó la prueba de sensibilidad mediante la aplicación de las siguientes dosis de glifosato 0, 500, 1000 y 2000 g (ea) ha⁻¹. Luego, a partir de la evaluación de supervivencia a los 21 días post-aplicación, se seleccionaron 18 plantas resistentes a 2000 g (ea) ha⁻¹ y 18 susceptibles controladas a 500 g (ea) ha⁻¹. Este protocolo fue llevado a cabo con el fin de seleccionar fenotipos susceptibles y resistentes provenientes de una misma población, así para las comparaciones de los costos biológicos se cumplió con la condición de disponer de un fondo genético homogéneo y aleatorizado (Vila-Aiub *et al.*, 2011).

Ensayos de campo

Estos experimentos fueron llevados a cabo en La Plata (34° S, 58° O) bajo condiciones de campo durante el año 2011 en el “Jardín de Genética” de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP) y repetido en el 2012 en el Instituto de Fisiología Vegetal (UNLP-CONICET). En cada experimento, 36 plantas al estado de macollaje (cuatro macollos por planta), 18 resistentes a glifosato y otras 18 susceptibles, fueron plantadas el 20 de junio (del 2011 y 2012) en un suelo argiudol típico. Se siguió un diseño de plantación de 6 x 6, donde las plantas se distanciaron a 30 cm unas de otras y se distribuyeron completamente al azar.

En el “Jardín de Genética” el suelo presentó las siguientes propiedades en los primeros 20 cm: pH 6,5; 0,20 % de nitrógeno total y 27 ppm de fósforo (Bray Kurtz N°1). Mientras que en el Instituto de Fisiología Vegetal el suelo, de igual clase taxonómica, mostró en su perfil de 0-20 cm: pH 7,0; 0,27 % de nitrógeno total y 22 ppm de fósforo (Bray Kurtz N°1). Previo a los experimentos, el suelo fue laboreado a una profundidad de 10 cm usando un motocultor. En el año 2011, se empleó riego complementario a las precipitaciones, de acuerdo a la demanda hídrica del cultivo. En tanto, en el año 2012 no se aplicó riego artificial.

El control de malezas se realizó semanalmente en forma manual en ambos experimentos. Por otra parte, se tomaron recaudos para minimizar el riesgo de generación de nuevos focos de resistencia. En ambas experiencias, en un área de 50 m alrededor del ensayo se censó la presencia de plantas espontáneas de *Lolium spp.* y se erradicaron manualmente. Tanto al inicio como durante el período de floración y al finalizar los ensayos, se repitió el mismo procedimiento.

Estudio de parámetros relacionados a la eficacia biológica

Se evaluaron parámetros de crecimiento y la fenología de plantas resistentes y susceptibles. En este sentido, se estudió el hábito de crecimiento (postrado o erecto) y la altura de planta (desde el cuello de la planta hasta el ápice del órgano más distante

–hojas o espigas-) a 60, 120 y 150 días después de plantación. También, se estimó el área foliar de la lámina de la hoja bandera (promedio de 10 hojas bandera por planta) en el estado de espigazón según la metodología no destructiva propuesta por Pandey y Singh (2011) a partir de mediciones del ancho y el largo de hojas. Se contó el número de semillas producido por planta y el peso de mil semillas ajustado a 12 % de humedad. Además para cada planta se determinó la biomasa aérea al estado de madurez y el índice de cosecha (relación del peso seco de semillas producidas por planta sobre el peso seco de la biomasa aérea total de la planta).

Las plantas fueron cosechadas, trilladas para obtener las semillas y luego, el resto de la biomasa aérea, se llevó a una estufa a 60 °C hasta que el material llegara a peso constante. Luego, se determinó el peso seco de cada planta empleando una balanza analítica (Sartorius® 2354). En el experimento del año 2012, además, se contó el número de espigas por planta, espiguillas por espiga y semillas por espiguilla.

Dentro del estudio de la fenología de plantas resistentes y susceptibles, a partir de observaciones semanales, para cada planta se determinó el número de días desde el trasplante hasta aparición del primer nudo aéreo, a espigazón y a madurez de cosecha.

La magnitud (%) de la penalidad biológica asociada con la resistencia a glifosato fue estimada según Maynard Smith (1998):

$$y = \left[1 - \left(\frac{R}{S} \right) \right] \cdot 100$$

Donde, y (%) representa la magnitud de la penalidad biológica, R el valor medio del parámetro de crecimiento de plantas resistentes y S la media del correspondiente parámetro en plantas susceptibles.

Estimación del estatus de nitrógeno y fósforo

En floración, se estimó el estatus de nitrógeno sobre la hoja bandera empleando un medidor portátil de clorofila (SPAD 502®, Minolta). A tal fin, se tomaron 10 hojas bandera al azar por planta, sobre éstas se realizaron tres lecturas a nivel del tercio medio de la lamina. Primero, las tres mediciones por hoja fueron promediadas y, posteriormente, se promediaron los valores de las 10 hojas por planta obteniendo un único valor.

En el experimento del año 2012, se estimó el estatus de fósforo de las hojas bandera de cada planta siguiendo la técnica de Brooks (1986) de determinación de ortofosfato extraído con ácido acético. Se muestrearon las 36 plantas del experimento a campo, tomando al azar una hoja bandera por planta, se pesó 0,05 g del material vegetal y cada muestra se sumergió en un microtubo con 1 ml de ácido acético (2 % v/v). Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 minutos y luego se centrifugaron a 4000 x *g* durante 10 minutos. Finalmente, se cuantificó el ortofosfato por espectrofotometría a 630 nm mediante la metodología de Lanzetta anteriormente descrita, empleando como patrón soluciones de KH₂PO₄ (0-100 µM). Los valores de ortofosfato se expresaron en µmoles por gramo de peso fresco de hoja.

Estudio de la germinación en el periodo post-cosecha

Luego de realizada la cosecha del experimento del año 2012, las semillas se conservaron a 25 ± 2 °C. Posteriormente, a un tiempo térmico de 1500 grados-día y 2000 grados-día (considerando una temperatura base de 5,4 °C, según Steadman *et al.*, 2003a), se tomó 100 semillas de la progenie de cada planta y se pusieron a germinar en cajas de Petri con papel de filtro embebido en agua bidestilada. Las condiciones de germinación fueron las mismas a las descritas en experimentos previos, empleando un régimen de 12/12 horas de alternancia de temperatura 25/15 °C en luz/oscuridad, respectivamente. Se determinó diariamente el número de semillas germinadas hasta los 8 días desde la siembra.

Análisis estadístico

Se realizó una prueba de χ^2 ($P > 0,05$) para evaluar la independencia de la sensibilidad a glifosato y el hábito de crecimiento de las plantas. A partir del resto de los parámetros evaluados, se realizaron análisis de la varianza a una vía o multifactoriales dependiendo del número de fuentes de variación implicadas en cada determinación: *biotipo* (susceptible y resistente a glifosato), *año* del experimento (2011 y 2012), *tiempo* (60, 120 y 150 días post-plantación) y sus interacciones. Para la evaluación de la germinación de semillas a 1500 y 2000 grados-día, las fuentes de variación fueron: *biotipo* (susceptible y resistente) y *días desde siembra* en cajas de Petri (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8).

Finalmente, los supuestos del análisis se comprobaron a partir del estudio de residuales. Se realizó la separación de medias mediante el test de diferencias mínimas significativas de Fisher ($P < 0,05$).

Resultados y discusión

Detección de la resistencia a glifosato

Ante un presumible caso de resistencia, las pruebas de detección deben ser rápidas y rigurosas con el fin de garantizar el tiempo necesario para tomar decisiones (Kim *et al.*, 2000). En este sentido, estudiando resistencia a distintos herbicidas, se han aplicado diferentes metodologías de detección que incluyen el análisis de toda la planta, incubación *in vitro* de tejidos, cultivo de granos de polen, germinación de semillas y análisis moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (Hensley, 1981; Richter y Powles, 1993; Kim *et al.*, 2000; Perez Jones *et al.*, 2005; Kaundun y Windass, 2006; Diez de Ulzurrun y Leaden, 2012). Los resultados obtenidos mediante estas pruebas deben permitir determinar el grado de insensibilidad de la planta y además deben ser indicadores del comportamiento a campo de la maleza (Moss, 2012).

Por ello, el diagnóstico de malezas resistentes a herbicidas es el primer paso para el manejo y para el estudio de su naturaleza (Beckie *et al.*, 2000). A menudo, las limitaciones en la eficacia de control están asociadas a factores externos a la resistencia como errores de aplicación, condiciones edafo-climáticas sub-óptimas o tratamientos en estados fenológicos de la maleza inadecuados (Moss, 2012). Por lo tanto, teniendo en cuenta los antecedentes descritos en la introducción en cuanto al control ineficaz con glifosato de la población problema, en el presente capítulo se pretende responder las siguientes preguntas: ¿Se trata de un caso de resistencia a glifosato? ¿Cuál es la sensibilidad a glifosato de la población problema? ¿En todos los estadios la sensibilidad es igual –relativamente, comparada a una población susceptible-? ¿Esta población es sensible a herbicidas de otro mecanismo de acción?

Bioensayo de dosis-respuesta de germinación

Comparando las poblaciones en estudio respecto al porcentaje de germinación bajo distintas dosis de glifosato, la población presumiblemente resistente mostró una menor sensibilidad al herbicida (Figura 17 y 18a). El índice de resistencia (IR) indica que es necesario incrementar la dosis de glifosato 3,2 veces para alcanzar una inhibición de la germinación similar a la lograda en la población susceptible (Tabla 2).

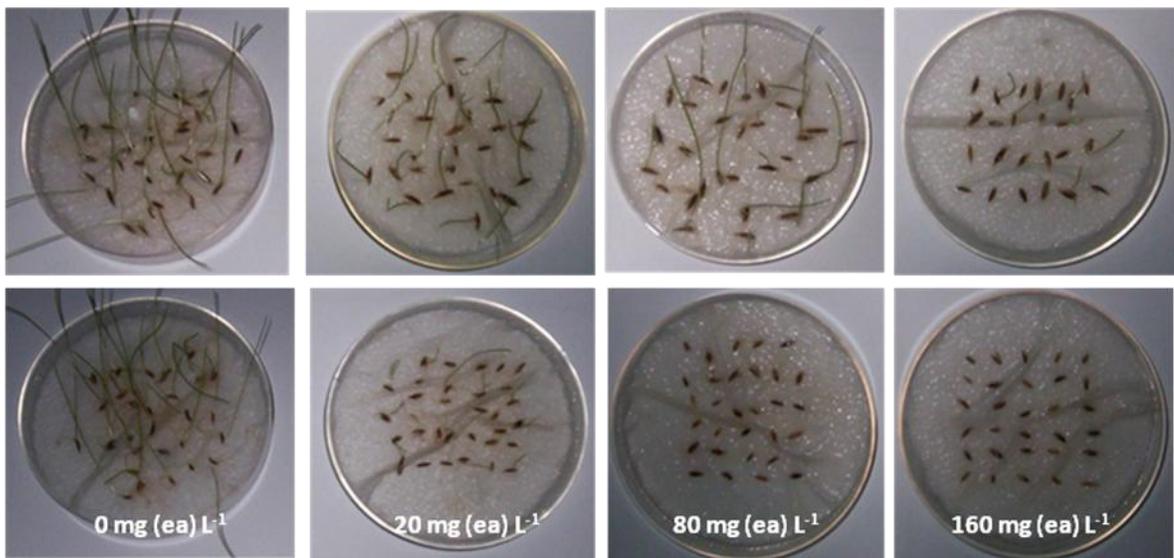


Figura 17. Germinación y crecimiento plumular de semillas resistentes (panel superior) y susceptibles (panel inferior) cultivadas en distintas concentraciones de glifosato.

El crecimiento de la plúmula fue inhibido significativamente en ambas poblaciones en todas las dosis de glifosato empleadas, comparando con los respectivos controles sin herbicida (Figura 17 y 18b). Al considerar este parámetro, el IR fue de 4,4, indicando que para causar un efecto equivalente en la población resistente respecto a la susceptible, se debe incrementar la dosis de glifosato más de cuatro veces (Tabla 3).

Tabla 2. Parámetros del modelo de regresión no lineal para el bioensayo de germinación, probabilidad (*P*) para la precisión del modelo e índice de resistencia estimado (IR). El modelo ajustado fue: Germinación (%) = $C + \{(D - C)/[1 + (x/LD_{50})^b]\}$

Población	<i>D</i> (%)	<i>C</i> (%)	<i>B</i>	<i>LD</i> ₅₀ (mg (ea) L ⁻¹)	<i>P</i>
Susceptible	85,0	1,0	1,4	42,0	<0,001
Resistente	86,6	10,0	0,9	138,0	<0,001

IR = 3,2

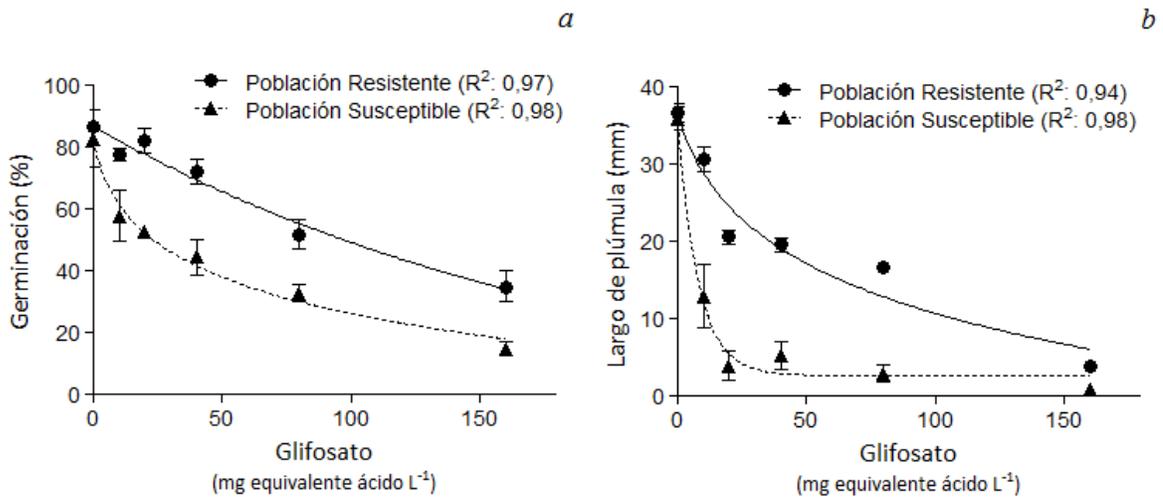


Figura 18. Porcentaje de germinación (a) y crecimiento plumular (b) de las poblaciones resistente y susceptible a diferentes concentraciones de glifosato. Los símbolos representan los valores medios y las líneas las respuestas predictivas para cada población. Las barras verticales representan ± 1 error estándar de la media.

Basado en los resultados de germinación a diferentes dosis de glifosato, el comportamiento contrastante de plantas susceptibles y resistentes no podría ser explicado por el transporte diferencial del herbicida. En las condiciones del ensayo, el embrión estaría embebido con la solución de glifosato, en consecuencia todos sus tejidos estarían expuestos al herbicida. Así, el transporte diferencial de glifosato como mecanismo de resistencia estaría inhibido en este estado ontogénico. En este sentido,

un mecanismo de exclusión celular no podría ser descartado al momento de explicar las diferencias de sensibilidad entre ambas poblaciones. Shaner (2009) propuso diferentes tipos de exclusión o compartimentalización celular como mecanismos de resistencia a glifosato. La existencia de transportadores que bombeen glifosato dentro de la vacuola, podría prevenir el daño celular y sería un posible mecanismo de resistencia por exclusión celular. En forma análoga, el herbicida podría ser bombeado fuera de la célula, hacia el apoplasto, o bien la entrada de glifosato a la célula podría estar inhibida por una modificación en los fosfato-transportadores (Shaner, 2009).

Tabla 3. Parámetros del modelo de regresión no lineal para el bioensayo de crecimiento plumular, probabilidad (*P*) para la precisión del modelo e índice de resistencia estimado (IR). El modelo ajustado fue:

$$\text{Largo de plúmula (mm)} = C + \{(D - C) / [1 + (x / GR_{50})^b]\}$$

Población	<i>D</i> (mm)	<i>C</i> (mm)	<i>b</i>	<i>GR</i> ₅₀ (mg (ea) L ⁻¹)	<i>P</i>
Susceptible	36,2	2,5	1,9	9,3	0,039
Resistente	37,3	0,1	0,9	41,5	<0,001
IR = 4,4					

Similares IR en pruebas de germinación han sido detectados en poblaciones de *L. multiflorum* resistente a glifosato. Entre estos, Perez-Jones *et al.* (2007) evaluando poblaciones de Chile y de EEUU, encontraron que la dosis de inhibición media de la germinación era 2 y 5 veces mayor a la de una población susceptible, respectivamente. Más recientemente, una población de ryegrass anual del sudeste bonaerense ha mostrado un IR de 3,3 al considerar el crecimiento plumular (Diez de Ulzurrun y Leaden, 2012), valor similar al detectado en el presente trabajo.

Bioensayo de dosis-respuesta de crecimiento y supervivencia de plantas

Contenido de clorofila

Ninguna de las dos poblaciones tratadas con glifosato mostraron diferencias en el contenido de clorofila, respecto a los controles, a los 2 y 3 días después de la aplicación del herbicida (datos no mostrados). En la población susceptible, el contenido de clorofila disminuyó significativamente ($P < 0,05$) a los 7 y 10 días post-aplicación, independientemente de la dosis empleada (Figura 19a y 19b). En contraste, plantas de la población resistente que fueron tratadas con glifosato no mostraron disminuciones significativas en el contenido de clorofila, comparado a sus controles, luego de los 10 días de realizada la aplicación. En este sentido, la evaluación del contenido de clorofila empleando un clorofilómetro portátil, podría ser un método simple y rápido para determinar la sensibilidad de plantas tratadas con glifosato.

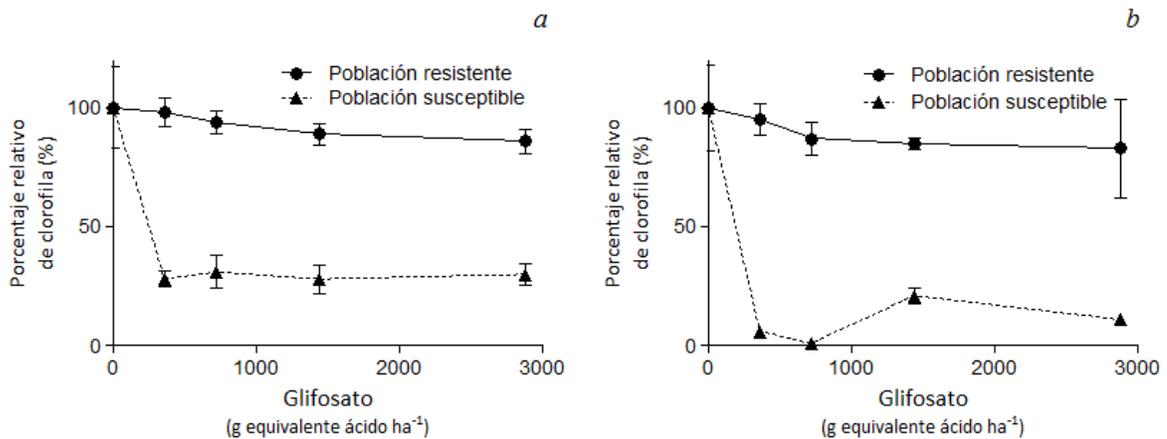


Figura 19. Porcentaje relativo de clorofila de las poblaciones resistente y susceptible a glifosato tratadas con diferentes dosis de glifosato, respecto a los correspondientes testigos sin herbicida: *a)* 10 días post-aplicación y *b)* 15 días post-aplicación. Los símbolos indican los valores medios. Las barras verticales representan ± 1 error estándar de la media.

La cuantificación de clorofila ha sido empleada como indicador de los efectos fitotóxicos del glifosato y de otros principios activos, permitiendo comparar plantas de diferente sensibilidad a un herbicida (Hoagland *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 2002;

Yasuor *et al.*, 2008). Coincidentemente con los resultados presentados, Zobiole *et al.* (2010) encontraron que los efectos inhibitorios del glifosato sobre el contenido de clorofila de las hojas no son inmediatos. Estos podrían ser causados por el daño directo del herbicida sobre los cloroplastos (Campbell *et al.*, 1976) o a causa del estrés oxidativo, como se discutirá más adelante.

Supervivencia de plantas

Para cada dosis de glifosato empleada, el porcentaje de supervivencia de plantas de la población susceptible y resistente fue significativamente diferente (Figura 20). En el rango de dosis recomendado, el glifosato controló entre 35-40 % de las plantas de la población resistente; esto indica que dentro de esa población existen plantas susceptibles. A los 15 días post-aplicación, el IR mostró que se requiere incrementar 10,8 veces la dosis de glifosato para equiparar el control de plantas resistentes respecto a las susceptibles (Tabla 4). Estos resultados de supervivencia de plantas, concuerdan con los publicados por Powles *et al.* (1998) y Owen y Powles (2010) donde al comparar la cantidad de glifosato requerida para provocar una mortalidad del 50 % en poblaciones de *Lolium rigidum* susceptibles y resistentes a glifosato, hallan valores del IR de entre 7 y 11.

Tabla 4. Parámetros del modelo de regresión no lineal para el bioensayo de supervivencia de plantas, probabilidad (*P*) para la precisión del modelo e índice de resistencia estimado (IR). El modelo ajustado fue:

$$\text{Supervivencia (\%)} = C + \{(D - C) / [1 + (x/ED_{50})^b]\}$$

Población	D (%)	C (%)	b	ED ₅₀ (g (ea) ha ⁻¹)	P
Susceptible	100,0	0,01	0,88	138,1	<0,001
Resistente	100,0	0,11	1,3	1495,0	<0,001
IR = 10,8					

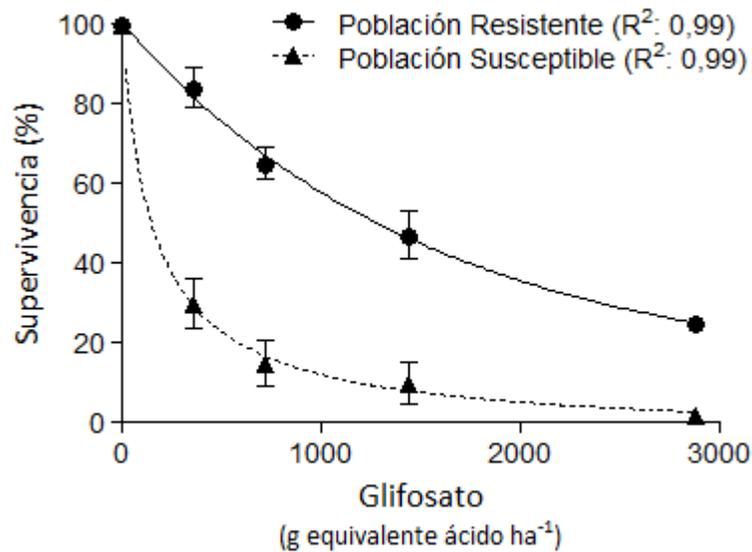


Figura 20. Porcentaje de supervivencia de las poblaciones resistente y susceptible a diferentes dosis de glifosato. Los símbolos indican los valores medios y las líneas las respuestas predictivas para cada población. Las barras verticales representan ± 1 error estándar de la media.

El efecto del herbicida sobre la población susceptible se acentuó a los 30 días post-aplicación pues plantas que previamente no habían sido controladas a los 15 días post-aplicación, murieron posteriormente sin evidenciar su rebrote. En contraste, un 40 % (± 12 % intervalo de confianza del 95 %) de las plantas de la población resistente que previamente habían sido controladas, rebrotaron a los 30 días de realizada la aplicación, independientemente de la dosis de herbicida aplicada (Tabla 5). El rebrote ocurrió a partir de las yemas axilares desde donde crecieron nuevos macollos producto de la ruptura de la dominancia apical, algunos con pigmentación normal y otros albinos (Figura 21). Aunque un número mayor de plantas fueron controladas al ir incrementando la dosis, el porcentaje de rebrote se mantuvo constante (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de plantas resistentes que, siendo controladas a los 15 días post-aplicación de glifosato, rebrotaron a los 30 días post-aplicación (expresadas sobre el total de plantas de la población y sobre el total de plantas controladas). Se presentan los valores medios (\pm intervalo de confianza del 95 %). Letras iguales indican diferencias no significativas ($P > 0,05$).

Tratamiento	<i>Plantas que rebrotaron (%)</i>	<i>Plantas rebrotadas respecto al total de plantas controladas (%)</i>
0 g (ea) ha ⁻¹	0 (\pm 0)	-
360 g (ea) ha ⁻¹	6 (\pm 3)	37 A
720 g (ea) ha ⁻¹	17 (\pm 2)	48 A
1440 g (ea) ha ⁻¹	23 (\pm 2)	43 A
2880 g (ea) ha ⁻¹	25 (\pm 4)	33 A

Por lo tanto, el porcentaje de rebrote fue independiente de la dosis de herbicida y esto podría ser explicado por la variación genética intrínseca de la población resistente. El daño foliar provocado por el glifosato podría afectar el movimiento del herbicida hacia órganos subterráneos, esto se reflejaría en un vigoroso rebrote desde las yemas axilares. En concordancia, el glifosato presenta el fenómeno de autolimitación del traslado, condicionando una reducción del proceso de transporte debido a la toxicidad provocada en la planta (Lorraine-Colwill *et al.*, 2003). Así, pese a incrementar la dosis de herbicida, las plantas que rebrotaron se mantuvieron relativamente constantes respecto al total de plantas controladas.

Por otra parte, el glifosato también causa reducciones en la fijación de CO₂ y limitaciones en el transporte de asimilados desde las hojas fuente, inhibiendo el traslado del herbicida hacia tejidos meristemáticos (Shaner, 2009). Resumiendo, el transporte diferencial del herbicida podría explicar parcialmente el rebrote de las plantas resistentes.

Estos casos donde el herbicida aparentemente controla ciertas plantas que luego rebrotan a partir de yemas axilares, son considerados un nuevo tipo de resistencia, llamada resistencia tipo fénix (Gressel, 2009). Este comportamiento, se ha atribuido a mecanismos de resistencia relacionados a un transporte diferencial de

glifosato como, también, a un incremento de 2 a 3 veces en los niveles de expresión de la EPSPs (Dinelli *et al.*, 2006; Dinelli *et al.*, 2008).

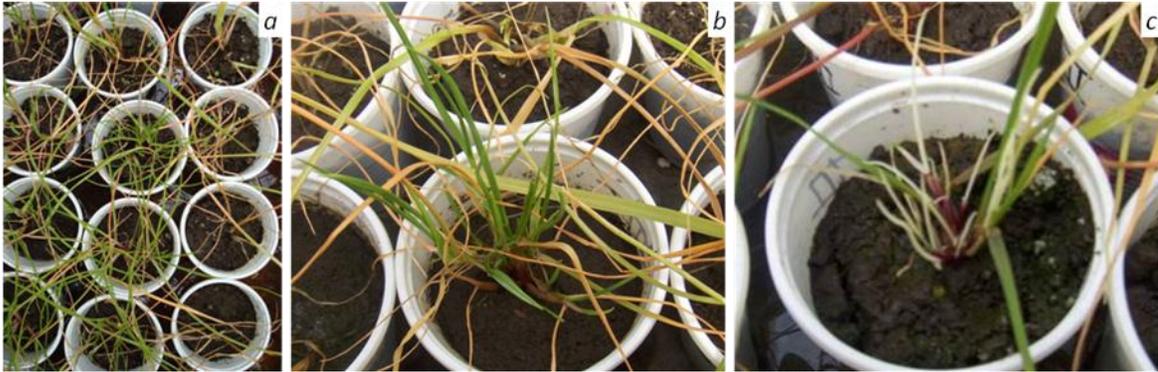


Figura 21. *Lolium perenne* resistente a glifosato durante post-aplicación del herbicida: a) Plantas resistentes y susceptibles a los 20 días post-aplicación de 2880 g (ea) ha⁻¹; b) Rebrote “normal” a los 30 días post-aplicación de 1440 g (ea) ha⁻¹; c) Rebrote albino a los 30 días post-aplicación de 1440 g (ea) ha⁻¹.

A partir de los resultados de los ensayos de dosis-respuesta, se encontró que el IR se incrementa al progresar el ciclo de la planta. Estas evidencias son consistentes con las presentadas por Christoffoleti *et al.* (2005) quienes, trabajando con *Lolium multiflorum*, encuentran que el control de plantas resistentes con glifosato es menos eficiente en estadios avanzados de crecimiento.

La resistencia a glifosato fue reportada en poblaciones australianas de *Lolium rigidum* luego de 15 años de uso de glifosato y en poblaciones chilenas de *Lolium multiflorum* sometidas a 10 años de presión con glifosato (Pérez y Kogan, 2003). Aquí se presenta un caso de resistencia en ryegrass perenne en un lote tratado con aplicaciones de glifosato durante 12 años, período similar a los presentados anteriormente. *A priori* no podría relacionarse exclusivamente la “aparición” de este caso de resistencia a un único factor causal como el continuo uso de glifosato. En ese sentido, Ferraro y Ghera (2013), modelando territorialmente los riesgos de resistencia a glifosato en *Sorghum halepense*, incorporaron variables ecológicas y de

manejo como condicionantes del riesgo de resistencia para complementar los análisis tradicionales basados únicamente en el aspecto genético del proceso evolutivo.

Acumulación de ácido shikímico en tejidos foliares de plantas tratadas con glifosato

Los niveles de shikimato detectados en láminas y vainas foliares, luego del tratamiento con glifosato, difirieron entre plantas de ambas poblaciones (Figura 22). A las 24 horas post-aplicación, se detectó la acumulación de shikimato en láminas de plantas susceptibles respecto a los valores basales (0 horas post-aplicación). Luego de 48 horas de la aplicación, la concentración de shikimato se incrementó en vainas y no difirió significativamente de los niveles registrados en láminas. A las 72 horas post-aplicación, las concentraciones de shikimato en láminas y vainas de plantas susceptibles cuadruplicaron los valores basales. En tanto, las plantas resistentes no presentaron incrementos significativos en la concentración de shikimato durante el periodo post-aplicación en ninguno de los tejidos foliares evaluados (Figura 22).

En coincidencia con otras publicaciones realizadas en especies pertenecientes al género *Lolium*, la acumulación de shikimato es diferencial entre poblaciones de distinta sensibilidad. Durante post-aplicación, en todos los casos, los niveles de ácido shikímico en plantas resistentes son bajos, comparado a los biotipos susceptibles (Perez-Jones *et al*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2009). Esto sugiere que la determinación de ácido shikímico podría ser un indicador de la sensibilidad de la planta al glifosato como ha sido propuesto en varios trabajos (Zelaya *et al.*, 2004; Shaner *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2007).

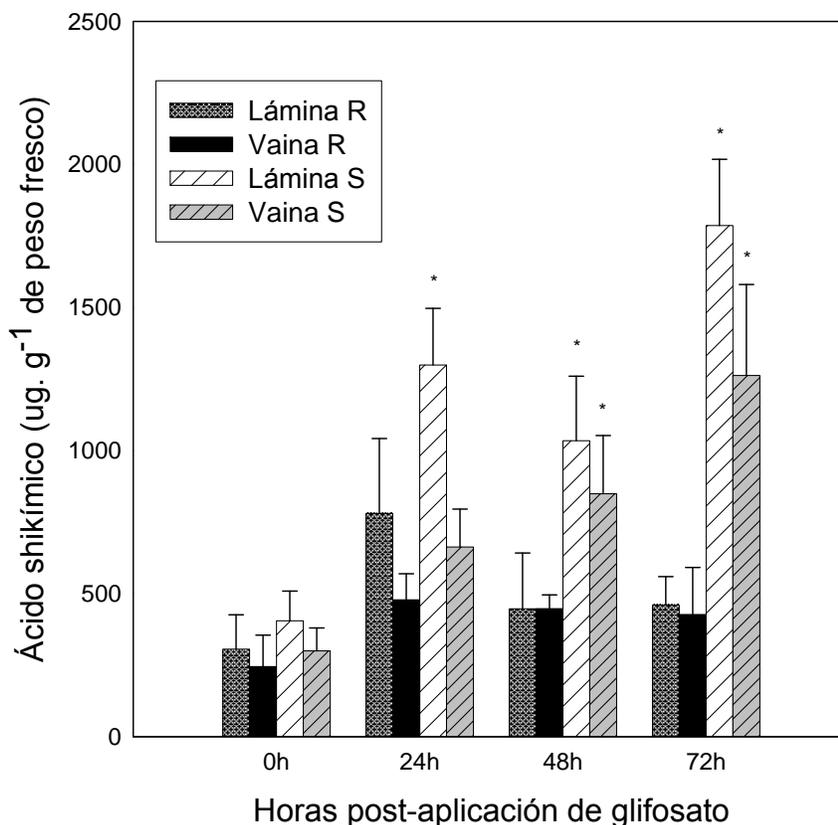


Figura 22. Acumulación de ácido shikímico en láminas y vainas de hojas de plantas de la población susceptible (S) y resistente (R) a distintas horas post-aplicación de 1440 g (ea) ha⁻¹ de glifosato. Se representan los valores medios \pm 1 error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a los valores detectados a 0 horas post-aplicación.

Evaluación de la relación entre la acumulación de shikimato y la sensibilidad a glifosato en hojas incubadas in vitro

A partir del análisis de los datos, la acumulación de ácido shikímico en hojas cortadas e incubadas *in vitro* dependió ($P < 0,001$) de la interacción entre la sensibilidad de la planta y la dosis aplicada (Tabla 6). En función de esto, se contrastaron los niveles de shikimato detectados en hojas de plantas susceptibles y resistentes para cada dosis aplicada. Se encontró que sin el tratamiento con glifosato, los niveles de shikimato no difieren significativamente entre plantas susceptibles y resistentes (Figura 23). Sin embargo, ante la aplicación de glifosato a dosis de 500,

1500 y 3000 g (ea) ha⁻¹ se produjo una acumulación de shikimato en hojas de plantas susceptibles de entre 4 y 5 veces los valores de su testigo sin herbicida. Esos niveles alcanzados, difirieron significativamente de los detectados en hojas de plantas resistentes (Figura 23). En estas plantas, el shikimato acumulado no llegó al 50 % de los valores encontrados en el correspondiente testigo (Figura 23).

Tabla 6. Efectos del nivel de sensibilidad (S/R, susceptible o resistente), las dosis (0, 500, 1500 o 3000 g (ea) ha⁻¹) y la interacción sobre la acumulación de shikimato en hojas incubadas *in vitro*.

Fuente de variación	GL	CM	SC	P
S/R	1	6,1 10 ⁷	6,1 10 ⁷	<0,001
Dosis	3	1,5 10 ⁷	4,6 10 ⁷	<0,001
S/R x Dosis	3	1 10 ⁷	3 10 ⁷	<0,001
Error	84	1,2 10 ⁶	1 10 ⁸	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el ensayo presentado anteriormente, donde sin aplicar glifosato, tanto las láminas como las vainas de las hojas en plantas susceptibles y resistentes no muestran diferencias significativas. No obstante, la aplicación de glifosato incrementó hasta tres veces los niveles basales de shikimato en las plantas susceptibles (Figura 22).

Los resultados de estos ensayos demuestran el valor de la medición de ácido shikímico como metabolito bioindicador del efecto del glifosato en plantas susceptibles. En este sentido, en varios trabajos se proponen distintos ensayos con el fin de evaluar la sensibilidad de plantas a glifosato midiendo los niveles de shikimato.

Entre esas metodologías se incluye la cuantificación de shikimato en plantas tratadas con glifosato como se realizó en el experimento previo (ver “Acumulación de ácido shikímico en tejidos foliares de plantas tratadas con glifosato”). Allí se cuantifica la acumulación del mencionado metabolito en post-aplicación de glifosato, utilizando las dosis y los sistemas de aplicación (equipos, volumen total aplicado, condiciones ambientales) similares a los empleados a campo (Perez-Jones *et al.*, 2007; Pline *et al.*,

2002b; Singh y Shaner, 1998). Sin embargo, sobre estas metodologías se podrían destacar ciertos inconvenientes cuando se las requiere emplear para la caracterización de plantas en ciertos planes de investigación. El principal inconveniente es que son métodos destructivos, la planta evaluada es asperjada con glifosato y, de ser sensible luego de la evaluación de shikimato muere por efecto del herbicida. Además, si no se recurre a técnicas de clonación, la misma planta no puede ser evaluada por más de una formulación simultáneamente sin interferencias.

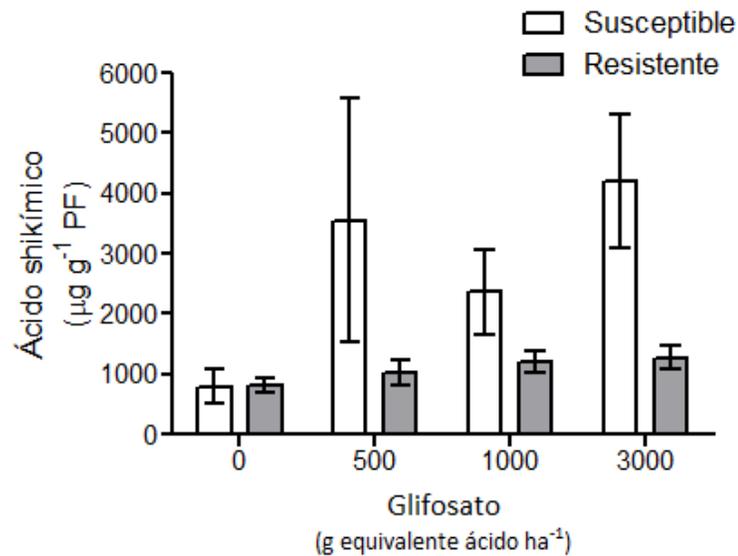


Figura 23. Concentración de shikimato en hojas de plantas susceptibles y resistentes tratadas con diferentes dosis de glifosato e incubadas *in vitro* durante 72 horas. Las barras verticales representan los intervalos de confianza (95 %).

Por otra parte, los métodos de cuantificación de shikimato en porciones de hojas incubadas con glifosato (*in vivo*) se muestran como alternativas rápidas donde la variante respecto a la metodología anterior reside en que el tratamiento con herbicida se realiza sobre partes de órganos (hojas) extraídos de la planta a evaluar (Shaner *et al.*, 2005). Se toman segmentos de hojas de plantas cultivadas en maceta o a campo, y se sumergen en recipientes cerrados que contienen una solución de determinada concentración de glifosato (de 4 a 500 µM) y luego de 16 a 23 horas de incubación, se

determina la concentración de shikimato siguiendo el protocolo de Cromartie y Polge (2000). Sin embargo, estos métodos son abstraídos del proceso de absorción normal del herbicida efectuado por la planta a campo. El desarrollo de procesos de evaluación *in vitro*, basados en tratamientos con glifosato soluble en un medio acuoso donde se sumerge el tejido vegetal a analizar, pierde la capacidad de determinar el efecto de diferentes formulaciones de glifosato, normalmente aplicadas a campo por aspersión.

En el experimento desarrollado en esta sección, se presenta una metodología innovadora que permite resolver los puntos críticos de otros protocolos. Por lo tanto, el presente experimento podría sugerirse como un método factible para la evaluación de formulaciones de glifosato y/o de evaluación de la sensibilidad de una planta al herbicida sin provocar un daño al vegetal que impida cumplir con su ciclo de vida.

Ensayo de evaluación a campo de un principio activo alternativo de diferente mecanismo de acción respecto a glifosato

En un ensayo de dosis-respuesta a campo, se evaluó la sensibilidad de la población problema a haloxifop. Este principio activo es un inhibidor de la enzima acetil-coA carboxilasa, clave en la síntesis de lípidos pues participa catalizando la formación de malonil-coA a partir de la descarboxilación de acetil-coA (Burton *et al.*, 1991). Los resultados mostraron que la dosis de haloxifop capaz de controlar en un 90 % el crecimiento de *Lolium perenne* resistente a glifosato fue de 87,7 g de ingrediente activo ha⁻¹ (Figura 24).

El haloxifop es un herbicida sistémico que se une al dominio carboxiltransferasa de la enzima acetil-CoA carboxilasa provocando cambios conformacionales que reducen su actividad (Zhang *et al.*, 2004). Así se inhibe la síntesis de lípidos y, presumiblemente, la biosíntesis de fosfolípidos que constituyen las membranas celulares, repercutiendo en el crecimiento de la planta (Senseman, 2007). En base a los resultados, se puede indicar que sería factible lograr un eficaz control de *Lolium perenne* resistente a glifosato con el herbicida haloxifop-R-metil a

dosis superiores a los 100 g de ingrediente activo ha⁻¹. Comparativamente, este principio activo ha sido recomendado para el control de *Cynodon hirsutus* resistente a glifosato, alcanzando similares niveles de control a la dosis de 120 g de ingrediente activo ha⁻¹ (Ustarroz *et al.*, 2011).

A pesar de que haloxifop sea un herbicida alternativo eficaz, cabe destacar que ante los antecedentes de la existencia de casos de resistencia a este principio activo en poblaciones de *Lolium spp.* de Sudáfrica, Australia y Chile (Espinoza y Zapata, 2000; Yu *et al.*, 2007; Heap, 2013), su empleo debería realizarse al resguardo de las recomendaciones de reducción de riesgo de resistencia (Norsworthy *et al.*, 2012). La detección de una población sudafricana de *Lolium multiflorum* con resistencia múltiple a glifosato, paraquat e inhibidores de ACCasa, entre ellos haloxifop (Yu *et al.*, 2007), advierte los riesgos de que el problema se complejice si no se toman los recaudos necesarios.

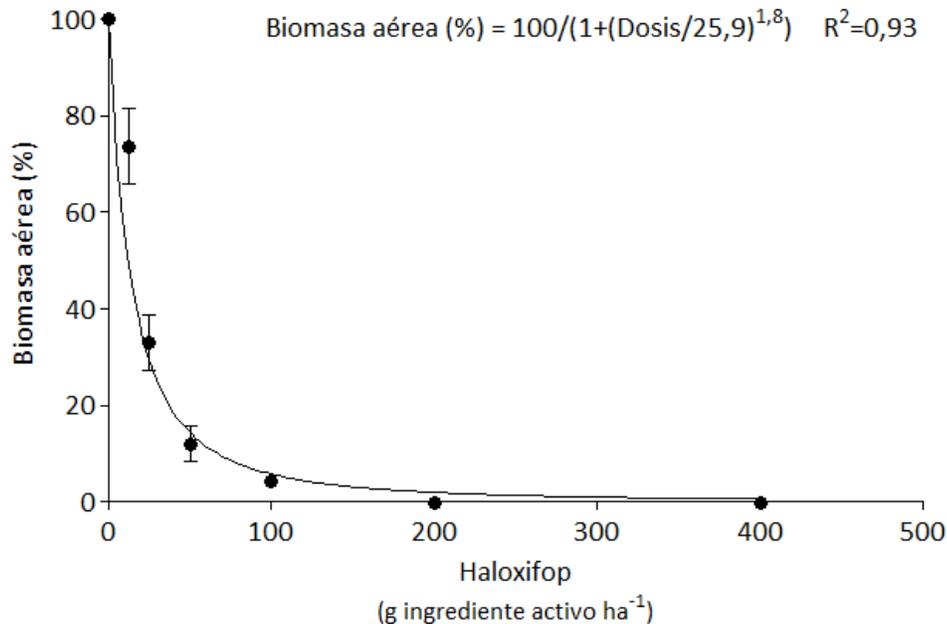


Figura 24. Efecto de diferentes dosis de haloxifop sobre la producción de biomasa aérea (porcentaje respecto al testigo sin herbicida) en *Lolium perenne* resistente a glifosato. Los símbolos indican los valores medios y las líneas las respuestas predictivas. Las barras verticales representan ± 1 error estándar de la media. Se muestra el modelo ajustado ($P < 0,01$).

Bases fisiológicas y bioquímicas de la resistencia a glifosato

Luego de confirmar la resistencia a glifosato de la población problema de *Lolium perenne*, se propuso evaluar las características fisiológicas y bioquímicas que causarían la baja sensibilidad a glifosato de los biotipos problema. Actualmente, existen discrepancias respecto a los efectos tóxicos que provoca este herbicida en las plantas (Diaz Vivancos *et al.*, 2011); cuáles son efectos primarios y secundarios, y cuáles son los causales de la muerte del vegetal (Siehl, 1997).

Recientemente, los efectos del glifosato han sido estudiados empleando abordajes moleculares asociados a la proteómica, comparaciones a nivel transcripcional y seguimientos de perfiles metabólicos (Ahsan *et al.*, 2008), no obstante el panorama de la secuencia de disturbios metabólicos generados luego de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPs) aún no está clara (Orcaray *et al.*, 2012).

Dentro de las particularidades del glifosato como potente herbicida, se destaca la capacidad de ser trasladado hacia tejidos meristemáticos y órganos subterráneos (Shaner, 2009). El movimiento sistémico del herbicida hacia los destinos de activo crecimiento, es determinado por el transporte de fotoasimilados (Bromilow *et al.*, 1990; Devine y Hall, 1990). A su vez, este proceso es dependiente de la tasa fotosintética y de la demanda generada por los destinos (Medrano *et al.*, 2008). La capacidad de un destino de consumir asimilados está determinada por su actividad metabólica y esto condiciona la demanda de carbohidratos (Mengel y Kirkby, 2001).

Pese a su importancia, la relación entre el glifosato, la síntesis de azúcares en las hojas fuente y el transporte de asimilados ha sido poco abordada. Geiger y Bestman (1990) han estudiado el efecto del glifosato sobre el metabolismo del carbono, sosteniendo que las alteraciones provocadas inhiben el traslado de asimilados y, conjuntamente, del herbicida. No está totalmente dilucidado si los efectos del herbicida sobre la disminución del traslado de asimilados se debe a la

inhibición de la demanda de los tejidos en activo crecimiento, o bien la reducción en la actividad metabólica es consecuencia de un limitado transporte de carbohidratos desde las hojas fuente producto de la acción del glifosato. Trabajando con materiales de *Beta vulgaris* L. de distinta sensibilidad a glifosato, Geiger y colaboradores (1999) demostraron que en plantas resistentes no se reflejan alteraciones en el metabolismo del carbono ni en el traslado asimilados, a diferencia de lo que ocurre en plantas susceptibles.

A lo largo de este capítulo se pretende responder: ¿Cómo afecta el glifosato a los procesos fisiológicos de crecimiento, fotosíntesis y transporte de asimilados del biotipo resistente y del susceptible hasta conducir a la muerte de la planta? ¿Por qué mueren las plantas susceptibles tratadas con glifosato? ¿Por qué las plantas resistentes sobreviven?

Efectos sobre el crecimiento

En los resultados del análisis de la varianza se encontró que los efectos sobre crecimiento fueron explicados por la interacción triple *Biotipo x Horas post-aplicación x Tratamiento* (Tabla 7). Por lo tanto, la diferencia entre biotipos susceptible y resistente estuvo condicionada por la aplicación de glifosato y el momento de evaluación luego del tratamiento.

A las 25 horas post-aplicación se registró la primera diferencia significativa en el biotipo susceptible, entre plantas tratadas con glifosato y su control (Figura 25). En ese momento, el herbicida provocó una disminución del crecimiento del 58 % respecto al testigo sin glifosato. Posteriormente, esta diferencia se mantuvo en forma proporcional, en la medida que continuó el crecimiento de las plantas y transcurrió el tiempo post-aplicación (Figura 25). En contraste, el biotipo resistente, en ningún momento mostró diferencias significativas en el crecimiento provocadas por el herbicida (Figura 25).

Tabla 7. Efectos del biotipo (susceptible y resistente); horas post-aplicación (4, 6, 9, 25, 30 y 50 horas); tratamiento (aplicación de glifosato y control) y las interacciones dobles y triple sobre el crecimiento.

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	87,55	0,005
Horas post-aplicación	5	1498,53	<0,001
Tratamiento	1	322,42	<0,001
Biotipo x Horas post-aplicación	5	11,86	0,372
Biotipo x Tratamiento	1	209,35	<0,001
Horas post-aplicación x Tratamiento	5	48,72	0,001
Biotipo x Horas post-aplicación x Tratamiento	5	43,53	0,002
Error	96	10,9	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

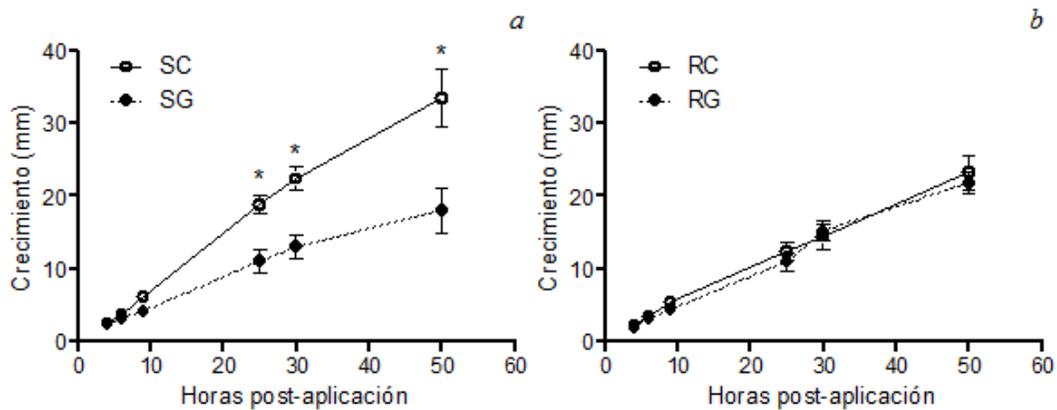


Figura 25. Efecto del glifosato sobre el crecimiento longitudinal de hojas. a) Biotipo susceptible control (SC) y tratado con glifosato (SG); b) Biotipo resistente control (RC) y tratado con glifosato (RG). Se presentan los promedios \pm el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento con glifosato y el respectivo control.

A partir de estos resultados, se sugiere que la inhibición provocada por el herbicida sobre el crecimiento del biotipo sensible es independiente de los efectos que el glifosato induce sobre la parte aérea. En concordancia a esto, la caída en la tasa de crecimiento podría explicarse por la inhibición en la síntesis de aminoácidos

arómicos (Franz *et al.*, 1997) que interferirían con la síntesis de enzimas necesarias en el metabolismo de los tejidos meristemáticos (Geiger y Bestman, 1990).

Al realizar el corte de la parte aérea, luego de la aplicación de glifosato, se eliminó el efecto del herbicida sobre la fijación de CO₂ y traslado de carbohidratos. En estas condiciones, como se describió previamente, se detectaron diferencias en el crecimiento entre plantas sensibles tratadas con el herbicida y sus controles. En el presente trabajo, se demuestra que al menos en el tiempo post-aplicación evaluado, la inhibición del crecimiento no es dependiente de la inhibición de la fotosíntesis y del traslado de fotoasimilados. Estos resultados se corresponden con el trabajo de El-Tayeb y Zaki (2009) que comunicaron el efecto inhibitorio del glifosato sobre la división celular de tejidos meristemáticos de raicillas de semillas en germinación de *Vicia faba*, siendo independientes de los efectos del herbicida sobre la fotosíntesis. Previamente esta inhibición había sido observada sobre semillas en germinación de *Lolium spp.* (Perez Jones *et al.*, 2007).

El crecimiento en el biotipo resistente no es inhibido por efecto del glifosato, tanto los mecanismos dependientes de la enzima blanco (Wakelin y Preston, 2006a; Salas *et al.*, 2012), como la limitación del traslado del herbicida podrían estar puestos en juego (Shaner, 2009). Recientemente, Roso y Vidal (2010) sugirieron la posibilidad de que fosfato-transportadores estén implicados en mecanismos de reducida translocación o vacuolización de glifosato. En cualquier caso, se espera que el efecto del herbicida sobre la actividad meristemática sea reducido o nulo en plantas resistentes como ha ocurrido en estos materiales.

Efectos sobre la acumulación de azúcares libres

Determinación de azúcares totales

A partir del análisis de la varianza se detectaron interacciones dobles de significancia estadística. Los biotipos interactuaron con el tratamiento mostrando diferencias en la acumulación de azúcares totales (Tabla 8). En el mismo sentido, la

concentración de azúcares totales varió significativamente por el efecto del tratamiento con glifosato, en interacción con los días post-aplicación (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de la varianza de los efectos del biotipo (susceptible y resistente), los días post-aplicación (1, 2, 3 y 5 días), el tratamiento (aplicación de glifosato y control) y las interacciones dobles y triple sobre la acumulación de azúcares totales libres en hojas.

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	1,792 10 ⁷	0,114
Días post-aplicación	3	3,225 10 ⁸	<0,001
Tratamiento	1	5,109 10 ⁸	<0,001
Biotipo x Días post-aplicación	3	2,250 10 ⁷	0,029
Biotipo x Tratamiento	1	1,473 10 ⁸	<0,001
Días post-aplicación x Tratamiento	3	1,964 10 ⁷	0,047
Biotipo x Días post-aplicación x Tratamiento	3	8,176 10 ⁶	0,429
Error	48	6,853 10 ⁶	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Luego de un día de realizada la aplicación se hallaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre plantas del biotipo susceptible tratadas con glifosato y sus controles, mostrando una tendencia al incremento de azúcares totales libres producto de la aplicación del herbicida. Posteriormente, a dos días post-aplicación y en las determinaciones consecutivas, el incremento de azúcares totales en hoja se acentuó bajo el tratamiento con glifosato difiriendo significativamente del control ($P < 0,05$) (Figura 26a). El glifosato incrementó la concentración de azúcares totales en el biotipo susceptible en un 90 % a un día post-aplicación, posteriormente esta diferencia fue de 124 %, 180 % y 100 % a 2, 3 y 5 días post-aplicación respectivamente (Figura 26a). Estos resultados se corresponden con la acumulación de azúcares totales producto del tratamiento con glifosato detectada por Ulanov *et al.* (2009) en tejidos de *Zea mays* cultivados *in vitro*. Esas experiencias indicaron que los principales carbohidratos responsables de los elevados tenores de azúcares totales son sacarosa, glucosa, sorbosa, fructosa y galactosa.

En base a los resultados presentados, el aumento en los niveles de azúcares libres podría ser una respuesta a la disminución en la tasa del crecimiento mostrada en el experimento anterior. Esta discusión ha sido previamente planteada por Geiger y Bestman (1990) donde, tratando el problema de la “auto-limitación” del traslado de glifosato, sostienen la posible relación entre la caída en la demanda de sacarosa, debido a la disminución de la síntesis proteica en tejidos en crecimiento, y sus efectos sobre la disminución del traslado del herbicida.

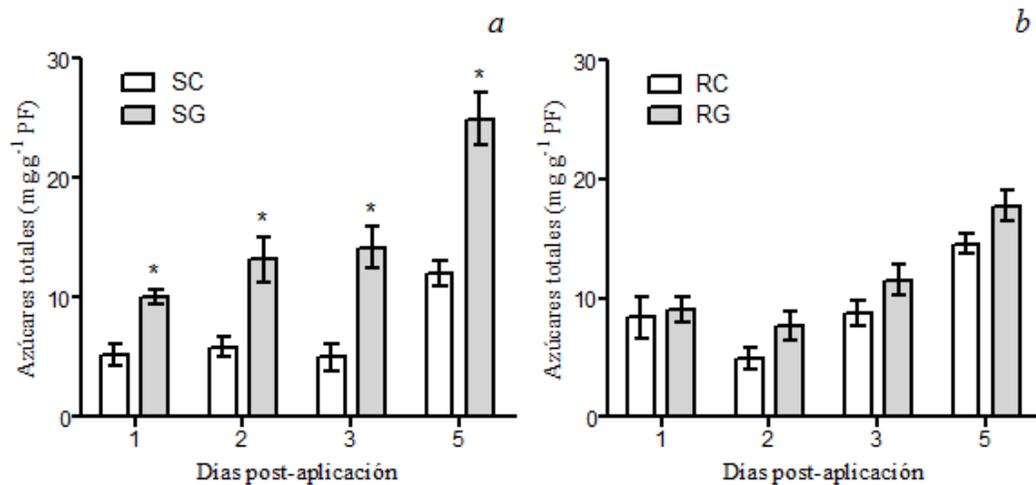


Figura 26. Acumulación de azúcares totales libres en la última hoja expandida expresada sobre peso fresco (PF) en función de los días post-aplicación: a) Biotipo susceptible control sin herbicida (SC) y tratado con glifosato (SG); b) Biotipo resistente control sin herbicida (RC) y tratado con glifosato (RG). Se muestran los valores promedio \pm el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento con glifosato y el respectivo control.

En el biotipo resistente, el glifosato provocó el incremento de azúcares totales libres en hoja pero esas diferencias no resultaron ser significativas en ninguna determinación post-aplicación ($P > 0,05$) (Figura 26b). Mengel y Kirkby (2001) indicaron que la demanda de azúcares de un destino está condicionada por su actividad metabólica. En concordancia a la discusión planteada, los efectos del glifosato sobre la acumulación de carbohidratos totales no serían detectados en

plantas resistentes, debido a que el mecanismo de resistencia puesto en juego le permitiría mantener la tasa de crecimiento y no alterar la demanda de azúcares en las fuentes.

Determinación de azúcares reductores

Se detectó que la interacción triple entre las tres fuentes de variación (*Biotipo x Días post-aplicación x Tratamiento*) fue significativa (Tabla 9). Desde la primera evaluación, a un día de realizada la aplicación, se detectó un aumento de azúcares reductores en hojas del biotipo susceptible producto del tratamiento con glifosato pero no resultó significativo ($P > 0,05$). A partir de los dos días post-aplicación, la concentración de azúcares reductores fue afectada significativamente por el herbicida respecto al control (Figura 27a). Esos incrementos de azúcares reductores fueron, en promedio, de 130 % (± 50 % de desvío estándar) los valores de las plantas control. Los resultados de Ulanov *et al.* (2009) antes citados, respecto a la acumulación de azúcares reductores como glucosa, sorbosa, fructosa y galactosa en respuesta al glifosato, concuerdan con los presentados.

Tabla 9. Análisis de la varianza de los efectos del biotipo (susceptible y resistente), los días post-aplicación (1, 2, 3 y 5 días), el tratamiento (aplicación de glifosato y control) y las interacciones dobles y triple sobre la acumulación de azúcares reductores libres en hojas.

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	1,886 10 ⁷	0,003
Días post-aplicación	3	5,424 10 ⁷	<0,001
Tratamiento	1	8,300 10 ⁷	<0,001
Biotipo x Días post-aplicación	3	9,863 10 ⁶	0,004
Biotipo x Tratamiento	1	5,926 10 ⁷	<0,001
Días post-aplicación x Tratamiento	3	6,201 10 ⁶	0,036
Biotipo x Días post-aplicación x Tratamiento	3	6,439 10 ⁶	0,031
Error	48	2,013 10 ⁶	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Contrastando con los resultados del biotipo susceptible, las plantas resistentes no mostraron incrementos significativos en los niveles de azúcares reductores producto de la aplicación del herbicida (Figura 27b). Anteriormente, Pline *et al.* (2002a) evaluaron el efecto del glifosato sobre la acumulación de fructosa y glucosa en hojas de algodón resistente al herbicida y, consistentemente a los resultados aquí presentados, no detectaron diferencias entre plantas tratadas y los controles sin herbicida. Los resultados de la determinación de azúcares reductores, se condicen con los antes discutidos en referencia a la acumulación de azúcares totales y su relación con la insensibilidad a glifosato de los tejidos en crecimiento.

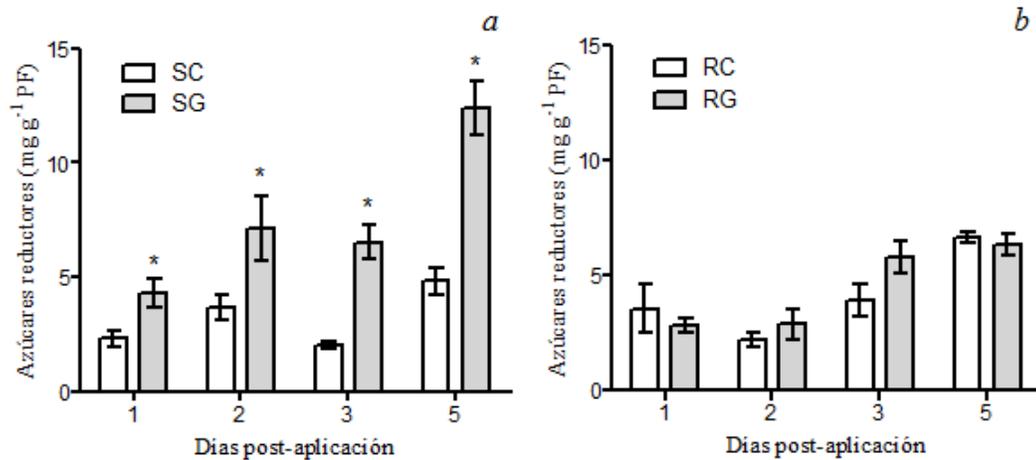


Figura 27. Acumulación de azúcares reductores libres en la última hoja expandida expresada sobre peso fresco (PF) en función de los días post-aplicación: a) Biotipo susceptible control sin herbicida (SC) y tratado con glifosato (SG); b) Biotipo resistente control sin herbicida (RC) y tratado con glifosato (RG). Se muestran los valores promedio \pm el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento con glifosato y el respectivo control.

Estimación de azúcares no reductores

El análisis de la varianza mostró que la interacción entre los biotipos y los tratamientos explica la variación de azúcares no reductores ($P < 0,05$). A esta fuente

de variación se le agrega el efecto aditivo de los días post-aplicación ($P < 0,001$) (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de la varianza de los efectos del biotipo (susceptible y resistente), los días post-aplicación (1, 2, 3 y 5 días), el tratamiento (aplicación de glifosato y control) y las interacciones dobles y triple sobre la acumulación de azúcares no reductores libres en hojas.

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	2,842 10 ⁵	0,797
Días post-aplicación	3	1,107 10 ⁸	<0,001
Tratamiento	1	1,668 10 ⁸	<0,001
Biotipo x Días post-aplicación	3	2,954 10 ⁶	0,838
Biotipo x Tratamiento	1	1,933 10 ⁷	0,038
Días post-aplicación x Tratamiento	3	2,954 10 ⁶	0,562
Biotipo x Días post-aplicación x Tratamiento	3	4,407 10 ⁶	0,388
Error	48	4,285 10 ⁶	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

En el biotipo susceptible el glifosato afectó significativamente los niveles de azúcares no reductores desde los dos días post-aplicación en adelante (Figura 28a). El herbicida provocó un incremento en la acumulación del 90 % de estos carbohidratos, en promedio para todos los días post-aplicación.

Considerando el biotipo resistente, el glifosato frente a los controles sólo provocó diferencias significativas a los cinco días post-aplicación (Figura 28b). En esa evaluación, el efecto del herbicida causó un incremento de azúcares no reductores del 45 %. Esta diferencia no se reflejó en las determinaciones realizadas sobre azúcares reductores, sugiriendo que el glifosato podría provocar una disminución de la demanda de sacarosa desde distintos órganos. Este efecto sería relativamente tardío, comparado con plantas susceptibles y no altera significativamente la síntesis de monosacáridos. En este sentido, existen antecedentes de Su *et al.* (1992) quienes reportaron que el glifosato reduce significativamente la actividad de enzimas

invertasas ácidas, responsables de la hidrólisis de sacarosa, conduciendo a un incremento de los tenores de este disacárido.

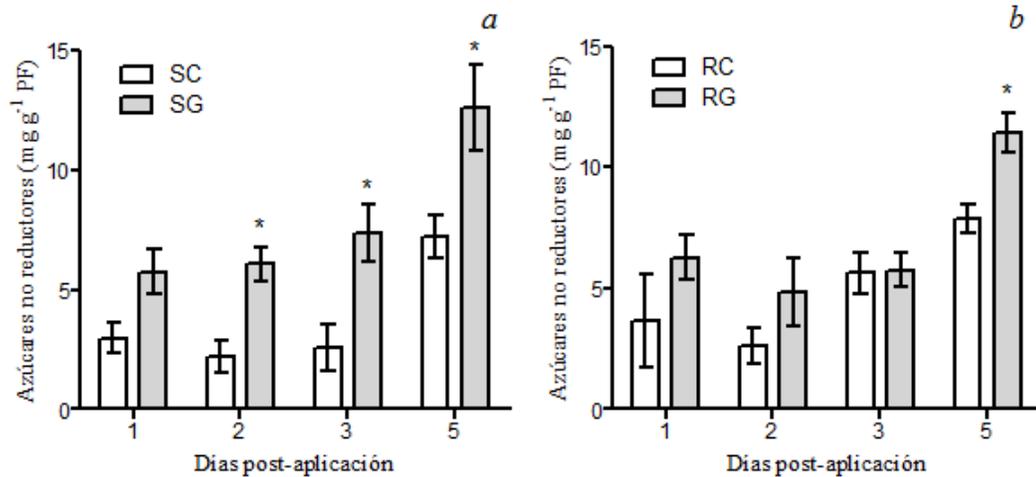


Figura 28. Acumulación de azúcares no reductores libres en la última hoja expandida expresada sobre peso fresco (PF) en función de los días post-aplicación: a) Biotipo susceptible control sin herbicida (SC) y tratado con glifosato (SG); b) Biotipo resistente control sin herbicida (RC) y tratado con glifosato (RG). Se muestran los valores promedio \pm el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento con glifosato y el respectivo control.

Efectos del glifosato en el traslado de asimilados

Patrón de absorción de glucosa y transporte de C¹⁴

Desde la siembra de glucosa-C¹⁴, la absorción se incrementó progresivamente en las dos poblaciones sin diferencias significativas en el perfil de absorción (Tabla 11). Por lo tanto, los datos registrados en la población resistente a glifosato y susceptible, fueron agrupados para su análisis debido a que no presentaron diferencias significativas. A las 24 horas post-marcación, aproximadamente el 75 % de la glucosa fue absorbida por las plantas de ambas poblaciones (Figura 29). Luego de este tiempo, no se registraron cambios significativos en el porcentaje de absorción de glucosa. Esto sugiere que la sensibilidad diferencial al glifosato no estaría asociada a

barreras inespecíficas condicionantes de una absorción diferencial entre poblaciones. De Prado *et al.* (2005) encontraron variación en la acumulación de ceras por área de superficie cuticular entre biotipos de *Lolium rigidum* resistente y susceptible a diclofop-metil. Estos autores sugieren que la elevada densidad de ceras epicuticulares detectada en las hojas de plantas resistentes podría ser una barrera hidrofóbica adicional para la difusión de pesticidas y esto podría ser la causa de una deficiente penetración de diclofop-metil en el mesófilo de las hojas del biotipo resistente.

Tabla 11. Análisis de la varianza de los efectos del tiempo post-marcaación (3, 6, 12, 24 y 72 horas), la población (susceptible y resistente) y la interacción sobre la absorción de glucosa-C¹⁴.

Fuente de variación	GL	CM	P
Tiempo post-marcaación	4	0,375	0,01
Población	1	0,049	0,45
Tiempo post-marcaación*Población	4	0,034	0,81
Error	30	0,092	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

El C¹⁴ total exportado desde la hoja marcada progresó mostrando diferencias significativas a lo largo del tiempo post-marcaación, sin embargo este parámetro no varió entre la población susceptible y la resistente (Tabla 12 y Figura 29). Considerando el patrón de traslado de asimilados, ambas poblaciones exportaron cantidades similares de C¹⁴ a los mismos destinos, aunque los diferentes órganos evaluados, entre sí mostraron diferencias altamente significativas (Tabla 13) como destinos de C¹⁴ (Tabla 14). Asimismo, a lo largo del tiempo post-marcaación estudiado, las cantidades de C¹⁴ exportado difirieron significativamente (Tabla 13 y Tabla 14).

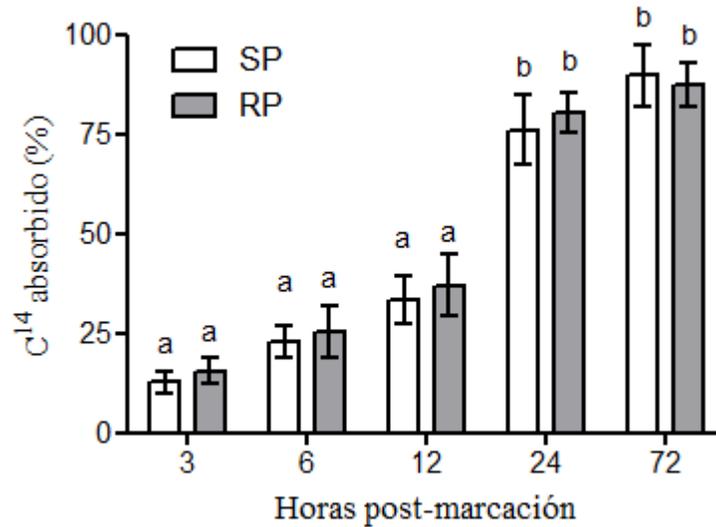


Figura 29. Evolución de la absorción de glucosa-C¹⁴ de hojas de una población de *Lolium perenne* susceptible (SP) y resistente a glifosato (RP) durante el período post-marcación. Los valores son expresados como porcentaje del total de glucosa-C¹⁴ aplicada. Las barras verticales representan ± 1 error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tabla 12. Análisis de la varianza de los efectos del tiempo post-marcación (3, 6, 12, 24 y 72 horas), la población (susceptible y resistente) y la interacción sobre la exportación de C¹⁴ desde la hoja marcada.

Fuente de variación	GL	CM	P
Tiempo post-marcación	4	0,131	0,04
Población	1	0,055	0,30
Tiempo post-marcación*Población	4	0,091	0,16
Error	30	0,047	

GL = grados de libertad; CM = cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Tabla 13. Análisis de la varianza de los efectos de la población (susceptible y resistente), los destinos (hojas no expandidas del macollo marcado y meristema apical, hojas expandidas, macollos y raíces), el tiempo post-marcaación (3, 6, 12, 24 y 72 horas) y sus interacciones sobre el C¹⁴ exportado desde la hoja marcada.

Fuente de variación	GL	CM	P
Población	1	0,026	0,53
Destino	3	1,323	<0,001
Tiempo post-marcaación	4	0,012	0,94
Población*Destino	3	0,094	0,24
Destino*Tiempo post-marcaación	12	0,143	0,04
Población*Tiempo post-marcaación	4	0,029	0,77
Población*Destino*Tiempo post-marcaación	12	0,056	0,59
Error	40	0,064	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

A medida que la absorción de glucosa progresó, se observaron diferencias significativas entre destinos. Luego de tres horas de realizada la siembra de glucosa-C¹⁴, las hojas expandidas del macollo tratado fue un fuerte destino conjuntamente con otros órganos (Tabla 14). Sin embargo, luego de 6 horas post-marcaación, las hojas expandidas del macollo marcado perdieron importancia como destino y las hojas no expandidas y el ápice meristemático resultaron ser el principal destino del C¹⁴ exportado (Tabla 14).

Tabla 14. Exportación de C^{14} desde la hoja marcada a los diferentes destinos durante el período post-marcaación en la población de *Lolium perenne* susceptible (SP) y resistente a glifosato (RP). Los valores son expresados como porcentaje del C^{14} exportado de la hoja marcada ± 1 error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Destinos	Horas post-marcaación					
	3	6	12	24	72	
Hojas expandidas del macollo marcado	SP	23,4 \pm 7,2 ab	9,6 \pm 2,6 b	2,8 \pm 0,8 c	4,2 \pm 1,3 b	2,2 \pm 1,2 b
	RP	19,5 \pm 3,7 ab	8,8 \pm 6,0 b	2,5 \pm 1,1 c	3,9 \pm 1,0 b	3,4 \pm 2,0 b
Hojas no expandidas y meristema apical del macollo marcado	SP	34,3 \pm 10,0 a	49,9 \pm 9,8 a	56,4 \pm 14,8 a	42,4 \pm 13,1 a	42,2 \pm 13,7 a
	RP	44,9 \pm 5,0 a	52,3 \pm 9,0 a	66,8 \pm 15,7 a	36,3 \pm 12,1 a	46,3 \pm 14,8 a
Raíces	SP	8,9 \pm 2,2 b	11,6 \pm 4,1 b	10,1 \pm 3,5 bc	11,6 \pm 2,4 b	13,5 \pm 7,4 b
	RP	5,8 \pm 0,6 b	8,6 \pm 3,2 b	8,8 \pm 4,2 bc	9,1 \pm 2,1 b	11,9 \pm 5,4 b
Macollos	SP	33,4 \pm 8,0 a	28,9 \pm 6,4 ab	30,7 \pm 13,6 b	41,8 \pm 16,8 a	42,1 \pm 18,3 a
	RP	29,8 \pm 5,0 a	30,3 \pm 9,1 ab	21,9 \pm 13,3 bc	50,7 \pm 12,5 a	38,4 \pm 14,0 a

Estos resultados muestran que la cantidad de C^{14} absorbido y transportado alcanzó su máximo a las 24 horas de realizada la marcaación. Consecuentemente, los efectos del glifosato sobre la exportación de C^{14} fueron evaluados a las 24 horas de realizada la siembra de glucosa- C^{14} .

Absorción de glucosa y localización de C^{14} luego del tratamiento con glifosato

Bajo el tratamiento con glifosato, entre poblaciones no se hallaron diferencias significativas en la absorción de glucosa (Tabla 15). En ambos casos, el glifosato no alteró la absorción de glucosa en plantas tratadas en comparación con los controles sin herbicida (Figura 30).

Tabla 15. Análisis de la varianza de los efectos de la población (susceptible y resistente), el tratamiento (aplicación de glifosato y control), los días post-aplicación (1, 3 y 6) y sus interacciones sobre la absorción de glucosa-C¹⁴.

Fuente de variación	GL	CM	P
Población	1	0,001	0,83
Tratamiento	1	0,019	0,44
Día post-aplicación	2	0,012	0,66
Población*Día post-aplicación	2	<0,001	0,99
Población*Tratamiento	1	0,016	0,47
Día post-aplicación*Tratamiento	2	0,031	0,37
Población*Día post-aplicación*Tratamiento	2	0,001	0,95
Error	12	0,028	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

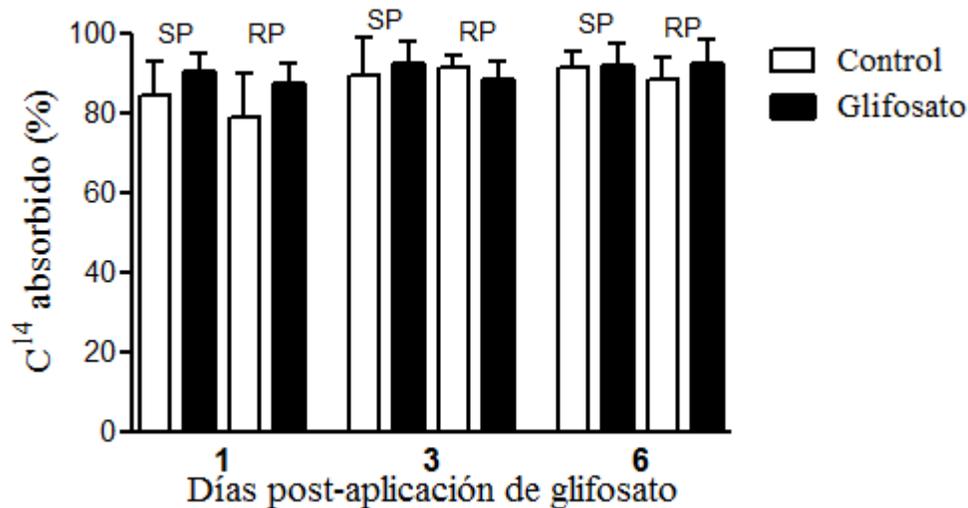


Figura 30. Glucosa-C¹⁴ absorbida por la población de *Lolium perenne* susceptible (SP) y resistente a glifosato (RP) luego del tratamiento con glifosato y control (sin herbicida) a 1, 3 y 6 días post-aplicación. Los valores son expresados como porcentaje de la glucosa-C¹⁴ aplicada. Las barras verticales representan ± 1 error estándar de la media.

El C¹⁴ trasladado desde la hoja marcada, mostró diferencias significativas entre tratamientos (control *versus* glifosato) independientemente del tiempo post-aplicación (Tabla 16). En consecuencia, los datos correspondientes a los distintos días post-aplicación fueron agrupados para su análisis por no presentar diferencias significativas entre ellos (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de la varianza de los efectos de la población (susceptible y resistente), el tratamiento (aplicación de glifosato y control), los días post-aplicación (1, 3 y 6) y sus interacciones sobre la exportación de C¹⁴ desde la hoja marcada.

Fuente de variación	GL	CM	P
Población	1	0,001	0,80
Tratamiento	1	0,133	0,01
Día post-aplicación	2	0,009	0,63
Población*Día post-aplicación	2	0,019	0,39
Población*Tratamiento	1	0,126	0,02
Día post-aplicación*Tratamiento	2	0,029	0,25
Población*Día post-aplicación*Tratamiento	2	0,010	0,61
Error	12	0,018	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

La interacción entre la población y el tratamiento mostró diferencias significativas (Tabla 16). En este sentido, en la población susceptible el traslado de asimilados disminuyó luego de la aplicación de glifosato mientras que en la población resistente no se observaron diferencias significativas (Figura 31).

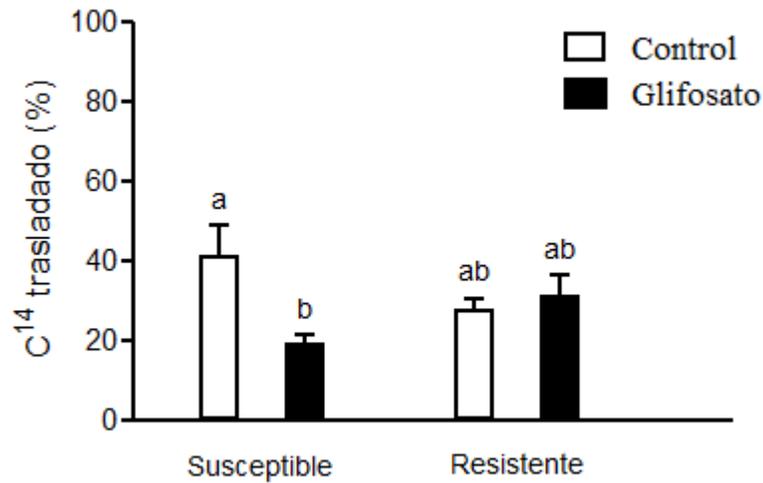


Figura 31. Exportación de C^{14} desde la hoja marcada bajo tratamiento con glifosato y sin tratamiento herbicida (control) en las poblaciones de *Lolium perenne* susceptible y resistente a glifosato. Los valores son expresados como porcentaje del C^{14} total absorbido. Las barras verticales indican el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Considerando la exportación de C^{14} a los diferentes destinos, la interacción *Población x Destino x Tratamiento* resultó ser altamente significativa (Tabla 17) indicando diferencias en el traslado de asimilados hacia los distintos destinos de la población susceptible y la resistente luego de la aplicación del herbicida. Los días post-aplicación en los cuales se realizaron las determinaciones no presentaron diferencias significativas, tanto al considerarlo factor principal como en interacción con otras fuentes de variación (Tabla 17). Por esa razón, los datos fueron agrupados para su análisis sin considerar esa fuente de variación.

Tabla 17. Análisis de la varianza de los efectos de la población (susceptible y resistente), el destino (zona marcada, resto de hoja marcada, hojas no expandidas y ápice del macollo marcado, hojas expandidas, macollos y raíces) el tratamiento (aplicación de glifosato y control), los días post-aplicación (1, 3 y 6) y sus interacciones sobre la localización del C¹⁴ exportado desde la hoja marcada.

Fuente de variación	GL	CM	P
Población	1	0,005	0,49
Destino	5	2,857	<0,001
Tratamiento	1	0,004	0,55
Día post-aplicación	2	0,006	0,58
Población*Destino	5	0,009	0,53
Población*Tratamiento	1	0,005	0,49
Destino*Tratamiento	5	0,096	<0,001
Población*Día post-aplicación	2	0,002	0,83
Destino*Día post-aplicación	10	0,020	0,16
Tratamiento*Día post-aplicación	2	0,002	0,83
Población*Destino*Tratamiento	5	0,046	<0,01
Población*Destino*Día post-aplicación	10	0,009	0,67
Población*Tratamiento*Día post-aplicación	2	0,002	0,83
Destino*Día post-aplicación*Tratamiento	10	0,015	0,20
Población*Destino*Día post-aplicación*Tratamiento	10	0,005	0,91
Error	216	0.011	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Las plantas susceptibles tratadas con glifosato mostraron una retención 57 % mayor de C¹⁴ en el área marcada comparado a sus controles (Figura 32a). Esta retención provocó un patrón diferente de exportación de asimilados, respecto a los controles. La inhibición del traslado de C¹⁴ no afectó a todos los destinos proporcionalmente. Los principales destinos afectados fueron las hojas no expandidas y el ápice meristemático del macollo marcado, donde la limitación en el traslado de C¹⁴ fue un 60 % menor que en los controles (Figura 32a).

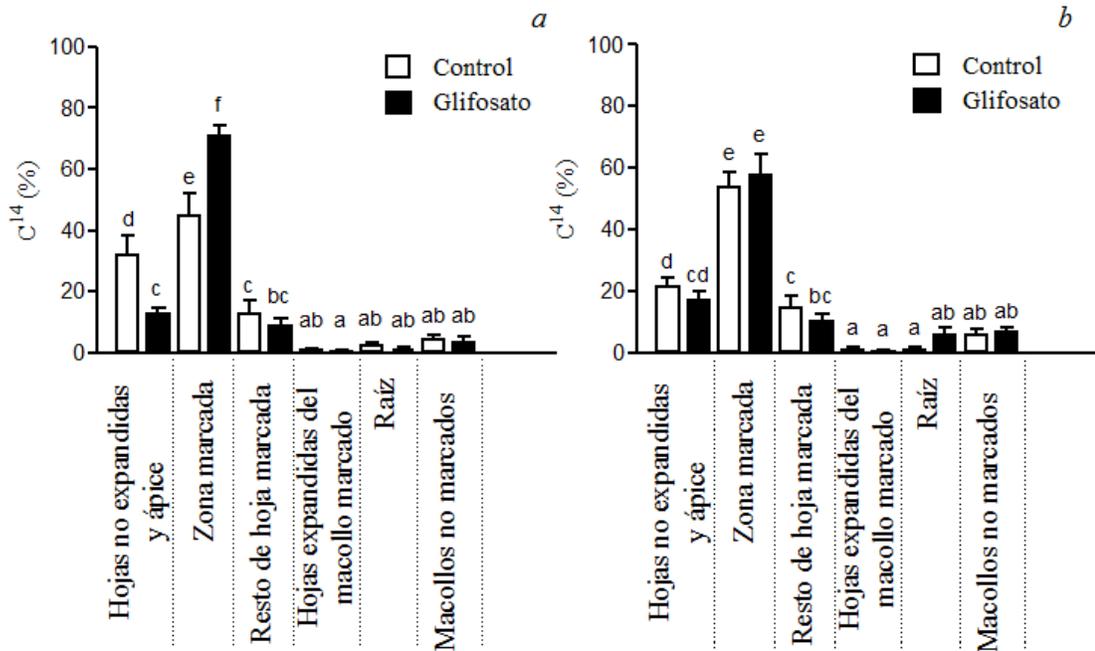


Figura 32. Efecto del glifosato sobre el C^{14} trasladado hacia diferentes destinos en la población de *Lolium perenne* susceptible (a) y resistente a glifosato (b). Los valores son expresados como porcentaje del C^{14} total exportado desde la hoja marcada. Las barras verticales representan el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En varios trabajos se han hallado correlaciones positivas entre el traslado de glifosato y el traslado de asimilados desde órganos fuente a destinos (Gougler y Geiger, 1981; Martin y Edgington, 1981; Shieh *et al.*, 1993). Esto indicaría que el transporte de glifosato podría estar condicionado al metabolismo de fotoasimilados, induciendo efectos de auto-limitación del traslado del herbicida en la planta. Varios factores podrían ser los responsables del proceso de auto-limitación en la movilidad. De acuerdo a Geiger y Bestman (1990), el glifosato parece limitar su transporte vía floema por alguna de las siguientes alternativas: a) inhibir la fijación de CO_2 lo cual limita la disponibilidad de asimilados; b) detener la síntesis de almidón y alterar la regulación del metabolismo del carbono entre las rutas de biosíntesis de almidón y de ácido shikímico en cloroplastos, esto limita la cantidad de carbono asimilado

disponible para la exportación durante la noche o en momentos de baja fotosíntesis; c) limitar el uso de las reservas de almidón para mantener la exportación de sacarosa a la noche y durante períodos de bajas tasas de fotosíntesis; d) dañar la integridad de los tejidos involucrados en la conducción de asimilados y e) reducir el flujo de sacarosa a lo largo de la ruta de exportación y por inhibir la descarga del disacárido o inhibir la síntesis de proteínas en los tejidos en crecimiento.

En el presente trabajo los resultados indican que la inhibición en el traslado de asimilados se detectó principalmente en hojas no expandidas y meristemas apicales resultando ser los destinos más afectados (Figura 32a). Ante esos efectos, el perfil de traslado muestra que no existió un desvío de asimilados hacia otros órganos y, por lo tanto, la inhibición de la exportación fue debida a una acumulación de C^{14} en el área marcada. Consecuentemente, la limitación de la demanda de asimilados desde hojas no expandidas y ápice no estuvo asociada a un incremento del C^{14} en el algún otro destino competitivo como raíces, macollos y hojas expandidas (Figura 32a).

La importancia de un destino, evaluada en términos de demanda relativa de asimilados, es condicionada por su actividad metabólica (Mengel y Kirkby, 2001). Pline y colaboradores (2002a) encontraron que el glifosato inhibe la división celular de meristemas radicales tratados con el herbicida. Si bien el mecanismo por el cual el glifosato ingresa a la célula aún está en discusión, ciertas evidencias hacen pensar que están involucrados fosfato-transportadores y un sistema pasivo de flujo masal (Shaner, 2009). También, Roso y Vidal (2010) sugirieron que los fosfato-transportadores pueden tener un importante rol en el movimiento de glifosato a través de las membranas. Cualquier efecto negativo del glifosato sobre los fosfato-transportadores podría condicionar indirectamente el transporte de asimilados hacia destinos en activo crecimiento, debido a que la función de esas proteínas transportadoras es esencial para el crecimiento celular y este proceso está relacionado directamente a la demanda de asimilados.

El transporte sistémico de herbicidas depende de la producción de sacarosa en los órganos fuente donde los fotoasimilados son cargados al floema (Devine y Hall,

1990). En coincidencia, los presentes resultados indican que los efectos del glifosato sobre su auto-limitación del transporte podría ser causada por la inhibición en el movimiento de asimilados registrado en plantas susceptibles de *Lolium perenne*.

El glifosato no afectó el patrón de transporte de C¹⁴ en la población resistente (Figura 32b). Estos resultados son consistentes con los comunicados por Lorraine-Colwill *et al.* (2003), quienes sugirieron que las plantas susceptibles podrían sufrir limitaciones en el traslado del herbicida y que esto no debería ocurrir en plantas sin efectos fitotóxicos evidentes.

Liberación de C¹⁴ desde la raíces luego del tratamiento con glifosato

A partir del análisis de la varianza, se encontró que el C¹⁴ liberado desde las raíces fue afectado por la aplicación de glifosato en forma altamente significativa dependiendo de las poblaciones estudiadas (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de la varianza de los efectos de la población (susceptible y resistente), el tratamiento (aplicación de glifosato y control) y el tiempo post-aplicación (3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas) y sus interacciones sobre la liberación de C¹⁴ desde las raíces.

Fuente de variación	GL	CM	P
Población	1	<1 10 ⁻⁶	0,92
Tratamiento	1	8,8 10 ⁻⁴	<0,001
Tiempo post-aplicación	5	9,8 10 ⁻⁴	<0,001
Población*Tratamiento	1	2,8 10 ⁻⁴	<0,01
Población* Tiempo post-aplicación	5	2,2 10 ⁻⁵	0,59
Tratamiento*Tiempo post-aplicación	5	1,5 10 ⁻⁴	<0,01
Población*Tratamiento*Tiempo post-aplicación	5	4,1 10 ⁻⁵	0,24
Error	72	3 10 ⁻⁵	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

El C¹⁴ detectado en la solución nutritiva, debido a la difusión de exudados radicales y a la respiración de las raíces, disminuyó significativamente con el tratamiento con glifosato en plantas susceptibles desde las 24 horas post-aplicación en adelante (Figura 33a). En ese momento, el C¹⁴ liberado decreció en un 67 % comparado con el control sin herbicida. Desde entonces, esta relación entre ambos tratamientos se mantuvo constante a lo largo del período en evaluación (Figura 33a). Estos resultados concuerdan con la inhibición del movimiento de C¹⁴ bajo efecto de glifosato en la población susceptible como muestran los resultados presentados previamente.

El glifosato no provocó diferencias significativas en la liberación de C¹⁴ desde las raíces en la población resistente, comparativamente al tratamiento control (Figura 33b). Hale *et al.* (1971) indicaron que algunos compuestos aplicados foliarmente son transportados no sólo desde los tallos hacia las raíces, sino que también son liberados al medio de cultivo. García *et al.* (2001) muestran que la exudación radical está correlacionada positivamente con el crecimiento de las raíces y, consecuentemente y de acuerdo a los presentes resultados, un activo crecimiento del sistema radicular segrega más exudados.

Varios trabajos abordaron los efectos de herbicidas sobre la exudación radical de los principios activos no metabolizados tanto en ryegrass como en otras especies (Dinelli *et al.*, 2007; Lorraine-Colwill *et al.*, 2003; Nissen *et al.*, 1994; Coupland y Caseley, 1979). Sin embargo, en el presente trabajo se demostró por primera vez que la glucosa o sus metabolitos liberados por las raíces son inhibidos por el glifosato en una planta susceptible.

Numerosos estudios muestran que cambios en la demanda de asimilados resultan en una alteración en la partición de carbono entre su acumulación como reserva y su exportación hacia otros destinos, o bien con modificaciones de las tasas de fotosíntesis, o ambos efectos (Wardlaw, 1990). Los resultados presentados aquí confirman que el glifosato reduce el traslado de asimilados y afecta su patrón de

exportación en la población susceptible. En contraste, el herbicida no afectó el transporte de asimilados en las plantas de *Lolium perenne* resistentes a glifosato.

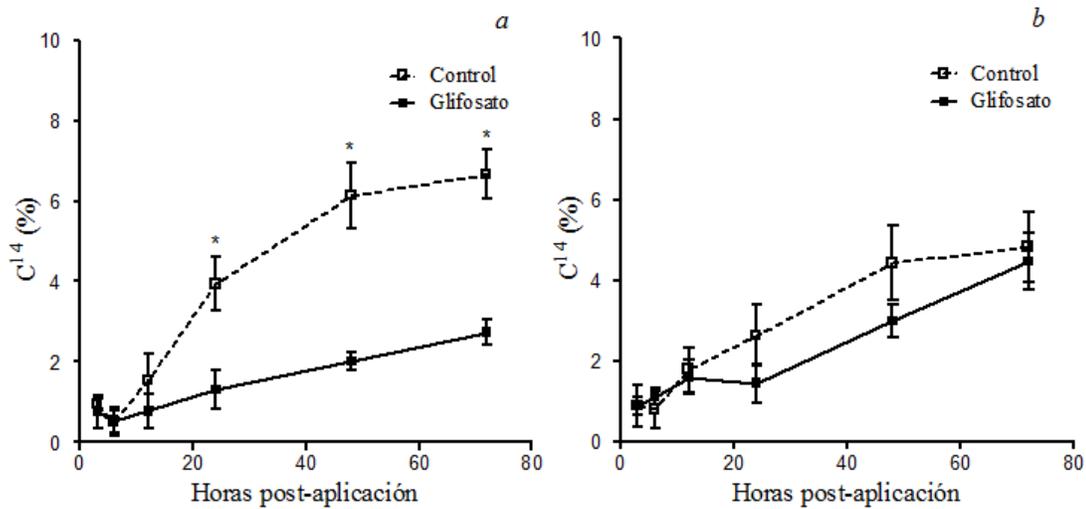


Figura 33. C^{14} liberado desde las raíces en la población de *Lolium perenne* susceptible (a) y resistente a glifosato (b) bajo tratamiento con glifosato y sin herbicida (control). Los valores son expresados como porcentaje del C^{14} absorbido por la hoja marcada. Las barras verticales representan ± 1 error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento con glifosato y el respectivo control.

Efectos del glifosato sobre la fotosíntesis

La fotosíntesis no parece ser el blanco primario de inhibición del glifosato, sin embargo algunas evidencias indican que este proceso es afectado por el herbicida (Madsen *et al.*, 1995). El glifosato produce una rápida y continua limitación de la asimilación de CO_2 en plantas susceptibles (Geiger *et al.*, 1986; Diaz Vivancos *et al.*, 2011). Además, la merma de intermediarios del ciclo de reducción del carbono ha sido observada rápidamente luego de la aplicación de glifosato (Servaites *et al.*, 1987).

Esos efectos pueden ser una consecuencia de la desregulación del flujo de carbono hacia la ruta del ácido shikímico debido a la inhibición de la EPSPs “aguas

abajo” y a su rol regulador de la primera enzima de la ruta (Siehl, 1997). Sin embargo, otros autores han argumentado que el cierre estomático es un importante factor que contribuye a la depresión de la asimilación de CO₂ (Zobiole *et al.*, 2010).

Debido a las discrepancias entre los diversos autores y ante los resultados presentados previamente, se intentó determinar los efectos del glifosato sobre la fotosíntesis, tanto durante la etapa bioquímica como lumínica, comparando un biotipo de *Lolium perenne* susceptible y otro resistente a glifosato.

Efectos del glifosato sobre la etapa bioquímica de la fotosíntesis: intercambio gaseoso foliar durante post-aplicación del herbicida

Al analizar el efecto del glifosato sobre la asimilación de carbono a saturación lumínica (A_{sat}) no se detectó significancia estadística en el efecto de la interacción triple entre el biotipo (susceptible y resistente), el tratamiento (glifosato y control) y los días post-aplicación (1, 2, 3, 5 y 7) ($P = 0,89$). Por lo tanto, los biotipos fueron analizados separadamente comparando la A_{sat} de plantas tratadas con glifosato respecto a sus controles sin herbicida a lo largo del período post-aplicación considerado (Tabla 19).

Los valores de A_{sat} registrados en el biotipo susceptible dependieron significativamente de los efectos de la interacción *Tratamiento x Tiempo post-aplicación* (Tabla 19). La asimilación de carbono a saturación lumínica registrada en el biotipo susceptible no fue afectada significativamente antes de los dos días post-aplicación de glifosato. Las plantas tratadas con el herbicida mostraron una disminución del 25 % en los valores de A_{sat} , comparado con sus controles a los dos días de realizado el tratamiento (Figura 34a). Seguidamente, la tasa fotosintética fue reducida en un 44 % por el glifosato a los 7 días post-aplicación (Figura 34a). En contraste, la A_{sat} no se vio afectada significativamente por el glifosato en el biotipo resistente hasta los 7 días de realizada la aplicación (Tabla 19 y Figura 34b).

Tabla 19. Análisis de la varianza de los efectos del tratamiento (aplicación de glifosato y control) y el tiempo post-aplicación (1, 2, 3, 5 y 7 días) y sus interacciones sobre la tasa fotosintética a saturación lumínica del biotipo susceptible y resistente a glifosato.

Fuente de variación	Susceptible			Resistente		
	GL	CM	P	GL	CM	P
Tratamiento	1	161,99	<0,001	1	3,13	0,562
Tiempo post-aplicación	4	83,73	<0,001	4	22,13	0,062
Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	15,97	0,012	4	3,54	0,818
Error	40	4,65		40	9,21	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

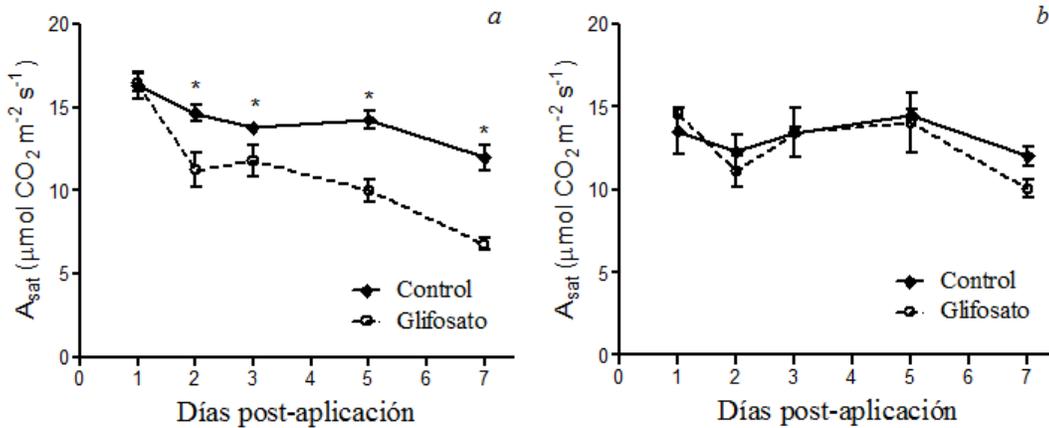


Figura 34. Evolución de la tasa fotosintética a saturación lumínica (A_{sat}) del biotipo susceptible (a) y resistente (b) luego de la aplicación de glifosato y del tratamiento control sin herbicida. Las barras verticales representan ± 1 error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento con glifosato y el respectivo control.

Al evaluar la conductancia estomática (g_s), el análisis de la varianza indicó que no existen efectos significativos de la interacción *Biotipo x Tratamiento x Tiempo post-aplicación* sobre ese parámetro ($P = 0,50$). En tanto, se realizaron análisis de la varianza para cada población comparando las plantas tratadas con glifosato frente a sus controles sin herbicida durante post-aplicación (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de la varianza de los efectos del tratamiento (aplicación de glifosato y control) y el tiempo post-aplicación (1, 2, 3, 5 y 7 días) y sus interacciones sobre la conductancia estomática del biotipo susceptible y resistente a glifosato.

Fuente de variación	Susceptible			Resistente		
	GL	CM	P	GL	CM	P
Tratamiento	1	21008	<0,001	1	7158	0,012
Tiempo post-aplicación	4	2408	0,004	4	4793	0,004
Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	133	0,91	4	2740	0,048
Error	40	545		40	1042	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Para los dos biotipos evaluados, el comportamiento de la g_s fue explicado significativamente por el efecto de la interacción entre el tratamiento y el tiempo post-aplicación (Tabla 20). En este sentido, a los dos días del tratamiento, la conductancia estomática del biotipo susceptible fue inhibida significativamente por el herbicida en un 30 %, comparado con sus controles (Figura 35a). Posteriormente, la g_s decreció paulatinamente hasta llegar a verse reducida en un 55 % a los 7 días post-aplicación (Figura 35a). En las plantas resistentes, la g_s resultó un 20 % inferior en relación a su control, entre los 5 y 7 días de realizado el tratamiento (Figura 35b), valor estadísticamente significativo.

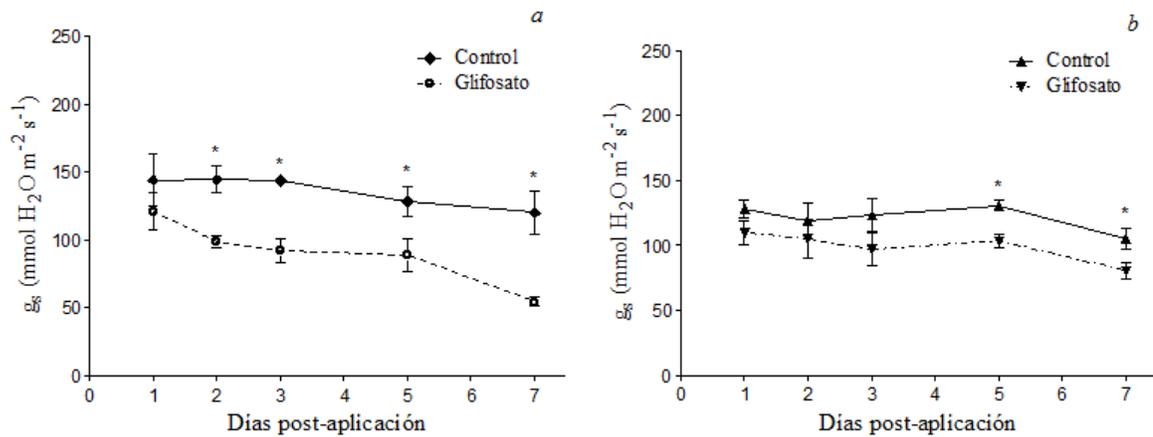


Figura 35. Evolución de la conductancia estomática (g_s) del biotipo susceptible (a) y resistente (b) luego de la aplicación de glifosato y del tratamiento control sin herbicida. Las barras verticales representan ± 1 error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento con glifosato y el respectivo control.

Intercambio gaseoso foliar en función de la concentración de CO₂

Las determinaciones de las tasas de asimilación de CO₂ en función de la concentración de CO₂ en el espacio aéreo intercelular (C_i) fueron llevadas a cabo a los dos días de realizada la aplicación de glifosato o tratamiento control. En ese momento, se detectaron las primeras diferencias en los valores de A_{sat} registrados en plantas susceptibles tratadas con glifosato respecto a sus controles, a 360 ppm de CO₂ externo, como se mostró en los resultados del experimento previo.

La evolución de la tasa de asimilación de CO₂ como función de la C_i fue significativamente diferente entre plantas susceptibles tratadas con glifosato y sus controles (Tabla 21). En este sentido, la tasa de asimilación fue inhibida entre 30-50 % debido al efecto del tratamiento con glifosato cuando la C_i fue de 75 ppm o mayor (Figura 36a). Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas en las tasas de fijación de CO₂ como función de la C_i entre plantas resistentes a glifosato tratadas con el herbicida y sus controles (Tabla 22 y Figura 36b).

Tabla 21. Análisis de la varianza de cada uno de los parámetros derivados de las curvas de asimilación de CO₂ en función de la concentración intercelular de CO₂ del biotipo susceptible a glifosato. A_{sat}: tasa fotosintética a saturación lumínica; A_{max}: tasa fotosintética máxima a saturación de CO₂; V_{cmax}: máxima velocidad de carboxilación de la enzima rubisco; J_{max}: tasa potencial de electrones que participa de la regeneración de ribulosa-1,5-bifosfato; Γ_{CO2}: punto de compensación de CO₂.

Fuente de variación	A _{sat}			A _{max}			V _{cmax}			J _{max}			Γ _{CO2}		
	GL	CM	P	GL	CM	P	GL	CM	P	GL	CM	P	GL	CM	P
Tratamiento	1	117	<0,001	1	200	<0,001	1	1399	<0,001	1	5116	<0,001	1	1485	0,041
Error	8	1,8		8	3,1		8	30,2		8	127		8	251	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Tabla 22. Análisis de la varianza de cada uno de los parámetros derivados de las curvas de asimilación de CO₂ en función de la concentración de CO₂ en el espacio aéreo intercelular del biotipo resistente a glifosato. A_{sat}: tasa fotosintética a saturación lumínica; A_{max}: tasa fotosintética máxima a saturación de CO₂; V_{cmax}: máxima velocidad de carboxilación de la enzima Rubisco; J_{max}: tasa potencial de electrones que participa de la regeneración de ribulosa-1,5-bifosfato; Γ_{CO2}: punto de compensación de CO₂.

Fuente de variación	A _{sat}			A _{max}			V _{cmax}			J _{max}			Γ _{CO2}		
	GL	CM	P	GL	CM	P	GL	CM	P	GL	CM	P	GL	CM	P
Tratamiento	1	0,93	0,70	1	0,17	0,92	1	115	0,43	1	212	0,55	1	365	0,23
Error	8	6,29		8	20,1		8	178		8	583		8	230	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

La tasa máxima de carboxilación de RuBP (V_{cmax}) fue significativamente inhibida por el tratamiento con glifosato en el biotipo susceptible (comparación de la pendiente de ambas curvas en la Figura 36a). La V_{cmax} mostró un valor 32 % más bajo debido al efecto del herbicida, en cambio, el biotipo resistente no presentó variaciones significativas en este parámetro al comparar los tratamientos (Tabla 23).

Tabla 23. Estimación de parámetros derivados de las curvas de asimilación de CO₂ en función de la concentración intercelular de CO₂ para el biotipo susceptible y el resistente a glifosato. Se presentan los valores promedio y el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto al control correspondiente.

	Susceptible		Resistente	
	Control	Glifosato	Control	Glifosato
A_{sat} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	14,0 ± 0,69	7,73 ± 0,35*	9,94 ± 0,80	10,47 ± 1,08
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	21,78 ± 0,63	13,60 ± 0,80*	18,16 ± 1,60	17,92 ± 1,85
V_{cmax} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	67,07 ± 1,68	45,47 ± 2,69*	58,13 ± 6,92	52,16 ± 3,53
J_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	131,03 ± 2,68	89,73 ± 5,93*	112,58 ± 11,27	104,46 ± 7,87
Γ_{CO_2} (ppm)	51,02 ± 7,01	71,90 ± 6,97*	50,80 ± 5,14	61,83 ± 7,08

La aplicación de glifosato provocó una reducción del 31 % en la tasa potencial de transporte de electrones que participa de la regeneración de la RuBP (J_{max}) en el biotipo susceptible, mientras que este parámetro no mostró cambios significativos en las plantas resistentes tratadas con glifosato. Los valores de A_{sat} y A_{max} fueron significativamente afectados por la aplicación del herbicida sólo en plantas del biotipo susceptible. En este sentido, A_{sat} y A_{max} mostraron reducciones del 44 y 37 %, respectivamente, comparando plantas tratadas con glifosato respecto a los controles (Tabla 23).

En el biotipo susceptible, el punto de compensación de CO₂ se incrementó significativamente debido al efecto del glifosato, estos valores pasaron de 51,0 a 71,9 ppm. En contraste, el biotipo resistente no mostró diferencias significativas entre tratamientos en el punto de compensación de CO₂ (Tabla 23).

En ambos biotipos, la g_s tendió a decrecer cuando la C_i se incrementó. La aplicación de glifosato redujo la g_s en plantas susceptibles, además al considerar una misma C_i , la g_s fue inhibida en un 50 % (Figura 36c). A diferencia de esto, el herbicida no afectó significativamente la g_s en el biotipo resistente a ninguna de las C_i alcanzadas (Figura 36d).

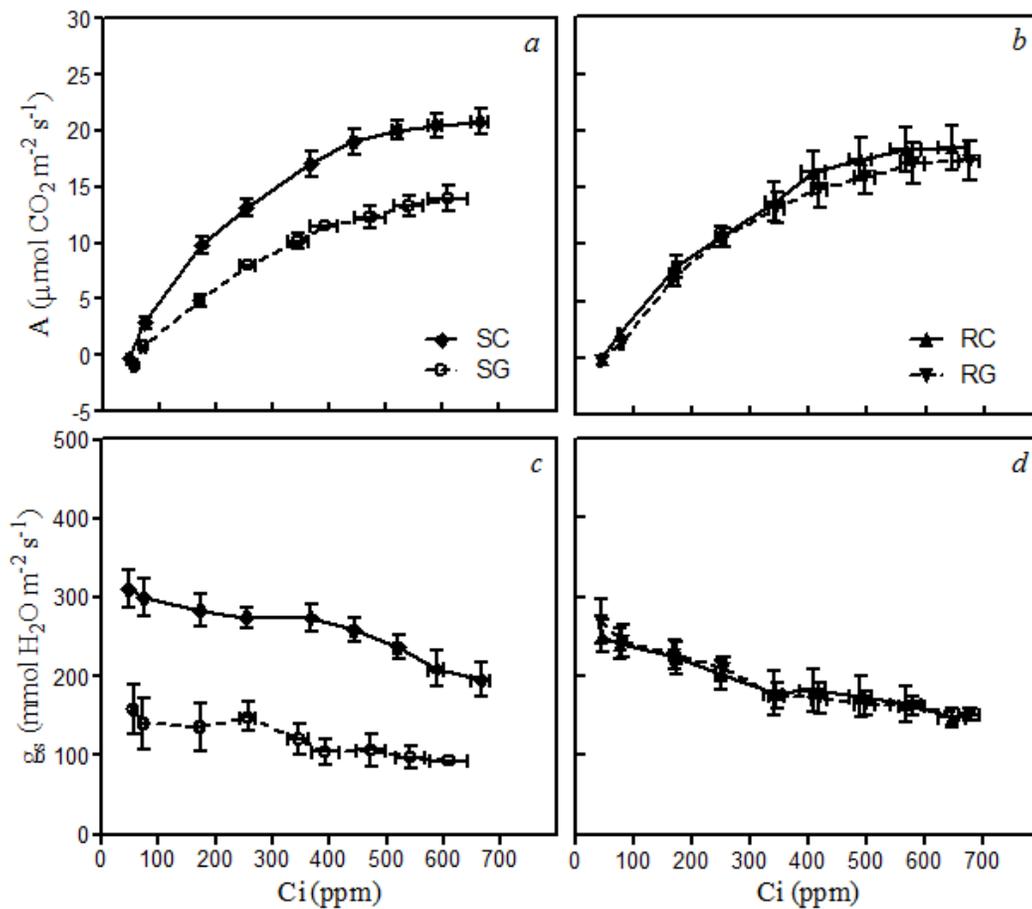


Figura 36. Respuesta de la tasa de asimilación de CO₂ (A) y de la conductancia estomática a la concentración de CO₂ en el espacio aéreo intercelular (C_i) en el biotipo susceptible (a y c) tratado con glifosato (SG) y control (SC) y en el biotipo resistente (b y d) tratado con glifosato (RG) y control (RC). Se presentan los valores promedios y las barras horizontales y verticales indican el error estándar de la media.

Efectos del glifosato sobre la etapa lumínica de la fotosíntesis: variaciones en la fluorescencia de la clorofila durante post-aplicación

Las variaciones registradas en el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II en hojas adaptadas a la oscuridad (F_v/F_m) fueron explicadas por la interacción triple de significancia estadística *Biotipo x Tratamiento x Tiempo post-aplicación* (Tabla 24).

Los valores de F_v/F_m no fueron afectados significativamente por el glifosato en las plantas susceptibles hasta los 5 días post-aplicación. Recién en ese momento, el herbicida provocó una reducción gradual de F_v/F_m que llegó a ser del 30 % a los 7 días de realizada la aplicación (Figura 37a). Contrariamente, la relación F_v/F_m no reveló cambios en el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II luego del tratamiento con glifosato en el biotipo resistente, alcanzando un valor promedio de 0,81 (Figura 37b).

Tabla 24. Análisis de la varianza de los efectos de la población (susceptible y resistente), el tratamiento (aplicación de glifosato y control) y el tiempo post-aplicación (1, 2, 3, 5 y 7 días) y sus interacciones sobre el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m).

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	0,013	0,002
Tratamiento	1	0,014	0,001
Tiempo post-aplicación	4	0,006	0,001
Biotipo*Tratamiento	1	0,013	<0,001
Biotipo*Tiempo post-aplicación	4	0,006	0,001
Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	0,008	<0,001
Biotipo*Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	0,005	0,003
Error	80	0,001	

GL = grados de libertad; CM = cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

La tasa fotosintética de transporte de electrones (ETR) fue diferente para cada biotipo dependiendo del tratamiento y el momento post-aplicación considerado (Tabla 25). En el biotipo susceptible, la tasa de transporte de electrones presentó un valor promedio de 145 μmol de electrones (e^-) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin mostrar diferencias significativas entre tratamientos hasta los 5 días post-aplicación (Figura 37c). En ese momento, la ETR fue significativamente inhibida en las plantas tratadas con glifosato alcanzando un promedio de 61 μmol $e^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que permaneció estable a los 7 días post-aplicación (Figura 37c). En el biotipo resistente, el tratamiento herbicida no indujo disturbios significativos en la ETR comparado a sus controles. Este parámetro

presentó un valor promedio de $141 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante todo el período de evaluación (Figura 37d).

Tabla 25. Análisis de la varianza de los efectos de la población (susceptible y resistente), el tratamiento (aplicación de glifosato y control) y el tiempo post-aplicación (1, 2, 3, 5 y 7 días) y sus interacciones sobre la tasa de transporte de electrones (ETR).

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	5945	0,018
Tratamiento	1	23502	<0,001
Tiempo post-aplicación	4	7569	<0,001
Biotipo*Tratamiento	1	10772	0,001
Biotipo*Tiempo post-aplicación	4	944	0,45
Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	4097	0,005
Biotipo*Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	4140	0,004
Error	80	1023	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Los efectos sobre la atenuación fotoquímica (qP) fueron explicados por la interacción *Biotipo x Tratamiento x Tiempo post-aplicación* (Tabla 26). La aplicación de glifosato alteró la atenuación fotoquímica (estimador de los centros del fotosistema II en estado abierto) en el biotipo susceptible, desde los 5 días post-aplicación en adelante. En este sentido, la proporción de centros de reacción del fotosistema II en estado abierto decreció en 42 % y 52 % a los 5 y 7 días post-aplicación, respectivamente (Figura 37e). En contraste, en el biotipo resistente este parámetro no mostró diferencias significativas en las plantas tratadas con glifosato comparado a sus controles. Para este biotipo, las plantas de ambos tratamientos arrojaron valores de qP de alrededor de 0,50 (Figura 37f).

Tabla 26. Análisis de la varianza de los efectos de la población (susceptible y resistente), el tratamiento (aplicación de glifosato y control) y el tiempo post-aplicación (1, 2, 3, 5 y 7 días) y sus interacciones sobre la atenuación fotoquímica (qP).

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	0,061	0,015
Tratamiento	1	0,246	<0,001
Tiempo post-aplicación	4	0,206	<0,001
Biotipo*Tratamiento	1	0,213	<0,001
Biotipo*Tiempo post-aplicación	4	0,006	0,66
Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	0,034	0,012
Biotipo*Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	0,040	0,005
Error	80	0,010	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

El rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (F_v'/F_m') varió significativamente dependiendo de la interacción *Biotipo x Tratamiento x Tiempo post-aplicación* (Tabla 27). En el biotipo susceptible, F_v'/F_m' fue inhibido por el glifosato a los 5 y 7 días post-aplicación, cuando el parámetro decreció alrededor del 30 % comparado con el tratamiento control (Figura 37g). En tanto, el biotipo resistente no mostró diferencias significativas entre tratamientos (Figura 37h).

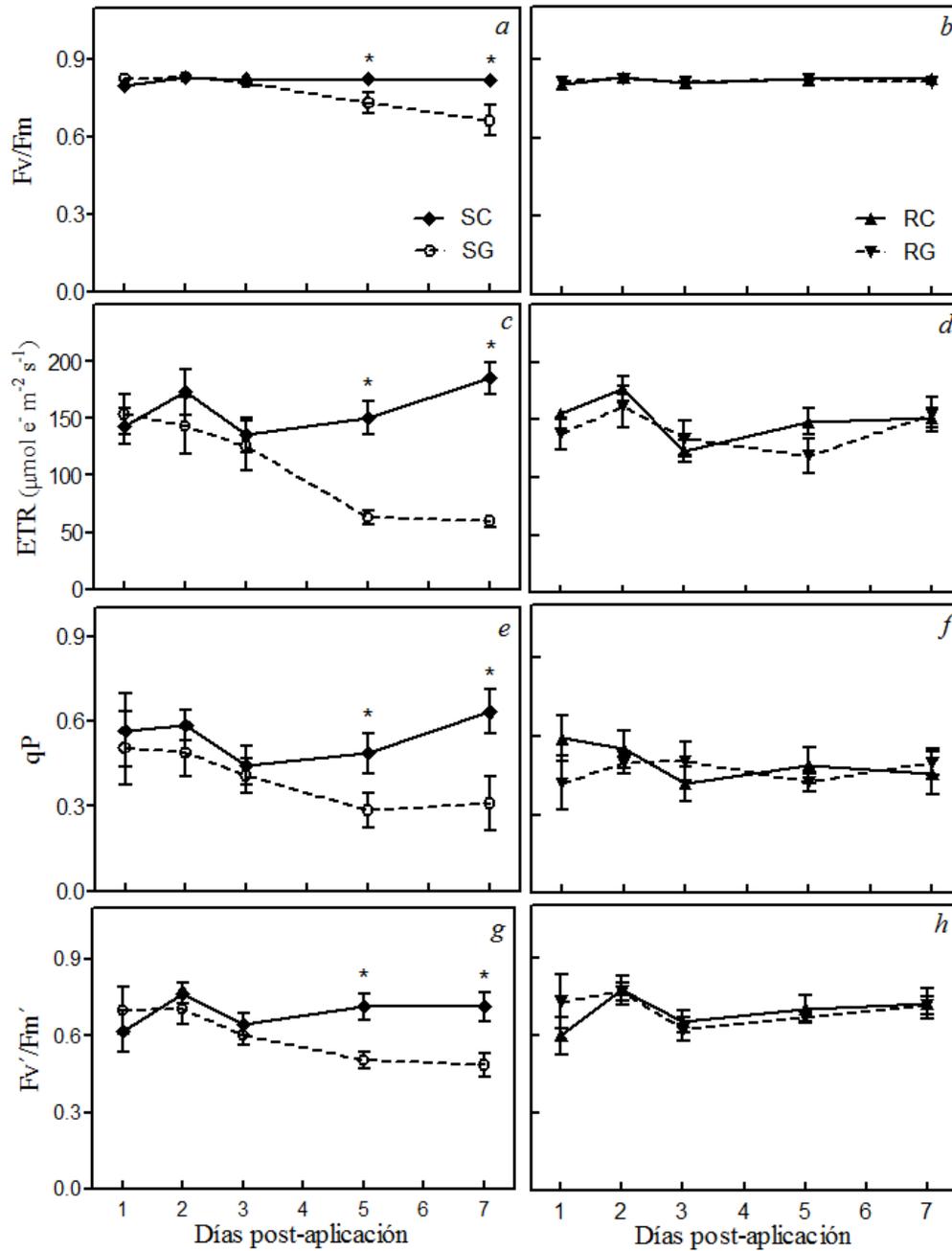


Figura 37. Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m), tasa de transporte de electrones (ETR), atenuación fotoquímica (qP) y rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (F_v'/F_m') durante post-aplicación en el biotipo susceptible (a, c, e, g) tratado con glifosato (SG) y control (SC) y en el biotipo resistente (b, d, f, h) tratado con glifosato (RG) y control (RC). Se muestran los valores promedio y las barras verticales representan el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento con glifosato y el respectivo control.

Tabla 27. Análisis de la varianza de los efectos de la población (susceptible y resistente), el tratamiento (aplicación de glifosato y control) y el tiempo post-aplicación (1, 2, 3, 5 y 7 días) y sus interacciones sobre el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (F_v'/F_m').

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	0,117	<0,001
Tratamiento	1	0,076	0,004
Tiempo post-aplicación	4	0,131	<0,001
Biotipo*Tratamiento	1	0,145	<0,001
Biotipo*Tiempo post-aplicación	4	0,026	0,027
Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	0,060	<0,001
Biotipo*Tratamiento*Tiempo post-aplicación	4	0,027	0,004
Error	80	0,009	0,023

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Inicialmente, la aplicación de glifosato no alteró el contenido de clorofila en hojas en ambos biotipos ($P > 0,05$), recién a los 7 días post-aplicación se detectó la primera respuesta significativa al tratamiento con glifosato únicamente en el biotipo susceptible ($P < 0,05$; Figura 38). Esto es consistente con los resultados mostrados previamente al determinar el efecto del glifosato sobre el contenido de clorofila. Este parámetro se volvió a medir en forma paralela a las lecturas de fluorescencia de la clorofila para descartar que los resultados obtenidos se deban a una alteración del contenido de clorofila en la hoja.

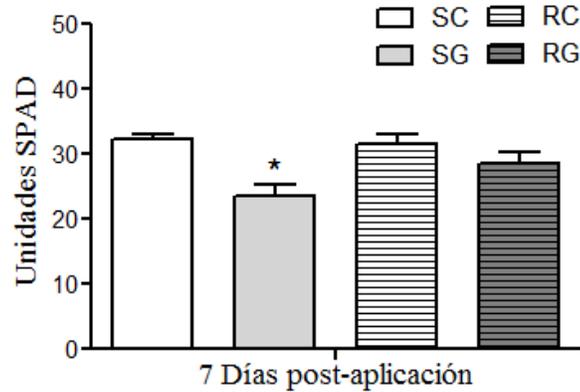


Figura 38. Contenido de clorofila (en unidades SPAD) en la última hoja expandida a los 7 días post-aplicación de glifosato, cuando se detectaron las primeras diferencias entre tratamientos, en el biotipo susceptible tratado con glifosato (SG) y control (SC) y en el biotipo resistente tratado con glifosato (RG) y control (RC). Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y con asteriscos se indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo biotipo ($P < 0,05$).

La inhibición de la asimilación de CO_2 de hojas durante el período post-aplicación de glifosato ha sido ampliamente documentado en varias especies (Geiger *et al.*, 1986; Ireland *et al.*, 1986; Zobiole *et al.*, 2010). Sin embargo, aún existen controversias respecto a las causas de ese efecto atribuido al herbicida. Coincidentemente con los presentes resultados, Geiger *et al.* (1986) y Olesen y Cedergreen (2010) han observado una disminución simultánea en la conductancia estomática y la asimilación de CO_2 . Los últimos autores sugieren que eso podría deberse a una inhibición de la fijación de carbono basada en la disminución de la regeneración de RuBP antes que un efecto directo sobre la conductancia estomática. Servaites y colaboradores (1987) propusieron que el glifosato induciría una disminución de carbono o de fosfato (o de ambos) del ciclo de Calvin, limitando la tasa de regeneración de RuBP y por ende la fotosíntesis. Existen antecedentes donde el tratamiento con glifosato provocó un descenso de los niveles de los intermediarios del ciclo fotosintético de reducción de carbono y una acumulación de shikimato, esto podría estar relacionado a la regulación de la vía del ácido shikímico mediante el arogenato (Siehl, 1997).

A partir de la respuesta de la tasa fotosintética a la concentración de CO₂ (*i. e.* curvas de asimilación en función de C_i) se pueden estimar varios parámetros que proveen importante información relacionada a la fisiología de las hojas (McMurtrie y Wang, 1993). En este sentido, en los presentes resultados se encuentran evidencias de la inhibición de la fotosíntesis debido a la limitación en la regeneración de RuBP provocada por el glifosato. Esto se comprueba a partir de la comparación de los valores de J_{max} de plantas susceptibles tratadas con glifosato respecto a sus controles. Bajo condiciones limitantes de regeneración de RuBP, la rubisco consume más rápido RuBP de lo que es sintetizada y, por lo tanto, la tasa de asimilación de CO₂ no responde al incremento de C_i (Caemmerer y Farquhar, 2001).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la caída en la tasa de asimilación de plantas susceptibles tratadas con glifosato está relacionada a la limitación por rubisco reflejada en la caída de V_{cm_{ax}}. El cambio en la pendiente de fijación de CO₂ en respuesta a bajos C_i, indica que la actividad *in vivo* de la rubisco fue alterada. Esto concuerda con Servaites *et al.* (1987), quienes encontraron que los niveles de RuBP y la activación de rubisco disminuyeron durante la post-aplicación de glifosato en *Beta vulgaris*. Más recientemente, Ahsan y otros (2008) mostraron que en arroz, proteínas correspondientes a las subunidades mayor y menor de la rubisco disminuyeron su expresión en respuesta al glifosato. La regulación de la expresión de rubisco es considerada una de las principales vías por la cual la tasa de asimilación se ajusta a la demanda de los destinos en plantas creciendo sin limitaciones de CO₂ (Paul y Foyer, 2001). Respecto a esto, los azúcares son una parte importante del conjunto de señales que coordina la interacción fuente-destino (Paul y Foyer, 2001).

El punto de compensación de CO₂ incrementó marcadamente en hojas de plantas susceptibles tratadas con glifosato. Este hallazgo se condice con trabajos previos donde el descenso del intercambio neto de carbono fue acompañado por un aumento en el punto de compensación de CO₂ (Geiger *et al.*, 1987). La fotorrespiración no parece estar involucrada en esto, debido a que no se han detectado efectos del glifosato sobre este proceso fisiológico (Geiger *et al.*, 1987).

El cierre estomático inducido por el glifosato, como fue detectado en el biotipo susceptible, podría ser un factor importante en la contribución a la depresión de la asimilación de CO₂ (Zobiole *et al.*, 2010). El herbicida tendió a disminuir la conductancia estomática y esta situación no fue revertida a bajas concentraciones de CO₂. En función de esto, los resultados presentados indican que los primeros efectos del glifosato fueron detectados en la alteración de la conductancia estomática y, por lo tanto, el intercambio gaseoso podría ser una respuesta a la regulación de la fotosíntesis mediada por el efecto inhibitorio de los productos finales.

Como se mostró anteriormente, al presentar el efecto del glifosato sobre el crecimiento, el herbicida afecta los tejidos en activo crecimiento independientemente de la inhibición de la fotosíntesis. Esto explica la caída en la demanda de asimilados conllevando a la acumulación de carbohidratos en hojas. La detención del crecimiento detectada luego de la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos sugiere una alteración del metabolismo que no permite mantener la tasa de utilización de los carbohidratos disponibles (Ahsan *et al.*, 2008). Consecuentemente, la inhibición de la fotosíntesis y de la conductancia estomática serían causadas por la acumulación de los productos finales de la fotosíntesis (Azcón-Bieto, 1983).

Los resultados presentados muestran que la acumulación de azúcares libres en hojas ha ocurrido de manera previa a la caída del intercambio gaseoso. Esto se condice con Orcaray *et al.* (2012) quienes detectaron la acumulación de glucosa en hojas y raíces de *Pisum sativum* como una respuesta rápida a la aplicación de glifosato, previo a la inhibición de la fotosíntesis.

En relación a los cambios en el metabolismo del carbono, el glifosato promueve alteraciones en la fluorescencia de la clorofila (Ireland *et al.*, 1986; Madsen *et al.*, 1995; Sobyte *et al.*, 2011). En base a esto, el empleo de fluorímetros ha sido propuesto como una herramienta para la evaluación rápida de los efectos del glifosato (Barbagallo *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2003). Sin embargo, los datos presentados en este trabajo muestran que en las plantas susceptibles tratadas con ese herbicida, la conductancia estomática y la asimilación de CO₂ son afectadas antes que la

fluorescencia de la clorofila. Esto sugiere que el descenso de la ETR sería un proceso de regulación y no la principal causa de la caída de la fotosíntesis. Luego, a 5 y 7 días post-aplicación, esto ocasionaría daños al fotosistema II como se deduce de la Figura 37c.

En plantas susceptibles tratadas con glifosato, los valores de F_v/F_m , ETR, qP y F_v'/F_m' fueron menores comparado a sus controles. Por lo tanto, los cambios en ETR pueden ser explicados por la proporción de centros de reacción del fotosistema II en estado abierto (qP) y por el rendimiento intrínseco de esos centros (F_v'/F_m').

Así, a partir de los 5 días post-aplicación, la disminución de V_{cmax} y J_{max} sugiere que los efectos del glifosato podrían ser atribuidos a la baja actividad de ciertas enzimas del ciclo de Calvin. Por consiguiente, hubo una disminución de la tasa de transporte de electrones resultando, a su vez, en un incremento del estado de reducción del aceptor primario de electrones del fotosistema II, señalado por el descenso en qP, como sostiene Fracheboud y Leipner (2003).

La evaluación de F_v/F_m provee una medida de la integridad del fotosistema II y del complejo de captación de luz (Rosenqvist y van Kooten, 2003). También a partir de los 5 días post-aplicación, el glifosato afectó este parámetro indicando el daño sobre el fotosistema. Sin embargo, este daño parece ser un evento tardío comparado a los efectos descritos antes y no sería la causa primaria de la caída de la tasa de asimilación de CO_2 .

La acumulación de azúcares libres y la disminución de la tasa de asimilación de carbono fueron independientes de los cambios en los parámetros estimados a partir de la medición de la fluorescencia de la clorofila. En otras palabras, la actividad fotoquímica de las hojas no fue afectada por el glifosato antes de los 5 días post-aplicación. El transporte fotosintético de electrones y la captación de luz no fueron inhibidos directamente por el herbicida y esto sería desencadenado por alteraciones en el metabolismo del carbono como fue discutido antes.

Lo indicando previamente concuerda con Olesen y Cedergreen (2010) al concluir que la medición de la asimilación de carbono es un biomarcador más rápido y sensible a los efectos del glifosato que la fluorescencia de la clorofila.

En plantas susceptibles, el glifosato inhibió la fijación de CO₂ desde los dos días post-aplicación, mientras que el transporte fotosintético de electrones no fue afectado a este tiempo post-aplicación. Además, si se evalúa la relación ETR/fijación de CO₂ a partir de las mediciones realizadas, se encuentra que a un día post-aplicación la tasa de transporte de electrones es de 9 μmol de electrones por cada μmol de CO₂ fijado mientras que a partir de los dos días post-aplicación es de 13 μmol de electrones por μmol de CO₂. Esto indica que podría haber ocurrido un re-direccionamiento de electrones hacia destinos alternativos (Fracheboud y Leipner, 2003). Probablemente, eso podría explicar los resultados de los trabajos que muestran la generación de especies reactivas del oxígeno durante post-aplicación (Orcaray *et al.*, 2012), asociada a la oxidación de lípidos y el consiguiente daño sobre las membranas celulares.

En el presente trabajo, el contenido de clorofila disminuyó a los 7 días post-aplicación en el biotipo susceptible. Por lo tanto, el daño oxidativo en plantas susceptibles tratadas con glifosato, parece ser un evento tardío y no sería la principal causa de la caída de la fotosíntesis.

Los valores absolutos de fluorescencia son dependientes de la actividad fotoquímica de la hoja y de sus propiedades ópticas, lo cual podría modificarse marcadamente con el contenido de clorofila (Barbagallo *et al.*, 2003). En el presente trabajo, el contenido de clorofila no cambió hasta los 7 días post-aplicación, además las variaciones en los parámetros de fluorescencia de la clorofila fueron detectadas previamente. Entonces, la caída en el contenido de clorofila podría ser explicada por el daño directo sobre los cloroplastos, por la degradación o perturbaciones en la biosíntesis de clorofila (Pihakaski y Pihakaski, 1980; Kitchen *et al.*, 1981).

En el biotipo resistente, una leve inhibición de la conductancia estomática fue observada a los 5 y 7 días post-aplicación. Cuando se considera el intercambio gaseoso y la actividad fotoquímica, la conductancia estomática es el único parámetro afectado

significativamente por el glifosato y esas reducciones parecen no estar mediadas por las variaciones en C_i . Los resultados obtenidos al evaluar los niveles de azúcares libres en el biotipo resistente durante la post-aplicación del herbicida, mostraron una leve tendencia de acumulación (Figura 28). Los presentes resultados sugieren que la conductancia estomática es un parámetro altamente sensible para evaluar la susceptibilidad/resistencia a glifosato en un estadio temprano, antes que los síntomas fitotóxicos sean evidentes visualmente. Esto resulta interesante debido a que la conductancia estomática podría ser fácilmente monitoreada (más sencillo que realizar mediciones de intercambio gaseoso foliar con un analizador infrarrojo de gases), bajo condiciones de campo usando un moderno porómetro.

La ausencia de alteraciones en el metabolismo del carbono podría explicar por qué no se detectaron cambios en los parámetros de fluorescencia de la clorofila de plantas resistentes a glifosato. La integridad del fotosistema II del biotipo resistente fue evidenciada por los valores de F_v/F_m , este parámetro no mostró alteraciones por efecto del herbicida. Tampoco se detectaron cambios en ETR durante todo el período post-aplicación considerado, por consiguiente no se esperó variaciones en la qP y F_v'/F_m' . Además, no se advirtió cambios en la relación ETR/fijación de CO_2 explicando la ausencia de síntomas de estrés en el biotipo resistente.

Efectos del glifosato sobre la actividad de peroxidasas y la integridad de las membranas celulares en plantas susceptibles y resistentes

Si bien la vía primaria de acción del glifosato no parece tener relación directa con la generación de estrés oxidativo, varios autores han encontrado que durante la post-aplicación de glifosato se elevan los niveles endógenos de H_2O_2 en hojas (Sergiev *et al.*, 2011) y los sistemas enzimáticos inducidos por especies reactivas del oxígeno aumentan su actividad (Cañal *et al.*, 1988; Ahsan *et al.*, 2008). No obstante, el

mecanismo por el cual el glifosato promueve el daño oxidativo no está completamente dilucidado (Sergiev *et al.*, 2011).

En función de lo expuesto, se estudiaron los efectos del glifosato sobre la actividad peroxidasa y se evaluó el daño sobre la estabilidad de las membranas celulares de plantas susceptibles y resistentes como señal de alteración por estrés oxidativo.

Efectos del glifosato sobre la actividad de peroxidasas totales

El análisis de la varianza de los datos permitió determinar que la actividad peroxidasa estuvo condicionada por el efecto del biotipo evaluado y el lapso post-aplicación (Tabla 28). En este sentido, el complejo de peroxidasas no mostró variación en su actividad a uno y dos días post-aplicación de glifosato, respecto al tiempo cero, en ambos biotipos (Figura 39). Sin embargo, a los tres días de realizado el tratamiento con el herbicida, las plantas susceptibles triplicaron la actividad de peroxidasas respecto a los niveles basales (Figura 39). A diferencia de esto, el biotipo resistente no mostró variaciones significativas en la actividad del mencionado sistema enzimático respecto a los valores hallados al inicio del tratamiento (Figura 39).

Tabla 28. Análisis de la varianza de los efectos del biotipo (susceptible y resistente), el tiempo post-aplicación de glifosato (0, 1, 2 y 3) y su interacción sobre la actividad de peroxidasas.

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	922	0,048
Tiempo post-aplicación	3	2008	<0,001
Biotipo*Tiempo post-aplicación	3	733	0,032
Error	24	212	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Estos resultados se condicen con los obtenidos por Basantani *et al.* (2011) trabajando con *Vigna radiata*. Los autores encuentran que el glifosato induce la expresión de peroxidasa reflejándose en incrementos de aproximadamente una a tres veces los niveles de actividad del control. Anteriormente, Cañal *et al.* (1988) encontraron que el glifosato incrementó la expresión de peroxidasa en *Cyperus esculentus*, entre éstas han detectado tres fracciones isoenzimáticas las cuales variarían su nivel de actividad dependiendo de la dosis de herbicida empleada.

Además, Sergiev *et al.* (2006) indicaron que en post-aplicación de glifosato, los efectos del herbicida sobre la generación de H_2O_2 en maíz no son inmediatos. Recién luego de tres días de realizado el tratamiento registraron un incremento significativo de los niveles de H_2O_2 y *a posteriori* la actividad de peroxidasa respondió alcanzando valores 10 veces superiores al del control, a los 10 días de efectuada la aplicación.

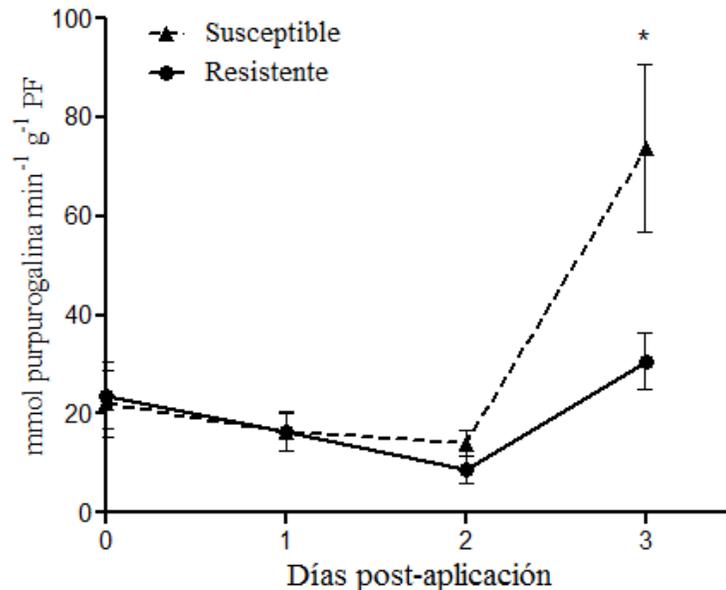


Figura 39. Actividad peroxidasa de los biotipos susceptible y resistente en post-aplicación de glifosato. Se muestran los valores promedio y las barras verticales representan el error estándar de la media. El asterisco indica diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto al correspondiente control (0 días post-aplicación).

Efectos del glifosato sobre la integridad de las membranas celulares

El daño provocado por el herbicida sobre la estabilidad de las membranas celulares dependió de la interacción entre el biotipo y el momento post-aplicación considerado (Tabla 29). En este sentido, a los tres días de realizado el tratamiento con glifosato no se detectaron efectos sobre la integridad de las membranas celulares en ninguno de los dos biotipos (Tabla 30). No obstante, a los 7 días post-aplicación, en las plantas susceptibles el daño provocado por el herbicida sobre las membranas fue significativo, alcanzando valores cercanos al 5 % de daño (Tabla 30). En contraste, el glifosato no causó alteraciones significativas sobre la integridad de las membranas del biotipo resistente a los 7 días post-aplicación (Tabla 30).

Tabla 29. Análisis de la varianza de los efectos del biotipo (susceptible y resistente), el tiempo post-aplicación de glifosato (3 y 7 días) y su interacción sobre el daño provocado en membranas celulares.

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	20,21	0,002
Tiempo post-aplicación	1	37,39	<0,001
Biotipo*Tiempo post-aplicación	1	22,15	0,001
Error	16	1,57	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Las determinaciones de liberación de electrolitos ha sido uno de las técnicas más empleadas para evaluar procesos que conducen a la pérdida de la integridad de las membranas celulares en condiciones estresantes asociadas a la aplicación de herbicidas (Chang y Kao, 1997; Sergiev *et al.*, 2006; Dayan y Watson, 2011). La membrana plasmática y las membranas subcelulares son esenciales para la compartimentalización y para que se lleven a cabo los procesos fisiológicos celulares, en ese sentido, las especies reactivas del oxígeno provocan daño sobre la integridad de las membranas (Jasper y Kangasjärvi, 2010).

Los resultados arribados en el presente trabajo indican que el glifosato afecta la estabilidad de las membranas celulares, sin embargo estos efectos se detectaron en una etapa relativamente tardía del período post-aplicación, considerado respecto a otras alteraciones descritas anteriormente. Entonces, la pérdida de integridad de las membranas podría ser un efecto secundario del glifosato mediado por la generación de especies reactivas del oxígeno.

Los resultados derivados de los presentes experimentos pueden ser explicados por las evidencias discutidas antes, al comparar la tasa fotosintética de transporte de electrones en función de la fijación de CO₂ en plantas susceptibles. El efecto inhibitorio del glifosato fue proporcionalmente mayor sobre la tasa de fijación de carbono que sobre la tasa de transporte de electrones (etapa lumínica). Por lo tanto, el diferencial de electrones que no es empleado en la asimilación de CO₂, sería derivado hacia destinos alternativos, como es la generación de especies reactivas del oxígeno. El daño oxidativo conduciría a la alteración de las membranas celulares y pigmentos, induciendo a la aparición de los primeros síntomas cloróticos perceptibles visualmente.

Las plantas resistentes, en cambio, no mostraron alteraciones significativas en la relación entre ETR/fijación de CO₂, tampoco se detectó el incremento en la expresión de peroxidasas como sistema antioxidante de defensa y no se registraron alteraciones en la integridad de las membranas.

Tabla 30. Daño provocado en la estabilidad de membranas celulares de los biotipos susceptible y resistente a glifosato a 3 y 7 días post-aplicación del herbicida. Se presentan los valores promedio expresados en porcentaje de daño \pm 1 error estándar de la media. Con asteriscos se indican diferencias significativas entre los biotipos.

Biotipo	Días post-aplicación	
	3	7
Susceptible	0,02 \pm 0,11	4,86 \pm 0,76 *
Resistente	0,12 \pm 0,30	0,75 \pm 0,74

Evaluación de la actividad in vitro de la enzima EPSPs

Las evaluaciones de la actividad *in vitro* de enzimas blanco de herbicidas en función de la concentración del principio activo inhibidor, han permitido determinar si mecanismos de resistencia dependientes del sitio activo son responsables de la baja sensibilidad en plantas resistentes (Baerson *et al.*, 2002; Burke *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010; Cruz-Hipólito *et al.*, 2011). Empleando este abordaje, se comparó la actividad de la EPSPs de los biotipos susceptible y resistente a glifosato a diferentes concentraciones del herbicida.

A partir de los datos obtenidos, los modelos fueron ajustados para cada biotipo ($P < 0,001$) y se contrastaron los parámetros que determinan el comportamiento de la actividad de la EPSPs de plantas susceptibles y resistentes. Se encontró que la asíntota inferior (C), *i. e.* el nivel de actividad a concentraciones infinitamente elevadas del inhibidor, no mostró diferencias significativas entre biotipos. Sin embargo, el parámetro D , relacionado a la actividad de EPSPs sin glifosato en el medio de reacción, difirió entre ambos biotipos de forma altamente significativa ($P = 0,0018$). Al comparar los puntos de inflexión de ambas curvas (I_{50}), entendidos como la concentración de glifosato que provocaría una reducción de la actividad enzimática al 50 % respecto a D , éstos no fueron significativamente distintos ($P = 0,93$) (Tabla 31).

Tabla 31. Parámetros del modelo de regresión no lineal de la actividad de la enzima EPSPs en función de la concentración de glifosato. Se muestra la probabilidad (P) de precisión del modelo. Con asteriscos se indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre biotipos para los parámetros del modelo:

$$\text{Actividad EPSPs (U mg}^{-1} \text{ proteína)} = C + \{(D - C)/[1 + (x/I_{50})]\}$$

Biotipo	D (U mg ⁻¹ proteína)	C (U mg ⁻¹ proteína)	I_{50} (µM glifosato)	P
Susceptible	3,2	-0,1	430,0	<0,001
Resistente	8,7*	-0,1	462,8	<0,001

Las diferencias detectadas a nivel del parámetro D , condicionan un comportamiento contrastante entre las curvas de actividad de la EPSPs del biotipo

resistente respecto al susceptible (Figura 40). En ausencia de glifosato en el medio de reacción, las plantas resistentes presentaron una actividad de EPSPs aproximadamente tres veces mayor respecto a las susceptibles (Figura 40). Sin embargo, la respuesta relativa de la actividad enzimática a las concentraciones crecientes de herbicida, fueron similares y ambas resultaron proporcionalmente inhibidas por el glifosato sin diferencias significativas. En este sentido, al determinar el factor de resistencia (IR), resultante de la relación de las concentraciones I_{50} del biotipo resistente respecto al susceptible, se encuentra que esta razón es de 1,07. Esto indica que la enzima EPSPs de ambos biotipos no muestra una sensibilidad diferencial al glifosato. Entonces, las plantas resistentes no presentarían una alteración del sitio activo capaz de condicionar la interacción entre la EPSPs y la molécula de glifosato, como se ha encontrado en otros casos de resistencia a este herbicida (Ng *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2007; Simarmata y Penner, 2008; Kaundun *et al.*, 2011).

La actividad enzimática diferencial entre biotipos susceptibles y resistentes sería la responsable de la contrastante sensibilidad de las plantas al glifosato. En la Figura 40 se observa que a una concentración de 1000 μM de herbicida, la EPSPs del biotipo resistente alcanzó un nivel de actividad similar al detectado en el biotipo susceptible sin glifosato en el medio. Por lo tanto, podría pensarse que a dosis del herbicida que resultarían altamente inhibitorias de la actividad EPSPs en las plantas susceptibles, el biotipo resistente podría mantener la ruta del ácido shíkímico activa.

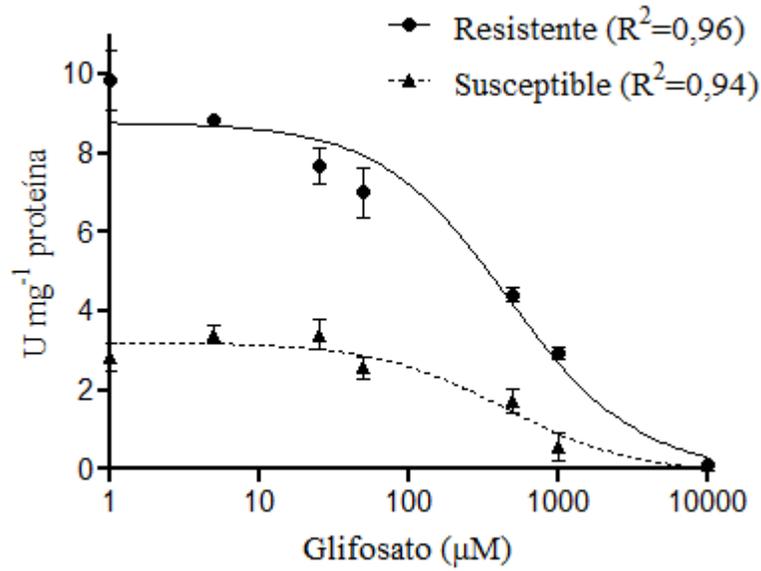


Figura 40. Actividad de la enzima EPSPs de los biotipos resistente y susceptible a glifosato en función de la concentración de herbicida. Los símbolos indican los valores promedio, las barras verticales representan el error estándar de la media y las curvas muestran el modelo ajustado para cada biotipo.

Estos resultados son consistentes con los publicados recientemente por Salas *et al.* (2012) estudiando una población estadounidense de ryegrass. Los autores encuentran que las plantas resistentes presentan una actividad basal de la EPSPs de entre tres y seis veces la detectada en plantas susceptibles. Asimismo, en concordancia a lo hallado en el presente trabajo, estos investigadores no encuentran diferencias entre plantas resistentes y susceptibles respecto a la concentración de inhibición media (I_{50}).

En algunos trabajos donde se ha documentado que la resistencia a glifosato de ciertas malezas se debe a una mayor actividad de la enzima blanco, se encontró que la causa de la elevada actividad enzimática fue el incremento del número de copias del gen EPSPs, respecto a controles susceptibles (Gaines *et al.*, 2011; Salas *et al.*, 2012). Sin embargo, existen otras vías por las cuáles ciertas plantas resistentes han mostrado una elevada actividad basal de la EPSPs como es el incremento de la tasa de transcripción del gen (Smart *et al.*, 1985) ó la mayor estabilidad de la enzima, asociada

a una menor tasa de recambio (Smart *et al.*, 1985). No obstante, la mayoría de los casos de resistencia a glifosato generados a partir del cultivo *in vitro* de tejidos en presencia del herbicida, se han debido a la sobreproducción de la EPSPs silvestre, mediante la amplificación del número copias del gen (Pline-Srnic, 2006). En este sentido, Salas *et al.* (2012), estudiando plantas de ryegrass de variable sensibilidad a glifosato, encontraron una correlación positiva entre el número de copias del gen EPSPs y el nivel de actividad enzimática.

La elevada actividad de la EPSPs del biotipo resistente explica por qué el glifosato no provoca la muerte de la planta a la dosis recomendada. En tal sentido, el herbicida no llegaría a alterar el crecimiento de tejidos meristemáticos debido a que la alta actividad de la EPSPs permitiría sostener la funcionalidad de la vía del shikimato, pese a los efectos inhibitorios del glifosato sobre una fracción enzimática respecto al total de la EPSPs expresada. Por lo tanto, como se evidencia en este trabajo, la demanda de asimilados desde los tejidos en activo crecimiento se mantiene, no se induce la acumulación de azúcares en hojas y, en consecuencia, no se inhibe la fijación de CO₂. Esto garantiza la estabilidad de la relación entre la tasa fotosintética de transporte de electrones y la asimilación de carbono durante post-aplicación. En estas condiciones, la generación de especies reactivas de oxígeno, su daño sobre la integridad de las membranas y sobre los pigmentos clorofilianos no se detecta y, en tanto, la planta sobrevive al herbicida.

Bases genéticas de la resistencia a glifosato

Recuento cromosómico y estimación de diferencias en el contenido de ADN nuclear en biotipos resistentes y susceptibles a glifosato

La variación en el nivel de ploidía y en el contenido nuclear de ADN se ha correlacionado con un amplio rango de caracteres fenotípicos en diversas especies vegetales (Bennett, 1987). La mayoría de las principales malezas son poliploides y al tener más copias de cada gen, respecto a las diploides, podrían presentar mayor diversidad genética (Gressel, 2009).

Dentro del género *Lolium* todas sus especies son diploides con un número cromosómico de $2n=14$ (Bennett *et al.*, 2000). Sin embargo, a partir del descubrimiento del efecto de la colchicina en la duplicación del número cromosómico (Myers, 1939), se han obtenido materiales de ryegrass autotetraploides estabilizados en búsqueda de mejorar sus características forrajeras (Ahloowalia, 1967).

Las plantas tetraploides de *Lolium perenne* presentan semillas más grandes (Nair, 2004), menor número de macollos, hojas más grandes y mayor contenido de clorofila (Sugiyama, 1998). Estos materiales han mostrado requerimientos superiores, exigiendo suelos más fértiles para expresar su potencial de crecimiento y han resultado ser más competitivos que los cultivares diploides pero menos tolerantes al estrés hídrico y a las bajas temperaturas (Sugiyama, 1998; Sugiyama 2006).

Por otra parte, la variación en el contenido de ADN, directamente relacionado al nivel de ploidía, ha sido ampliamente estudiada por su asociación a cambios evolutivos, sin embargo las causas y consecuencias de las alteraciones genómicas a nivel de los cromosomas han recibido menor atención (Ryan Gregory, 2001). El tamaño del genoma, entendido como la cantidad total de ADN nuclear (Ryan Gregory, 2001), ha sido estrechamente relacionado a la adaptabilidad y éxito reproductivo de las plantas (Humphreys, 1991).

El objetivo de los experimentos de esta sección fue determinar si la variación en la sensibilidad a glifosato está asociada a variaciones en el tamaño del genoma, ya sea a partir de diferencias en el nivel de ploidía o en la cantidad de ADN nuclear de plantas susceptibles y resistentes a glifosato.

Dotación cromosómica de plantas susceptibles y resistentes a glifosato

A partir del recuento cromosómico de plantas medio hermanas de distinta sensibilidad a glifosato, se determinó que la resistencia a glifosato no está asociada al nivel de ploidía de los materiales (Figura 41). En todos los casos, el número cromosómico fue $2n=14$, coincidiendo con los valores de los ecotipos silvestres evaluados en distintos trabajos (Jain, 1957; Ahloowalia, 1965; Bennett *et al.*, 2000).

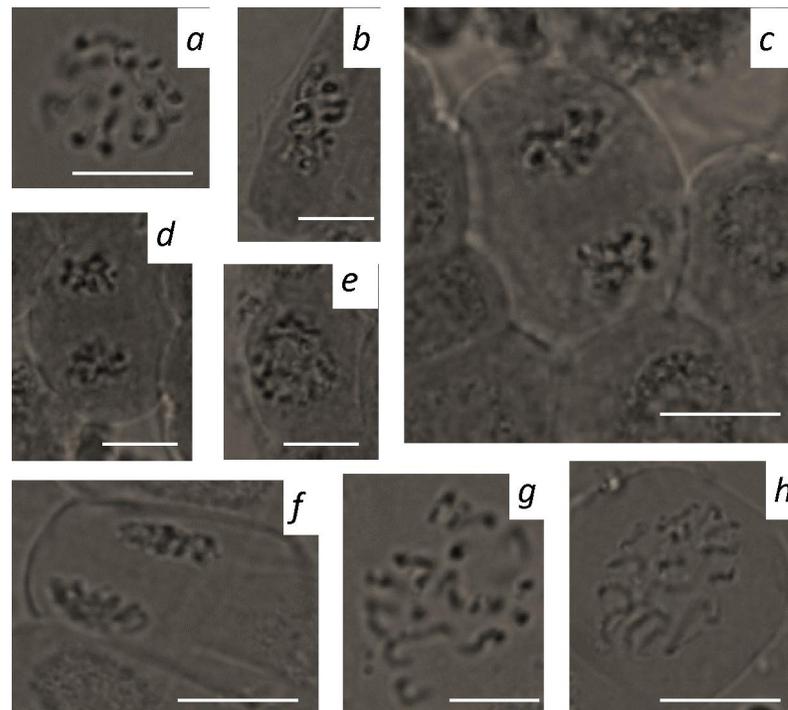


Figura 41. Células de *Lolium perenne* en división mitótica: biotipo susceptible en metafase (a y h) y anafase (d y f) y biotipo resistente en metafase (b, e y g) y anafase (c). Las barras representan 10 μm (600x).

La relación entre la dotación cromosómica y la resistencia a herbicidas ha sido estudiada en *Paspalum notatum*. En una población de esa especie, el nivel de ploidía condiciona su sensibilidad a un herbicida inhibidor de la acetolactato sintasa. Las plantas tetraploides son resistentes a metsulfurón, mientras que los materiales diploides resultan susceptibles (Bunnell *et al.*, 2003).

Como se citó antes, Salas *et al.* (2012) encuentran que el incremento en el número de copias del gen de la EPSPs en ryegrass, está relacionado a la resistencia a glifosato. Asimismo, estos autores indican que debería estudiarse si la existencias de múltiples copias del gen podría ser atribuida a la duplicación del material genético. Sin embargo, en la población de estudio del presente trabajo esa posibilidad es descartada debido a que no se encontró relación entre la sensibilidad a glifosato de los materiales y el nivel de ploidía.

Estimación del contenido de ADN nuclear de plantas susceptibles y resistentes

Si bien el número cromosómico entre plantas evolutivamente cercanas puede ser el mismo, las variaciones en el contenido de ADN nuclear puede ser significativamente distinto (Vogel *et al.*, 1999). En relación a esto, dentro del género *Lolium* existen especies que comparten la misma dotación cromosómica ($2n=2x=14$) como *L. perenne* y *L. temulentum*, sin embargo la cantidad de ADN nuclear de la última especie es, aproximadamente, 50 % mayor respecto a *L. perenne* (Hutchinson *et al.*, 1979; Seal y Rees, 1982). En el presente trabajo, se encontraron diferencias significativas en el contenido de ADN de las plantas estudiadas (Tabla 32). Sugiyama *et al.* (2002) detectaron que la variación intra-específica en el contenido de ADN de *L. perenne* tendría un importante rol en la determinación de varias diferencias fenotípicas. Esos autores indicaron que el contenido de ADN se correlacionó positivamente con el tamaño de las células de la epidermis, el área foliar de una hoja individual y el peso de las semillas.

Tabla 32. Análisis de la varianza del contenido de ADN nuclear de seis plantas de *Lolium perenne* de la población problema.

Fuente de variación	GL	CM	P
Planta	5	461	0,011
Error	12	95	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Al estimar el contenido de ADN nuclear de plantas susceptibles y resistentes a glifosato en el presente trabajo, se encontró que la sensibilidad al herbicida no explica la variación en la cantidad de ADN (Tabla 33). Los resultados concuerdan con Culpepper *et al.* (2006), quienes empleando la misma metodología, estudiaron plantas de *Amaranthus palmeri* de distinta sensibilidad a glifosato y no encontraron asociación entre el contenido de ADN nuclear y la respuesta al herbicida.

En otras especies resistentes a herbicidas tampoco se ha encontrado relación entre el contenido de ADN y la sensibilidad al herbicida. Puri *et al.* (2007) indicaron que las variaciones en el nivel de ploidía y la cantidad de ADN nuclear de *Hydrilla verticillata* no explican la sensibilidad de esta maleza acuática a fluridone.

Tabla 33. Análisis de la varianza de los efectos del biotipo (susceptible y resistente) sobre el contenido de ADN nuclear.

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	144	0,41
Error	16	206	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

A partir de ciertas modelizaciones, se ha determinado que el nivel de ploidía condicionaría la evolución de la resistencia a herbicidas de las malezas (Gressel y Segel, 1978). Huertas *et al.* (2010) encontraron que la capacidad de ciertas especies del fitoplancton de adaptarse y crecer en presencia de simazina, depende del nivel de ploidía. Los investigadores demostraron que los organismos haploides responden a la

selección más rápidamente que los diploides debido a que en los primeros, las mutaciones no neutrales son expresadas inmediatamente. Por lo tanto, los resultados presentados en esta sección son de importancia al momento de abordar e interpretar las bases genéticas de la herencia de la resistencia a glifosato.

Cruzamientos dirigidos entre plantas susceptibles y resistentes de Lolium perenne

A partir del análisis de la progenie de cuatro años consecutivos de cruzamientos forzados se llegó a determinar un modelo de herencia de la resistencia a glifosato. Estos aspectos son de importante trascendencia para interpretar la evolución de la resistencia y condicionan el manejo de las plantas resistentes en la región problema (Gressel y Segel, 1978; Powles y Yu, 2010).

Auto-incompatibilidad y auto-fertilidad en Lolium perenne

Durante el año 2009 y 2010 se forzó la autofecundación de 10 plantas resistentes (seleccionadas por su supervivencia a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹), descendientes de la población problema. Cuatro de estas plantas resultaron completamente auto-incompatibles debido a que no se llegó a obtener ninguna semilla. Sin embargo, las 6 plantas restantes presentaron cierto grado de auto-compatibilidad llegando a cosechar entre 12 y 39 semillas viables de cada planta.

Estudios pioneros que abordaron la genética de *Lolium perenne*, han determinado que esta planta sería alógama obligada debido al elevado nivel de auto-incompatibilidad, determinado por un sistema gametofítico controlado por dos genes *S* y *Z* (Spoor, 1976; Cornish *et al.*, 1979; Fearon *et al.*, 1983). Para ambos locus, *S* y *Z*, existen múltiples alelos y la incompatibilidad ocurre cuando el par de alelos *S* - *Z* del polen coincide con la misma combinación alélica del estigma (Lawrence *et al.*, 1983).

Pese a este estricto sistema que garantizaría la alogamia, existen antecedentes que indican distorsiones en la segregación esperada, considerando el modelo *S - Z* (Thorogood *et al.*, 2002). En este sentido, forzando la autofecundación de ciertos materiales de ryegrass se han obtenido algunas semillas viables (Jenkin, 1924), indicando que la alogamia no es obligada.

Por otra parte, a partir de los primeros resultados de auto-compatibilidad, la auto-fertilidad del *Lolium perenne* ha despertado el interés agronómico (Jones y Jenabzadeh, 1981). Actualmente, se conoce que existe un gen *T* de auto-compatibilidad que resulta independiente del par *S - Z* y cuya variante dominante permite la auto-fertilidad (Thorogood *et al.*, 2005; Manzanares, 2013).

Estos antecedentes sustentan los resultados obtenidos en el presente trabajo dado que al forzar la autofecundación de las mencionadas plantas, varios genotipos han mostrado auto-compatibilidad (Tabla 34). Esto ha permitido evaluar modelos de herencia de la resistencia a glifosato realizando, además, cruzamientos dirigidos entre individuos determinados. Otros trabajos en distintos materiales de *Lolium spp.* resistente a glifosato, han establecido el modo de herencia de la resistencia sin castrar las plantas empleadas como madre, subestimando la probable auto-compatibilidad de ciertos genotipos (Lorraine-Colwill *et al.*, 2001; Simarmata *et al.*, 2005).

El alto grado de alogamia detectado en *Lolium spp.*, tendría gran importancia en la evolución de poblaciones hacia la resistencia a herbicidas, al favorecer la capacidad de recombinación de factores genéticos trascendentes para la supervivencia de las plantas en post-aplicación (Delye *et al.*, 2013). En experimentos conducidos sobre especies autógamas bajo presión de selección con glifosato, no se ha podido incrementar el nivel de resistencia de la población a pesar de la variación genética inicial en la sensibilidad al herbicida (Brotherton *et al.*, 2007). Por lo tanto, el elevado grado de alogamia resultaría imprescindible al momento de explicar la evolución de la resistencia en *L. perenne*, no obstante la auto-compatibilidad debe ser considerada e incluida en el análisis cuando se desea evaluar la herencia de la resistencia.

Herencia de la resistencia a glifosato

Las plantas de la descendencia de la población problema seleccionadas por su resistencia a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹, fueron auto-fecundadas para evaluar *a posteriori* la sensibilidad a glifosato de la progenie. En este sentido, se encontró segregación en la descendencia de cada planta, donde la mayoría de los individuos presentaron el mismo fenotipo que la planta que le dio origen, sobreviviendo a dosis de glifosato de 750 y 1000 g (ea) ha⁻¹ (resistencia moderada ó intermedia). Aquellas plantas resistentes a 750 g (ea) ha⁻¹ también lo fueron a 1000 g (ea) ha⁻¹. En tanto, se detectaron plantas susceptibles a 750 g (ea) ha⁻¹ y otras resistentes a dosis de glifosato de hasta 3000 g (ea) ha⁻¹ (resistencia elevada). Esta segregación indica que las plantas seleccionadas no resultaron ser homocigotas respecto al carácter “resistencia a glifosato”.

En función de estos resultados, se evaluó el ajuste de un modelo de dominancia intermedia donde la resistencia a glifosato está regulada por un gen mayor (Tabla 34). También, se consideraron otros modelos donde la resistencia resulta del efecto epistático de dos genes que darán tres fenotipos diferenciables: susceptibilidad, resistencia intermedia (sobreviviente hasta 1000 g (ea) ha⁻¹) y resistencia elevada (sobreviviente hasta 3000 g (ea) ha⁻¹). Entre esas interacciones génicas se evaluó la epistasis recesiva (9:3:4, respectivamente), epistasis dominante (12:3:1) y epistasis doble dominante con efecto acumulativo (9:6:1). En estos casos de interacción, la prueba de χ^2 indicó que las frecuencias observadas difirieron significativamente de las esperadas (valor de χ^2 para epistasis recesiva: 124,8 ($P < 0,001$); epistasis dominante: 202,4 ($P < 0,001$) y epistasis doble dominante con efecto acumulativo: 90,7 ($P < 0,001$)). En consecuencia, se descartó la posibilidad de que la interacción entre dos genes explique la variación en la sensibilidad a glifosato.

Cuando la segregación se estudió bajo el modelo que determina que un gen con dominancia intermedia controla la resistencia a glifosato, esperando una relación 1:2:1 (susceptibilidad, resistencia intermedia y resistencia elevada) en la descendencia, se encontró que no hay evidencia estadística que permita descartar la

hipótesis nula planteada. En tanto, las frecuencias observadas no son significativamente distintas a las frecuencias esperadas a partir del modelo indicado y los desvíos entre éstas frecuencias se deben al azar (Tabla 34).

Tabla 34. Progenie obtenida de la autofecundación de plantas (sobrevivientes a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹) descendientes de la población problema. Sensibilidad a glifosato de la progenie y prueba de χ^2 según el modelo determinado por un gen *R* de dominancia intermedia.

<i>Progenitor</i>		<i>Susceptible</i>	<i>Resistencia intermedia</i>	<i>Resistencia elevada</i>	<i>Total</i>	<i>P</i>
Ri10-1 x Ri10-1	Observado	10	16	4	30	
<i>RR' x RR'</i>	Esperado	7,5	15	7,5	30	
	(1:2:1)					
	χ^2	0,83	0,06	1,63	2,52	0,28
Ri10-3 x Ri10-3	Observado	6	9	4	19	
<i>RR' x RR'</i>	Esperado	4,75	9,5	4,75	19	
	(1:2:1)					
	χ^2	0,32	0,02	0,11	0,45	0,79
Ri10-5 x Ri10-5	Observado	6	23	10	39	
<i>RR' x RR'</i>	Esperado	9,75	19,5	9,75	39	
	(1:2:1)					
	χ^2	1,44	0,62	0,006	2,07	0,35
Ri10-7 x Ri10-7	Observado	1	7	4	12	
<i>RR' x RR'</i>	Esperado	3	6	3	12	
	(1:2:1)					
	χ^2	1,33	0,16	0,16	1,66	0,43
Ri11-1 x Ri11-1	Observado	7	10	2	19	
<i>RR' x RR'</i>	Esperado	4,75	9,5	4,75	19	
	(1:2:1)					
	χ^2	1,06	0,02	1,59	2,67	0,26
Ri11-2 x Ri11-2	Observado	3	8	4	15	
<i>RR' x RR'</i>	Esperado	3,75	7,5	3,75	15	
	(1:2:1)					
	χ^2	0,15	0,03	0,01	0,19	0,9

Susceptible (*RR*): controlada a 750 g (ea) ha⁻¹.

Resistencia intermedia (*RR'*): sobreviviente a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹.

Resistencia elevada (*R'R'*): sobreviviente a dosis de hasta 3000 g (ea) ha⁻¹.

Además, se evaluó el posible efecto materno sobre la descendencia respecto a la resistencia a glifosato. En la Tabla 35, Tabla 36 y Tabla 37, se presentan los resultados de la sensibilidad a glifosato de la progenie de cruzamientos dirigidos entre

plantas con resistencia intermedia y susceptibles y los correspondientes cruzamientos recíprocos. Se encontró que no existe efecto materno al considerar el mencionado carácter, debido a que no se encontraron diferencias en la segregación entre cruzamientos recíprocos. Entonces, considerando los posibles efectos maternos sobre la progenie (Roach y Wulff, 1987), se descarta la posibilidad de que genes extra-nucleares de herencia citoplasmática codifiquen la baja sensibilidad al herbicida. Asimismo, se desestima que genes nucleares maternos condicionen la resistencia a glifosato de la progenie durante la embriogénesis.

Al cruzar una planta de elevada resistencia ($R'R'$, seleccionada de la progenie obtenida por autofecundación de la planta Ri10-5) por una susceptible a glifosato (RR , seleccionada de las descendientes obtenidas por autofecundación de Ri10-1), se encontró una descendencia homogénea respecto al nivel de sensibilidad al herbicida. Toda la progenie mostró resistencia intermedia a glifosato (*i. e.* sobrevivieron a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹) (Tabla 35). Esta población constituye la F₁ y, según el modelo de herencia empleado, el genotipo de las plantas sería RR' .

Cuando se cruzaron distintas plantas de resistencia intermedia a glifosato, la progenie presentó la misma segregación ($1:2:1$) que la obtenida de la autofecundación de fenotipos de resistencia intermedia (Tabla 35). Estos resultados sugieren que las plantas que resultan resistentes hasta una dosis de 1000 g (ea) ha⁻¹, son heterocigotas para el carácter (RR'). Por tanto, la población obtenida del cruzamiento de dos plantas de resistencia intermedia o la progenie obtenida por autofecundación segregan con la relación esperada en una F₂.

Además, se cruzó una planta susceptible (Sa11), seleccionada de la descendencia de la autofecundación de Ri10-1 (Tabla 34), con otra planta susceptible proveniente de la población problema (Sb11). Toda la descendencia resultó ser susceptible al glifosato manteniendo el mismo nivel de sensibilidad al herbicida que los padres (Tabla 35). El carácter de resistencia no estaría enmascarado por el alelo de susceptibilidad, confirmando los resultados esperados a partir del modelo planteado

de dominancia incompleta, pues ninguno de los dos alelos (resistente y susceptible) resultaría completamente dominante sobre el otro.

Tabla 35. Progenie obtenida a partir de cruzamientos dirigidos entre plantas con resistencia elevada (Ra11), resistencia intermedia (Ri11-1 y Ri11-2) y susceptibles (Sa11 y Sb11). Sensibilidad a glifosato de la progenie y prueba de χ^2 según el modelo determinado por un gen *R* de dominancia intermedia.

Cruzamiento		Susceptible	Resistencia intermedia	Resistencia elevada	Total	<i>P</i>
Ra11 x Sa11	Observado	0	26	0	26	
<i>R'R' x RR</i>	Esperado	0	26	0	26	
	(1)					
	χ^2	0	0	0	0	1
Ri11-1 x Ri11-2	Observado	13	24	11	48	
<i>RR' x RR'</i>	Esperado	12	24	12	48	
	(1:2:1)					
	χ^2	0,08	0	0,08	0,16	0,92
Ri11-2 x Ri11-1	Observado	4	13	2	19	
<i>RR' x RR'</i>	Esperado	4,75	9,5	4,75	19	
	(1:2:1)					
	χ^2	0,11	1,28	1,59	2,98	0,22
Sb11 x Sa11	Observado	17	0	0	17	
<i>RR x RR</i>	Esperado	17	0	0	17	
	(1)					
	χ^2	0	0	0	0	1

Susceptible (*RR*): controlada a 750 g (ea) ha⁻¹.

Resistencia intermedia (*RR'*): sobreviviente a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹.

Resistencia elevada (*R'R'*): sobreviviente a dosis de hasta 3000 g (ea) ha⁻¹.

Posteriormente, se realizó el cruzamiento de una planta con resistencia intermedia (Re12) y una susceptible (Sc12). En su descendencia se encontraron los mismos fenotipos que los paternos en una segregación 1:1, independientemente del material empleado como madre (Tabla 36; Figura 42). Estos resultados fueron consistentes con los esperados a partir del modelo planteado.

Por otra parte, cuando se forzó la autofecundación de la planta moderadamente resistente (Re12), se obtuvo una descendencia segregante ajustada a la proporción 1:2:1 donde la mayor parte de la progenie presentó la misma sensibilidad a glifosato que el progenitor (*RR'*) (Tabla 36). Asimismo, se encontraron

plantas con elevado nivel de resistencia ($R'R'$) y susceptibles a glifosato (RR) (Tabla 36).

Tabla 36. Progenie obtenida por autofecundación y cruzamientos dirigidos entre un clon de resistencia intermedia (Re12) y uno susceptible (Sc12). Sensibilidad a glifosato de la progenie y prueba de χ^2 según el modelo determinado por un gen R de dominancia intermedia.

Cruzamiento/progenitor		Susceptible	Resistencia intermedia	Resistencia elevada	Total	P
Re12 x Sc12	Observado	39	40	0	79	
$RR' \times RR$	Esperado	39,5	39,5	0	79	
	(1:1)					
	χ^2	$6 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	0	0,0001	0,99
Sc12 x Re12	Observado	21	27	0	48	
$RR \times RR'$	Esperado	24	24	0	48	
	(1:1)					
	χ^2	0,37	0,37	0	0,75	0,68
Re12 x Re12	Observado	5	11	3	19	
$RR' \times RR'$	Esperado	4,75	9,5	4,75	19	
	(1:2:1)					
	χ^2	0,01	0,23	0,64	0,88	0,64

Susceptible (RR): controlada a 750 g (ea) ha⁻¹.

Resistencia intermedia (RR'): sobreviviente a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹.

Resistencia elevada ($R'R'$): sobreviviente a dosis de hasta 3000 g (ea) ha⁻¹.

Finalmente, al repetir los cruzamientos y auto-fecundaciones descriptos previamente a partir de plantas seleccionadas de la descendencia del cruzamiento Re12 x Sc12 y su recíproco (Tabla 36), se obtuvieron resultados consistentes a los mostrados antes. Segregaciones 1:1 de individuos susceptibles y moderadamente resistentes fueron obtenidas al cruzar plantas de resistencia intermedia (RR') por susceptibles (RR) (Tabla 37). En tanto, la autofecundación de plantas susceptibles dieron toda la descendencia susceptible a glifosato (Tabla 37; Figura 43) y la progenie de los fenotipos de resistencia intermedia (RR') presentaron una segregación 1:2:1 producto de la autofecundación (Tabla 37; Figura 43). Por último, la descendencia obtenida de la autofecundación de una planta altamente resistente ($R'R'$) fue toda resistente al mismo nivel que el progenitor (Tabla 37; Figura 43).



Figura 42. Progenie de Re12 x Sc 12 tratada con una dosis de glifosato de 750 g (ea) ha⁻¹ a 15 días post-aplicación: plantas sobrevivientes (izquierda) y controladas (derecha).

Tabla 37. Progenie obtenida por autofecundación y cruzamientos dirigidos entre plantas de resistencia intermedia (Ri13-1, Ri13-2 y Ri13-3), resistencia elevada (Re13) y susceptibles (Sc13-1 y Sc13-2). Sensibilidad a glifosato de la progenie y prueba de χ^2 según el modelo determinado por un gen *R* de dominancia intermedia.

Cruzamiento/progenitor		Susceptible	Resistencia intermedia	Resistencia elevada	Total	<i>P</i>
Ri13-1 x Sc13-1 <i>RR' x RR</i>	Observado	7	5	0	12	
	Esperado (1:1)	6	6	0	12	
	χ^2	0,16	0,16	0	0,33	0,84
Sc13-1 x Ri13-1 <i>RR x RR'</i>	Observado	13	12	0	25	
	Esperado (1:1)	12,5	12,5	0	25	
	χ^2	0,02	0,02	0	0,04	0,98
Sc13-1 x Sc13-1 <i>RR x RR</i>	Observado	6	0	0	6	
	Esperado (1)	6	0	0	6	
	χ^2	0	0	0	0	1
Sc13-2 x Sc13-2 <i>RR x RR</i>	Observado	8	0	0	8	
	Esperado (1)	8	0	0	8	
	χ^2	0	0	0	0	1
Re13 x Re13 <i>R'R' x R'R'</i>	Observado	0	0	9	9	
	Esperado (1)	0	0	9	9	
	χ^2	0	0	0	0	1
Ri13-1 x Ri13-1 <i>RR' x RR'</i>	Observado	4	7	2	13	
	Esperado (1:2:1)	3,25	6,5	3,25	13	
	χ^2	0,17	0,03	0,48	0,68	0,71
Ri13-2 x Ri13-2 <i>RR' x RR'</i>	Observado	3	4	4	11	
	Esperado (1:2:1)	2,75	5,5	2,75	11	
	χ^2	0,02	0,4	0,56	1	0,6
Ri13-3 x Ri13-3 <i>RR' x RR'</i>	Observado	3	5	4	12	
	Esperado (1:2:1)	3	6	3	12	
	χ^2	0	0,16	0,33	0,5	0,77

Susceptible (*RR*): controlada a 750 g (ea) ha⁻¹.

Resistencia intermedia (*RR'*): sobreviviente a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹.

Resistencia elevada (*R'R'*): sobreviviente a dosis de hasta 3000 g (ea) ha⁻¹.



Figura 43. Progenie tratada con una dosis de glifosato de 750 g (ea) ha⁻¹ a 15 días post-aplicación: descendientes de Re13 x Re13 (izquierda), Ri13-1 x Sc13-1 (centro) y Sc13-2 x Sc13-2 (derecha).

Los presentes resultados indican que la resistencia a glifosato de la población problema de *Lolium perenne*, estaría regulada por un gen nuclear de herencia mendeliana con dominancia incompleta, transmitido por el polen y sin efectos de herencia citoplasmática. Estos resultados coinciden con las evidencias obtenidas a partir de una población australiana de *Lolium rigidum* resistente a glifosato (Lorraine-Colwill *et al.*, 2001). Los autores indican que un gen semi-dominante codifica la resistencia a glifosato. Sin embargo, no se descarta que otros genes tengan cierta importancia en la supervivencia de la planta cuando es tratada con bajas dosis del herbicida (Lorraine-Colwill *et al.*, 2001).

Trabajando con *L. multiflorum* del sur de Brasil, Vargas *et al.* (2007) encontraron que en la F₁ la resistencia a glifosato presentaba una respuesta intermedia respecto a los padres susceptible y resistente. Estos investigadores emplearon una dosis de glifosato de 720 g (ea) ha⁻¹ para discriminar entre plantas susceptibles y medianamente resistentes, similar a la empleada en el presente trabajo. Asimismo, usando esa dosis de glifosato, en la F₂ hallaron una segregación 3:1 de

resistentes:susceptibles sugiriendo que un único gen sería el responsable de la resistencia al herbicida.

En diferentes especies resistentes a glifosato, más allá del género *Lolium*, como *Eleusine indica* y *Conyza canadensis*, se ha demostrado que la resistencia al herbicida estaría regulada por el genoma nuclear y resultaría parcialmente dominante sobre la susceptibilidad (Ng *et al.*, 2004a; Zelaya *et al.*, 2004). Sorprendentemente, diferentes mecanismos de resistencia serían los responsables de la supervivencia de las plantas pero compartirían el mismo tipo de herencia.

En el caso de *Eleusine indica*, el gen de resistencia estaría relacionado a una variante resistente de la enzima EPSPs que presenta una mutación puntual (Baerson *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2004b). Por otra parte, la base de la resistencia en *Conyza canadensis* parece ser un mecanismo de secuestro del herbicida en la vacuola (Ge *et al.*, 2010).

En *Amaranthus palmeri* resistente a glifosato, el incremento en el número copias del gen que codifica la EPSPs es la base de la resistencia, este rasgo se heredó como un carácter monogénico en más del 50 % de los casos estudiados (Chandi *et al.*, 2012). Sin embargo, en esa misma especie, también existen antecedentes donde la resistencia a glifosato parece ser poligénica (Chandi *et al.*, 2012; Mohseni-Moghadam *et al.*, 2013).

Simarmata *et al.* (2005) al estudiar una población de *Lolium rigidum* resistente a glifosato de Norteamérica, encuentran que la resistencia dependería del efecto de dos genes. En la F₂ encuentran una segregación 1:14:1, donde los fenotipos extremos poseen la misma sensibilidad a glifosato que las plantas que le dieron origen a la F₁: una planta susceptible a una dosis 8 veces menor a la recomendada y otra resistente a una dosis 8 veces mayor a la recomendada. En tanto, la mayor parte de la progenie mostró un grado intermedio de sensibilidad al glifosato.

Por otra parte, estudios realizados en Australia sobre varias poblaciones de ryegrass resistente a glifosato, han demostrado que en la mayoría de los materiales la

resistencia se heredó como un carácter regulado por un gen nuclear. Sin embargo, el grado de dominancia del gen resistente presentaría cierta variación, que iría desde la dominancia intermedia a la dominancia completa, dentro de las dosis de glifosato probadas (Wakelin y Preston, 2006b).

Si bien los resultados demuestran que el gen de resistencia a glifosato en la población estudiada en el presente trabajo no es totalmente dominante, a las dosis normalmente empleadas en condiciones de campo, las plantas heterocigotas muestran suficiente insensibilidad al herbicida como para sobrevivir a las aplicaciones. Como concluyen Lorraine-Colwill *et al.* (2001), a las dosis recomendadas a campo, el gen de resistencia podría mostrarse como un carácter dominante.

Gressel (2009) ha indicado que es necesario emplear múltiples dosis de herbicida para poder interpretar la herencia de la resistencia discriminando entre casos de resistencia monogénica o poligénica. Cuando se emplea una única dosis de herbicida, relativamente baja, los efectos de múltiples factores podrían presentar una segregación similar a la de un único gen mayor. Sin embargo, al incrementar la dosis podrían detectarse los efectos de varios genes. En este sentido, en el presente trabajo se emplearon tres dosis de glifosato para caracterizar la descendencia de los cruzamientos dirigidos.

En función de los aspectos de la herencia de la resistencia a glifosato y el elevado grado de alogamia que presenta *L. perenne*, bajo una continua presión de selección con el herbicida, la frecuencia de plantas resistentes podría incrementarse en unas pocas generaciones. Esto explicaría la evolución de la resistencia a glifosato en esta población, luego de 12 años de uso del herbicida, como se indicó antes, y la difusión del problema en la región.

Herencia de la resistencia en híbridos de Lolium multiflorum x Lolium perenne

Como se indicó al inicio de este trabajo, tanto *Lolium multiflorum* como *L. perenne* son especies con alto grado de alogamia y existen antecedentes respecto a la

capacidad de generar híbridos espontáneamente (Ellstrand y Hoffman, 1990). Ambas especies son malezas frecuentes en el sur de la provincia de Buenos Aires y tanto *L. perenne* como *L. multiflorum* han resultado ser problemáticas en los últimos años por su resistencia a herbicidas (Vigna *et al.*, 2008; Diez de Ulzurrun y Leaden, 2012; Yanniccari *et al.*, 2012).

Dilucidada la herencia de la resistencia a glifosato en *L. perenne*, se evaluó la capacidad del carácter de ser transmitido a la descendencia híbrida mediado por el polen. En esta vía, al forzar el cruzamiento de *L. multiflorum* x *L. perenne* (resistente R'R', Re13) sólo un 20 % de las plantas dieron descendencia viable. En total, se consiguió obtener 10 plantas híbridas que fueron evaluadas según su sensibilidad a glifosato.

Al estado de macollaje, los híbridos presentaron caracteres intermedios en cuanto al largo y ancho de las láminas foliares y producción de biomasa aérea (Figura 44). En floración, otros caracteres mostraron rasgos intermedios en el híbrido: número de espiguillas por espiga (*L. perenne*: 17,5; *L. multiflorum*: 27,5 e híbrido: 20,7), número de flores por espiguilla (*L. perenne*: 5, *L. multiflorum*: 13,5 e híbrido: 9,3), longitud de las glumas (*L. perenne*: 11 mm, *L. multiflorum*: 7 mm e híbrido: 9 mm) y presencia de aristas (*L. perenne*: sin arista; *L. multiflorum*: aristado e híbrido: flores del tercio apical brevemente aristadas) (Figura 45).

Los marcadores morfológicos son de gran utilidad para la detección de híbridos entre *L. perenne* y *L. multiflorum* por su robustez y su sencilla determinación (Deniz y Dogru, 2007). Ryan *et al.* (2006) emplearon el carácter presencia/ausencia de aristas conjuntamente con marcadores moleculares (microsatélites) para detectar hibridaciones entre ambas especies de ryegrass.



Figura 44. Plantas de *Lolium perenne* (izquierda), descendencia híbrida de *L. multiflorum* x *L. perenne* (centro) y *L. multiflorum* (derecha).



Figura 45. Espigas de *Lolium perenne* (izquierda), descendencia híbrida de *L. multiflorum* x *L. perenne* (centro) y *L. multiflorum* (derecha).

Cuando las plantas presentaban de dos a tres macollos, se evaluó la sensibilidad de los híbridos a una dosis de glifosato de 750 g (ea) ha⁻¹, se encontró que toda la descendencia híbrida era resistente. Sin embargo, cuando se aplicó una dosis de 3000 g (ea) ha⁻¹ todos los híbridos fueron controlados. En cada caso, los híbridos se compararon con la descendencia obtenida de la autofecundación de los padres *L. multiflorum* (control susceptible) y *L. perenne* (control resistente) (Figura 46).

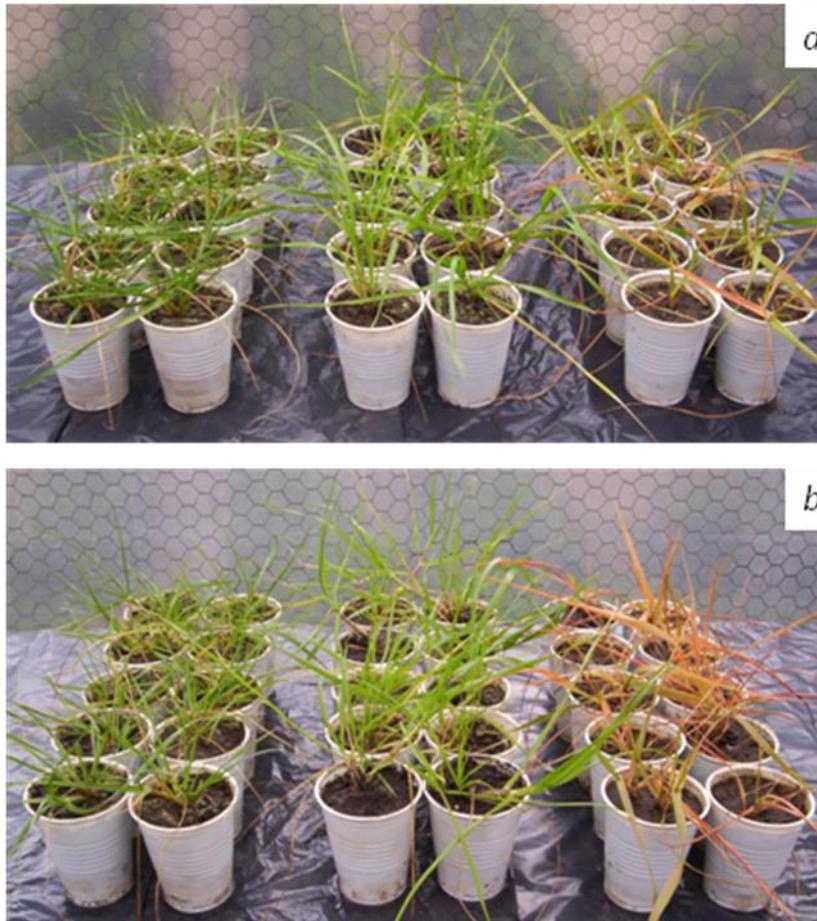


Figura 46. Plantas de *Lolium perenne* (izquierda), descendencia híbrida de *L. multiflorum* x *L. perenne* (centro) y *L. multiflorum* (derecha) a 10 días (a) y 20 días (b) de la aplicación de una dosis de glifosato de 750 g (ea) ha⁻¹.

No existen antecedentes que muestren la evaluación de la herencia de la resistencia a glifosato en híbridos de *L. multiflorum* x *L. perenne*. No obstante, la estrecha relación entre estas especies ha despertado el interés de investigadores de la disherbología (Dinelli y Lucchese, 1999; Dinelli *et al.*, 2004). Dentro de la comunidad de malezas de una amplia región de Italia, se han evaluado diferentes ecotipos de ryegrass de variable sensibilidad a diclofop-metil. En cada población se encontró un 40-60 % de híbridos tanto intra-genéricos como producto del cruzamiento con *Festuca spp*, sin embargo no se hallaron relaciones entre la afinidad taxonómica de las plantas y la resistencia al mencionado herbicida (Dinelli *et al.*, 2002).

Los resultados presentados en esta sección, indican que el modelo de herencia de la resistencia a glifosato, basado en un gen nuclear con dominancia incompleta, también se ajustaría al caso de los híbridos entre *L. multiflorum* (susceptible) y *L. perenne* (resistente). En consecuencia, estos aspectos muestran el riesgo de la difusión de la resistencia, no sólo entre plantas de la misma especie sino también hacia una especie afín como *L. multiflorum*.

Estudio del flujo de genes de resistencia

Numerosos trabajos han focalizado su interés en el estudio de los cambios de la frecuencia génica de una población debido a la migración de individuos, grupos de individuos o gametas, entre poblaciones (Wright, 1931). Este movimiento de individuos y gametas en el espacio, ha sido definido como “flujo génico” (Slatkin, 1987) y su trascendencia sobre las propiedades ecológicas y evolutivas de las poblaciones han motivado su estudio (Hanski y Gilpin, 1997).

Con la introducción de cultivos transgénicos, los estudios de flujo génico han cobrado especial interés al momento de evaluar el riesgo de determinados eventos (Chapman y Burke, 2006; Mallory-Smith y Zapiola, 2008). Asimismo, a partir de la detección de malezas resistentes a herbicidas, el estudio de la dispersión de la resistencia mediada por el polen o las semillas ha comenzado a ser abordado para

predecir la dinámica del problema (Dauer *et al.*, 2007; Busi *et al.*, 2008; Délye *et al.*, 2010).

La migración de malezas entendida como una dispersión espacial de propágulos, ha sido relacionada a la adaptación de las plantas para diseminar su descendencia a través de vectores como el viento, el agua, los animales y la acción antrópica (Bakker, 1996). Existen antecedentes donde se ha estudiado el mecanismo de abscisión de semillas de *Lolium perenne* durante post-maduración como primera condición necesaria para su dispersión espacial, y la influencia del ambiente en ese proceso (Elgersma *et al.*, 1988).

Si bien la dinámica de la dispersión de semillas de malezas con cierto grado de adaptación a tal fin, resulta importante al estudiar procesos de enmalezamiento, en *Lolium perenne* el nivel de flujo génico mediado por el polen ha resultado ser 3,5 veces mayor que el flujo por dispersión de semillas (Balfourier *et al.*, 2000). En función de esto, en el presente trabajo se ha limitado el estudio del flujo génico al movimiento de gametas en el espacio, es decir a través del polen.

El mecanismo de polinización juega un importante rol en la determinación de los niveles de flujo génico y los patrones de micro-evolución en las plantas (Govindaraju, 1988). Considerando el elevado nivel de alogamia de *L. perenne* y la importancia del viento como vector de dispersión del polen, el objetivo de esta sección fue evaluar la importancia del flujo efectivo de genes de resistencia (*i. e.* granos de polen capaces de polinizar una flor) en la región problema.

Se evaluó la progenie de plantas sembradas a distintas distancias de la parcela donde se cultivó una población de *Lolium perenne* resistente a glifosato empleada como fuente de genes de resistencia. A través de diferentes estudios de sensibilidad a glifosato realizados sobre las diferentes progenies, se estimó la relación entre la distancia de la fuente de resistencia y el efecto del flujo de genes mediado por el polen.

Sensibilidad a glifosato de la progenie germinando en presencia del herbicida

Al evaluar el efecto del glifosato sobre el porcentaje de germinación, no se encontró evidencia estadística ($P > 0,05$) que permita afirmar que la variación en el número de semillas germinadas se deba a la distancia a la cual fueron cultivadas las plantas trampa respecto de la población resistente (Tabla 38). En este sentido, la concentración de glifosato empleada, no permitió distinguir la descendencia de las plantas susceptibles en aislamiento respecto a las resistentes (Tabla 38). El porcentaje de germinación de las semillas cultivadas en glifosato a razón de 42 mg (ea) L⁻¹, varió en un rango de 52 a 71,3 %.

Tabla 38. Análisis de la varianza de la germinación de semillas en presencia de glifosato: efecto de la progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m) y aisladas de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela sobre el porcentaje de germinación.

Fuente de variación	GL	CM	P
Progenie	10	28,0	0,75
Error	22	42,7	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Aunque no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación, el crecimiento plumular de las plántulas cultivadas en la mencionada concentración de glifosato, dependió de forma altamente significativa de la distancia entre las plantas madre y la fuente de genes de resistencia (Tabla 39). Asimismo, en este análisis se incluyeron los controles positivo (progenie de plantas de la parcela resistente) y negativo (descendencia de plantas susceptibles aisladas durante la floración).

Tabla 39. Análisis de la varianza del crecimiento plumular de semillas en presencia de glifosato: efecto de la progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m y aisladas) de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela sobre la longitud de la plúmula.

Fuente de variación	GL	CM	P
Progenie	10	2120	<0,001
Error	22	74,4	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

El crecimiento plumular acusó diferencias entre las distintas progenies dependiendo de la distancia a la fuente de resistencia. Los mayores valores de longitud plumular se registraron en la descendencia de las plantas resistentes (Figura 47). En tanto, el crecimiento de la plúmula de la descendencia de las plantas susceptibles aisladas, resultó estar entre los menores valores promedio (Figura 47). Consistentemente, la progenie de plantas susceptibles cultivadas en torno a la parcela resistente (0 m) fue menos sensible al herbicida que la descendencia proveniente de plantas localizadas a mayor distancia (≥ 15 m) (Figura 47).

Estos resultados concuerdan con los presentados antes, al evaluar las semillas descendientes de la población problema para la detección de la resistencia. Al determinar la respuesta de semillas a glifosato, el porcentaje de germinación resultó ser un parámetro menos sensible que el crecimiento plumular.

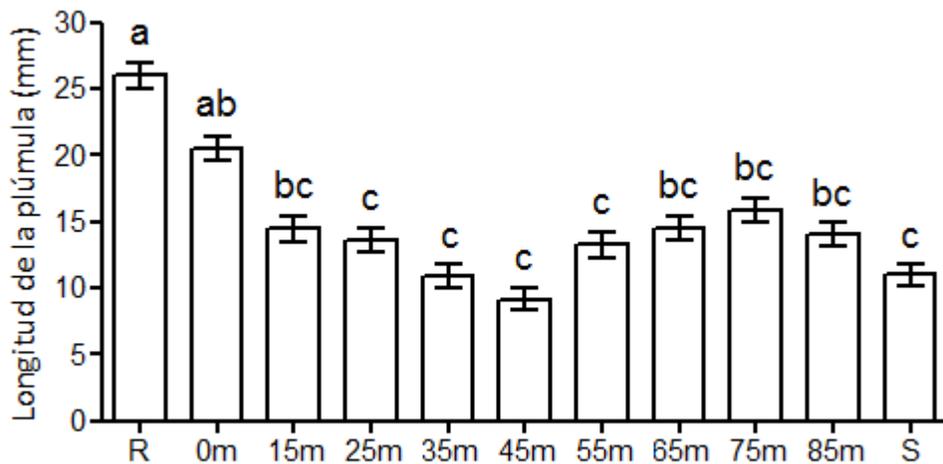


Figura 47. Crecimiento plumular de semillas germinando en presencia de glifosato (42 mg (ea) L⁻¹): progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m) y aisladas (S) de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela (R). Se muestran los valores promedio y las barras representan el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Además de lo indicado, los efectos de ciertos fenotipos resistentes podrían no ser detectados en la progenie debido a que en la comparación de valores promedio, una baja proporción de individuos resistentes tendría un importante efecto sobre la dispersión de los datos. En función de esto, se comparó el crecimiento plumular de la progenie considerando la distribución de frecuencias para cada grupo de descendientes (Tabla 40).

Contrastando las frecuencias de cada progenie respecto a la de la descendencia de plantas susceptibles aisladas, se encontraron diferencias significativas en aquellas descendientes de plantas ubicadas a 0, 15 y 25 m de la fuente de resistencia. También, la progenie resistente se diferenció significativamente de la descendencia de las plantas susceptibles aisladas (Tabla 40). En este sentido, más del 40 % de los individuos de la progenie resistente se halló dentro de las tres clases de mayor longitud plumular (30-40, 40-50 y 50-60 mm), mientras que en esas mismas clases se

encontraron menos del 2 % de las plántulas de la descendencia susceptible en aislamiento (Tabla 40, Figura 48).

Tabla 40. Distribución de frecuencias relativas (%) de la longitud plumular de plántulas (medida a los 7 días de germinación en presencia de glifosato) de la progenie de plantas de *Lolium perenne* susceptible, cultivadas a distintas distancias (m) de la población resistente a glifosato y en aislamiento (S aislado).

Progenie	Clases (mm)					
	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60
Resistente *	10,1	27,0	22,5	29,2	10,1	1,1
0 m *	11,1	47,5	28,3	5,1	7,1	1,0
15 m *	43,9	35,4	12,2	6,1	2,4	0,0
25 m *	31,6	48,4	16,8	1,1	2,1	0,0
35 m	43,0	53,2	2,5	1,3	0,0	0,0
45 m	53,3	41,0	4,8	1,0	0,0	0,0
55 m	38,5	50,0	9,0	1,3	1,3	0,0
65 m	40,4	51,1	7,4	1,1	0,0	0,0
75 m	39,1	50,0	8,7	2,2	0,0	0,0
85 m	44,7	37,6	12,9	2,4	1,1	0,0
S aislado	49,1	41,8	7,3	0,9	0,9	0,0

* La distribución de frecuencias difiere significativamente ($P < 0,05$) del susceptible en aislamiento (S aislado).

La progenie de las plantas cultivadas a 0 m de la población resistente, mostró un incremento de individuos de baja sensibilidad a glifosato comparado a la descendencia susceptible en aislamiento. Más del 13 % de las plántulas fueron categorizadas dentro de las tres clases de mayor longitud plumular, esto representa un incremento de más de 7 veces respecto al susceptible aislado. Del mismo modo, al comparar la progenie de plantas cultivadas a 15 y 25 m de la fuente de genes de resistencia, el incremento en el número de individuos de baja sensibilidad resultó ser de más de cuatro veces y casi dos veces, respectivamente.

Al emplear los valores promedio, el avance genético relativo hacia la resistencia a glifosato en las descendientes de plantas sembradas a 0, 15 y 25 m, respecto a la progenie susceptible en aislamiento, fue de 81 %, 27 % y 23 % en forma

respectiva. Estas evidencias muestran que ha existido un flujo de genes de resistencia, dependiente de la distancia, desde la parcela resistente hacia las plantas trampa.

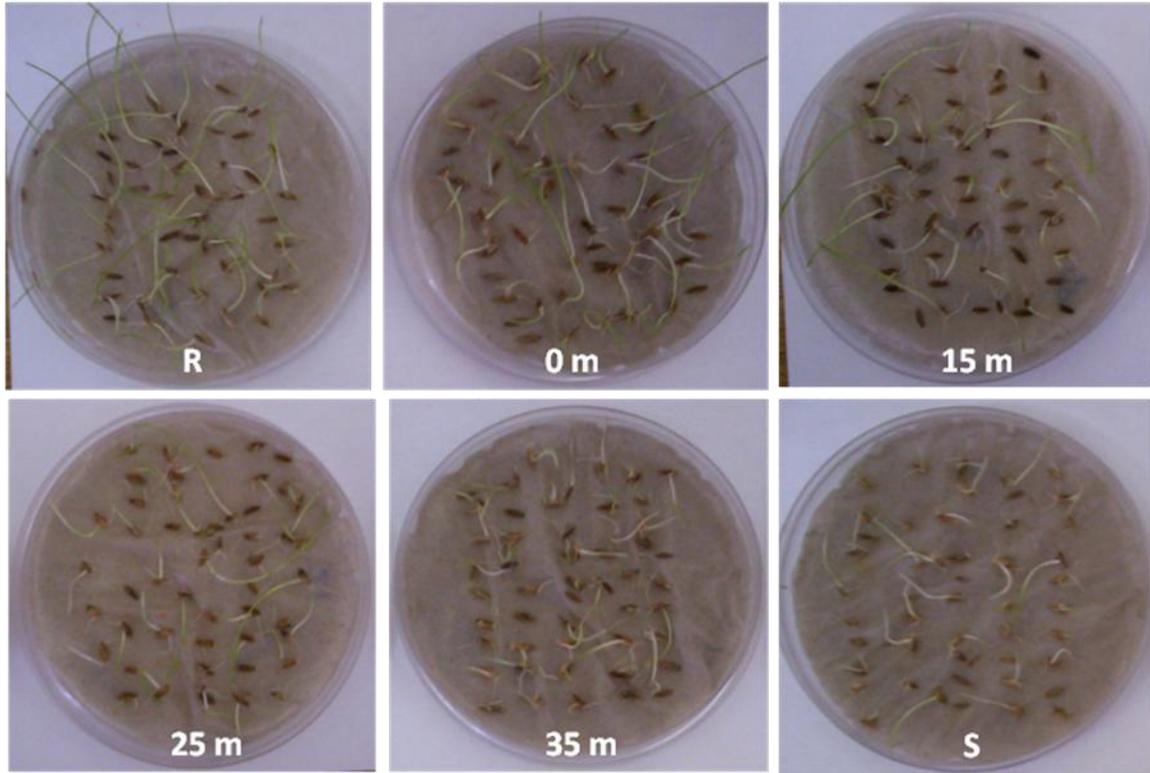


Figura 48. Semillas en germinación embebidas con una concentración de glifosato de 42 mg (ea) L⁻¹: progenie de las plantas “fuente de genes de resistencia” (R), de plantas susceptibles distanciadas a 0, 15, 25 y 35 m de la población resistente y de plantas susceptibles aisladas durante la floración (S).

Sensibilidad a glifosato de la progenie en macollaje: efecto del herbicida sobre el crecimiento longitudinal de las hojas

Al aplicar una dosis de glifosato de 1000 g (ea) ha⁻¹ el crecimiento longitudinal de las hojas registrado a las 72 horas post-aplicación, dependió de forma altamente significativa de la progenie considerada (Tabla 41). La descendencia de plantas susceptibles aisladas durante la floración, se diferenciaron ($P < 0,05$) de la progenie de las plantas resistentes. Éstas últimas, bajo los efectos del herbicida, crecieron un 41 %

más que las susceptibles (Figura 49). Entre ambos grupos de descendientes, la progenie de las plantas trampa se diferenció significativamente de una o de otra descendencia dependiendo de la distancia a la que estuvo sembrada la planta madre de la fuente de resistencia (Figura 49).

Tabla 41. Análisis de la varianza del crecimiento de las hojas en post-aplicación de glifosato: efecto de la progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m) y aisladas de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela sobre el crecimiento longitudinal de las hojas a 72 horas post-aplicación.

Fuente de variación	GL	CM	P
Progenie	10	68,12	<0,001
Error	99	12,07	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

La progenie de plantas ubicadas a 0, 15 y 25 m de la parcela resistente, mostraron un crecimiento longitudinal de hojas similar a la descendencia de plantas resistentes ($P > 0,05$), mostrando diferencias significativas respecto a la progenie de plantas susceptibles en aislamiento (Figura 49). En tanto, aquellas cosechadas sobre los individuos trampa a 35 m, mostraron un crecimiento intermedio entre la progenie resistente y la descendencia de plantas aisladas, sin diferenciarse significativamente de ninguno de los dos grupos (Figura 49).

A distancias superiores a los 35 m de la fuente de resistencia, no se han detectado diferencias significativas respecto a las plantas susceptibles en aislamiento. Esto indica que, al menos con esta metodología empleada, no habría evidencia que demuestre que el flujo de genes de resistencia llegue a tener efectos sobre la baja sensibilidad a glifosato en descendientes de plantas distanciadas a más de 35 m.

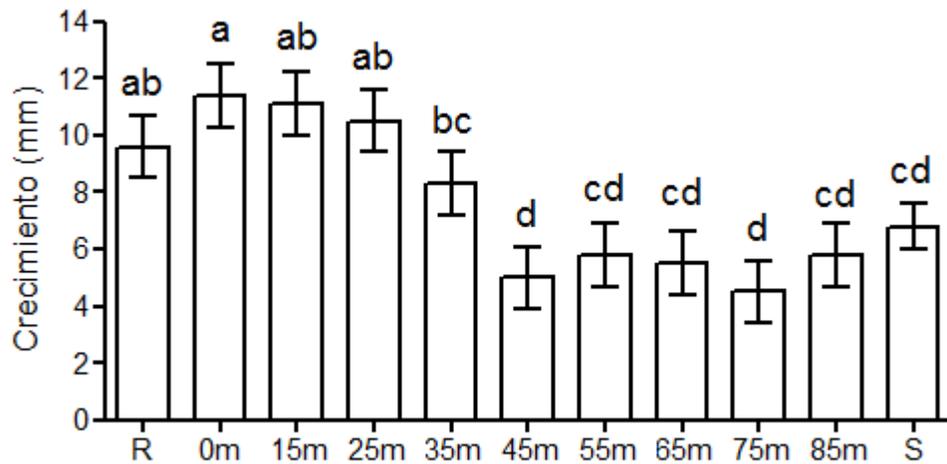


Figura 49. Crecimiento longitudinal de hojas a las 72 horas post-aplicación de una dosis de glifosato de 1000 g (ea) ha⁻¹: progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m) y aisladas (S) de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela (R). Se muestran los valores promedio y las barras representan el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Sensibilidad a glifosato de la progenie en macollaje: efecto del herbicida sobre el porcentaje de control

El control de plantas en macollaje, empleando una dosis de glifosato de 1000 g (ea) ha⁻¹, dependió significativamente de la progenie considerada (Tabla 42). En consistencia con las evaluaciones presentadas previamente, la descendencia de plantas resistentes se diferenció significativamente de la progenie de plantas susceptibles aisladas (Tabla 43). En tanto, el porcentaje de control sobre la descendencia de plantas resistentes no llegó al 50 % y la progenie de las plantas susceptibles en aislamiento, superó el 90 % de control (Tabla 43).

Tabla 42. Análisis de la varianza del porcentaje de control con glifosato: efecto de la progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m) y aisladas de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela, sobre el porcentaje de control de plantas a 10 días post-aplicación.

Fuente de variación	GL	CM	P
Progenie	10	20,44	<0,001
Error	44	0,99	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

Ante la variación genética entre la descendencia de plantas susceptibles y resistentes, la progenie de las plantas trampa ubicadas a 0 m no se diferenció ($P > 0,05$) de la población resistente (Tabla 43). En este sentido, se comprobó un fuerte efecto del flujo de genes de resistencia entre plantas vecinas.

Al considerar distancias mayores, sólo a los 15 m de la fuente de resistencia se detectó una significativa disminución del porcentaje de control respecto a las plantas susceptibles en aislamiento (Tabla 43). Empleando la dosis indicada previamente, más allá de los 15 m de las plantas resistentes no se encontró una alteración significativa en el porcentaje de control de las distintas descendientes (Tabla 43).

En evaluaciones realizadas a 20 días post-aplicación, el porcentaje de control se incrementó en todos los casos pero la tendencia indicada se mantuvo y sólo en la progenie de plantas trampa ubicadas a 0 y 15 m se encontraron plantas sobrevivientes al tratamiento (Figura 50).

Tabla 43. Porcentaje de control de la progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m) y aisladas de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela (Resistente) a 10 días post-aplicación de una dosis de glifosato de 1000 g (ea) ha⁻¹. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Progenie	Control (%)
Resistente	49,0 a
0 m	38,3 a
15 m	62,7 b
25 m	89,9 c
35 m	96,6 c
45 m	89,3 c
55 m	89,2 c
65 m	89,9 c
75 m	86,7 c
85 m	96,4 c
S aislado	93,0 c

Al evaluar la supervivencia de los diferentes grupos de descendientes, luego de la aplicación de las siguientes dosis de glifosato: 0, 500, 1000 y 2000 g (ea) ha⁻¹, se encontró que el nivel de control dependió de la interacción entre la dosis y la progenie (Tabla 44). Las variaciones observadas en el porcentaje de control de las diferentes progenies (a 20 días post-aplicación), concuerdan con los registrados en el ensayo presentado previamente (Tabla 45).

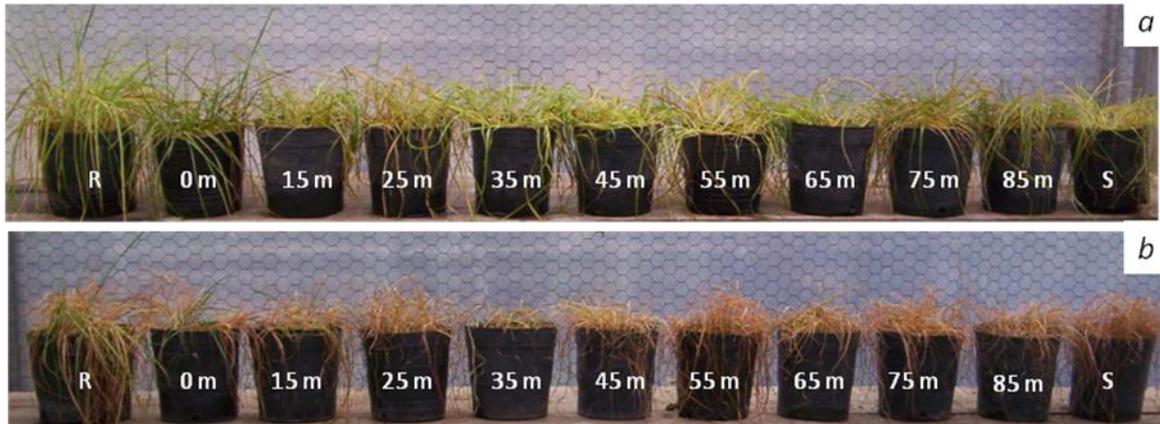


Figura 50. Control de la progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m) y aisladas (S) de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela (R) a 10 días (a) y 20 días (b) post-aplicación de una dosis de glifosato de 1000 g (ea) ha⁻¹.

Tabla 44. Análisis de la varianza del porcentaje de control con glifosato: efecto de la dosis (0, 500, 1000 y 2000 g (ea) ha⁻¹), de la progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m) y aisladas de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela, y la interacción doble sobre el porcentaje de control de plantas a 20 días post-aplicación.

Fuente de variación	GL	CM	P
Dosis	3	733,5	<0,001
Progenie	10	11,57	<0,001
Dosis*Progenie	30	2,47	<0,001
Error	88	0,33	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

A dosis de glifosato de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹, el porcentaje de control de la progenie de plantas ubicadas a 0, 15 y 25 m de la parcela resistente, difirió significativamente del control susceptible, aislado durante la floración (Tabla 45, Figura 51). Asimismo, más allá de los 35 m, el efecto del flujo de genes de resistencia no ha sido detectado en la descendencia de las plantas trampa (Tabla 45).

Tabla 45. Porcentaje de control de la progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 m) y aisladas de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela (Resistente) a 20 días post-aplicación de diferentes dosis de glifosato. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Progenie	Control (%)		
	500 g (ea) ha ⁻¹	1000 g (ea) ha ⁻¹	2000 g (ea) ha ⁻¹
Resistente	0 a	47 a	67 a
0 m	34 bc	84 b	100 b
15 m	24 b	85 b	100 b
25 m	4 a	93 bc	100 b
35 m	44 c	100 c	100 b
45 m	44 c	100 c	100 b
55 m	47 c	100 c	100 b
65 m	34 bc	100 c	100 b
75 m	37 bc	100 c	100 b
85 m	40 bc	100 c	100 b
S aislado	47 c	100 c	100 b

Por otra parte, en la Tabla 45 se advierte que cuando la dosis es de 2000 g (ea) ha⁻¹, las variaciones en la sensibilidad a glifosato de la descendencia de plantas trampa no son detectadas. Esto es consistente con el modelo herencia propuesto, donde un gen mayor con dominancia incompleta sería el responsable de la resistencia a glifosato. En este sentido, las plantas heterocigotas para este gen son detectadas en macollaje a dosis de hasta 1000 g (ea) ha⁻¹.

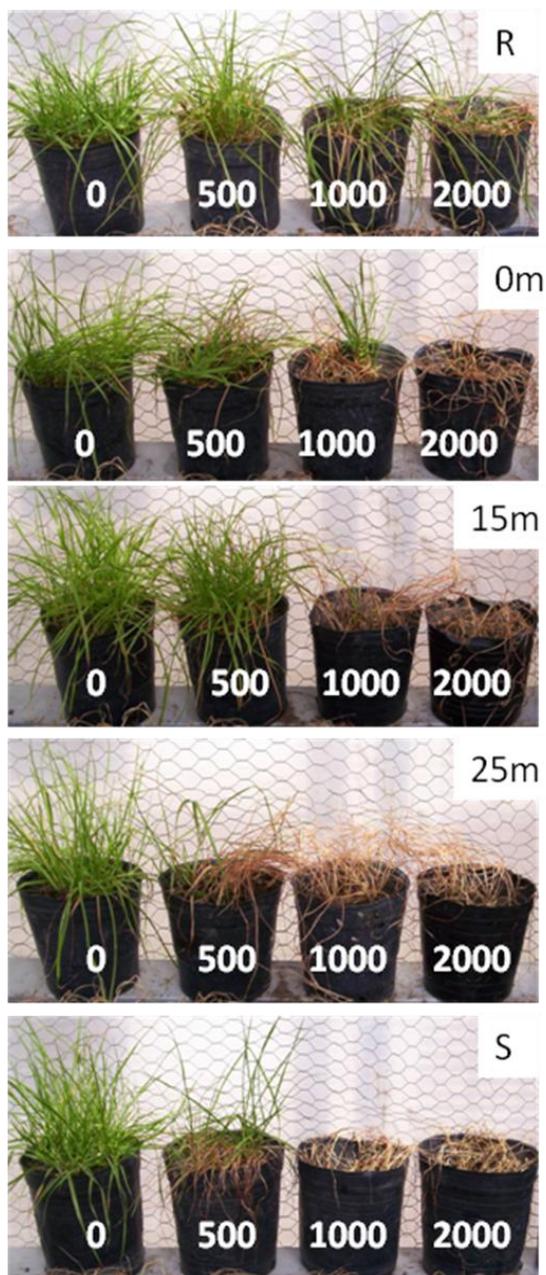


Figura 51. Control de la progenie de plantas susceptibles de *Lolium perenne* cultivadas a distintas distancias (0, 15, 25 m) y aisladas (S) de la parcela de plantas resistentes a glifosato y de plantas cosechadas intra-parcela (R) a 20 días post-aplicación de una dosis de glifosato de 0, 500, 1000 y 2000 g (ea) ha⁻¹.

El primer estudio de dispersión de polen de *Lolium perenne* fue realizado por Griffiths (1950). En ese trabajo, se muestra que el efecto del flujo génico es altamente dependiente de la distancia, consistentemente con los resultados presentados aquí. En función de las evidencias halladas, el investigador sugiere que los distanciamientos que garantizarían el aislamiento entre poblaciones de ryegrass rondarían los 90 m de distancia.

Más recientemente, se han realizado estudios tendientes a dilucidar la influencia de la distancia y la dirección del viento sobre la dispersión del polen de *Lolium perenne* (Giddings *et al.*, 1997a; Giddings *et al.*, 1997b). Estos autores encuentran que, luego de que los granos de polen son liberados, su deposición es dependiente de la distancia. A más de 20 m de la fuente de polen, el número de granos de polen hallados es aproximadamente inferior al 10 % del total de granos hallados a 0 m (Giddings *et al.*, 1997a). Sin embargo, los mismos investigadores indican que no siempre la dispersión del polen es proporcionalmente afectada por la distancia, debido a que otros factores como la velocidad del viento y las turbulencias podrían alterar el patrón de distribución en el espacio.

En esos estudios realizados por Giddings y colaboradores (1997a; 1997b), efectuaron los recuentos de granos de polen de *Lolium perenne* empleando dispositivos similares a las trampas de esporas. Por lo tanto, para relacionar los resultados de dispersión del polen y el flujo efectivo de genes habría que considerar la producción de polen de plantas vecinas a las plantas trampa y sus efectos competitivos con el producido por la fuente de polen a analizar (Dafni y Firmagi, 2000; Rognli *et al.*, 2000). En el ensayo del presente trabajo, el polen de plantas susceptibles vecinas habría competido con el polen resistente, como sería esperable en condiciones agroecológicas habituales.

Existen modelizaciones y experimentos donde se presume que el polen de *Lolium spp.* podría llegar a distanciarse de la planta madre a un kilómetro o más (Giddings, 2000; Busi *et al.*, 2008). Sin embargo, en estos casos habría que considerar

que la longevidad del grano de polen es un importante factor para garantizar su viabilidad y la oportunidad de fecundación (Dafni y Firmagi, 2000).

El incremento de la distancia entre las plantas trampa y la fuente de polen resistente debe realizarse asegurándose que en el área a trabajar (y más allá) no existen otras plantas resistentes que puedan alterar el gradiente generado. Esta condición sin duda limita la posibilidad de realizar ensayos a grandes distancias. Sin embargo, en el presente estudio, el experimento se llevó a cabo dentro de la CEI Barrow, donde hasta el momento del ensayo no se han registrado casos de resistencia, tampoco en establecimientos vecinos.

Busi *et al.* (2008) han evaluado el flujo génico de *Lolium rigidum* resistente a inhibidores de la acetolactato sintasa, en Australia. Precisamente en una región no cultivada, libre de *L. rigidum*, al sudoeste de ese país. Allí los investigadores encontraron que el flujo de genes de resistencia podían alcanzar los 3 km de distancia desde las plantas madre. Sin embargo, los mismos autores indican que la amplia distribución de *L. rigidum* resistente en ese país, podría haber constituido una vastísima fuente de polen resistente que, sometida a los vientos, contribuiría a incrementar su deriva a grandes distancias. Según Busi y colaboradores, este hecho explicaría las diferencias con los resultados de ensayos realizados a distancias más acotadas como los de Giddings *et al.* (1997ab), similares al abordaje realizado en el presente trabajo.

Contrastando los resultados de las diferentes pruebas realizadas, tendientes a distinguir alteraciones en la frecuencia de fenotipos resistentes de las distintas progenies de plantas trampa, se advierte que las evaluaciones de crecimiento plumular y de crecimiento longitudinal de hojas han sido las más sensibles. En este sentido, los desvíos de la distribución de frecuencias del largo de la plúmula de la descendencia respecto a la de la progenie de plantas susceptibles en aislamiento, permitieron detectar el efecto del flujo génico hasta los 25 m de distancia de la fuente de polen resistente. Por su parte, las mediciones del crecimiento longitudinal de hojas

reflejaron los efectos del glifosato sobre la actividad meristemática, evidenciando que el flujo efectivo de genes de resistencia alcanzaría los 35 m.

En el caso de las semillas en germinación con glifosato, el alto número de individuos analizados (150 por progenie) y los efectos de las resistentes sobre el desvío de la distribución de frecuencias, sería la base de la robustez del experimento. En tanto, la sensibilidad de la prueba de crecimiento longitudinal de hojas en post-aplicación mostró grandes diferencias entre plantas susceptibles y resistentes, consistentes con los resultados presentados en el capítulo previo. Esto permitió detectar el efecto de genes de resistencia en las distintas progenies al comparar los crecimientos promedio.

Por otra parte, las evaluaciones determinadas sobre el porcentaje de control en plantas en macollaje tratadas con glifosato, también permitieron distinguir alteraciones de la frecuencia de plantas susceptibles. Sin embargo, fue menor el número de plantas evaluadas, dado que para evaluar un elevado número de individuos se requiere una gran infraestructura. Al reducir el número de plantas evaluadas se condiciona la sensibilidad del ensayo.

Como se indicó, el efecto de genes de resistencia fue detectado en la progenie de plantas trampa ubicadas hasta 35 m de la fuente de resistencia. Los resultados de la presente sección muestran la importancia del flujo de genes de resistencia, si bien este efecto es conspicuo de 0 a 15 m, flujos mayores serían trascendentes al momento de incrementar la frecuencia inicial de plantas resistentes (Busi *et al.*, 2011). Este hecho, sumado a condiciones de continua presión de selección con glifosato, conduciría a una importante dispersión del problema a nivel regional, como ciertamente ha ocurrido.

En ese sentido, el flujo de genes y los efectos de la resistencia sobre la tasa reproductiva neta de las plantas han sido identificados como dos factores claves para la modelización de la dinámica de malezas resistentes a herbicidas (Maxwell *et al.*, 1990). Pese a su importancia, el flujo génico ha sido mayormente abordado para estudiar el riesgo de hibridaciones entre cultivos transgénicos y malezas (Lu y Yang,

2009; Londo *et al.*, 2010; Mallory-Smith y Olguin, 2011) más que como factor de dispersión de genes de resistencia a herbicidas entre poblaciones de malezas.

Visto desde otro sentido, el flujo de genes fue propuesto como una interesante alternativa para el manejo de *Lolium multiflorum* resistente a diclofop-metil en Oregon (Ghersa *et al.*, 1994). En agro-ecosistemas dedicados al cultivo de trigo e infestados con esa maleza resistente, los investigadores citados sugieren suspender las aplicaciones del herbicida y cultivar una variedad de ryegrass anual (lógicamente susceptible) donde el flujo de genes de susceptibilidad y la habilidad competitiva del cultivar conlleven a una reducción de la frecuencia de plantas resistentes.

La posibilidad de manejo o control del flujo génico mediado por el polen es reducida una vez que la planta ha llegado al estado reproductivo (Busi *et al.*, 2011). Por lo tanto, es importante controlar aquellas plantas resistentes aisladas antes que lleguen a florecer. Asimismo, en las tácticas de prevención hay que considerar que las primeras plantas que presentarán cierto grado de insensibilidad a glifosato, debido al flujo de genes de resistencia de poblaciones cercanas, serán heterocigotas. En función de esto, debido a la dominancia incompleta del alelo de resistencia resultarán resistentes o susceptibles dependiendo de la dosis de glifosato aplicada. Por lo tanto, es esencial evitar el empleo de dosis sub-recomendadas.

Implicancias adaptativas de la resistencia

Cuando una población es expuesta a la selección con un determinado herbicida, la evolución de la resistencia al herbicida requiere de una población que presente variación genética respecto a la sensibilidad a ese principio activo. Sin embargo, el efecto neto de selección de resistencia es condicionada por los beneficios y costos de los genes de resistencia (Baucom y Mauricio, 2004). Bajo una elevada presión de selección, los beneficios de la resistencia a herbicidas han sido asociados a una fuerte selección de alelos que permiten la supervivencia y reproducción de la planta, a pesar de cualquier efecto pleiotrópico negativo sobre la capacidad adaptativa (*i. e.* costos adaptativos ó penalidades biológicas) (Bergelson y Purrington, 1996; Roux *et al.*, 2004; Vila-Aiub *et al.*, 2005; Tardif *et al.*, 2006).

En ausencia de la presión de selección, el costo o penalidad biológica juega un importante rol evolutivo al prevenir la fijación de alelos adaptativos y contribuye al mantenimiento del polimorfismo genético dentro de las poblaciones (Antonovics y Thrall, 1994). Previo al inicio de un proceso de selección con determinado herbicida, los genotipos resistentes a herbicidas son raros en las poblaciones de malezas; en tanto, los costos biológicos de la resistencia, junto a la deriva genética aleatoria, son los factores ecológicos que explican esa baja frecuencia (Preston y Powles, 2002).

Las penalidades biológicas asociadas a los genes de resistencia son evidentes pero no universales entre las especies de plantas (Vila-Aiub *et al.*, 2009). Existen dificultades para medir la expresión y magnitud del costo de la resistencia y, en este sentido, el control del fondo genético es esencial para atribuir, inequívocamente, penalidades a los genes de resistencia (Vila-Aiub *et al.*, 2011).

Actualmente, se conoce muy poco de los costos biológicos asociados a genes de resistencia a glifosato (Vila-Aiub *et al.*, 2009). Sin embargo, la determinación de la

existencia y cuantificación de las penalidades biológicas, permiten entender y predecir la evolución de la resistencia a herbicidas en poblaciones de malezas y, además, esto tiene un rol importante al momento de definir las mejores estrategias de manejo de la resistencia (Jasieniuk *et al.*, 1996; Jordan *et al.*, 1999; Menchari *et al.*, 2008; Vila-Aiub *et al.*, 2009). Dado el valor que tiene el glifosato en la agricultura actual y la rápida dispersión de la resistencia al herbicida en muchas especies de malezas, es importante cuantificar los efectos de la resistencia a glifosato sobre la capacidad reproductiva neta de la planta.

¿El carácter “resistencia a glifosato”, evaluado a lo largo de este trabajo, está asociado a costos biológicos que puedan condicionar la dinámica de las poblaciones resistentes? En esta sección se presentan los resultados de experimentos llevados a cabo con el objeto de detectar si existen penalidades biológicas asociadas a la resistencia a glifosato en *Lolium perenne*.

Fenología y hábito de crecimiento

No fueron detectadas diferencias significativas entre plantas susceptibles y resistentes a glifosato en cuanto a la duración del período vegetativo y reproductivo ($P = 0,79$). En promedio para ambos biotipos, el estadio reproductivo comenzó a los 60 días del trasplante. Similarmente, el número de días desde el trasplante a la emergencia de la espiga (*i. e.* espigazón), no mostró diferencias entre biotipos ($P = 0,39$) (Tabla 46). Estos resultados no fueron significativamente distintos en los experimentos del 2011 y 2012 ($P = 0,25$). Tanto los biotipos resistente y susceptible a glifosato presentaron, indistintamente ($P = 0,65$), plantas de hábito de crecimiento postrado y erecto (55 % y 45 % de plantas erectas y postradas, respectivamente) (Figura 52).

Tabla 46. Fenología del biotipo susceptible y resistente a glifosato de *Lolium perenne*. Los días de cada estadio se contabilizaron desde el día de trasplante. Se presentan los valores promedio para los experimentos del año 2011 y 2012 \pm el error estándar de la media (n=36).

Biotipo	<i>Días hasta la aparición del primer nudo aéreo</i>	<i>Días a espigazón</i>	<i>Días a madurez de cosecha</i>
Susceptible a glifosato	60,0 \pm 1,8	132,0 \pm 1,2	196,4 \pm 1,6
Resistente a glifosato	60,8 \pm 2,4	133,8 \pm 1,7	194,2 \pm 2,1



Figura 52. Plantas erectas y postradas del biotipo resistente y susceptible a glifosato a 60 días del trasplante en el experimento del año 2012.

Caracteres adaptativos: análisis de parámetros de crecimiento vegetativo

Considerando la altura de las plantas, se encontraron interacciones estadísticamente significativas: *Biotipo x Tiempo* y *Año x Tiempo* (Tabla 47). Esto indicó que la altura de las plantas fue diferente entre los biotipos dependiendo del lapso de días desde el trasplante. Asimismo, fueron detectadas diferencias entre los experimentos de ambos años independientemente del biotipo (Tabla 47). La

diferencia en la altura de las plantas entre ambos biotipos considerados, fue evidente en los experimentos del año 2011 y 2012 (Tabla 47). El biotipo resistente a glifosato presentó plantas de menor altura (14 % menos, en promedio) comparadas a las plantas susceptibles (Figura 53). Sin embargo, estas diferencias fueron detectadas sólo durante el estado reproductivo (desde los 120 días desde el trasplante) (Figura 53).

Tabla 47. Resumen del análisis de la varianza: cuadrado medio (CM), grados de libertad (GL) y valor de probabilidad (P) para el efecto del biotipo (susceptible y resistente a glifosato), año del experimento (2011 y 2012), tiempo (60, 120 y 150 días desde el trasplante) y sus interacciones sobre parámetros vegetativos y productivos.

Fuente de variación	Altura de planta	Area foliar de la hoja bandera	Biomasa aérea	Número de semillas	Peso de mil semillas	Índice de cosecha
Biotipo	CM = 2707 GL = 1 P < 0,001	CM = 235 GL = 1 P < 0,001	CM = 44858 GL = 1 P < 0,001	CM = 1,2 10 ⁹ GL = 1 P < 0,001	CM = 1,16 GL = 1 P = 0,044	CM = 0,0016 GL = 1 P = 0,32
Año	CM = 10117 GL = 1 P < 0,001	CM = 1396 GL = 1 P < 0,001	CM = 64,710 GL = 1 P < 0,001	CM = 1,8 10 ⁸ GL = 1 P < 0,001	CM = 2,38 GL = 1 P = 0,004	CM = 0,0003 GL = 1 P = 0,64
Tiempo	CM = 41943 GL = 2 P < 0,001					
Biotipo*Año	CM = 13 GL = 1 P = 0,3	CM = 0.4 GL = 1 P = 0,83	CM = 3633 GL = 1 P = 0,17	CM = 1,2 10 ⁶ GL = 1 P = 0,66	CM = 0,32 GL = 1 P = 0,28	CM = 0,0017 GL = 1 P = 0,3
Biotipo*Tiempo	CM = 329 GL = 2 P = 0,026					
Año*Tiempo	CM = 1,022 GL = 2 P < 0,001					
Biotipo*Año*Tiempo	CM = 28 GL = 2 P = 0,73					
Error	CM = 89 GL = 204	CM = 9,7 GL = 68	CM = 1926 GL = 68	CM = 6,6 10 ⁶ GL = 68	CM = 0,27 GL = 68	CM = 0,0016 GL = 68

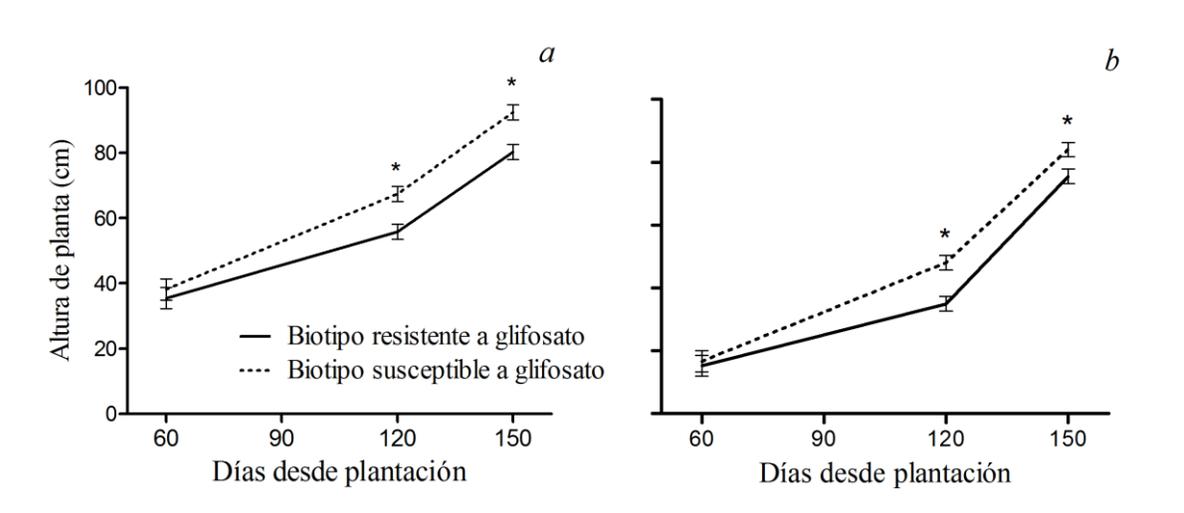


Figura 53. Altura de plantas susceptibles y resistentes a glifosato a 60, 120 y 150 días del trasplante en 2011 (a) y 2012 (b). Se presentan los valores promedio y las barras verticales indican el error estándar de la media. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre biotipos.

El área foliar de la lámina de la hoja bandera difirió significativamente entre biotipos ($P < 0,001$) en ambos años, sin embargo este parámetro no estuvo condicionado por la interacción *Biotipo x Año* ($P = 0,83$). No obstante, el área foliar de la hoja bandera fue significativamente mayor en 2011 que en 2012 (Tabla 47). Las plantas del biotipo resistente presentaron una menor área foliar de la hoja bandera del orden del 24,5 %, en promedio, comparado a las plantas pertenecientes al biotipo susceptible (Figura 54a).

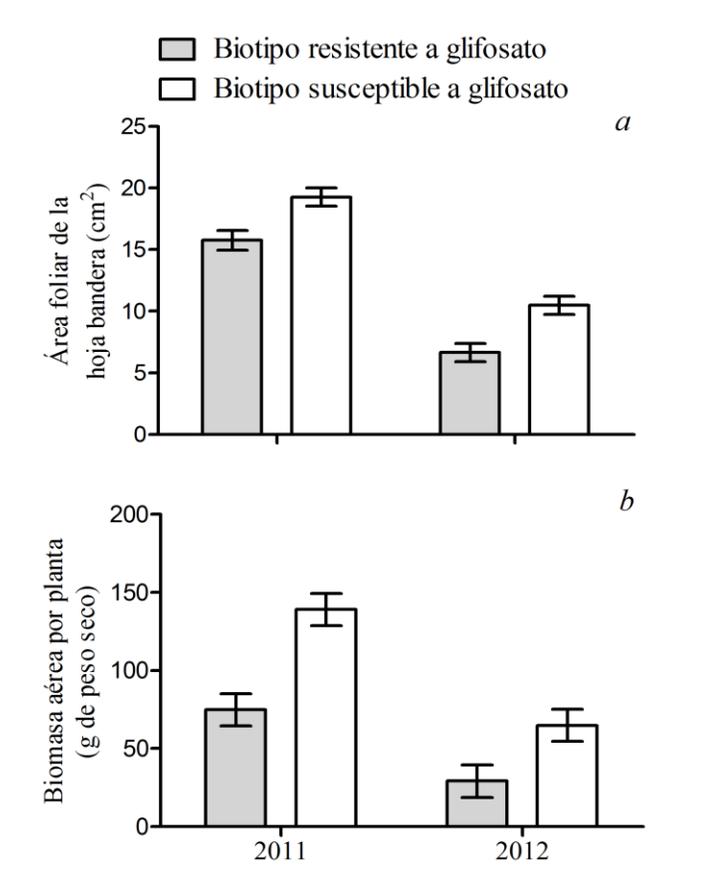


Figura 54. Área foliar de la hoja bandera (a) y biomasa aérea total (b) producida por plantas de los biotipos resistente y susceptible a glifosato en 2011 y 2012. Se presentan los valores promedio y las barras verticales indican el error estándar de la media.

La biomasa aérea total producida por planta fue diferente entre biotipos ($P < 0,001$). El factor “Año” tuvo un efecto significativo sobre la producción de biomasa ($P < 0,001$) que fue atribuido a diferentes condiciones hídricas del suelo. En el experimento del año 2011, se suministró agua por riego como complemento a las lluvias y la producción de biomasa aérea fue el doble de la registrada en 2012, no obstante las diferencias entre biotipos (*i. e.* el efecto *Biotipo*) persistió en ambos años. La biomasa aérea total producida por plantas susceptibles a glifosato fue aproximadamente el doble de la determinada en plantas resistentes (Figura 54b).

Estatus de nitrógeno y fósforo en la hoja bandera

Las diferencias en los parámetros de crecimiento asociadas a los biotipos, no se correspondieron con diferencias en el estatus nitrogenado estimado a partir del verdor (*i. e.* valor de SPAD). No se detectaron efectos significativos del *biotipo*, tanto como factor principal como en interacción, sobre el valor de SPAD de la lámina de la hoja bandera al estado de floración (Tabla 48). Sin embargo, el factor *año* de los experimentos explicó la variación en el verdor de la hoja bandera (Tabla 48).

En el experimento del año 2012, los valores promedio de SPAD registrados fueron 20 % menores al del año previo, en el cual, además del agua provista por las precipitaciones, se suplementó con riego (Figura 55). Esto se corresponde con las diferencias detectadas en la producción de biomasa para ambos años, independientemente del biotipo considerado.

Tabla 48. Análisis de la varianza: efecto del biotipo (susceptible y resistente a glifosato), año del experimento (2011 y 2012) y la interacción doble sobre el verdor de la hoja bandera (SPAD).

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	6,7	0,44
Año	1	1603	<0,001
Biotipo*Año	1	19,6	0,19
Error	68	11,4	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

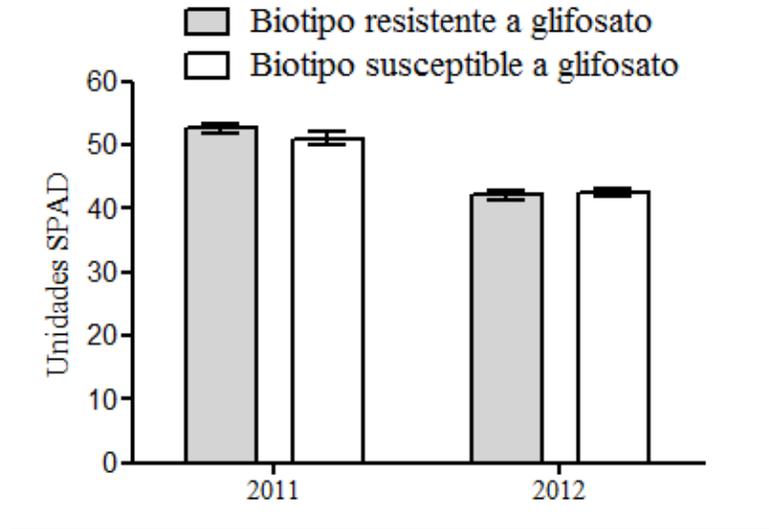


Figura 55. Verdor de la hoja bandera de plantas de los biotipos resistente y susceptible a glifosato en 2011 y 2012. Se presentan los valores promedio y las barras verticales representan el error estándar de la media.

Respecto al estatus del fósforo inorgánico soluble en ácido acético (2 % v/v), determinado en la lámina de la hoja bandera, no se detectaron diferencias entre los biotipos susceptible y resistente a glifosato (Tabla 49). Las láminas de las hojas banderas presentaron, en promedio, 9,5 μ moles de ortofosfato por cada gramo de peso fresco (Figura 56). A diferencia de la estimación del estatus nitrogenado indicada anteriormente, este análisis sólo se realizó en el año 2012, por lo tanto no se han podido realizar comparaciones entre experimentos de diferentes niveles de producción de biomasa total.

Tabla 49. Análisis de la varianza: efecto del biotipo (susceptible y resistente a glifosato) sobre el contenido de fósforo inorgánico en la hoja bandera (soluble en ácido acético 2 % v/v).

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	0,151	0,93
Error	34	22,21	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

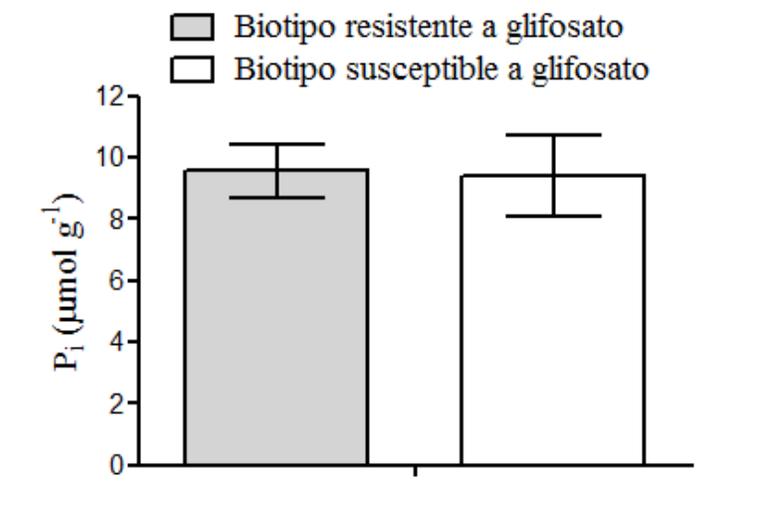


Figura 56. Contenido de fósforo inorgánico (soluble en ácido acético 2 % v/v) de la hoja bandera de plantas de los biotipos resistente y susceptible a glifosato (gramos de peso fresco). Se presentan los valores promedio y las barras verticales representan el error estándar de la media.

Caracteres adaptativos: componentes del rendimiento y producción de semillas

El biotipo resistente a glifosato y el susceptible difirieron significativamente en el número de espigas producidas por planta ($P = 0,005$), número de espiguillas por espigas ($P = 0,003$) y semillas producidas por espiguilla ($P = 0,03$) (Figura 57). Las plantas resistentes a glifosato produjeron un 25 % menos de espigas (Figura 57a), 10 % menos de espiguillas por espigas (Figura 57b) y 10 % menos semillas por espiguillas (Figura 57c) que las plantas del biotipo susceptible.

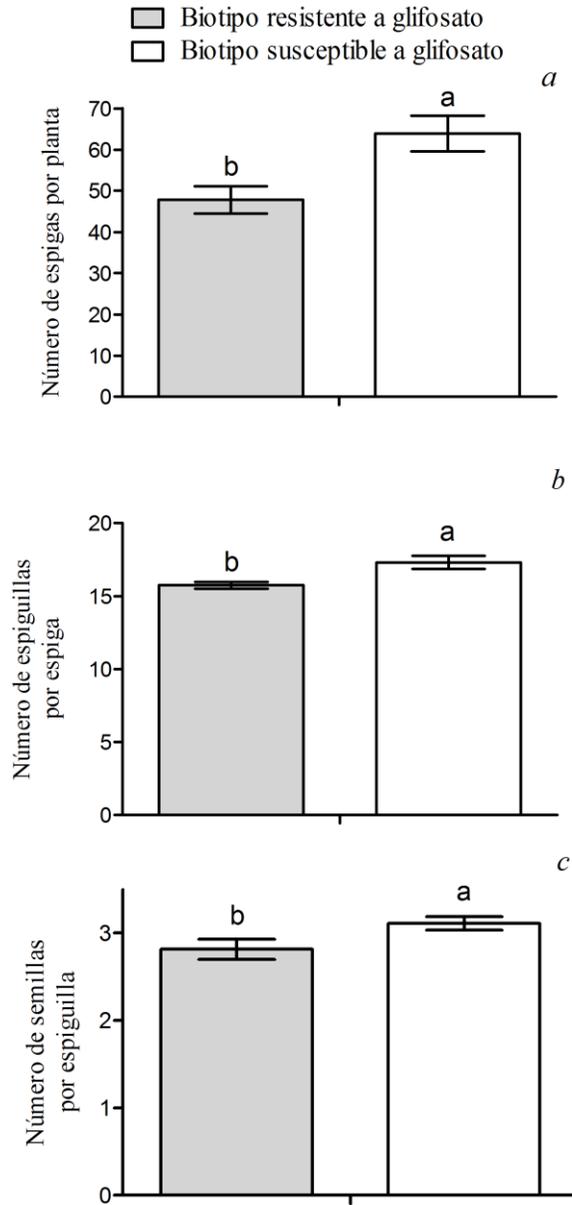


Figura 57. Componentes del rendimiento de plantas susceptibles y resistentes a glifosato: número de espigas por planta (a), número de espiguillas por espiga (b) y número de semillas por espiguilla (c). Se presentan los valores promedio y las barras verticales representan el error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En el primer año, independientemente del biotipo, la producción de semillas fue aproximadamente dos veces mayor que la producida en el 2012. Sin embargo, la

producción de semillas por planta fue diferente entre biotipos tanto en el año 2011 como en el 2012 (Tabla 47). En ambos años, las plantas del biotipo resistente a glifosato mostraron un 40 % menos de semillas que las plantas susceptibles (Figura 58a). Además, se detectó efecto del *biotipo* en el peso de las semillas (Tabla 47). Las plantas resistentes para los dos años en conjunto (pues no se encontró interacción *Biotipo x Año*), produjeron semillas con un peso 10 % menor respecto a las de plantas susceptibles (Figura 58b).

La relación del peso seco de las semillas producidas respecto al peso seco total de la biomasa aérea, no fue significativamente afectada por las fuentes de variación: *biotipo*, *año* ó su interacción (Tabla 47). En este sentido, el índice de cosecha fue, en promedio, de 12,6 % ($\pm 0,4$ % error estándar).

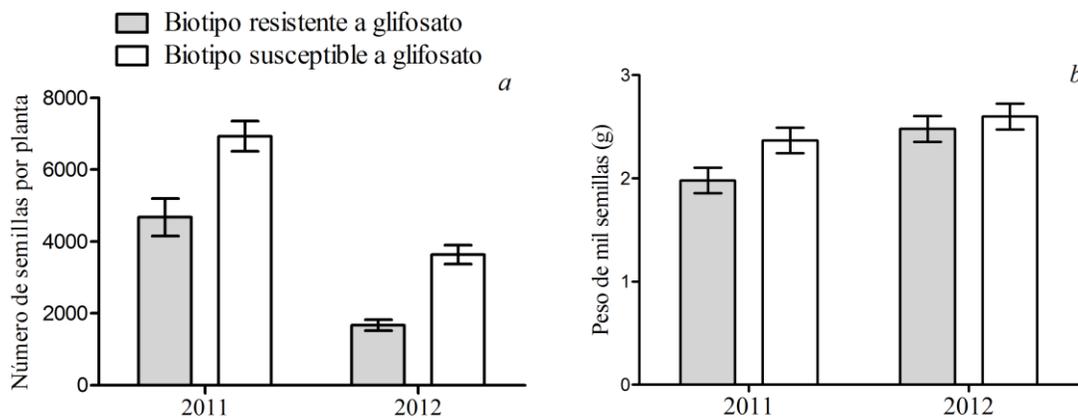


Figura 58. Número de semillas (a) y peso de mil semillas (b) producidas por plantas de los biotipos resistente y susceptible a glifosato en 2011 y 2012. Se presentan los valores promedio y las barras verticales representan el error estándar de la media.

Porcentaje de germinación y dormición de las semillas producidas

Se evaluó la capacidad de germinación de las semillas producidas por plantas resistentes y susceptibles a glifosato en condiciones de libre cruzamiento. Se encontró que el número de semillas que germinaron a los 1500 grados-día desde la madurez de cosecha, dependió del biotipo considerado y de los días de incubación (Tabla 50). A lo

largo del período de incubación en cámara de crecimiento, el número de semillas germinadas se incrementó en ambos biotipos sin mostrar interacción (Tabla 50). Esto indicó que no existieron diferencias entre biotipos respecto a la energía germinativa ó velocidad de germinación. Sin embargo, se hallaron diferencias en el número de semillas germinadas. A los 8 días de iniciada la prueba de germinación, el biotipo resistente presentó un poder germinativo de 2,1 % ($\pm 0,8$ % error estándar) mientras que el 6,3 % ($\pm 1,8$ % error estándar) de las semillas producidas por las plantas del biotipo susceptible fueron capaces de germinar (Figura 59a).

Tabla 50. Análisis de la varianza: efecto del biotipo (susceptible y resistente a glifosato), días desde siembra (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) y la interacción sobre el número de semillas germinadas a 1500 grados-día.

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	160,4	<0,001
Días	7	60,0	<0,001
Biotipo*Días	7	14,5	0,09
Error	128	8,0	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

A los 2000 grados-día desde la madurez de cosecha, no se detectaron efectos del biotipo sobre el número de semillas germinadas (Tabla 51). El día de la evaluación a lo largo del período de incubación, explicó las variaciones en el porcentaje de germinación, sin embargo no se detectó interacción entre el biotipo y el día desde el inicio de la incubación (Tabla 51). Esto indica que los biotipos no difirieron en la velocidad de germinación. En contraste a lo hallado a 1500 grados-día, en este momento post-cosecha, entre ambos biotipos no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación. En este sentido, al final del período de incubación, el 25 % de las semillas germinaron (Figura 59b).

Tabla 51. Análisis de la varianza: efecto del biotipo (susceptible y resistente a glifosato), días desde siembra (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) y la interacción sobre el número de semillas germinadas a 2000 grados-día.

Fuente de variación	GL	CM	P
Biotipo	1	6,6	0,84
Días	7	1023	<0,001
Biotipo*Días	7	6,2	0,99
Error	128	179	

GL = grados de libertad; CM= cuadrado medio; P = valor de probabilidad de la prueba de F

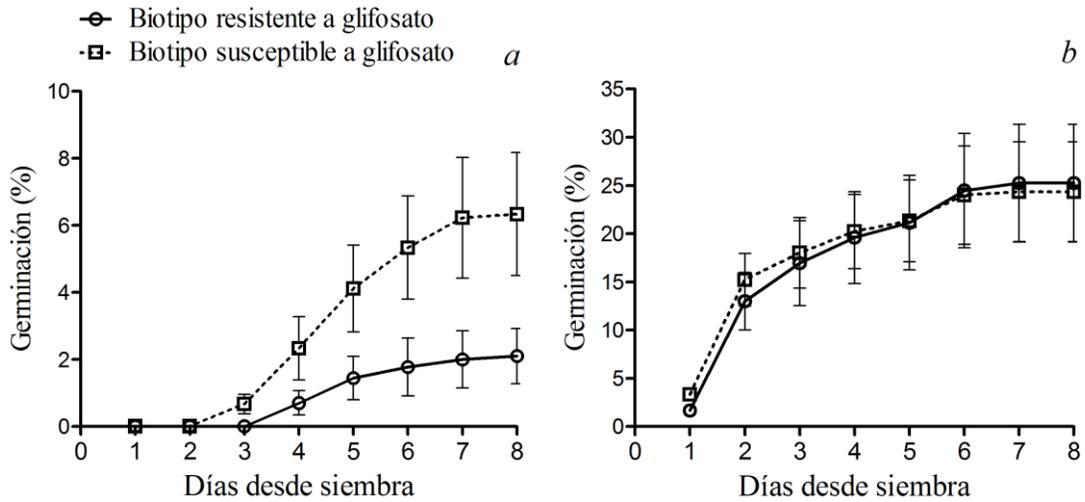


Figura 59. Germinación de semillas cosechadas de plantas de los biotipos resistente y susceptible a glifosato, luego de 1500 (a) y 2000 (b) grados-día desde la madurez de cosecha. Se presentan los valores promedio \pm error estándar de la media a lo largo del período de incubación (días desde la siembra).

Los costos biológicos asociados con caracteres de adaptación a un nuevo ambiente, han sido llamados “costos de adaptación” (Bergelson y Purrington, 1996). Los principios de la ecología evolutiva predicen que los genes de resistencia a herbicidas aparejarán costos en la tasa reproductiva neta que influyen en la dinámica evolutiva de la resistencia, pero no todos los tipos de resistencia a herbicidas

conllevan costos adaptativos (Cipollini *et al.*, 2003; Menchari *et al.*, 2008; Vila-Aiub *et al.*, 2009).

Los resultados del presente estudio muestran que a pesar de no detectar variaciones en la fenología de plantas de *Lolium perenne* susceptibles y resistentes a glifosato, los individuos del biotipo resistente expresan un significativo costo adaptativo. En el estado reproductivo, las plantas resistentes fueron significativamente más pequeñas que las plantas del biotipo susceptible. Esta diferencia en la altura de las plantas influiría en la capacidad de interceptación lumínica con importantes implicancias para la habilidad competitiva potencial (Falster y Westoby, 2003). Las plantas con un gran índice de área foliar concentrado en estratos superiores del canopy han mostrado una ventaja competitiva frente a la interceptación de luz (Graham *et al.*, 1998). En el presente trabajo, el biotipo susceptible fue más alto y presentó hojas bandera de mayor área foliar comparado al biotipo resistente, evidenciando la mayor habilidad competitiva potencial de las plantas susceptibles estudiadas.

La diferencia en la altura de las plantas entre ambos biotipos se relacionó a las variaciones en la biomasa aérea total al estado reproductivo. Sin embargo, la diferencia relativa en la biomasa aérea total entre biotipos (50 %) fue mayor que las diferencias relativas en altura (14 %) y área foliar de la hoja bandera (24,5 %). Estas comparaciones indican que las plantas resistentes a glifosato fueron más pequeñas que las plantas susceptibles en todos los componentes de competencia por recursos (Goldberg, 1990). En este sentido, las plantas más pequeñas tienden a tener respuestas competitivas más débiles sobre sus plantas vecinas (Goldberg, 1990). No obstante, las plantas de menor tamaño requieren menos recursos para alcanzar su madurez reproductiva, y bajo intensa competencia podrían ser capaces de presentar una elevada “economía reproductiva”. Estas plantas producirán descendencia a pesar de una fuerte supresión por competencia y, por lo tanto, requieren poca biomasa vegetativa para producir semillas (Tracey y Aarssen, 2011). El destino relativo de recursos hacia órganos reproductivos (*i. e.* índice de cosecha) fue similar entre el biotipo susceptible y el resistente a glifosato. Esto permite destacar que mientras las

plantas del biotipo resistente resultaron más pequeñas y produjeron menos semillas, comparado a las susceptibles que fueron de mayor tamaño, ambos biotipos maximizaron su producción de granos y el destino relativo de los recursos fue constante, independientemente del tamaño de la planta (Bonser y Aarssen, 2009).

El biotipo resistente a glifosato produjo menor progenie (*i. e.* número y peso de semillas) que el susceptible y la diferencia de fecundidad entre ambos biotipos fue proporcional al tamaño de las plantas. Aunque durante el estado vegetativo se registraron similares tasas de crecimiento entre ambos biotipos, al estado reproductivo las plantas resistentes mostraron un costo adaptativo que representó una producción de semillas 40 % menor que las plantas del biotipo susceptible. El número de semillas por planta es un factor crucial de la capacidad reproductiva neta de las plantas de una población e influencia la supervivencia de los individuos resistentes y susceptibles (Maynard Smith, 1998; Vila-Aiub *et al.*, 2009).

La reducción en la producción de semillas de los individuos resistentes frente a los susceptibles, fue principalmente atribuida a un menor número de macollos, espiguillas por planta y semillas por espiguillas. En tanto, a partir de la aproximación realizada, las diferencias en crecimiento y producción no se pudieron relacionar a variaciones en el estatus de nitrógeno o fósforo. Tampoco, las evaluaciones sobre la etapa lumínica y bioquímica de la fotosíntesis y el transporte de asimilados presentaron diferencias significativas entre biotipos cuando no se aplicó glifosato como se mostró anteriormente.

Los costos adaptativos de la resistencia a glifosato de *L. perenne* no fueron compensados por un poder germinativo mayor respecto a las plantas del biotipo susceptible. No obstante, fueron detectadas diferencias en la dormición de las semillas entre los biotipos estudiados a 1500 grados-día, pese al bajo poder germinativo. Esto indicaría un efecto materno donde las plantas susceptibles impondrían menores requerimientos térmicos para perder la dormición. En este sentido, el control primario de la dormición de las semillas depende de los efectos del tejido materno (Roach y Wulff, 1987). Aunque algunos autores han demostrado que la dormición en

semillas de *Lolium spp.* es dependiente de las temperaturas ambientales durante el desarrollo de las semillas (Akpan y Bean, 1977; Steadman, 2004), en este caso el ambiente donde las plantas crecieron, fue el mismo para los dos biotipos.

La variación en la dormición de las semillas es la principal causa de un amplio rango de emergencia en *L. rigidum* y por lo tanto condiciona su dinámica poblacional (Steadman *et al.*, 2003). Trabajando con plantas de esa especie resistentes a múltiples herbicidas, Vila-Aiub *et al.* (2005) han encontrado que el nivel de dormición de las semillas está relacionado a los mecanismos de resistencia implicados.

A los 2000 grados-día, el poder germinativo de las semillas cosechadas fue similar entre plantas de ambos biotipos. Esto ha permitido demostrar que en estas condiciones, las variaciones en la producción de semillas entre plantas resistentes y susceptibles a glifosato no han sido compensadas por diferencias en la capacidad germinativa.

Los resultados presentados en esta sección coinciden con Pedersen *et al.* (2007) quienes han encontrado una reducción en el número de semillas producidas por plantas resistentes de *L. rigidum*, comparado a las susceptibles, cuando compiten con trigo. Mientras todos los caracteres que condicionan la vida de la planta se mantengan constantes, la diferencia observada en la producción de semillas de plantas de los biotipos de *L. perenne* resistente y susceptible a glifosato, es probable que afecte la frecuencia de genotipos resistentes en la población (Vila-Aiub *et al.*, 2009). Por consiguiente, es esperable que la frecuencia de plantas resistentes decline, una vez que la presión de selección con glifosato se suspenda. En este sentido, ha sido observada una reducción en el porcentaje de fenotipos de *L. rigidum* resistentes a glifosato cuando no se realizaron aplicaciones del herbicida durante tres años (Preston *et al.*, 2009). Aunque hasta el momento, en ese caso no se ha especificado el fundamento del costo adaptativo, se sabe que la penalidad biológica se asocia a un mecanismo de resistencia que afecta el traslado de glifosato dentro de la planta. Cabe destacar que los costos adaptativos relacionados a la resistencia a herbicidas han sido

dependientes del gen de resistencia en particular y exclusivos para un determinado mecanismo (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

En el presente estudio, la mayor actividad de la enzima EPSPs tendría un efecto pleiotrópico que representaría un costo adaptativo para las plantas. Esa enzima clave en la ruta del shikimato tendría un fuerte impacto en los procesos fisiológicos del vegetal. Se sabe que a través de la vía del ácido shikímico se consume el 20 % del carbono fijado en el ciclo de Calvin (Haslam, 1993). Además, se estima que las moléculas que requieren de la ruta del shikimato para su síntesis, representan más del 60 % del peso seco de la planta (Haslam, 1993). Por lo tanto, la mayor actividad de la EPSPs de las plantas resistentes a glifosato tendría importantes efectos en el crecimiento y la productividad de la planta como sugieren los presentes resultados.

Cabe destacar que las diferencias en el crecimiento y la producción de semillas halladas entre el biotipo resistente y el susceptible a glifosato, fueron expresadas en ambientes caracterizados por diferentes condiciones hídricas del suelo. Los costos adaptativos cuantificados en términos de número de semillas producidas, fueron 33 % y 53 % en los años 2011 y 2012 respectivamente. Estos resultados indican que la penalidad asociada a la resistencia a glifosato en *L. perenne* fue expresada en diferentes ambientes. Considerando que la disponibilidad de agua edáfica es el principal factor determinante del rendimiento, estas evidencias reflejan la estabilidad de los costos adaptativos en *L. perenne*.

Conclusiones

El glifosato ha sido un herbicida de amplia utilidad en la producción agrícola extensiva, comparativamente a otros principios activos alternativos, presenta baja toxicidad para mamíferos y una limitada vida media en el ambiente (Geisy *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000; Duke *et al.*, 2003; Cerdeira y Duke, 2006). Sin embargo, su amplio uso en forma casi exclusiva y continua, a lo largo de los últimos quince años, ha llevado a la evolución de poblaciones de malezas resistentes al herbicida poniendo en riesgo la vida útil de esta tecnología.

A partir de este trabajo se ha determinado la resistencia a glifosato de una población de *Lolium perenne* resultando ser el primer caso de esta especie en Argentina y a nivel mundial, según el registro internacional de malezas resistentes a herbicidas (Heap, 2013). A partir de la comparación de los índices de resistencia (IR) obtenidos mediante los bioensayos presentados, se encontró que la sensibilidad a glifosato de la población resistente varió en forma decreciente al avanzar el ciclo de la planta; según se trató de la germinación de semillas (IR: 3,2), del crecimiento plumular (IR: 4,4) o plantas establecidas (IR: 10,8). Esto indica que cuanto más ha avanzado el ciclo de la planta, la diferencia entre plantas resistentes y susceptibles respecto a la sensibilidad al herbicida es mayor.

En función de esto, se puede indicar que cuando en una rotación de principios activos en los campos problema sea necesario emplear glifosato, éste debe ser aplicado en estadios fenológicos tempranos donde los índices de resistencia son menores. En estas circunstancias, el control total de la población no conllevaría una selección neta de individuos resistentes (Christoffers, 1999).

Pese al amplio uso de glifosato, los efectos que el herbicida provoca en las plantas y cómo conducen a su muerte aún están en discusión (Duke y Powles, 2008). El presente trabajo ha mostrado una pormenorizada e inédita descripción de las alteraciones que el glifosato induce sobre los procesos fisiológicos de *L. perenne* susceptible, los cuales se resumen en la Figura 60.

El primer efecto detectado fue una alteración de la actividad meristemática, reflejada en una inhibición del crecimiento de la planta puesta en evidencia a las 24 horas post-aplicación. En este sentido, la interrupción de la ruta del ácido shikímico y la inhibición en la síntesis de aminoácidos aromáticos podría ser el factor que explique la caída en la tasa de crecimiento (Siehl, 1997). Además, los efectos inhibitorios sobre la actividad de los tejidos meristemáticos, se asociaron con una disminución en la demanda de asimilados por parte de estos destinos. Esa caída en la demanda se relacionó a la inhibición del traslado de asimilados y su acumulación en las hojas fuente. Esto explica la reducción en la tasa de asimilación de CO₂ a las 48 horas post-aplicación, es conocido que los productos finales de la fotosíntesis inhiben la fijación de carbono como mecanismo de autorregulación (Azcón-Bieto, 1983).

La caída en la tasa de asimilación de carbono no resulta acompañada por una proporcional disminución de la tasa de transporte de electrones del fotosistema II, sino que el transporte de electrones se mantiene dentro de los parámetros normales. En tanto, el poder reductor que no es demandado desde la fijación de CO₂, tendría destinos alternativos presumiblemente asociados a la formación de radicales libres (Fracheboud y Leipner, 2003).

Por otra parte, luego de las 48 horas post-aplicación, la inhibición de la ruta del shikimato comienza a ser detectable a partir de la cuantificación de los niveles de ácido shikímico. Posteriormente, comenzaron a registrarse indicios de estrés oxidativo a través del incremento de la actividad de peroxidasas a 72 horas post-aplicación. Esto explica la degradación de clorofila, detectada luego hasta hacerse evidente la muerte del vegetal.

La progresión de la clorosis de las malezas tratadas con glifosato es un indicador sencillo, capaz de ser empleado a campo, para evaluar la eficiencia de control desde los 7 días post-aplicación en adelante. Esto permitiría advertir focos incipientes de resistencia y prevenir la dispersión y magnificación del problema.

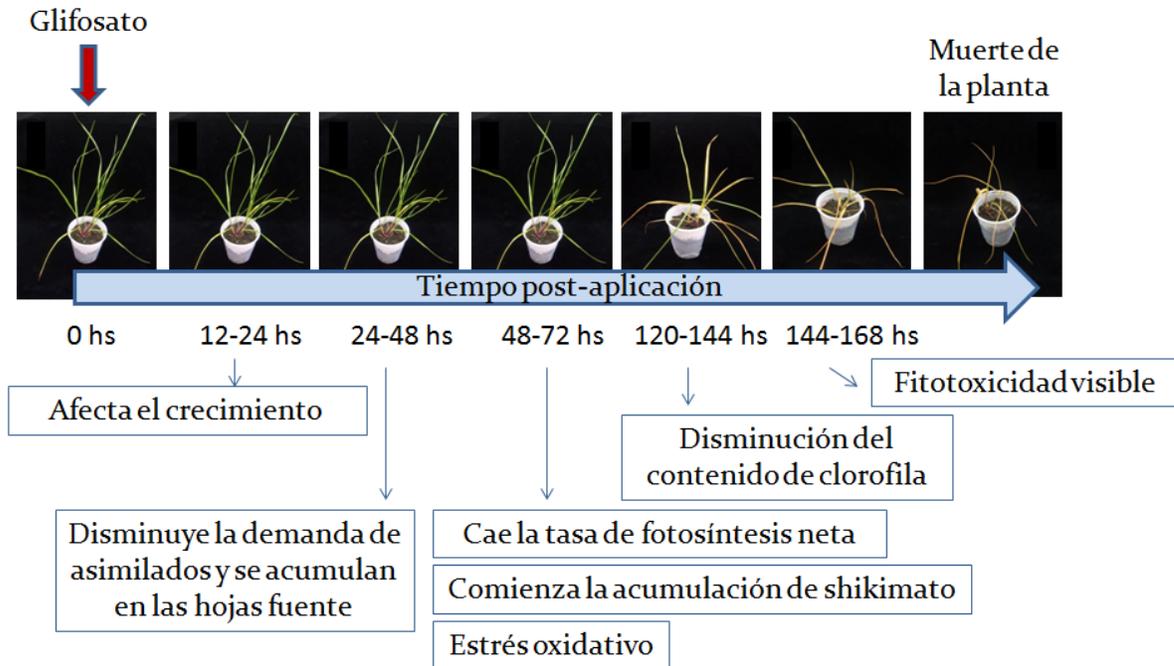


Figura 60. Evolución de los efectos provocados por glifosato sobre las plantas susceptibles de *Lolium perenne* desde la aplicación hasta la muerte del vegetal.

Las plantas de *L. perenne* resistentes a glifosato mostraron una mayor actividad de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPs), casi tres veces superior a la detectada en plantas susceptibles. Aunque la EPSPs de plantas resistentes fue inhibida por el glifosato, la mayor actividad basal de ésta explicaría la capacidad de las plantas de mantener la ruta del shikimato activa luego de la aplicación de una dosis normalmente letal. Esto respondería por qué en las plantas resistentes el herbicida no afectó el crecimiento y, por lo tanto, por qué no fueron detectados fuertes efectos inhibitorios sobre los demás procesos fisiológicos. En este sentido, se ha dilucidado que la elevada actividad de la enzima blanco sería el mecanismo que explica la resistencia a glifosato en la población de *L. perenne* estudiada.

De los estudios genéticos, se encontró que el carácter de resistencia a glifosato es controlado por un único gen, el cual mostró dominancia intermedia sobre la susceptibilidad. Bajo este modelo, las plantas resistentes homocigotas presentaron

menor sensibilidad al herbicida que aquellas heterocigotas. Sin embargo, ambos genotipos serían capaces de sobrevivir a las dosis normalmente empleadas a campo.

La resistencia a glifosato de *L. perenne* puede transmitirse a la descendencia híbrida inter-específica, a través del polen, al cruzarse con *L. multiflorum*. Además, el polen sería un importante factor para la dispersión de la resistencia dentro de los 35 metros de distancia cuando se cruza una planta susceptible por una resistente. Sin embargo, no se han podido descartar derivas de polen a mayores distancias que, si bien serían poco probables, podrían tener fuertes implicancias en la evolución de la resistencia a partir del incremento de la frecuencia inicial de genotipos resistentes (Busi *et al.*, 2011).

Según las evidencias obtenidas, el mecanismo de resistencia tendría carácter constitutivo, es decir, no dependería del tratamiento con glifosato para su inducción. Bajo esta consideración y teniendo en cuenta la importancia de la ruta del shikimato para la síntesis del 60 % de las moléculas que determinan el peso seco total de la planta (Haslam, 1993), la mayor actividad de la EPSPs está asociada a un costo adaptativo. En este sentido, la penalidad repercute en el crecimiento de la planta durante la etapa reproductiva y afectando la producción de semillas en un 40 % en promedio, respecto al biotipo susceptible. Este trabajo sería el primer antecedente al respecto.

El costo biológico asociado a genes de resistencia a herbicidas es un parámetro importante para la construcción de modelos de evolución de la resistencia a herbicidas (Gressel y Segel, 1990; Maxwell *et al.*, 1990; Gressel, 2009) y proveen una información valiosa respecto a preguntas relacionadas a los costos de adaptación de las plantas (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

En base a lo expuesto, existen evidencias que permiten aceptar la *hipótesis* de trabajo planteada, sosteniendo que la baja sensibilidad a glifosato del biotipo resistente de *Lolium perenne* se explica mediante diferencias génico-fisiológicas que pueden ser caracterizadas y que tienen un costo en la eficacia biológica de estos materiales. Futuras investigaciones son necesarias para determinar si estas

penalidades asociadas a la resistencia a glifosato en *L. perenne* podrían ser explotadas mediante estrategias de manejo para prevenir, retrasar o revertir su evolución.

Bibliografía

- Acciaresi, H.; Chidichimo, H.; Sarandón, S. 2001. Wheat-*Lolium multiflorum* competition: effect of nitrogen application onto Argentinean varieties aggressivity. *Cereal Research Communication* 29: 451-458.
- Acciaresi, H.; Chidichimo, H.; Sarandón, S. 2003. Shoot and root competition in a *Lolium multiflorum*-wheat association. *Biological Agriculture and Horticulture* 21: 15-33.
- Ahloowalia, B. 1967. Colchicine induced polyploids in ryegrass. *Euphytica* 16: 49-60.
- Ahsan, N.; Lee, D.; Lee, K.; Alam, I.; Lee, S.; Dong, J.; Bahk, D.; Lee, B. 2008. Plant physiology and biochemistry glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 1062-1070.
- Akpan, E.; Bean, E. 1977. The effects of temperature upon seed development in three species of forage grasses. *Annals of Botany* 4: 689-695.
- Altieri, M. 1999. Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable. Montevideo. Nordan-Comunidad. 338pp.
- Amini, R.; An, M.; Pratley, J.; Azimi, S. 2009. Allelopathic assessment of annual ryegrass (*Lolium rigidum*): bioassays. *Allelopathy Journal* 24: 67-76.
- Amrhein, N.; Deus, B.; Gehrke, P.; Steinrucken, H. 1980. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiology* 66: 830-834.
- Antonovics, J.; Thrall, P. 1994. The cost of resistance and the maintenance of genetic polymorphism in host-pathogen systems. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 257: 105-110.
- Aparicio, V.; De Gerónimo, E.; Marino, D.; Primost, J.; Carriquiriborde, P.; Costa, J. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93: 1866-1873.
- Azcon Bieto, J. 1983. Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiology* 73: 681-686.
- Baan Hofman, T.; Ennik, G. 1980. Investigation into plant characters affecting the competitive ability of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Netherland Journal of Agricultural Science* 28: 97-109.
- Bachelard, G. 2000. La formación del espíritu científico. Buenos Aires. Siglo XXI. 302pp.

- Baerson, S.; Rodriguez, D.; Tran, M.; You, J.; Kreuger, R.; Dill, G.; Pratley, J.; Gruys, K. 2002. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science* 50: 721–730.
- Baird, D.; Upchurch, R.; Homesley, W.; Franz, J. 1971. Introduction of a new broadspectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. *Proceedings North Central Weed Control Conference* 64-68.
- Baker, H. 1974. The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5: 1-24.
- Bakker, J.; Poschold, P.; Strykstra, R.; Bekker, R.; Thompson, K. 1996. Seed Banks and seed dispersal: important topics in restoration ecology. *Acta Botanica Neerlandica* 45: 461-490.
- Balfourier, F.; Imbert, C.; Charmet, G. 2000. Evidence for phylogeographic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe: a cpDNA study. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 131–138.
- Barbagallo, R.; Oxborough, K.; Pallett, K.; Baker, N. 2003. Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132: 485-493.
- Basantani, M.; Srivastava, A.; Sen, S. 2011. Elevated antioxidant response and induction of tau-class glutathione S-transferase after glyphosate treatment in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99: 111-117.
- Baucom, R.; Mauricio, R. 2004. Fitness costs and benefits of novel herbicide tolerance in a noxious weed. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 13386-13390.
- Baylis, A. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science* 56: 299-308.
- Beckie, H.; Heap, I.; Smeda, R.; Hall, L. 2000. Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology* 14: 428-445.
- Bennett, M. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implication. *New Phytologist* 106: 93-111.
- Bennett, S.; Hayward, M.; Marshall, D. 2000. Morphological differentiation in four species of the genus *Lolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 247-255.
- Bergelson, J.; Purrington, C. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The American Naturalist* 148: 536-558.

- Bhowmik P. C.; Inderjit. 2003. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Protection* 22: 661-671.
- Blair, B.; Parochetti, J. 1982. Extension implementation of integrated pest management systems. *Weed Science* 1: 48-53.
- Bonari, E.; Mazzonzini, M.; Peruzzi, A. 1995. Effects of conventional and minimum tillage on winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) in a sandy soil. *Soil and Tillage Research* 33: 91-108.
- Bonser, S.; Aarssen, L.W. 2009. Interpreting reproductive allometry: Individual strategies of allocation explain size-dependent reproduction in plant populations. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11: 31-40.
- Bott, S.; Tesfamariam, T.; Kania, A.; Eman, B.; Aslan, N.; Roemheld, V.; Neumann, G. 2011. Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilization. *Plant and Soil* 315: 2-11.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248- 254.
- Bradshaw, L.; Padgett, S.; Kimball, S.; Wells, B. 1997. Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology* 11: 189-198.
- Bromilow, R.; Chamberlain, K.; Evans, A. 1990. Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Science* 38: 305-314.
- Brooks, A. 1986. Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some calvin-cycle metabolites in spinach leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 221-237.
- Brotherton, J.; Jeschke, M.; Tranel, P.; Widholm, J. 2007. Identification of *Arabidopsis thaliana* variants with differential glyphosate responses. *Journal of Plant Physiology* 164: 1337-1345.
- Bulinska-Radomska, Z.; Lester, R. 1985. Relationships between five species of *Lolium* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* 148: 169-175.
- Bunnell, B.; Baker, R.; McCarty, L.; Hall, D.; Colvin, D. 2003. Differential responses of five bahiagrass (*Paspalum notatum*) cultivars to metsulfuron. *Weed Technology* 17: 550-553.

Burke, I.; Burton, J.; York, A.; Cranmer, J.; Wilcut, J. 2006. Mechanism of resistance to clethodim in a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype. *Weed Science* 54: 401-406.

Burton, J.; Gronwald, W.; Keith, R.; Somers, D.; Gegenbach, B.; Wyse, D. 1991. Kinetics of inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by sethoxydim and haloxyfop. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 39: 100-109.

Busi, R.; Michel, S.; Powles, S.; Délye, C. 2011. Gene flow increases the initial frequency of herbicide resistance alleles in unselected *Lolium rigidum* populations. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 142: 403-409.

Busi, R.; Yu, Q.; Barrett-Lennard, R.; Powles, S. 2008. Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 1281-1290.

Cabrera, A. 1970. Flora de la Provincia de Buenos Aires: Gramíneas. Tomo IV. Buenos Aires. Colección Científica INTA. 623pp.

Cabrera, A.; Zardini, E. 1978. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Buenos Aires. ACME. 715pp.

Caemmerer, S.; Farquhar, G. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.

Campbell, W.; Evans, J.; Reed, S. 1976. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. *Weed Science* 24: 22-25.

Cañal, M.; Tamés, R.; Fernández, B. 1988. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in *Cyperus esculentus* leaves following glyphosate applications. *Physiologia Plantarum* 74: 125-130.

Capinera, J. 2005. Relationships between insect pests and weeds: an evolutionary perspective. *Weed Science* 53: 892-901.

CASAFE. 2013. Estadísticas. Disponible en: http://www.casafe.org/estadisticas_links.php. Último acceso: 5/7/2013.

Catullo, J.; Valletti, O.; Rodriguez, E. 1982. Relevamiento de malezas en cultivos comerciales de trigo y girasol en el centro sur bonaerense. IX Reunión Argentina de Malezas y su Control ASAM. Santa Fe. Malezas 11: 204-235.

Cerderia, A.; Duke, S. 2006. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. *Journal of Environmental Quality* 35: 1633-1658.

Chandi, A.; Milla-Lewis, S.; Giacomini, D.; Westra, P.; Preston, C.; Jordan, D.; York, A.; Burton, J.; Whitaker, J. 2012. Inheritance of evolved glyphosate resistance in a North

- Carolina palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) biotype. International Journal of Agronomy 2012: 1-7.
- Chang, C.; Kao, C. 1997. Paraquat toxicity is reduced by metal chelators in rice leaves. *Physiologia Plantarum* 101: 471-476.
- Chapman, M.; Burke, J. 2006. Letting the gene out of the bottle: the population genetics of genetically modified crops. *New Phytologist* 170: 429-443.
- Cheah, U.; Kirkwood, R.; Lum, K. 1997 Adsorption, desorption and mobility of four commonly used pesticides in malaysian agricultural soils. *Pesticide Science* 50: 53-63.
- Christensen, M.; Teicher, H.; Streibig, J. 2003. Linking fluorescence induction curve and biomass in herbicide screening, *Pest Management Science* 59: 1303-1310.
- Christoffers, M. 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technology* 13: 647-652.
- Christoffoleti, P.; Trentin, R.; Tocchetto, S.; Marochi, A.; Batista Galli, A.; López-Ovejero, R.; Nicolai, M. 2005. Alternative herbicides to manage Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) resistant to glyphosate at different phenological stages. *Journal of Environmental Science and Health* 40: 59-67.
- Cipollini, D.; Purrington, C.; Bergelson, J. 2003. Basic and applied ecology costs of induced responses in plants. *Basic and Applied Ecology* 85: 79-85.
- Clements, D.; Weise, S.; Swanton, C. 1994. Integrated weed management and weed species diversity. *Phytoprotection* 75: 1-18.
- Clúa, A.; Conti, M.; Beltrano, J. 2012. The effects of glyphosate on the growth of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and its interaction with different phosphorus contents in soil. *Journal of Agricultural Science* 4: 208-218.
- Cobb, A.; Reade, J. 2010. *Herbicides and plant physiology*. Oxford. Wiley-Blackwell. 286pp.
- Cole, D. 1985. Mode of action of glyphosate-a literatura analysis. En: "The herbicide glyphosate". Grossbard, E.; Atkinson, D. (Eds.). Londres. Butterworth. 490pp.
- Cornish, M.; Hayward, M.; Lawrence, M. 1979. Self- incompatibility in ryegrass. 1: Genetic control in diploid *Lolium perenne* L. *Heredity* 43: 95-106
- Coupland, D.; Casely, J. 1979. Presence of ¹⁴C activity in root exudates and guttation fluid from *Agropyron repens* treated with ¹⁴C-labelled glyphosate. *New Phytologist* 83: 17-22.

Cousens, R.; Mokhtari, S. 1998. Seasonal and site variability in the tolerance of wheat cultivars to interference from *Lolium rigidum*. *Weed Research* 38: 301-307.

Cousens, R.; Mortimer, M. 1995. *Dynamics of Weed Populations*. Cambridge. Cambridge University Press. 332pp.

Cromartie, T.; Polge, N. 2000. An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. *Proceedings of Weed Science Society of America* 40: 291.

Cruz-Hipólito, H.; Osuna, M.; Domínguez-Valenzuela, J.; Espinoza, N.; De Prado, R. 2011. Mechanism of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in wild oat (*Avena fatua*) from Latin America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 7261-7267.

Culpepper, A.; Grey, T.; Vencill, W.; Kichler, J.; Webster, T.; Brown, S.; York, A.; Davis, J.; Hanna, W. 2006. Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Science* 54: 620-626.

Dafni, A.; Firmagi, D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* 222: 113-132.

Dauer, J.; Mortensen, D.; VanGessel, M. 2007. Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. *Journal of Applied Ecology* 44: 105-114.

Dayan, F.; Watson, S. 2011. Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101: 182-190.

De la Fuente, E.; Suárez, S.; Ghersa, C. 2006. Soybean weed community composition and richness between 1995 and 2003 in the Rolling Pampas (Argentina). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 115: 229-236.

De la Fuente, E.; Suárez, S.; Ghersa, C.; León, R. 1999. Soybean weed communities: relationships with cultural history and crop yield. *Agronomy Journal* 91: 234-241.

de las Carreras, A. 2010. Ganados y carnes vacunas. En: "El crecimiento de la agricultura argentina" Reza, L.; Lema, D.; Flood, C. (Eds.). Buenos Aires. Ed. Facultad de Agronomía – UBA. 488pp.

De Prado, J.; Osuna, M.; Heredia, A.; De Prado, R. 2005. *Lolium rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2185-2191.

- De Prado, R.; Sánchez, M.; Jorrín, J.; Domínguez, C. 1992. Negative cross-resistance to bentazone and pyridate in atrazine-resistant *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus hybridus* biotypes. *Pesticide Science* 35: 131-136.
- De Wet, J.; Harlan J. 1975. Weeds and domesticates – evolution in man-made habitat. *Economic Botany* 29: 99–107.
- Dekker, J. 1997. Weed diversity and weed management. *Weed Science* 45: 357-363.
- Dekker, J.; Duke, S. 1995. Herbicide resistance in field crops. *Advances in Agronomy* 54: 69-116.
- Délye, C.; Clément, J.; Pernin, F.; Chauvel, B.; Le Corre, V. 2010. Gene flow homogenises the evolution of arable weed populations at the landscape level. *Basic and Applied Ecology* 11: 504-512
- Délye, C.; Jasieniuk, M.; Le Corre, V. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics* 29: 649-658.
- Délye, C.; Matějček, A.; Michel, S. 2008. Cross-resistance pattern to ACCase-inhibiting herbicide conferred by mutant ACCase isoforms in *Alopecurus myosuroides* Huds. (black-grass) re-examined at the recommended herbicide field rate. *Pest Management Science* 64: 1179-1186.
- Deniz, B.; Dogru, U. 2007. Interspecific hybridisation in *Lolium* evaluated by morphological genetic markers. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 50: 279-284.
- Devine, M.; Hall, L. 1990. Implications of sucrose translocation mechanisms for the translocation of herbicides. *Weed Science* 38: 299-304.
- Diaz Vivancos, P.; Driscoll, S.; Bulman, C.; Ying, L.; Emami, K.; Treumann, A.; Mauve, C.; Noctor, G.; Foyer, C. 2011. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant Physiology* 157: 256-268.
- Diez de Ulzurrun, P.; Leaden, M. 2012. Análisis de la sensibilidad de biotipos de *Lolium multiflorum* a herbicidas inhibidores de la enzima ALS, ACCasa y Glifosato. *Planta Daninha* 30: 667-673.
- Diez de Ulzurrun, P.; Margueritte Paz, C.; Leaden, M. 2011. Análisis de la tolerancia de *Lolium multiflorum* a glifosato en sistemas de promoción de raigrás. *Revista Argentina de Producción Animal* 31: 129-134.

Dill, G.; Sammons, D.; Feng, P.; Kohn, F.; Kretzmer, K.; Mehrsheikh, A.; Bleeke, M.; Honegger, J.; Farmer, D.; Wright, D.; Hauptfear, E. 2010. Glyphosate: discovery, development, applications and properties. En: "Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management". Nandula, V. (Ed.). Nueva Jersey. Willey & Sons. 321pp.

Dinelli, G.; Bonetti, A.; Lucchese, C.; Catizone, P.; Bravin, F.; Zanin, G. 2002. Taxonomic evaluation of Italian populations of *Lolium spp.* resistant and susceptible to diclofop-methyl. *Weed Research* 42: 156-165.

Dinelli, G.; Bonetti, A.; Marotti, I.; Minelli, M.; Busi, S.; Catizone, P. 2007. Root exudation of diclofop-methyl and triasulfuron from foliar-treated durum wheat and ryegrass. *Weed Research* 47: 25-33.

Dinelli, G.; Bonetti, A.; Marotti, I.; Minelli, M.; Catizone, P. 2004. Characterization of Italian populations of *Lolium spp.* resistant and susceptible to diclofop by inter simple sequence repeat. *Weed Science* 52: 554-563.

Dinelli, G.; Lucchese, C. 1999. Comparison between capillary and polyacrylamide gel electrophoresis for identification of *Lolium* species and cultivars. *Electrophoresis* 20: 2524-2532.

Dinelli, G.; Marotti, I.; Bonetti, A.; Minelli, M.; Catizone, P.; Barnes, J. 2006. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86: 30-41.

Dinelli, G.; Marotti, I.; Bonetti, A.; Catizone, P.; Urbano, J.; Barnes, J. 2008. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. *Weed Research* 48: 257-265.

Duhalde, J.; Di Nezio, L.; Perea, A.; Jensen, M. 2012. El crecimiento de la agricultura argentina. *Carpteta ganadera 2010/2011 -CEI Barrow-*. Disponible en: <http://www.inta.gob.ar>. Último acceso. 10/11/12.

Duke, S.; Baerson, S.; Rimando, A. 2003. Herbicides: glyphosate. En: "Encyclopedia of Agrochemicals" Plimmer, J.; Gammon, D.; Ragsdale, N. (Eds.). Nueva York. Wiley & Sons. 1638pp.

Duke, S.; Hoagland, R. 1978. Effects of glyphosate on metabolism of phenolics compounds. I. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in dark-grown maize roots. *Plant Science Letters* 11: 185-190.

Duke, S.; Powles, S. 2008. Glyphosate : a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 325: 319-325.

- Elgersma, A.; Leeuwangh, J.; Wilms, H. 1988. Abscission and seed shattering in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Euphytica* 39: 51-57.
- Ellstrand, N.; Hoffman, C. 1990. Hybridization as an avenue of escape for engineered genes. *BioScience* 40: 438-442.
- El-Tayeb, M.; Zaki, H. 2009. Cytophysiological response of *Vicia faba* to a glyphosate-based herbicide. *American-Eurasian Journal of Agronomy* 2: 168-175.
- Englard, S.; Seifter, S. 1990. Precipitation techniques. *Methods in Enzymology* 182: 285-300.
- Eschenburg, S.; Healy, M.; Priestman, M.; Lushington, G.; Schönbrunn, E. 2002 How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Planta* 216: 129-135.
- Espinoza, N.; Zapata, M. 2000. Resistencia de ballica anual (*Lolium rigidum* L.) y avenilla (*Avena fatua* L.) a herbicidas gramínicas en las zonas centro-sur y sur de Chile. *Agricultura técnica* 60: 3-13.
- Falster, D.; Westoby, M. 2003. Plant height and evolutionary games. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 337-343.
- Fearon, C. H.; Hayward, M.; Lawrence, M. 1983. Self-incompatibility in ryegrass. V. Genetic control, linkage and seed-set in diploid *Lolium multiflorum* Lam. *Heredity* 50: 35-45.
- Feng, P.; Tran, M.; Chiu, T.; Sammons, R.; Heck, G.; Jacob, C. 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science* 52: 498-505.
- Ferraro, D.; Ghersa, C. 2013. Fuzzy assessment of herbicide resistance risk: Glyphosate-resistant johnsongrass, *Sorghum halepense* (L.) Pers., in Argentina's croplands. *Crop Protection* 51: 32-39.
- Fracheboud, Y.; Leipner, J. 2003. The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. En: "Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology" Dell, J.; Toivonen, P. (Eds.). Norwell. Kluwer Academic Publishers. 259 pp.
- Franz, J.; Mao, M.; Sikorski, J. 1997. Glyphosate: A unique and global herbicide. ACS Monograph No. 189. Washington. American Chemical Society. 653pp.
- Fuchs, M.; Geiger, D.; Reynolds, T.; Bourque, J. 2002. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medikus). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74: 27-39.

- Gaines, T.; Zhang, W.; Wang, D.; Bukun, B.; Chisholm, S.; Shaner, D.; Nissen, S.; Patzoldt, W.; Tranel, P.; Culpepper, A.; Grey, T.; Webster, T.; Vencill, W.; Sammons, R.; Jiang, J.; Preston, C.; Leach, J.; Westra, P. 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 1029-1034.
- Gaines, T.; Shaner, D.; Ward, S.; Leach, J.; Preston, C.; Westra, P. 2011. Mechanism of resistance of evolved glyphosate-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 5886-5889.
- Gaitonde, M.; Gordon, M. 1958. A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 230: 1043-1050.
- Garcia, J.; Barbas, C.; Probanza, A.; Barrientos, M.; Manero, F. 2001. Low molecular weight organic acids and fatty acids in root exudates of two *Lupinus* cultivars at flowering and fruiting stages. *Phytochemical Analysis* 12: 305-311.
- Ge, X.; d'Avignon, D.; Ackerman, J.; Duncan, B.; Spaur, M.; Sammons, R. 2011. Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by ^{31}P NMR. *Pest Management Science* 67: 1215-1221.
- Ge, X.; d'Avignon, D.; Ackerman, J.; Sammons, R. 2010. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science* 66: 345-348.
- Geiger, D.; Bestman, H. 1990. Self-limitation of herbicide mobility by phytotoxic action. *Weed Science* 38: 324-329.
- Geiger, D.; Kapitan, S.; Tucci, M. 1986. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves, *Plant Physiology* 82: 468-472.
- Geiger, D.; Shieh, W.; Fuchs, M. 1999. Causes of self-limited translocation of glyphosate in *Beta vulgaris* plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64: 124-133.
- Geisy, J.; Dobson, S.; Solomon, K. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167: 35-120.
- Ghersa, C.; Martínez-Ghersa, M.; Brewer, T.; Roush, M. 1994. Use of gene flow to control diclofop-methyl resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Weed Technology* 8: 139-147.
- Giddings, G. 2000. Modeling the spread of pollen from *Lolium perenne*. The implications for the release of wind-pollinated transgenics. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 971-974.

- Giddings, G.; Sackville-Hamilton, N.; Hayward, M. 1997a. The release of genetically modified grasses. Part 1: Pollen dispersal to traps in *Lolium perenne*. Theoretical and Applied Genetics 94: 1000-1006.
- Giddings, G.; Sackville-Hamilton, N.; Hayward, M. 1997b. The release of genetically modified grasses. Part 2: The influence of wind direction on pollen dispersal. Theoretical and Applied Genetics 94: 1007-1014.
- Goldberg, D. 1990. Components of resource competition in plant communities. En: "Perspectives in Plant Competition" Grace, J.; Tilman, D. (Eds.). San Diego. Academic Press. 484pp.
- Gougler, J.; Geiger, D. 1981. Uptake and distribution of N-phosphono-methylglycine in sugar beet plants. Plant Physiology 68: 668-672.
- Govindaraju, D. 1988. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants. Oikos 52: 31-35.
- Grahan, P.; Steiner, J.; Wiese, A. 1998. Light Absorption and Competition in Mixed Sorghum-Pigweed Communities. Agronomy Journal 80: 415-418.
- Grandy, A.; Robertson, G.; Thelen, K. 2006. Do productivity and environmental trade-offs justify periodically cultivating no-till cropping systems? Agronomy Journal 98: 1377-1383.
- Gressel, J. 2009. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. Pest Management Science 65: 1164-1173.
- Gressel, J.; Segel, L. 1978. The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides: possible reasons and implications. Journal of Theoretical Biology 75: 349-371.
- Gressel, J.; Segel, L. 1990. Modelling the effectiveness of herbicide rotations and mixtures as strategies to delay or preclude resistance. Weed Technology 4: 186-198.
- Griffiths, D. 1950. The liability of seed crops of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) to contamination by wind-borne pollen. Journal of Agricultural Science 40: 19-38.
- Grossbard, E.; Atkison, D. 1985. The herbicide glyphosate. Londres. Butterworth. 490pp.
- Guoxi, L.; Sen, Z.; Houjin, L.; Zhongi, Y.; Guorong, X.; Jiangang, Y.; Yi, L. 2008. Allelopathic effects of decaying Italian ryegrass (*Lolium mutiflorum* Lam.) residues on rice. Allelopathy Journal 22: 15-24.

- Gussin, E.; Lynch, J. 1981. Microbial fermentation of grass residues to organic acids as a factor in the establishment of new grass swards. *New Phytologist* 89: 449-457.
- Hakansson, S. 2003. Weeds and weed management on arable land. An ecological approach. Cambridge. CABI Publishing. 274 pp.
- Hale, M.; Foy, C.; Shay, F. 1971. Factors affecting root exudation. *Advances in Agronomy* 23: 89-109.
- Hall, L.; Holtum, J.; Powles, S. 1994. Mechanisms responsible for cross resistance and multiple resistance. En: "Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry" Powles, S.; Holtum, J. (Eds.). Boca Raton. Lewis Publishers. 353pp.
- Hall, L.; Moss, S.; Powles, S. 1997. Mechanisms of resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in two resistant biotypes of *Alopecurus myosuroides* (blackgrass): herbicide metabolism as a cross-resistance mechanism. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 57: 87-98.
- Hanski, I.; Gilpin, M. 1997. Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution. Nueva York. Academic Press. 512pp.
- Harker, K.; Clayton, G. 2004. Diversified weed management systems. En: *Weed biology and management*. Inderjit (Ed.). Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 566pp.
- Harker, K.; O'Donovan, J. 2013. Recent weed control, weed management, and integrated weed management. *Weed Technology* 27: 1-11
- Harper, J. 1977. Population biology of plants. London, Gran Bretaña: Academic Press.
- Hashem, A.; Radosevich, S.; Roush, M. 1998. Effect of proximity factors on competition between winter wheat (*Triticum aestivum*) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Weed Science* 46: 181-190.
- Haslam, E. 1993. Shicimic Acid: metabolism and metabolites. Chichester. Wiley. 387pp.
- Hassan, S.; Bigler, F.; Bogenschütz, H.; Boller, E.; Brun, J.; Chiverton, P.; Edwards, P.; Mansour, F.; Naton, E.; Oomen, P.; Overmeer, P.; Polgar, L.; Rieckmann, W.; Samsøe-Petersen, L.; Stäubli, A.; Sterk, G.; Tavares, K.; Tuset, J.; Viggiani, G.; Vivas, A. 1988 Results of the fourth joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". *Journal of Applied Entomology* 105: 321-329.
- Heap, I. 2013. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en: <http://www.weedscience.com>. Último acceso: 11/11/12.

Henry, W.; Shaner, D.; West, 2007. Shikimate accumulation in sunflower, wheat, and proso millet after glyphosate application. *Weed Science* 55: 1-5.

Hensley, J. 1981. A method for identification of triazine resistant and susceptible biotypes of several weeds. *Weed Science* 29: 70-73.

Hoagland, D.; Snyder, W. 1933. Nutrition of strawberry plants under controlled conditions. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 30: 288-296.

Hoagland, R.; Norsworthy, J.; Talbert, R. 1999. Chemical interactions with the herbicide propanil on propanil-resistant barnyardgrass. *Pest Management Science* 55: 571-573.

Holt, J.; Le Baron, H. 1990. Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology* 4: 141-149.

Holt, J.; Powles, S.; Holtum, J. 1993. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 203-229.

Huertas, I.; Rouco, M.; López-Rodas, V.; Costas, E. 2010. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytologist* 188: 478-487

Hull, H. 1970. Leaf structure as related to absorption of pesticides and other compounds. *Residue Reviews* 31: 1-150.

Humphreys, M. 1991. Genetic control of physiological response - a necessary relationship. *Functional Ecology* 5: 213-221.

Hutchinson, J.; Rees, H.; Seal, A. 1979. An assay of the activity of supplementary DNA in *Lolium*. *Heredity* 43: 411-421.

Inda-Aramendía, L. 2005. El género *Lolium*. Claves dicotómicas. *Revista de la Real Academia de Ciencias de Zaragoza*. 60: 143-155.

Ireland, C.; Percival, M.; Baker, N. 1986. Modification of the induction of photosynthesis in wheat by glyphosate, an inhibitor of amino acid metabolism. *Journal of Experimental Botany* 37: 299-308.

Istilart, C. 1991. Relevamiento de malezas en cultivos de trigo en los partidos de Tres Arroyos, G. Chaves y Necochea. *XII Reunión ASAM* 2: 87-96.

Istilart, C.; Yannicari, M. 2012. Análisis de la evolución de malezas en cereales de invierno durante 27 años en la zona sur de la pampa húmeda argentina. *Revista*

- Técnica Especial: Malezas problema (Aapresid): 47-50.
- Jain, H. 1957. Effect of high temperature on meiosis in *Lolium*: nucleolar inactivation. *Heredity* 11: 23-36.
- Jasieniuk, M.; Brule Babel, A.; Morrison, I. 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science* 44: 176-193.
- Jaspers, P.; Kangasjärvi, J. 2010. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling, *Physiologia Plantarum* 138: 405-413.
- Jenkin, T. 1924. The artificial hybridization of grasses. *Welsh Plant Breed Station Bull H* 2: 2-18.
- Jensen, P. 2010. Longevity of seeds of *Poa pratensis* and *Lolium perenne* as affected by simulated soil tillage practices and its implications for contamination of herbage seed crops. *Grass and Forage Science* 65: 85-91.
- Johnson, W.; Davis, V.; Kruger, G.; Weller, S. 2009. Influence of glyphosate-resistant cropping systems on weed species shifts and glyphosate-resistant weed populations. *European Journal of Agronomy* 31: 162-172.
- Johnston, J.; Bennett, M.; Rayburn, A.; Galbraith, D.; Price, H. 1999. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany* 86: 609-613.
- Jones, R.; Jenabzadeh, P. 1981. Variation in self-fertility, flowering time and inflorescence production in inbred *Lolium perenne* L. *Journal of Agricultural Science* 96: 521-537.
- Jordan, N.; Kelrick, M.; Brooks, J.; Kinerk, W. 1999. Biorational management tactics to select against triazine-resistant *Amaranthus hybridus*: a field trial. *Journal of Applied Ecology* 36: 123-132.
- Jung, G.; van Wijk, A.; Hunt, W.; Watson, C. 1996. Ryegrasses. En: "Cool-season forage grasses". Moser, L.; Buxton, D.; Casler, M (Eds.). *Agronomy monograph* 34. Madison. American Society of Agronomy. 841pp.
- Kaundun, S.; Dale, R.; Zelaya, I.; Dinelli, G.; Marotti, I.; McIndoe, E.; Cairns, A. 2011. A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 3227-3233.
- Kaundun, S.; Windass, J. 2006. Derived cleaved amplified polymorphic sequence, a simple method to detect a key point mutation conferring acetyl CoA carboxylase inhibitor herbicide resistance in grass weeds. *Weed Research* 46: 34-39.

- Kim, D.; Caseley, J.; Brian, P.; Riches, C.; Valverde, B. 2000. Rapid Detection of Propanil and Fenoxaprop Resistance in *Echinochloa colona*. *Weed Science* 48: 695-700.
- Kirkwood, R.C. 1993. Use and mode of action of adjuvants to herbicides: a review of some current work. *Pesticide Science* 38: 93-102.
- Kitchen, L.; Witt, W.; Rieck, C. 1981. Inhibition of D-aminolevulinic acid synthesis by glyphosate. *Weed Science* 29: 571-577.
- Kleffmann y Partner, S.R.L. 2008. Mercado argentino de productos fitosanitarios 2008. Buenos Aires. Informe para la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). 12pp.
- Labrada, R.; Parker, C. 1996. El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. En: "Manejo de malezas para países en desarrollo". Labrada, R.; Caseley, J.; Parker, C. Roma. FAO. 403pp.
- Lanzetta, P.; Alvarez, L.; Reinach, P.; Candia, O. 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry* 100: 95-97.
- Le Baron, H.; Gressel, J. 1982. Herbicide resistance in plants. Nueva York. Wiley & Sons. 441pp.
- Le Baron, H.; McFarland, J. 1990. Overview and prognosis of herbicide resistance in weeds and crops. En: "Managing Resistance to agro-chemicals: from fundamental research to practical strategies." Green, M.; Le Baron, H.; Moberg, W. (Eds). Washington. American Chemical Society. 496pp.
- Lee, T. 1981. Effects of glyphosate on synthesis and degradation of chlorophyll in soybean and tobacco cells. *Weed Research* 21: 161-164.
- Lemerle, D.; Verbeek, B.; Cousens, R.; Coombes, N. 1996. The potential for selecting wheat varieties strongly competitive against weeds. *Weed Research* 36: 505-513.
- Lemerle, D.; Verbeek, B.; Orchard, B. 2001. Ranking the ability of wheat varieties to compete with *Lolium rigidum*. *Weed Research* 41: 197-209.
- Lison, L. 1976. Las condiciones de validez del análisis de la varianza y de los ensayos t, defectos y soluciones. En: "Estadística aplicada a la biología experimental" Lison, L. Buenos Aires. EUDEBA. 355pp.
- Londo, J.; Bautista, N.; Sagers, C.; Lee, E.; Watrud, L. 2010. Glyphosate drift promotes changes in fitness and transgene gene flow in canola (*Brassica napus*) and hybrids. *Annals of Botany* 106: 957-965.

- Loos, B. 1993. Morphological variation in *Lolium* (Poaceae) as a measure of species relationships. *Plant Systematics and Evolution* 188: 87-99.
- Lorraine-Colwill, D.; Powles, S.; Hawkes, T.; Hollinshead, P.; Warner, S.; Preston, C. 2003. Investigations into mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74: 62-72.
- Lorraine-Colwill, D.; Powles, S.; Hawkes, T.; Preston, C. 2001. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum* Gaud. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 545-550.
- Lu, B.; Yang, C. 2009 Gene flow from genetically modified rice to its wild relatives: Assessing potential ecological consequences. *Biotechnology Advances* 27: 1083-1091.
- MacMillan, C.; Blundell, C.; King, R. 2005. Flowering of the grass *Lolium perenne*. Effects of vernalization and long days on gibberellin biosynthesis and signaling. *Plant Physiology* 138: 1794-1806.
- Madsen, K.; Heitholt, J.; Duke, S.; Smeda, R.; Streibig, J. 1995. Photosynthetic parameters in glyphosate-treated sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Weed Research* 35: 81-88.
- Mallory-Smith, C.; Olguín, E. 2011. Gene flow from herbicide-resistant crops: It's not just for transgenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 5813-5818.
- Mallory-Smith, C.; Zapiola, M. 2008. Gene flow from glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science* 64: 428-440.
- Manzanares, C. 2013. Genetics of self-compatibility in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Facultad de Biociencias. Universidad de Birmingham. Tesis doctoral. 319pp.
- Martin, R.; Edington, L. 1981. Comparative systemic translocation of several xenobiotics and sucrose. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 16: 87-96.
- Maxwell, B.; Roush, M.; Radosevich, S. 1990. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. *Weed Technology* 4: 2-13.
- Maynard Smith, J. 1998. *Evolutionary Genetics*. Oxford. Oxford University Press. 362pp.
- McCarty, L.; McCauley, H.; Liu, H.; Totten, F.; Toler, J. 2010. Perennial ryegrass allelopathic potential on bermudagrass germination and seedling growth. *HortScience* 45: 1872-1875.

- McMurtrie, R.; Wang, Y. 1993. Mathematical models of the photosynthetic responses of tree stands to rising CO₂ concentrations and temperatures. *Plant, Cell and Environment* 16: 1-3.
- Medrano, H.; Galmés, J.; Flexas, J. 2008. Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. En: "Fundamentos de fisiología vegetal". Azcón-Bieto, J.; Talón, M. Madrid. McGraw-Hill Interamericana. 656pp.
- Menchari, Y.; Chauvel, B.; Darmency, H.; Delye, C. 2008. Fitness costs associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. *Journal of Applied Ecology* 45: 939-947.
- Mengel, K.; Kirkby, E. 2001. Principles of plant nutrition. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 849pp.
- Michitte, P.; De Prado, R.; Espinoza, N.; Ruiz-Santaella, J.; Gauvrit, C. 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science* 55: 435-440.
- Mohseni-Moghadam, M.; Schroeder, J.; Heerema, R.; Ashigh, J. 2013. Resistance to Glyphosate in Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) Populations from New Mexico Pecan Orchards. *Weed Technology* 27: 85-91.
- Moss, S. 2008. Weed research: is it delivering what it should? *Weed Research* 48: 389-393.
- Moss, S. 2012. Detecting herbicide resistance. Guidelines for conducting diagnostic tests and interpreting results. Herbicide Resistance Action Committee. Disponible en: <http://www.hracglobal.com>. Último acceso: 15/08/2013.
- Myers, W. 1939. Colchicine induced tetraploidy in perennial ryegrass. *Journal of Heredity* 30: 499-504.
- Nair, R. 2004. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 47: 45-49.
- Nakamura, A.; Catterall, C.; Kitching, R.; House, A.; Burwell, C. 2008. Effects of glyphosate herbicide on soil and litter macro-arthropods in rainforest: implications for forest restoration. *Ecological Management and Restoration* 9: 126-133.
- Nandula, V.; Reddy, K.; Poston, D.; Rimando, A.; Duke, S. 2008. Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. *Weed Science* 56: 344-349.

- Neve, P.; Diggle, A.; Smith, F.; Powles, S. 2003. Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* I: population biology of a rare resistance trait. *Weed Research* 43: 404-417.
- Ng, C.; Wickneswari, R.; Salmijah, S.; Teng, Y.; Ismail, B. 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Research* 43: 108-115.
- Ng, C.; Wicneswary, R.; Salmijah, S.; Ismail, B. 2004a. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Science* 52: 564-570.
- Ng, C.; Wicneswary, R.; Salmijah, S.; Teng, Y.; Ismail, B. 2004b. Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L.) Gaertn. from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Australian Journal of Agricultural Research* 55: 407-414.
- Nissen, S.; Masters, R.; Thompson, W.; Stougaard, R. 1994. Imazethapyr absorption and fate in leafy spurge (*Euphorbia esula*). *Weed Science* 42: 158-162.
- Norsworthy, J.; Ward, S.; Shaw, D.; Llewellyn, R.; Nichols, R.; Webster, T.; Bradley, K.; Frisvold, G.; Powles, S.; Burgos, N.; Witt, W.; Barrett, M. 2012 Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. *Weed Science* 2012 Special Issue: 31-62.
- Obschatko, E.; Piñeiro, M. 1986. Agricultura pampeana: cambio tecnológico y sector privado. Buenos Aires. Centro de Investigaciones Sociales sobre el Estado y la Administración. 63pp.
- Olea, I. 2013. *Sorghum halepense*, *Echinochloa colona* y otras posibles malezas resistentes a glifosato en el Noroeste Argentino. I Seminario Internacional: Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. INIA, Uruguay.
- Olesen, C.; Cedergreen, N. 2010. Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Pest Management Science* 66: 536-542.
- Orcaray, L.; Zulet, A.; Zabalza, A.; Royuela, M. 2012. Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *Journal of Plant Physiology* 169: 27-33.
- Otto, F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. En: "Methods in cell biology". Vol. 33. Darzynkiewickz, Z.; Crissman H. (Eds.). San Diego. Academic Press. 716pp.
- Owen, M.; Powles, S. 2010. Glyphosate-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations in the Western Australian grain belt. *Weed Technology* 24: 44-49.

- Pandey, S.; Singh, H. 2011. A simple, cost-effective method for leaf area estimation. *Journal of Botany* 2011: 1-6.
- Patzoldt, W.; Tranel P. 2007. Multiple ALS mutations confer herbicide resistance in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Science* 55: 421-428.
- Paul, M.; Foyer, C. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1383-1400.
- Pedersen, B.; Neve, P.; Andreasen, C.; Powles, S. 2007. Ecological fitness of a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population: growth and seed production along a competition gradient. *Basic and Applied Ecology* 8: 258-268.
- Pengue, W. 2005. Transgenic crops in Argentina: the ecological and social debt. *Bulletin of Science, Technology and Society* 25: 314-322.
- Perez A.; Kogan, M. 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Research* 43: 12-19.
- Perez-Jones, A.; Park, K.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C.; Shaner, D. 2005. Identification of glyphosate-resistant ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Science* 53: 775-779.
- Perez-Jones, A.; Park, K.; Polge, N.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226: 395-404
- Peruzzo, P.J.; Porta, A.A.; Ronco, A.E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156: 61-66.
- Pihakaski, S.; Pihakaski, K. 1980. Effects of glyphosate on ultrastructure and photosynthesis of *Pellia epiphylla*. *Annals of Botany* 46: 133-141.
- Pline, W.; Wilcult, J.; Edmisten, K.; Wells, R. 2002a. Physiological and morphological response of glyphosate-resistant and non-glyphosate-resistant cotton seedlings to root-absorbed glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73: 48-58.
- Pline, W.; Wilcut, J.; Duke, S.; Edmisten, K.; Wells, R. 2002b. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 506- 512.
- Pline-Srnic, W. 2006. Physiological mechanisms of glyphosate resistance. *Weed Technology* 20: 290-300.

- Polok, K. 2007. Molecular evolution of the genus *Lolium* L. Olsztyn. Studio Poligrafii Komputerowej. 318pp.
- Pop, M.; Sand, C.; Barbu, H.; Balan, M.; Grusea, A.; Boeriu, H.; Popa, A. 2010. Correlations between productivity elements in *Lolium perenne* L. species for new varieties resistant to drought. *Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie* 27: 183-185.
- Powles, S.; Holtum, J. 1994. *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*. Boca Raton. Lewis Publishers 353pp.
- Powles, S.; Lorraine-Colwill, D.; Dellow, J.; Preston, C. 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science* 46: 604-607.
- Powles, S.; Yu, Q. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61: 317-347.
- Prata, F.; Camponez, V.; Lavorenti, A.; Tornisiello, V.L.; Borges, J. 2003. Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels. *Scientia Agricola* 60: 175-180.
- Preston, C.; Powles, S. 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.
- Preston, C.; Wakelin, A.; Dolman, F.; Bostamam, Y.; Boutsalis, P. 2009. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. *Weed Science* 57: 435-441.
- Puntarulo, S.; Sánchez, R.; Boveris, A. 1998. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiology* 86: 626-630.
- Puri, A.; MacDonald, G.; Haller, W. 2007. Ploidy variations in fluridone-susceptible and -resistant hydrilla (*Hydrilla verticillata*) biotypes. *Weed Science* 55: 578-583.
- Puricelli, E.; Tuesca, D. 2005. Weed density and diversity under glyphosate-resistant crop sequences. *Crop Protection* 24: 533-542.
- Radosevich, S.; Holt, J.; Ghersa, M. 1997. *Weed ecology. Implications for management*. Nueva York. Wiley & Sons. 589pp.
- Radosevich, S.; Holt, J.; Ghersa, C. 2007. *Ecology of weeds and invasive plants: relationship to agriculture and natural resource management*. Nueva York. Wiley & Sons. 472pp.

- Rainero, H. 2008. Problemática del manejo de malezas en sistemas productivos actuales. Boletín de Divulgación Técnica Nro. 3. Manfredi. Ed. INTA. 14pp.
- Reade, J.; Milner, L.; Cobb, A. 2004. A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. *Weed Science* 52: 468-474.
- Ribeiro, D.; Gil, D.; Cruz-Hipólito, H.; Ruiz-Santaella, J.; Christoffoleti, P.; Vidal, R.; De Prado, R. 2008. Rapid assays for detection of glyphosate-resistant *Lolium spp.* *Journal of Plant Disease and Protection* 21: 95-100.
- Richter, J.; Powles, S. 1993. Pollen expression of herbicide target site resistance genes in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Plant Physiology* 102: 1037-1041.
- Roach, D.; Wulff, R. 1987. Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 209-235.
- Rognli, O.; Nilsson, N.; Nurminiemi, M. 2000. Effects of distance and pollen competition on gene flow in the wind-pollinated grass *Festuca pratensis* Huds. *Heredity* 85: 550-560.
- Rosenqvist, E.; van Kooten, O. 2003 Chlorophyll Fluorescence : a general description and nomenclature. En: "Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology" Dell, J.; Toivonen, P. (Eds.). Norwell. Kluwer Academic Publishers. 259pp.
- Roso, A.; Vidal, R. 2010 A modified phosphate-carrier protein theory is proposed as a non-target site mechanism for glyphosate resistance in weeds. *Planta Daninha* 28: 1175-1185.
- Roux, F.; Gasquez, J.; Reboud, X. 2004. The dominance of the herbicide resistance cost in several *Arabidopsis thaliana* mutant lines. *Genetics* 166: 449-460.
- Ryan Gregory, T. 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews* 76: 65-101.
- Ryan, E.; Mullins, E.; Burke, J.; Downes, M.; Meade, C. 2006. Tracing field hybridization in Ryegrass species using microsatellite and morphological markers. *Environmental Biosafety Research* 5: 11-17.
- Ryan, G. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science* 18: 614-616.
- Salas, R.; Dayan, F.; Pan, Z.; Watson, S.; Dickson, J.; Scott, R.; Burgos, N. 2012. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne ssp. multiflorum*) from Arkansas. *Pest Management Science* 68: 1223-1230.

Schneider, M.; Sánchez, N.; Pineda, S.; Chi, H.; Ronco, A. 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. *Chemosphere* 76: 1451-1455.

Schönbrunn, E.; Eschenburg, S.; Shuttleworth, W.; Schloss, J.; Amrhein, N.; Evans, J.; Kabsch, W. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 1376-1380.

Schönherr J.; Riederer M. 1989. Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 108: 1-70.

Schreiber, U.; Bilger, W.; Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. En: "Ecophysiology of photosynthesis. Ecological studies" Schulze, E.; Caldwell, M. (Eds.). Nueva York. Springer. 576pp.

Seal, A.; Rees, H. 1982. The distribution of quantitative DNA changes associated with the evolution of diploid Festuceae. *Heredity* 49: 179-190.

Senseman, S. 2007. *Herbicide Handbook*. Ed 9. Lawrence. Weed Science Society of America. 458pp.

Sergiev, I.; Alexieva, V.; Ivanov, S.; Moskova, I.; Karanov, E. 2011. The phenyl urea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: 139-146.

Servaites, J.; Tucci, M.; Geiger, D. 1987. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. *Plant Physiology* 85: 370-374.

Shaner, D. 2009. The role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Science* 57: 118-123.

Shaner, D.; Nadler-Hassar, T.; Henri, W.; Koger, C. 2005. A rapid in vivo shikimate assay with excised leaf disc. *Weed Science* 53: 769-774.

Siehl, D. 1997. Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthase and hystidine synthesis. En: "Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology" Roe, R.; Burton, J.; Kuhr, R. (Eds.). Amsterdam. IOS Press. 205pp.

Silvertown, J.; Charlesworth, D. 2001. *Introduction to plant population biology*. Oxford. Blackwell Science. 210pp.

- Simarmata, M.; Bughrara, S.; Penner, D. 2005. Inheritance of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. *Weed Science* 53: 615-619.
- Simarmata, M.; Penner, D. 2008. The basis for glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. *Weed Science* 56: 181-188.
- Singh B.; Shaner D. 1998. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology* 12: 527-530.
- Singh, S.; Khurma, U.; Lockhart, P. 2010. Weed hosts of root-knot nematodes and their distribution in Fiji. *Weed Technology* 24: 607-612.
- Slatkin M. 1976. The rate of spread of an advantageous allele in a subdivided population. En: "Population genetics and ecology" Karlin, S.; Nevo, E. (Eds.). Nueva York. Academic Press. 832pp.
- Smart, C.; Johilnning, D.; Miiller, G.; Amrhein, N. 1985. Selective overproduction of 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 16338-16346.
- Søbye, K.; Streibig, J.; Cedergreen, N. 2011. Prediction of joint herbicide action by biomass and chlorophyll a fluorescence. *Weed Research* 51: 23-32.
- Souza, A.; Ferreira, F.; Silva, A.; Cardoso, A.; Ruiz, H. 1999. Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr. *Planta Daninha* 17: 387-398.
- Spoor, W. 1976. Self-incompatibility in *Lolium perenne* L. *Heredity* 37: 417-421.
- Sprankle, P.; Meggitt, W.; Penner, D. 1975. Adsorption, action and translocation of glyphosate. *Weed Science* 23: 235-240.
- Steadman, K. 2004. Dormancy release during hydrated storage in *Lolium rigidum* seeds is dependent on temperature, light quality, and hydration status. *Journal of Experimental Botany* 55: 929-937.
- Steadman, K.; Crawford, A.; Gallagher, R. 2003a. Dormancy release in *Lolium rigidum* seeds is a function of thermal after-ripening time and seed water content. *Functional Plant Biology* 30: 345-352.
- Steadman, K.; Bignell, G.; Ellery, A. 2003b. Field assessment of thermal after-ripening time for dormancy release prediction in *Lolium rigidum* seeds. *Weed Research* 43: 458-465.
- Streibig J.; Rudemo, M.; Jensen, J. 1993. Dose-response curves and statistical models. En: "Herbicide Bioassays" Streibig, J.; Kudsk, P. (Eds.). Boca Raton. CRC Press. 270pp.

- Su, L.; De la Cruz, A.; Moore, P.; Maretzki, A. 1992. The relationship of glyphosate treatment to sugar metabolism in sugarcane: new physiological insights. *Journal of Plant Physiology* 140: 168-173.
- Sugiyama, S. 1998. Differentiation in competitive ability and cold tolerance between diploid and tetraploid cultivars in *Lolium perenne*. *Euphytica* 103: 55-59.
- Sugiyama, S. 2006. Responses of shoot growth and survival to water stress gradient in diploid and tetraploid populations of *Lolium multiflorum* and *L. perenne*. *Grassland Science* 52: 155-160.
- Sugiyama, S.; Yamaguchi, K.; Yamada, T. 2002. Intraspecific phenotypic variation associated with nuclear DNA content in *Lolium perenne* L. *Euphytica* 128: 145-151.
- Sullivan, C. 1972. Mechanisms of heat and drought resistance in grain sorghum and methods of measurement. En: "Sorghum in the seventies" Rao N.; House L. (Eds.). Oxford. IBH Publishing Company. 638pp.
- Sullivan, T. 1985. Effects of glyphosate on selected species of wildlife. En: "The Herbicide Glyphosate" Grossbard, E.; Atkinson, D. (Eds.). Londres. Butterworth. 490pp.
- Swanton, C.; Clements, D.; Derksen, D. 1993. Weed succession under conservation tillage: A hierarchical framework for research and management. *Weed Technology* 7: 286-297.
- Swanton, C.; Murphy, S. 1996. Weed science beyond the weeds: the role of integrated weed management (IWM) in agroecosystem health. *Weed Science* 44: 437-445.
- Taberner Palou, A. 1996. Biología de *Lolium rigidum* Gaud. Como planta infestante del cultivo de cebada. Aplicación al establecimiento de métodos de control. Tesis doctoral. 86pp.
- Tardif, F.; Rajcan, I.; Costea, M. 2006. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. *New Phytologist* 169: 251-264.
- Thorogood, D.; Armstead, I.; Turner, L.; Humphreys, M.; Hayward, M. 2005. Identification and mode of action of self-compatibility loci in *Lolium perenne* L. *Heredity* 94: 356-363.
- Thorogood, D.; Hayward, D. 1991. The genetic control of self-compatibility in an inbred line of *Lollum perenne* L. *Heredity* 67: 175-181.

Thorogood, D.; Kaiser, W.; Jones, J.; Armstead, I. 2002. Self- incompatibility in ryegrass 12. Genotyping and mapping the S and Z loci of *Lolium perenne* L. *Heredity* 88: 385-390.

Tracey, A.; Aarssen, L. 2011. Competition and body size in plants: the between-species trade-off for maximum potential versus minimum reproductive threshold size. *Journal of Plant Ecology* 4: 115-122.

Tranel, P.; Wright, T. 2002. Resistance of weeds to ALS- inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* 50: 700-712.

Trigo, E.; Cap, E.; Malach, V.; Villarreal, F. 2009. The case of zero-tillage technology in Argentina. International Food Policy Research Institute. Washington. 2020 Vision Initiative. 33pp.

Ulanov, A.; Lygian, A.; Duncan, D.; Widholm, J.; Lozovaya, V. 2009. Metabolic effects of glyphosate change the capacity of maize culture to regenerate plants. *Journal of Plant Physiology* 166: 978-987.

Ustarroz, D.; Mazzini, P.; Rainero, H. 2012. Avances en el manejo de *Cynodon hirsutus* resistente a glifosato. Cartilla Digital INTA Manfredi. Disponible en: www.inta.gob.ar. Último acceso: 11/05/13.

Vargas, L.; Bianchi, M.; Rizzardi, M.; Agostinetto, D.; Dal Magro, T. 2007. *Conyza bonariensis* biotypes resistant to the glyphosate in Southern Brazil. *Planta Daninha* 25: 573-578.

Vereecken, H. 2005. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science* 61: 1139-1151.

Vigna, M.; López, R.; Gigón, R. 2008. Efecto de glifosato sobre cultivares de raigrás en el SO de Buenos Aires. XVII Congreso Latinoamericano Malezas. Ouro Preto - MG-Brasil.

Vila-Aiub, M.; Balbi, M.; Distéfano, A.; Fernandez, L.; Hopp, E.; Yu, Q.; Powles, S. 2012. Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass) endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. *Pest Management Science* 68: 430-436

Vila-Aiub, M.; Balbi, M.; Gundel, P.; Ghersa, C.; Powles, S. 2007. Evolution of glyphosate-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean. *Weed Science* 55: 566-571.

Vila-Aiub, M.; Neve, P.; Powles, S. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist* 184:751-767.

- Vila-Aiub, M.; Neve, P.; Steadman, K.; Powles, S. 2005. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. *Journal of Applied Ecology* 42: 288-298.
- Vila-Aiub, M.; Neve, P.; Roux, F. 2011. A unified approach to the estimation and interpretation of resistance costs in plants. *Heredity* 107: 386-394.
- Vogel, K.; Arumuganathan, K.; Jensen, K. 1999. Nuclear DNA content of perennial grasses of the Triticeae. *Crop Science* 39: 661- 667.
- Wakelin, A.; Lorraine-Colwill, D.; Preston, C. 2004. Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Research* 44: 453-459.
- Wakelin, A.; Preston, C. 2006a. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. *Weed Research* 46: 432-440.
- Wakelin, A.; Preston, C. 2006b. Inheritance of glyphosate resistance in several populations of rigid rygrass (*Lolium rigidum*) from Australia. *Weed Science* 54: 212-219.
- Wardlaw, I. 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist* 116: 341-381.
- Wauchope, R.; Butler, T.; Hornsby, A.; Augustijn-Beckers, P.; Burt, J. 1992. The SCS/ARS/CES pesticide properties database: select values for environmental decision making. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 123: 1-164.
- Weaver, L.; Hermann, K. 1997. Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science* 2: 346-351.
- Weed Science Society of America. 1998. Resistance and tolerance definitions. *Weed Technology* 12: 789.
- Williams, G.; Kroes, R.; Munro, I. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31: 117-165.
- Woodburn, A. 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science* 56: 309-312.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Yannicari, M.; Acciaresi, A. 2013. Perennial weeds in Argentinean crop systems: biological and ecological characteristics and basis for a rational weed management.

En: "Agricultural Research Updates Vol. 5." Gorawala, P.; Mandhatri, S. (Eds.). Nueva York. Nova Science Publishers. 176pp.

Yanniccari, M.; Istilart, C.; Giménez, D. 2009. Evaluación de la resistencia a glifosato de una población de *Lolium perenne* L. del sur de la provincia de Buenos Aires. II Congreso Iberoamericano de Ciencias de las Malezas. Lisboa – Portugal. Volumen II: 521-524.

Yanniccari, M.; Istilart, C.; Giménez, D.; Castro, A. 2012. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. *Crop Protection* 32: 12-16.

Yasuor, H.; TenBrook, P.; Tjeerdema, R.; Fischer, A. 2008. Responses to clomazone and 5-ketoclomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice field. *Pest Management Science* 64: 1031-1039.

Yu, Q.; Abdallah, I.; Han, H.; Owen, M.; Powles, S. 2009. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta* 230: 713-723.

Yu, Q.; Cairns, A.; Powles, S. 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 225: 499-513.

Yu, Q.; Collavo, A.; Zheng, M.; Owen, M.; Sattin, M.; Powles S. 2007. Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. *Plant Physiology* 145: 547-558

Yu, L.; Kim, Y.; Tong, L. 2010. Mechanism for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase by pinoxaden. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 22072-22077.

Zelaya, I.; Owen M.; VanGessel M. 2004. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 58-70.

Zhang, H.; Tweel, B.; Tong, L. 2004. Molecular basis for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme-A carboxylase by haloxyfop and diclofop. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 5910-5915.

Zimdahl, R. 2007. *Weed-crop competition: a review*. Iowa. Blackwell Publishing. 220pp.

Zobiolo, L.; de Oliveira, R.; Kremer, R.; Constantin, J.; Bonato, C.; Muniz, M. 2010. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. *Pesticide Biochemistry Physiology* 97: 182-193.

