

Aplicación conjunta de herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos en malas hierbas sensibles y resistentes

Trabajo fin de grado

Presentado por

OSCAR ARMENDARIZ GARCIA-*k*

aurkeztua

Pamplona, junio de 2014

Iruñean, 2014-ko ekaina

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL
NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN ETA LANDA INGURUNEAREN INGENIARITZAKO GRADUA

Mención hortofruticultura, jardinería y paisaje
Baratzezaintza, frutagintza, lorezaintza eta paisaia aipamena

A mis compañeros/as

Nire kideei

RESUMEN

Se ha evaluado la existencia de sinergia o antagonismo y se ha profundizado en el modo de acción de aplicaciones conjuntas de dos herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (glifosato) o ramificados (imazamox), tanto en un biotipo de *Amaranthus palmeri* sensible y en otro resistente a glifosato. Dicha evaluación se ha realizado de una manera novedosa, ya que se ha abordado utilizando como marcadores de ambos herbicidas los efectos fisiológicos de su toxicidad. Se determinó previamente una dosis de imazamox, no demasiado agresiva que permitiera su aplicación combinada con las dosis de glifosato establecidas previamente. Se corroboraron los marcadores fisiológicos del imazamox sobre la planta objeto de estudio. Se evaluaron como marcadores fisiológicos el contenido de aminoácidos libres, de proteína soluble y actividades enzimáticas etanólicas en raíz para dos combinaciones de imazamox con dos dosis de glifosato. En la población resistente, el glifosato no tuvo efecto alguno y el efecto de las aplicaciones conjuntas se debió principalmente a la acción del imazamox. En la población sensible la mayoría de las interacciones resultaron antagónicas, apuntando que no tendría sentido aplicar de manera conjunta estos herbicidas.

Palabras clave *Amaranthus palmeri* ▪ antagonismo ▪ aplicación conjunta ▪ glifosato ▪ inhibidores de ALS ▪ resistencia ▪ sinergia

Índice



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CONTROL QUÍMICO DE MALAS HIERBAS	1
1.1.1. Historia de los herbicidas y situación actual	1
1.1.2. Mecanismo y modo de acción.....	3
1.1.3. Clasificación de los herbicidas	4
1.2. HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS	6
1.2.1. Aminoácidos ramificados.....	6
1.2.1.1. Ruta de biosíntesis.....	6
1.2.1.2. Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (IBAR).....	7
1.2.1.3. Imidazolinonas	8
1.2.1.3.1. Imazamox	9
1.2.2. Aminoácidos aromáticos	9
1.2.2.1. Ruta de biosíntesis.....	10
1.2.2.2. Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (IBAA): Glifosato.....	11
1.2.3. Efectos fisiológicos comunes de los herbicidas IBAR e IBAA	12
1.2.3.1. Aminoácidos libres y proteína soluble	12
1.2.3.2. Carbohidratos	13
1.2.3.3. Fermentación.....	14
1.3. DESARROLLO DE RESISTENCIAS A HERBICIDAS EN MALAS HIERBAS.....	15
1.3.1. Evolución de las resistencias y situación actual	15
1.3.2. Mecanismos de resistencia a herbicidas	17
1.3.2.1. Modificación del sitio de acción (target-site).....	17
1.3.2.2. Cambios en los procesos que intervienen en la acción del herbicida (non target-site).....	17
1.3.2.2.1. Reducción de la concentración del herbicida en el sitio de acción	17
1.3.2.2.2. Metabolización a especies no tóxicas.....	18
1.3.3. Resistencias a glifosato	18
1.3.3.1. Amplificación génica (target-site resistance) en <i>Amaranthus palmeri</i>	19
1.4. APLICACIÓN CONJUNTA DE HERBICIDAS	20
1.4.1. Aplicación conjunta de glifosato con inhibidores de ALS	21
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. DESCRIPCIÓN DE <i>Amaranthus palmeri</i> S. Watson	25
3.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	26
3.2.1. Germinación de las semillas.....	26
3.2.2. Condiciones de crecimiento	27

3.2.3. Aplicación de los tratamientos	28
3.2.3.1. Ensayo con imazamox	28
3.2.3.1. Ensayo de aplicación conjunta	28
3.2.4. Obtención de muestras	29
3.3. DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES	30
3.3.1. Extracción	30
3.3.2. Determinación analítica de la concentración de aminoácidos libres	30
3.4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE	31
3.5. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS	31
3.5.1. Extracción	31
3.5.2. Determinación analítica de la concentración de carbohidratos	31
3.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS FERMENTATIVAS <i>IN VITRO</i>	32
3.6.1. Extracción	32
3.6.2. Piruvato descarboxilasa (PDC)	32
3.6.3. Alcohol deshidrogenasa (ADH)	32
3.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SIQUIMATO MEDIANTE LA TÉCNICA HPLC	33
3.7.1. Extracción	33
3.7.2. Determinación analítica	33
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE IMAZAMOX Y ESTABLECIMIENTO DE DOSIS	35
4.2. ENSAYO DE APLICACIÓN CONJUNTA: GLIFOSATO E IMAZAMOX	42
4.2.1. Contenido de siquimato en hojas	44
4.2.2. Contenido de aminoácidos libres en hojas y raíces	45
4.2.3. Contenido de proteína soluble en raíces	46
4.2.4. Actividades enzimáticas fermentativas en raíces	47
4.3. DISCUSIÓN GENERAL	48
5. CONCLUSIONES	51

▪ **BIBLIOGRAFÍA**

▪ **ANEXO I**

Introducción



1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTROL QUÍMICO DE MALAS HIERBAS

Se puede definir un *herbicida* como todo producto químico que mata plantas o que inhibe total o parcialmente su crecimiento. Los herbicidas se utilizan para controlar el crecimiento de plantas no deseadas, denominadas desde un punto de vista antropocéntrico como “malas hierbas”, ya que obstaculizan los propósitos del hombre en un lugar y en un momento determinado.

Las *malas hierbas* son plantas que crecen siempre, o de manera predominante, en situaciones marcadamente alteradas por el hombre y no son deseables ya que reducen los rendimientos, interfieren en la recolección, incrementan los costes de producción y pueden transmitir enfermedades al cultivo. Las malas hierbas son plantas con una alta capacidad de dispersión y de competencia. Las causas de las pérdidas producidas por las malas hierbas en los cultivos son la competencia por agua, luz, nutrientes y la alelopatía.

Los herbicidas pueden ser absorbidos vía radical, foliar o ambas; pueden afectar a todas las plantas (herbicidas totales) o por el contrario afectar solo a algunas especies (herbicidas selectivos); pueden persistir en el medio o ser rápidamente degradados; pueden afectar de manera local, sólo en la zona de la planta que ha sido tratada (herbicidas de contacto) o trasladarse a otras zonas de la planta y producirse efectos tóxicos en zonas no tratadas directamente (herbicidas sistémicos).

Los herbicidas constituyen la principal herramienta de control de malas hierbas en agricultura y forman una parte esencial del control integrado de las mismas junto con los métodos agronómicos y mecánicos; asimismo, permiten un control selectivo de este tipo de flora. Una elección adecuada del tipo de herbicida permite mantener la cobertura vegetal y reducir o eliminar la necesidad de laboreo, lo que hace que disminuya la erosión. Otros métodos de control también pueden presentar estas ventajas pero no de forma tan eficiente y no siempre tan económica (Zimdahl, 2007).

1.1.1. Historia de los herbicidas y situación actual

Desde el inicio de la agricultura el hombre ha intentado controlar las malas hierbas. Hasta mediados del siglo pasado los únicos métodos existentes para tal fin eran los medios mecánicos, que primero fueron manuales, luego de tracción animal y por último basados en maquinaria cada vez más sofisticada.

Antes del desarrollo de productos orgánicos para el control de malas hierbas se habían usado compuestos inorgánicos, tales como la sal común y sulfato de cobre y de hierro. Sin embargo podemos considerar que el inicio de la síntesis y desarrollo de herbicidas viene marcado por el descubrimiento, al principio de la década de los 40, del 2, 4-D (ácido 2, 4-diclorofenoxiacético), siendo este compuesto el primer herbicida orgánico sintetizado.

A partir de 1950 la industria química privada empezó a sintetizar nuevos herbicidas. Los primeros en dicho terreno fueron los Estados Unidos y Gran Bretaña, pero durante la década siguiente todas las naciones industrializadas se vieron involucradas. En esta década se desarrollan varias familias químicas de herbicidas de gran importancia: las *triazinas* (atrazina, clorazina, simazina) y los *derivados de la urea* (monurón, fenurón, diurón o DCMU), todos ellos son inhibidores de la fotosíntesis y con posibilidad de utilización selectiva sobre cultivos. El impacto más inmediato fue el control de malas hierbas en cereales. Algunos de estos herbicidas todavía se siguen utilizando en la actualidad.

Introducción

En la década de los 60 aparecieron nuevos herbicidas, muchos de los cuales actuaban a través del suelo. Con estos herbicidas se llegó a controlar malas hierbas en cultivos como patata, alubia, remolacha azucarera, zanahoria, apio, frutales y colza, y así se redujo la utilización de los medios mecánicos para el control de malas hierbas. Pertenecen también a esta época los herbicidas *bipiridilos* (dicuat y paracuat), herbicidas totales muy rápidos y efectivos que tuvieron gran implantación internacional aunque ahora su utilización está muy limitada en algunos países por su toxicidad animal y su persistencia en el suelo.

A partir de 1970 se prestó especial atención al control de gramíneas que actuaban como malas hierbas de cereales y otros cultivos. Pero el hecho que marcó fundamentalmente esta década fue el descubrimiento del herbicida *glifosato*, único en su familia (inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos) y el herbicida más utilizado históricamente. Es un herbicida total, sistémico y de poca persistencia en el suelo. Su descubrimiento permitió el inicio de nuevas técnicas de cultivo, como la siembra directa, para proteger el suelo del desgaste provocado por el laboreo continuo. En la actualidad, es el herbicida que más se utiliza en el mundo debido a que en los años 90 se desarrollan cultivos transgénicos resistentes a este herbicida.

En la década de los 80, distintas empresas patentaron herbicidas químicamente distintos pero que resultaron tener el mismo mecanismo de acción, eran la *imidazolinonas* (American Cyanamid) y las *sulfonilureas* (DuPont®). Ambas familias son inhibidoras de la biosíntesis de aminoácidos ramificados.

En la década de los 90 se desarrollaron los cultivos modificados genéticamente resistentes a herbicidas. También destacó este periodo por el descubrimiento de la primera biomolécula herbicida, el *glufosinato*.

A partir del año 2000, a pesar de introducirse nuevos herbicidas, ninguno de ellos ha presentado nuevos mecanismos de acción, cuando antes aparecían nuevos mecanismos de acción cada tres años aproximadamente (Duke, 2012). Sin embargo, el estímulo económico de la industria herbicida causado por la evolución de malas hierbas resistentes, especialmente resistentes a glifosato, podría resultar en la disponibilidad de uno o más mecanismos de acción nuevos en un futuro no muy lejano (Duke, 2012).

A pesar de que el glifosato ocupa el primer puesto a nivel mundial en el uso de herbicidas, no todo el herbicida utilizado es glifosato, y menos en Europa, donde no está permitido el uso de cultivos modificados genéticamente y este herbicida no alcanza la importancia que tiene en otros continentes.

Dada la creciente preocupación por los aspectos ambientales en los últimos años, la Unión Europea decidió la reducción progresiva de materias activas que pueden ser utilizadas como herbicidas. La aplicación de la Directiva 91/414/CEE preveía que para mediados de 2011 se hubiera retirado el 75% de las sustancias activas comercializadas como fitosanitarios hasta 1993, además de restricciones en la autorización de usos (MARM, 2009). Así, no se renovaron las autorizaciones de 22 sustancias pesticidas, 8 de ellas herbicidas. Dicha directiva también ejerce un mayor control sobre la producción, aprobación y distribución de pesticidas en la UE. Sin embargo, las decisiones adoptadas no tendrán un impacto pleno hasta el año 2018, fecha en la que vencerán los permisos más recientes para el uso de estos compuestos en la UE.

En la actualidad, del total de 307 materias activas reconocidas con propiedades herbicidas (Heap, 2014), solo 115 están autorizadas en España para su uso como herbicidas (MAGRAMA, 2014). Además, el Real Decreto 1131/2012 para el uso sostenible de productos fitosanitarios, junto con el Plan de Acción Nacional fruto de su implementación, establecen que se deberán utilizar prácticas de forma que se evite el desarrollo de las resistencias de plagas, enfermedades y malas hierbas como única alternativa posible para gestionar las infestaciones de malas hierbas de forma sostenible. Esto supone la integración de alternativas no sólo químicas, sino también de manejo, basada en la combinación de fechas de siembra, labores, rotación de cultivos o barbecho. Todo esto permitirá un control de malas hierbas sostenible en el tiempo y además disminuir la dependencia de los herbicidas previniendo la aparición de resistencias.

1.1.2. Mecanismo y modo de acción

Una vez que el herbicida entra en contacto con la célula vegetal, pueden producirse muy diversas reacciones químicas según la especie vegetal, estado fenológico, herbicida aplicado, dosis, formulación y condiciones ambientales. Para que un herbicida sea activo en una determinada especie vegetal, tiene que interrumpir algún proceso fisiológico esencial de la planta.

Se denomina *mecanismo de acción* de un herbicida (también conocido como *diana*) al primer lugar de acción del mismo, al proceso primario, bioquímico o biofísico, que es bloqueado o destruido con la menor dosis de herbicida (Abell, 1996). La secuencia de acontecimientos que se desencadenan desde que se afecta este primer proceso hasta la muerte de la planta, es decir, las consecuencias fisiológicas del mecanismo de acción es lo que se conoce como *modo de acción* de un herbicida.

El conocimiento del mecanismo y modo de acción de cada herbicida requiere años de investigación. Cuando los herbicidas se comercializan normalmente sólo se conoce parcialmente su modo de acción. Aunque se trate de compuestos herbicidas de gran éxito comercial, lo habitual es que no resulte del todo conocido el proceso que origina la toxicidad en las plantas. La investigación sobre la letalidad de los herbicidas ha permitido, por un lado, conocer en mayor profundidad la fisiología vegetal y, por otro, plantear un uso más racional de dichos compuestos. Sin embargo, siguen siendo necesarios este tipo de estudios sobre el modo de acción de los herbicidas por diferentes aspectos:

- Por un lado, el desarrollo de resistencias entre las poblaciones de malas hierbas. La persistente selección sobre un gran número de individuos de malas hierbas en grandes superficies puede resultar en la rápida evolución de resistencias a herbicidas (Powles y Yu, 2010). El registro de un caso de desarrollo de resistencia es debido a muchos factores, que incluyen las especies de malas hierbas, la presión de selección, la diversidad genética y la naturaleza del mecanismo de acción. Por eso, aplicar herbicidas con distinto mecanismo de acción podría disminuir la aparición de malas hierbas resistentes (Duke, 2011). Utilizar compuestos que ejerzan su acción sobre distintos puntos metabólicos es esencial para aliviar esta presión (Abell, 1996) y el mejor modo de encontrar nuevos puntos de acción es conocer qué procesos metabólicos generan finalmente la muerte de las plantas, para reproducirlos partiendo de mecanismos de acción distintos y con ello desviando la presión de selección del punto inicial.

- Por otro lado, la respuesta de las plantas a los herbicidas puede servir de modelo para diseñar nuevas moléculas de origen natural con efecto herbicida. Si se conocieran los procesos implicados en la muerte de las plantas y su regulación, se podrían buscar los nuevos inhibidores entre moléculas de síntesis natural, provenientes del propio metabolismo de las plantas, intentando mimetizar lo que hacen los herbicidas pero con distintos mecanismos de acción. Con ello se conseguiría desarrollar materias activas basadas en compuestos naturales cuya biodegradabilidad estaría asegurada y se evitaría utilizar herbicidas cuya persistencia en campo o deriva supone un importante impacto ambiental asociado a los usos agrícolas.
- La utilización de herbicidas, como herramienta de estudio, permite conocer las respuestas de distintas especies de plantas o de otros organismos del agro ecosistema, y cómo estas respuestas pueden verse afectadas por variaciones ambientales. Esto conllevaría la posibilidad de una aplicación más eficaz y sostenible de estos inhibidores, y un mayor conocimiento de la regulación del metabolismo de las plantas y de las múltiples interacciones que se dan entre las vías metabólicas como consecuencia de la acción de los herbicidas.

1.1.3. Clasificación de los herbicidas

Los herbicidas se pueden clasificar en función de diferentes criterios: según sus principales usos, según el modo de aplicación, según su comportamiento en la planta, según su comportamiento en el suelo y según su estructura química. La clasificación en función de su comportamiento en la planta se puede establecer según la respuesta de las especies vegetales, según el transporte del herbicida en la planta y según el mecanismo primario por el que los herbicidas causan la interrupción del desarrollo de las plantas (García-Torres y Fernández-Quintanilla, 1991).

El Comité de Acción contra la Resistencia a Herbicidas (HRAC) y la Sociedad Norteamericana de Malherbología (WSSA) han desarrollado conjuntamente una clasificación de los herbicidas agrupándolos de la A a la Z en un total de 22 mecanismos de acción. A cada grupo de herbicidas con el mismo mecanismo de acción se le designa con una letra (Tabla 1.1). Dentro de cada uno de ellos puede haber más de una familia química de herbicidas. Esta clasificación sirve a los agricultores y a los servicios técnicos agrícolas para realizar mezclas o alternar herbicidas con diferente mecanismo de acción y tratar de evitar así, o retrasar, la aparición de resistencias.

Los principales mecanismos de acción, agrupados por procesos fisiológicos, son:

GRUPO	MECANISMO DE ACCIÓN	FAMILIA QUÍMICA
A	Inhibición de la enzima acetil CoA carboxilasa (ACCase)	Triazolopirimidinas Ariloxyfenoxipropionatos Ciclohexanodionas Fenilpirazoles
B	Inhibición de la acetolactato sintetasa (ALS)	Sulfonilureas Imidazolinonas Triazolopirimidinas Pirimidiltiobenzosatos Sulfonil-aminocarbonil-triazolinonas
C1	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazinas Triazinonas Uracilos Piridazinona
C2	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Urea Amida
C3	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Nitrilos Benzotiadiazol Fenil-piridazina
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema I	Bipiridilos
E	Inhibición del protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difeniléteres N-fenil-ftalamidas Tiadiazoles
F1	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	Piridazinona Nicotinanilida
F2	Decoloración: inhibición de la 4-hidroxi-fenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD)	Trikenona Ixosazol Pirazol
F3	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides	Triazol Isoxazolidinona Urea
G	Inhibición de la EPSP sintetasa	Glicinas
H	Inhibición de la glutamino sintetasa (GS)	Ácido fosfínico
I	Inhibición del DHP (dihidropterato) sintetasa	Carbamatos
K1	Inhibición de la unión de los microtúbulos de la mitosis	Dinitroanilinas Fosforoamidatos
K2	Inhibición de la mitosis	Benzileter Carbamatos
K3	Inhibición de la división celular	Acetamida Benzamida Cloroacetamidas Carbamatos
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Nitrilos Benzamida
M	Desacopladores (alteración de la membrana)	Dinitrofenoles
N	Inhibición de la síntesis de los lípidos (no ACCase)	Tiocarbamatos Fosforditioato Benzofurano
O	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético)	Ácidos fenoxi-carboxílicos Ácido benzoico Ácido piridin-carboxílico Ácido quinolin-carboxílico
P	Inhibición del AIA	Ftalamato Diflufenzopir
Z	Desconocido	Organoarsénicos Ácidos arilaminopropiónicos

Tabla 1.1. Clasificación de herbicidas según el mecanismo de acción (HRAC y WSSA, 2014)

1.2. HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS

En las últimas décadas, los productos herbicidas cuyo mecanismo de acción conlleva procesos específicos en las plantas (como fotosíntesis, interacciones planta-hormona o biosíntesis de aminoácidos esenciales para animales) han tenido un gran auge. La seguridad toxicológica que estos mecanismos de acción representan y las consideraciones ambientales han llevado a que estos herbicidas tengan un gran éxito, al menos potencial (Duke y Powles, 2008a). En este contexto, las rutas biosintéticas de aminoácidos afectadas por los herbicidas son muy importantes, ya que se trata de aminoácidos esenciales para mamíferos, y que solo son sintetizados por plantas y microorganismos, por lo que los compuestos herbicidas que afectan a estas rutas presentan una baja toxicidad para los mamíferos.

Los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos (IBA) se pueden dividir en tres grupos según sus mecanismos de acción: inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (IBAR), inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (IBAA) e inhibidores de la biosíntesis de glutamina (Ray, 1989).

1.2.1. Aminoácidos ramificados

Los aminoácidos de cadena ramificada son *valina*, *leucina* e *isoleucina*. Estos aminoácidos sólo pueden ser sintetizados por plantas, hongos y microorganismos. Para los mamíferos resultan, pues, esenciales, de manera que necesitan ingerirlos a través de la dieta.

Estos aminoácidos deben su nombre a su estructura, ya que poseen un compuesto alifático y no son lineales (Fig. 1.1).

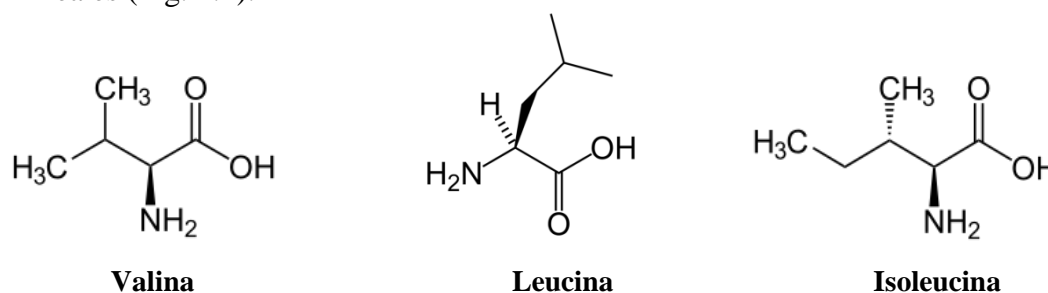


Figura 1.1. Estructura química de los tres aminoácidos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina.

1.2.1.1. *Ruta de biosíntesis*

Los aminoácidos ramificados valina e isoleucina son sintetizados en una serie de reacciones paralelas que comparten enzimas comunes. La leucina, por su parte, es sintetizada como una ramificación a partir de la ruta de síntesis de la valina (Fig. 1.2).

El primer paso en la ruta de síntesis de la isoleucina es catalizado por la enzima treonina deshidratasa (E.C. 4.2.1.16) o treonina desaminasa. Este enzima lleva a cabo una desaminación de la treonina dando lugar a una molécula de 2-cetobutirato y amonio. La enzima *acetolactato sintasa* (ALS, E.C. 4.1.3.18) es primer enzima común a ambas vías y cataliza dos reacciones. El enzima reductoisomerasa (KARI, E.C. 1.1.1.86) reduce los acetoácidos sintetizados por el enzima ALS y produce dihidroxiácidos. Éstos son transformados en derivados del ácido valérico por la actividad del siguiente enzima que se denomina dihidroxiácido deshidratasa (E.C. 4.2.1.9). El último paso en la ruta biosintética de los 3 aminoácidos necesita la acción de un enzima aminotransferasa.

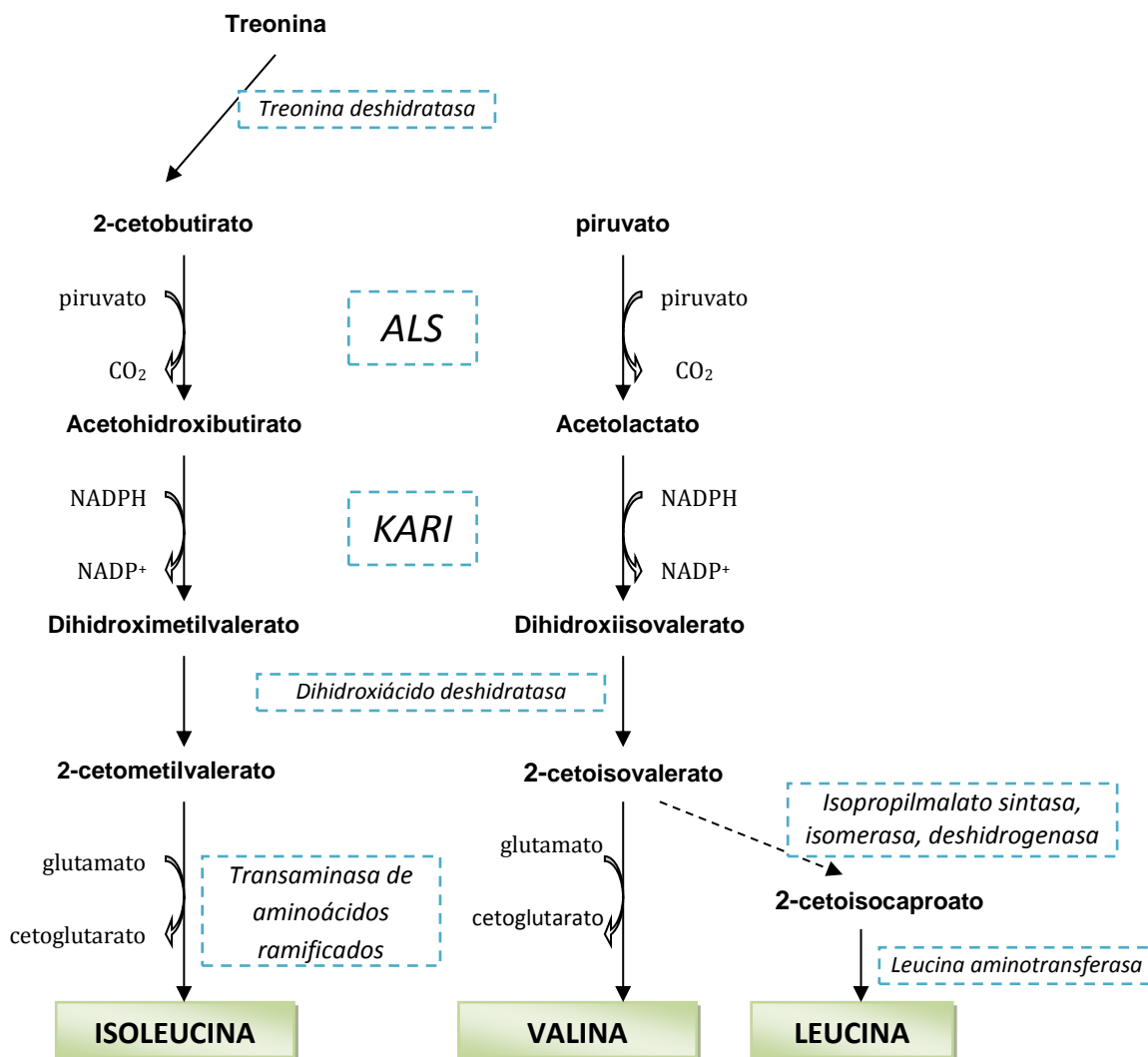


Figura 1.2. Ruta biosintética de los tres aminoácidos ramificados: valina, leucina e isoleucina. ALS (acetolactato sintasa); KARI (cetoácido reductoisomerasa).

La ruta biosintética de los aminoácidos ramificados se localiza a nivel subcelular en los plastidios (Singh, 1999). Todos los órganos de una planta pueden sintetizar aminoácidos ramificados pero es en los tejidos jóvenes donde se da preferentemente esta biosíntesis. Según varios estudios los tejidos jóvenes presentan el mayor contenido de mRNA que codifica los enzimas en esta ruta (Weirsmá *et al.*, 1989; Keeler *et al.*, 1993), y estos tejidos presentan los mayores niveles de actividad de varios de los enzimas de la ruta (Singh *et al.*, 1990; Stidham y Singh, 1991; Szamosi *et al.*, 1993; Hofgen *et al.*, 1995).

1.2.1.2. Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (IBAR)

Las mayores ventajas de los herbicidas que inhiben la ruta de biosíntesis de aminoácidos ramificados es que no son tóxicos para animales, son muy selectivos y muy potentes, lo que permite su aplicación a dosis muy bajas (McCourt y Duggleby, 2006). El descubrimiento y desarrollo de estos herbicidas y de cultivos resistentes a ellos ha provocado un auge en la investigación de los aspectos bioquímicos, moleculares y genéticos de la ruta de biosíntesis de aminoácidos ramificados (Singh, 1999).

Introducción

El mecanismo de acción de los herbicidas IBAR es la inhibición del primer enzima común de la ruta, el enzima *acetolactato sintasa* (ALS). Aunque se han descrito compuestos inhibidores de otros enzimas de la misma ruta, ninguno de ellos ha sido catalogado como herbicida, debido a su menor eficacia en comparación con los inhibidores de la actividad ALS. Los herbicidas inhibidores de ALS pertenecen a cinco familias químicas, entre las que destacan las *sulfonilureas*, *imidazolinonas*, *triazolpirimidinas* y *pirimidiniltiobenzoatos*. Las diferentes familias presentan lugares de unión diferentes al enzima ALS. Estos herbicidas provocan inhibición del crecimiento y una muerte lenta de la planta que puede llevar semanas.

Muchos de los inhibidores de la ALS son herbicidas selectivos para su uso en diversos cultivos como herbicidas en pre o post-emergencia. La base de esta selectividad natural se debe, en todos los casos conocidos, a que los cultivos tolerantes presentan diferencias en el metabolismo detoxificante del herbicida frente a las malas hierbas (Wittenbach y Abell, 1999). En el caso de las sulfonilureas se han descrito nueve reacciones metabólicas diferentes, en varios puntos de la molécula, que han llevado a su inactivación. La detoxificación metabólica también es el mecanismo principal de selectividad de las imidazolinonas (Shaner, 1991). Así, la selectividad del herbicida imazamox es debida a tasas y rutas metabólicas diferentes en cultivos tolerantes y malas hierbas sensibles. La combinación de una mayor absorción de imazamox y un menor metabolismo de éste son los mecanismos más destacados en la selectividad diferencial entre algunas especies de leguminosas (Bukun *et al.*, 2012)

1.2.1.3. Imidazolinonas

Las imidazolinonas, por su estructura química, son derivados del imidazolín. Están caracterizadas por un anillo 1,4-imidazolinona unido a un anillo aromático en la segunda posición. El anillo aromático contiene un grupo carboxílico en *orto* respecto del anillo de la imidazolinona.

Los herbicidas pertenecientes a la familia química de las imidazolinonas fueron sintetizados en la década de los 80 por la compañía de agroquímicos American Cyanamid (perteneciente a BASF desde 2000) y están compuestos por las siguientes materias activas: imazametabenz (-metil), imazamox, imazapic, imazapir, imazaquín e imzetapir (PPDB, 2014). Actualmente en España solamente está permitido el uso de *imazamox*, según la lista comunitaria de sustancias activas incluidas, excluidas y en evaluación comunitaria (anexo I del REGLAMENTO (CE) N° 1107/2009, MAGRAMA 2014).

Las imidazolinonas muestran actividad tanto sobre gramíneas como dicotiledóneas, si bien, la susceptibilidad a las imidazolinonas varía mucho según especies. Se absorben rápidamente a través de las raíces y parte aérea de la planta y se transportan vía xilema y floema, acumulándose en las regiones meristemáticas. Debido a esto, los tejidos meristemáticos son los que se ven afectados en primer lugar. Se pueden aplicar en pre-siembra, pre-emergencia y post-emergencia.

Se han seleccionado cultivos, o inducido mutaciones, en los que la enzima ALS es tolerante a imidazolinonas (Tan *et al.*, 2005). Este tipo de cultivos tolerantes a las imidazolinonas se comercializan bajo el nombre de cultivos *Clearfield*[®], y, estrictamente hablando, no son cultivos transgénicos, ya que se han obtenido por métodos de mutagénesis inducida y selección. Esta tecnología ha permitido utilizar una materia activa determinada en los cultivos de interés. Desde 1992 se han comercializado en el mundo cinco cultivos tolerantes a imidazolinonas: maíz, trigo, arroz, colza y girasol (Tan *et al.*, 2006).

Cuatro materias activas pertenecientes a las imidazolinonas se han registrado para poder ser utilizadas en los cultivos tolerantes a imidazolinonas en diferentes zonas del mundo. Estas materias activas son imazamox, imazetapir, imazapir e imazapic (Tan *et al.*, 2006). En España se comercializan variedades Clearfield® de maíz y girasol tolerantes a imazamox.

1.2.1.3.1. Imazamox

Este herbicida, perteneciente a la familia de las imidazolinonas, fue descubierto por la compañía American Cyanamid en su centro de investigación agrícola situado en Princeton (New Jersey, US). En España se comercializa bajo el nombre de Pulsar® 40, y en combinación con otros herbicidas bajo el nombre de Mutual® y Corum® (BASF Española). La estructura molecular es la de un ácido débil, cuya formulación es ácido 2-(4-isopropilo-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-(metoximetil)-nicotínico:

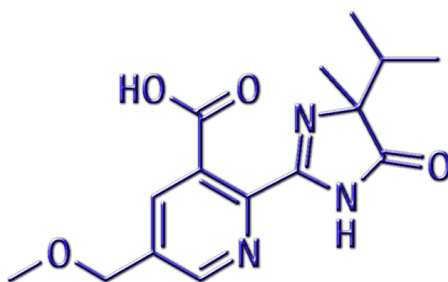


Figura 1.3. Molécula del herbicida imazamox (Heap, 2014).

Imazamox es un herbicida selectivo y sistémico, por lo que se usa tanto en pre-siembra, como en pre-emergencia y post-emergencia para controlar las malas hierbas anuales herbáceas y de hoja ancha en muchos cultivos de leguminosas, como la soja o alfalfa (Blackshaw, 1998; Nelson y Renner, 1998), ya que muchas de estas especies son tolerantes de forma natural a las imidazolinonas, debido a que son capaces de metabolizarlas rápidamente (Shaner y Robson, 1985). Para obtener la máxima eficacia son necesarios adyuvantes y fertilizantes. Se utiliza en combinación con la tecnología Clearfield® en cultivos como maíz, girasol, arroz y soja.

1.2.2. Aminoácidos aromáticos

Los aminoácidos aromáticos son *tirosina*, *fenilalanina* y *triptófano*. Se les designa por ese nombre porque todos ellos contienen un anillo aromático que deriva del corismato (Fig. 1.4). Estos aminoácidos sólo pueden ser sintetizados por plantas, bacterias y hongos, por lo que son indispensables en la dieta de los animales, para los que se les considera aminoácidos esenciales.

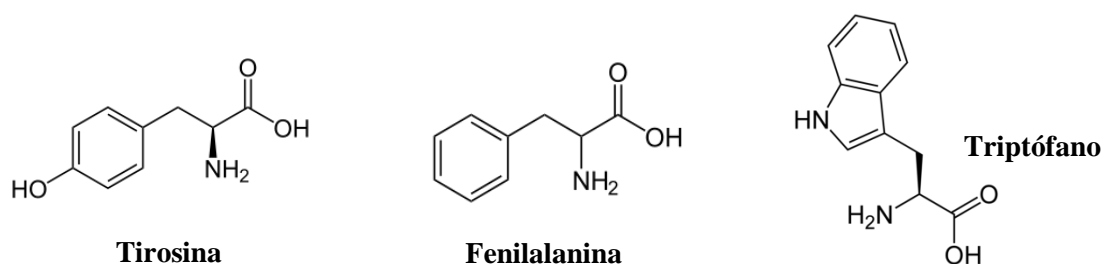


Figura 1.4. Estructura química de los tres aminoácidos aromáticos: tirosina, fenilalanina y triptófano.

1.2.2.1. Ruta de biosíntesis

La biosíntesis de los aminoácidos aromáticos se realiza a través de una ruta plastidial (Schmind y Amrhein, 1999) que se divide en dos partes (Fig. 1.5). La primera, denominada *ruta del siquimato*, va desde la combinación de fosfoenolpiruvato (PEP) (intermediario de la glucólisis) y eritrosa-4-fosfato (intermediario del ciclo de Calvin) hasta la formación de corismato y es común a la biosíntesis de los tres aminoácidos aromáticos. La segunda parte, denominada *ruta del post-corismato* comprende las tres rutas terminales específicas que utilizan el corismato como sustrato hasta la biosíntesis de tirosina, fenilalanina y triptófano.

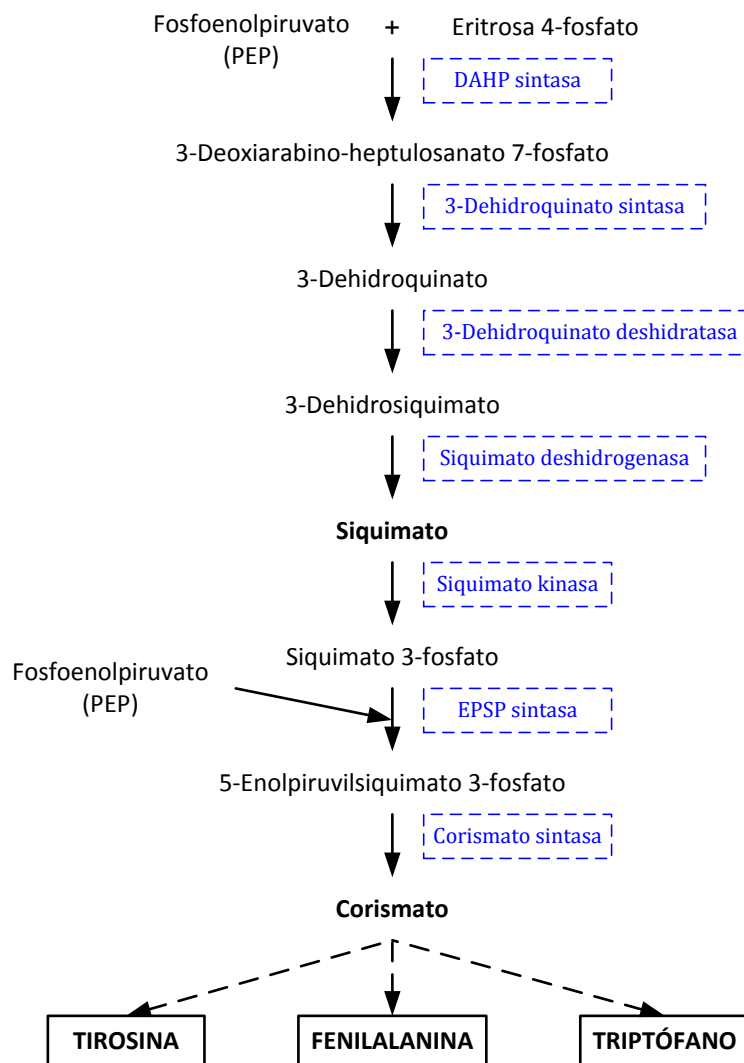


Figura 1.5. Ruta biosintética de los tres aminoácidos aromáticos: tirosina, fenilalanina y triptófano. DAHPS (3-deoxiarabino-heptulosanato 7-fosfato sintasa); EPSPS (5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa).

La ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos tiene un gran peso específico en plantas. En condiciones normales, aproximadamente el 20% de carbono fijado en plantas se incorpora a la ruta del siquimato (Haslam, 1993).

1.2.2.2. Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (IBAA): Glifosato

En los inicios de los años 70 fue descubierto el glifosato, único compuesto herbicida capaz de bloquear un paso enzimático de la ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. Su mecanismo de acción es la inhibición de la actividad enzimática *5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa* (EPSPS). El glifosato actúa como inhibidor competitivo del PEP y no competitivo del siquimato-3-fosfato (Devine *et al.*, 1993b).

En la actualidad, el glifosato (Fig. 1.6) es el herbicida más utilizado a nivel mundial debido a su gran versatilidad (Powles y Preston, 2006) y a su eficacia, junto con los beneficios económicos y ambientales que aporta (Duke y Powles, 2008b; Dill *et al.*, 2008). Pertenece a la familia de las glicinas, es un herbicida total (no selectivo) y sistémico, cuyo uso no ha parado de aumentar desde su comercialización en los años 70 por la firma Monsanto.

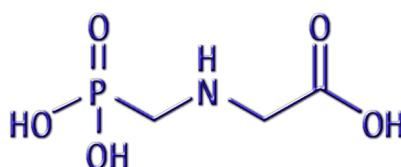


Figura 1.6. Molécula del herbicida glifosato.

La toxicidad que presenta este herbicida frente a los mamíferos es muy baja, siendo más tóxico el surfactante que le acompaña en su formulación que el propio glifosato (Sawada *et al.*, 1988). El glifosato no es volátil, por lo que no produce contaminación atmosférica (Duke y Powles, 2008b). Aunque el principal producto bajo el que se comercializa es Roundup[®], de la compañía Monsanto, tras la expiración de la patente en el año 2000, aparecieron un gran número de productos genéricos registrados y comercializados que también presentan glifosato en distintas concentraciones, que van desde 7 a 540 g l⁻¹, como materia activa. Glyfos[®] (Cheminova Agro), Verdys[®] (Dow Agrosiences Iberica), Orlador[®] (Trade Corporation International) son algunos de los productos registrados en España.

El glifosato, al ser un herbicida total y muy poco persistente se utilizó, de forma habitual durante más de tres décadas, en pre-siembra y en sistema de siembra directa. Sin embargo, debido a la baja probabilidad de aparición de malas hierbas resistentes y a su baja toxicidad ambiental se ha utilizado en el desarrollo de cultivos transgénicos resistentes a herbicidas. Para ello, intentaron diferentes estrategias. De todas ellas, la sobreexpresión de una forma de la enzima EPSPS y la expresión de una forma del enzima insensible a glifosato, proveniente de *Agrobacterium*, es lo que les confiere resistencia a este herbicida en los cultivos comercializados (Dill *et al.*, 2008).

Estas tecnologías han permitido que desde 1996 se encuentren en el mercado una serie de cultivos tolerantes a glifosato, cuyo nombre comercial es Roundup Ready[®] (Dill, 2005; Tan *et al.*, 2006), lo que permitió usar el glifosato en post-emergencia como un herbicida selectivo, con el fin de eliminar todas las malas hierbas emergentes sin dañar el cultivo (Powles, 2008). Los cultivos transgénicos resistentes a glifosato incluyen el maíz, soja, algodón, colza y remolacha (Duke, 2011). En 2007, el 90% de la soja, el 91% del algodón y el 60% del maíz cultivados en Estados Unidos eran resistentes a glifosato (James, 2006; Dill *et al.*, 2008). En 1996, los cultivos biotecnológicos contaban con 1,7 millones de hectáreas. Estos valores se han multiplicado por 94 hasta alcanzar los 160 millones en 2011, lo que convierte a los cultivos biotecnológicos en la tecnología con la aceptación más rápida en la historia de la agricultura moderna (James, 2011).

1.2.3. Efectos fisiológicos comunes de los herbicidas IBAR e IBAA

Se ha observado que tras la aplicación de herbicidas IBAR, como *imazamox* y de herbicidas IBAA, como *glifosato*, las plantas presentan una serie de efectos fisiológicos comunes. A pesar de que estos dos tipos de herbicidas inhiben dos rutas de biosíntesis diferentes, en ambos casos se ha observado clorosis, enanismo y acumulación de algunos metabolitos. Cuando se aplica glifosato, no sólo se ven efectos en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, sino también en la de los ramificados. Lo mismo sucede cuando se aplican inhibidores de ALS. De ahí que algunos autores hayan defendido una regulación cruzada entre ambas rutas (Guyer *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1998).

La estimulación de algunas rutas metabólicas tras los tratamientos con herbicidas inhibidores de la biosíntesis de ALS y EPSPS, y la acumulación de ciertos metabolitos lleva a pensar que el modo de acción de ambos herbicidas puede tener muchos puntos en común, de manera que pueden inducir la muerte de forma similar. A continuación se describen algunos de los principales procesos en los que la aplicación de ambos herbicidas produce efectos comparables.

1.2.3.1. Aminoácidos libres y proteína soluble

Se ha observado una acumulación del contenido de aminoácidos libres en las plantas tratadas con herbicidas inhibidores de ALS (Anderson y Hibberd, 1985a; Shaner y Reider, 1986; Zabalza *et al.*, 2006). Los niveles de aminoácidos ramificados no llegan a ser limitantes para la biosíntesis de proteínas, por lo que no puede atribuirse a la falta de estos aminoácidos el cese de crecimiento y la muerte de la planta (Rhodes *et al.*, 1987; Royuela *et al.*, 1991; Orcaray *et al.*, 2010). Se ha propuesto que los niveles de valina, leucina e isoleucina se renuevan debido a un aumento del *turnover* de las proteínas existentes. Es decir, la degradación de las proteínas a sus correspondientes aminoácidos aumenta los niveles de aminoácidos libres y disminuye la cantidad de proteína soluble; lo que permite mantener niveles de aminoácidos ramificados normales (Royuela *et al.*, 1991; Wittenbach y Abell, 1999). De hecho, se ha demostrado que los niveles inhibidores de ALS prácticamente anulan la síntesis *de novo* de proteínas (Zabalza *et al.*, 2006), por lo que la síntesis proteica en las plantas tratadas con herbicidas IBAR podría ser realizada mediante la utilización de aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas ya existentes.

A pesar de que el glifosato, al inhibir la actividad de la EPSPS, bloquea la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, los estudios del efecto del glifosato sobre el contenido de dichos aminoácidos han dado lugar a resultados diversos (Cole, 1985). En las investigaciones iniciales sobre el efecto del glifosato en plantas se detectó un aumento en el contenido de fenilalanina a partir del segundo día tras el inicio del tratamiento, como también un aumento el contenido en aminoácidos libres totales y una disminución de la proteína soluble (Haderlie *et al.*, 1977). En cambio, en otro estudio de aquella época (Hollander y Amrhein, 1980), el contenido de los aminoácidos aromáticos disminuyó, mientras que el contenido en aminoácidos libres totales permanecía invariable. En dicho estudio ya se proponía que posiblemente exista un sistema de control homeostático entre diferentes reservas (*pools*) de aminoácidos, que se autorregularía ante la falta de uno o un grupo de aminoácidos, y que además, la falta de un aminoácido podría estimular una mayor degradación de proteínas (proteólisis) lo que aumentaría el contenido de ese aminoácido.

En estudios más recientes, realizados en plantas de guisante, se observó un aumento general en el contenido total de aminoácidos libres a corto plazo (Orcaray *et al.* 2010; Orcaray *et al.*, 2012; Zulet *et al.*, 2013), unido a un descenso transitorio en la proporción de aminoácidos aromáticos (Orcaray *et al.*, 2010). Posteriormente, se detectó el aumento de estos aminoácidos, lo que probablemente estaría relacionado con la proteólisis (Rhodes *et al.*, 1987).

Debido a que ambos tipos de herbicidas provocan una acumulación de aminoácidos libres se ha comparado sus efectos en los principales sistemas proteolíticos de las plantas (Zulet *et al.*, 2013). A pesar de no haberse detectado un incremento generalizado de dichos sistemas se ha comprobado que las modificaciones que provocan ambos tipos de herbicidas son muy similares, apoyando así la hipótesis de que a pesar de tener diferentes dianas provocan la muerte por un mecanismo similar.

1.2.3.2. Carbohidratos

Un efecto fisiológico descrito y que fue muy discutido en plantas tratadas con herbicidas inhibidores de la ALS es la acumulación de carbohidratos en hojas, a pesar de no estar directamente relacionado con la biosíntesis de aminoácidos. Dicha acumulación ha sido explicada por una inhibición del transporte de fotosintetizados por el floema a los sumideros de la planta (Devine, 1989; Bestman *et al.*, 1990). Se ha demostrado que dicho efecto se debe a una falta de demanda de fotosintetizados de los sumideros lo cual provoca la inhibición del transporte por el floema que justifica la acumulación de azúcares en las hojas tratadas (Gastón *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2004). Se ha detectado acumulación de sacarosa y almidón en raíces, previa a la acumulación de carbohidratos en hojas, por lo que la falta de carbono en los sumideros no es la causa de la detención en el crecimiento de la planta (Gastón *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2004).

Parece que las alteraciones metabólicas inducidas por los inhibidores de la ALS impiden el uso de los carbohidratos sin causar un gran efecto en la fotosíntesis y dando lugar a la acumulación de carbohidratos en raíces. El aumento del contenido de sacarosa y almidón en los sumideros sugiere que la sacarosa es transportada de las hojas a las raíces a una tasa mayor a la que los sumideros son capaces de utilizarla. En estas condiciones, el gradiente de azúcares necesario para un transporte a larga distancia es anulado, y la carga de fotoasimilados en el floema dañada. Esta disminución en la demanda de los sumideros parece la causante de la acumulación de carbohidratos en hojas (Zabalza *et al.*, 2004).

Los estudios en los que se analiza el contenido de carbohidratos en plantas tras un tratamiento con glifosato son escasos. Se ha descrito una inhibición de la acumulación de almidón en hojas de *Beta vulgaris* L. cuatro horas después de haber sido tratadas con glifosato (Geiger *et al.*, 1986). Parece que esa inhibición en la acumulación de almidón se debe a su degradación para formar sacarosa, y ésta a su vez es degradada en glucosa y fructosa, ya que existen trabajos en los que se ha cuantificado una acumulación de estos tres metabolitos (Gatford *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2007). Sin embargo, en otros estudios también se ha descrito que tras la aplicación de herbicidas inhibidores de EPSPS se produce una acumulación del contenido de carbohidratos solubles. Esta acumulación se ha detectado tanto en las hojas como en las raíces de las plantas tratadas. Su explicación fisiológica ha sido similar a la descrita para los inhibidores de la actividad ALS (Orcaray *et al.*, 2012).

1.2.3.3. Fermentación

La síntesis de etanol y lactato a partir de piruvato constituye las denominadas rutas fermentativas (etanólica y láctica, respectivamente) que las plantas presentan habitualmente solo en condiciones de déficit de oxígeno (Fig. 1.7). Esta fermentación también se ve afectada con ambos tipos de herbicidas.

Se ha descrito un aumento en la actividad específica de las enzimas fermentativas piruvato descarboxilasa (PDC), alcohol deshidrogenasa (ADH) y lactato deshidrogenasa (LDH) tras la aplicación de inhibidores de ALS en raíces de guisante. También aumentó la actividad de la alanina aminotransferasa (AlaAT) (Gastón *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2005). El aumento significativo de las actividades específicas de estas enzimas detectadas en raíces de guisante tras la aplicación de estos herbicidas se produce en condiciones de aerobiosis. Se ha propuesto que el incremento de estas actividades ayude a metabolizar el piruvato, el cual podría estar más disponible debido a la inhibición de la ALS que también utiliza piruvato como sustrato.

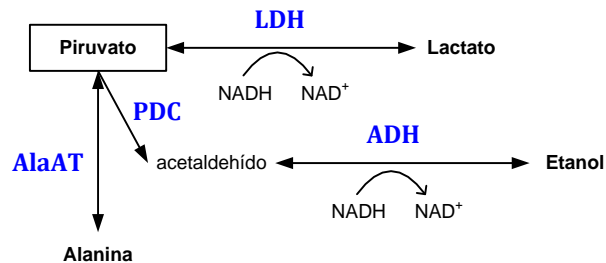


Figura 1.7. Regeneración de NAD^+ mediante la conversión de piruvato en lactato y etanol por las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH).

Del mismo modo, se ha descrito que en plantas de guisante tratadas con glifosato, se produce una inducción de las actividades fermentativas ADH y PDC en raíz, a pesar de que las plantas permanecieron aireadas durante todo el ensayo (Orcaray *et al.*, 2012).

Se desconoce el papel de la fermentación como consecuencia de la aplicación de los herbicidas inhibidores de ALS y EPSPS. Por un lado podría ayudar a la supervivencia de las plantas durante un tiempo, pero por otro lado, el lactato y el etanol (ambos productos de la fermentación) podrían resultar tóxicos para las plantas (Perata y Alpi, 1993).

Aunque la activación de las rutas fermentativas se pueda deber principalmente a una mayor disponibilidad del sustrato piruvato, no se puede descartar el hecho de que pudiese estar relacionada con la respuesta de la ruta etanólica ante estreses ambientales, y podría ser consecuencia de ambas situaciones. Se ha descrito una activación de la fermentación etanólica ante diversos estreses ambientales, tales como déficit hídrico, SO_2 , ozono o bajas temperaturas, que provocaron la producción de acetaldehído y etanol a concentraciones no limitantes de oxígeno (Kimmerer y Kozlowski, 1982).

1.3. DESARROLLO DE RESISTENCIAS A HERBICIDAS EN MALAS HIERBAS

Las malas hierbas representan una amenaza para la productividad y supervivencia de los cultivos, así como un importante coste para el agricultor. La buena relación coste/efectividad de los herbicidas ha llevado a un uso extensivo de estos productos en las últimas décadas. En los años 50 a 70 se pensó que los herbicidas eran el instrumento adecuado, la solución final para el control de malas hierbas, pero cuarenta años después los datos muestran que no se han erradicado las malas hierbas y que algunas han aumentado su presencia.

La resistencia de las malas hierbas a los herbicidas es una respuesta adaptativa de estas plantas a la presión de selección ejercida por estos compuestos (Beckie *et al.*, 2006; Powles y Yu, 2010). Se trata de una respuesta que refleja la evolución con la que las plantas se adaptan a nuevas condiciones de desarrollo (Gressel, 2009).

Así pues, se define la resistencia de una mala hierba como *la capacidad heredable de una planta para sobrevivir y reproducirse después de un tratamiento herbicida que, en condiciones normales, la hubiese controlado* (WSSA); o bien, como *un descenso en la respuesta de una población de una especie a la aplicación de un herbicida* (FAO).

Al hablar de resistencias se utilizan algunos términos que es conveniente conocer de antemano (CPRH, 2011).

- **Biotipo:** Grupo de plantas de una especie que presentan identidad para un determinado carácter, en este caso, susceptibilidad o resistencia para un determinado herbicida.
- **Mala hierba sensible:** Es un determinado biotipo de mala hierba que no sobrevive con la cantidad recomendada de uso, acorde con la dosis de registro, de un herbicida.
- **Mala hierba insensible o tolerante:** Es un determinado biotipo de mala hierba que nunca se ha podido controlar con un determinado herbicida.
- **Población:** Conjunto de individuos de una especie de mala hierba que invaden un campo determinado.
- **Presión de selección:** Efecto del tratamiento herbicida sobre el conjunto de malas hierbas presentes en un campo por el que es capaz de seleccionar biotipos resistentes. Su intensidad depende del tipo de tratamiento y/o de herbicida, de la forma y frecuencia de aplicación, de las características biológicas de la mala hierba y del cultivo.

1.3.1. Evolución de las resistencias y situación actual

El primer caso de resistencia a herbicidas (a la auxina sintética, 2,4-D) se informó en 1957 pero no fue sino hasta 1970, cuando se documentó la resistencia a triazinas en *Senecio vulgaris*, que la resistencia comenzó a ser reconocida como un problema de importancia agronómica y económica (Ryan, 1970). En este momento existen 432 biotipos de malas hierbas resistentes a los herbicidas a nivel mundial (Fig. 1.8), con 235 especies (138 dicotiledóneas y 97 monocotiledóneas). Las malas hierbas han desarrollado resistencia a 22 de los 25 lugares de acción de herbicidas conocidos y a 155 herbicidas diferentes (Heap, 2014).

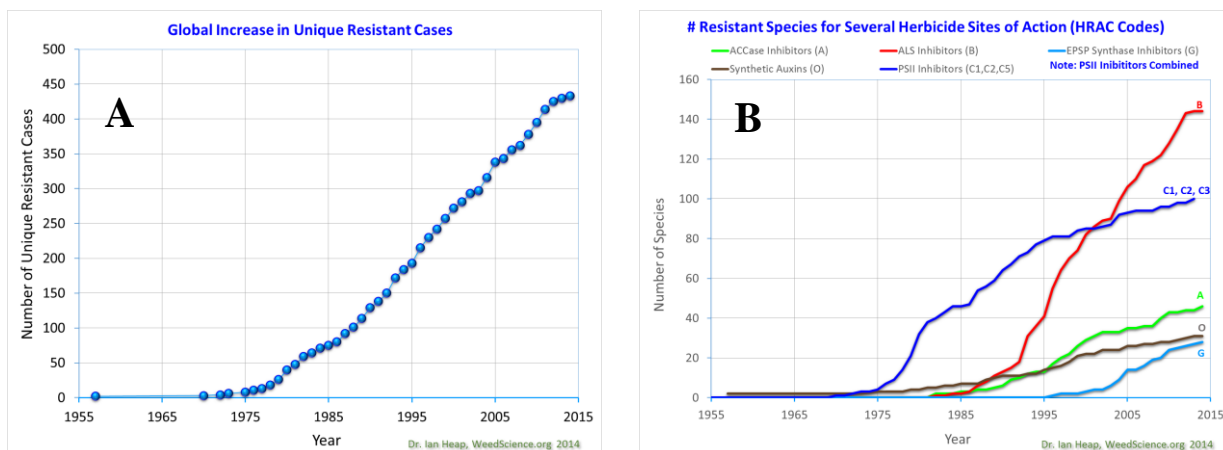


Figura 1.8. (A) Evolución global de los biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas. (B) Evolución de las especies de malas hierbas resistentes según los principales mecanismos de acción (Heap, 2014).

Los grupos de herbicidas en los que se han descrito más especies de malas hierbas resistentes son los inhibidores de la ALS (grupo B), inhibidores de la fotosíntesis (grupos C1, C2, C5) y los inhibidores de la ACCasa (grupo A) (Fig. 1.8). Destaca también el reciente pero incesante incremento de las resistencias al grupo de las glicinas, en concreto al herbicida glifosato (Powles y Preston, 2006). Este último caso reviste especial importancia, por su buena eficacia en general, por su elevado uso a nivel mundial y por la problemática que se genera en el manejo de los cultivos modificados genéticamente.

Sin duda, el caso más dramático al que nos enfrentamos hoy en día es el de los inhibidores de ALS. Las sulfonilureas comenzaron a comercializarse en 1982 y después de varios años de uso continuado surgieron algunas poblaciones de malas hierbas que mostraban signos de resistencia (Wittenbach y Abell, 1999). Lo mismo ocurrió con las imidazolinonas. Las principales causas de la aparición de malas hierbas resistentes se atribuyen a la alta frecuencia de individuos resistentes en poblaciones de malas hierbas, el uso repetido del mismo herbicida y la actividad residual en el suelo de este grupo de herbicidas. En la actualidad el número de especies vegetales resistentes a los inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados es de 144 (Heap, 2014).

El principal mecanismo responsable de la resistencia de las malas hierbas es diferente al descrito para la selectividad natural de los cultivos, que se debe a diferencias en el metabolismo. La resistencia de las malas hierbas a las sulfonilureas y a las imidazolinonas se debe principalmente a la reducida sensibilidad a estos herbicidas que presenta la enzima ALS en estos biotipos (Wittenbach y Abell, 1999). En varios casos se ha descrito que existen resistencias cruzadas, es decir, plantas cuya enzima ALS es resistente a un herbicida los son también a otros herbicidas de la misma familia e incluso de otras familias. Esto ocurre principalmente con las sulfonilureas y no tanto con las imidazolinonas.

Este fenómeno supone un gran problema, ya que el aspecto económico de las resistencias es, de siempre, motivo de preocupación (Orson, 1999; Mueller *et al.*, 2005). El control de malas hierbas puede encarecerse hasta un 300% ó incluso obligar a dejar la tierra en barbecho durante uno o varios años, lo que provoca la pérdida del valor de la finca. La aparición de resistencias implica la disminución del uso de un determinado herbicida, que debe ser sustituido por otro herbicida o, incluso por otros métodos de control que no impliquen el uso de herbicidas. Puesto que el agricultor utiliza el herbicida más efectivo y más barato posible, la aparición de las resistencias supone un incremento de costes (Orson, 1999).

La prevención de la aparición de resistencias implica la adopción de un manejo integrado de las malas hierbas, dado que ningún método de control por si solo es capaz de controlarlas adecuadamente y de forma sostenible (Storrie, 2006). De ahí que los programas de manejo de resistencia a herbicidas deban contemplar el uso de las opciones culturales, mecánicas y herbicidas disponibles para el control de malas hierbas en cada situación siguiendo las buenas prácticas agrícolas (Norsworthy *et al.*, 2012). Muchos de estos herbicidas se usan en combinación con otros que tengan un mecanismo de acción diferente para evitar la aparición de biotipos de malas hierbas resistentes. También, muchos de los nuevos compuestos introducidos en el mercado tienen una actividad residual más baja, por lo que ejercen una menor presión de selección sobre las poblaciones de malas hierbas. El uso de la rotación de cultivos o el uso alterno de herbicidas con diferente mecanismo de acción deberían ayudar a aumentar la vida útil de los compuestos que presentan mayores problemas.

La resistencia, sin embargo, también ha generado aspectos positivos (Owen, 1997). Así, han obligado a un mejor conocimiento de la biología de las distintas especies de malas hierbas (Sans y Fernández-Quintilla, 1997), a un mejor conocimiento de los herbicidas (Mallory-Smith y Retzinger, 2003) y, en definitiva, a una adopción de métodos de control integrado de malas hierbas (Catizone y Zanin, 2002).

1.3.2. Mecanismos de resistencia a herbicidas

Los mecanismos por los cuales una mala hierba llega a ser resistente se dividen en dos grupos (Powles y Yu, 2010). Uno es la alteración del sitio de acción (*target-site*) y el otro es debido a un cambio en cualquiera de los procesos que intervienen en la acción del herbicida (intercepción, retención, absorción, transporte o metabolización). Este último tipo de resistencia se conoce como resistencia de tipo metabólico (*non target-site*).

1.3.2.1. Modificación del sitio de acción (target-site)

De forma general se acepta que los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su actuación sobre un sitio de acción primario, generalmente una enzima, de especial relevancia biológica. Salvo casos más bien excepcionales, este sitio primario (enzima) es específico y la acción del herbicida sobre él (efecto primario) suele conducir al desarrollo de efectos secundarios, de naturaleza mucho más general, que normalmente acaban produciendo la muerte de la planta. Cualquier modificación en la estructura de la enzima (una o varias mutaciones en la secuencia de aminoácidos que componen la enzima) puede resultar en una pérdida de afinidad del herbicida por ésta, imposibilitando la unión efectiva de ambos e impidiendo así la inhibición del proceso vital mediado por dicho sitio. En la mayoría de los casos la resistencia a herbicidas es debida a esta pérdida de afinidad por el sitio de acción.

1.3.2.2. Cambios en los procesos que intervienen en la acción del herbicida (non target-site)

1.3.2.2.1. Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción

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 permitirá reducir la concentración de éste en el sitio de acción, lo que permitirá al último mantenerse funcional. Estas bajas concentraciones pueden lograrse ya sea mediante una reducción en la penetración, absorción o translocación, o por la existencia de fenómenos de secuestro en orgánulos celulares metabólicamente inactivos.

1.3.2.2. Metabolización a especies no tóxicas

En los procesos de detoxificación metabólica, entendidos como aquellos procesos biológicos en los que moléculas fitotóxicas son metabolizadas a compuestos inocuos, los biotipos resistentes son capaces de degradar el herbicida antes de que éste cause daños irreversibles. La velocidad de degradación enzimática puede variar con factores endógenos y exógenos tales como el estadio de crecimiento de la planta, las condiciones climáticas, etc.

1.3.3. Resistencias a glifosato

De forma natural están apareciendo malas hierbas que presentan cierta tolerancia o resistencia al glifosato, lo que no era esperable, pues era descrito como un herbicida de baja presión selectiva y de degradación rápida en el suelo. Así, mientras que el uso de glifosato como herbicida total tuvo como resultado el desarrollo de unas pocas especies de malas hierbas resistentes, su uso como herbicida selectivo durante más de una década ha supuesto que las poblaciones de malas hierbas resistentes a glifosato estén surgiendo como un grave problema (Powles, 2008). En total se han confirmado en torno a 28 especies alrededor del mundo con resistencia a este herbicida (Fig. 1.9).

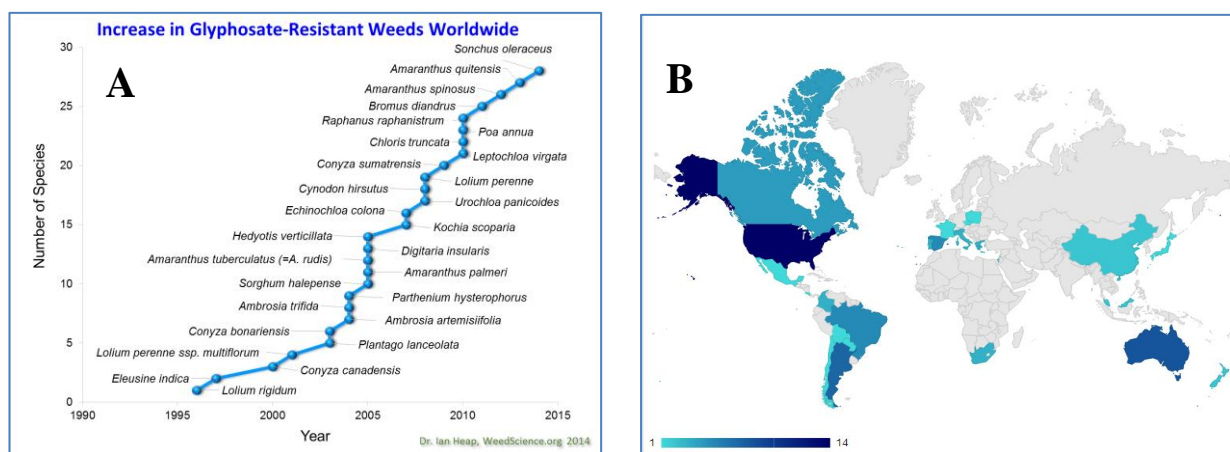


Figura 1.9. (A) Evolución de malas hierbas resistentes a glifosato a nivel mundial. (B) Distribución global de las especies de malas hierbas resistentes a glifosato (Heap, 2014).

Los mecanismos por los que las especies de malas hierbas desarrollan resistencia a glifosato son diversos e incluyen mutaciones en el sitio de acción del herbicida (target-site), amplificación del gen EPSPS y alteración de la traslocación del herbicida debido a un secuestro en la vacuola (Shaner *et al.*, 2012). Otro de ellos es una menor traslocación de glifosato a los meristemos (non target-site resistance) es un mecanismo de resistencia común en *Conyza canadensis* y *Lolium rigidum*. Este mecanismo confiere un elevado nivel de resistencia (de 7 a 11 veces más) comparado con las mutaciones de la EPSPS en malas hierbas. Respecto a este último, cambios en el aminoácido 106 de la EPSPS (según la numeración en *Arabidopsis thaliana*) de prolina a serina o treonina (target-site resistance) confieren resistencia a glifosato en varias especies de malas hierbas resistentes (Powles y Preston, 2006) incluidas *Eleusine indica* (Baerson *et al.*, 2002), *Lolium rigidum* (Wakelin y Preston, 2005) y *L. multiflorum* (Jasieniuk, 1995). Los bajos niveles de resistencia (de 2 a 3 veces) conferidos por las mutaciones en Pro106 son suficientes para que las malas hierbas sobrevivan a las dosis de glifosato habituales (Jasieniuk *et al.*, 2008).

Otros mecanismos (non target-site resistance) observados son el secuestro del glifosato en la vacuola (Ge *et al.*, 2010) o la metabolización del herbicida de forma natural en plantas de soja. Aunque este último mecanismo no se sabe si es debido a una actividad glifosato oxidoreductasa (GOX) de microorganismos endófitos (Duke, 2011).

Debido a la situación que se está generando, el uso de glifosato se está viendo comprometido si no se ponen medidas y muchos agricultores van a necesitar nuevos métodos para el control de las malas hierbas. Para ello se proponen diferentes alternativas, como la utilización de herbicidas con diferentes mecanismos de acción ya que es necesaria una diversidad suficiente en el sistema para que la resistencia no se desarrolle o lo haga muy lentamente (Powles, 2008). Otra alternativa es el desarrollo de nuevos cultivos modificados genéticamente que soporten el glifosato y otro tipo de herbicidas. Así, se plantea que el desarrollo de cultivos con múltiples resistencias permitiría un manejo más eficaz del glifosato al poderlo aplicar conjuntamente con otros herbicidas (Nandula, 2010).

1.3.3.1. Amplificación génica (target-site resistance) en *Amaranthus palmeri*

Recientemente se ha descubierto la evolución de una nueva resistencia a glifosato en una población de *Amaranthus palmeri*, que representa una de las peores malas hierbas en el cultivo de algodón en Georgia (US) (Culpepper *et al.*, 2006). En esta especie se ha comprobado que el mecanismo de resistencia al glifosato es debido a una amplificación del gen de la EPSPS y un aumento de la expresión de este enzima (Gaines *et al.*, 2011). Se ha demostrado que dentro de un biotipo de *Amaranthus palmeri* de Georgia (Culpepper *et al.*, 2006), la resistencia a glifosato estaba correlacionada con aumentos en (a) el número de copia genómica de la EPSPS, (b) la expresión de la transcripción de la EPSPS, (c) el nivel de proteína de EPSPS y (d) la actividad enzimática de la EPSPS (Gaines *et al.*, 2011). La amplificación del gen EPSPS producía una abundancia de copias del gen EPSPS que actuaba como una esponja molecular de absorción de glifosato. A pesar de que el glifosato bloqueaba ciertas copias del gen EPSPS, otras copias funcionaban de manera normal y el glifosato no podría matar la planta. El grado de amplificación génica fue muy variable, la población resistente contaba con entre 40 y 100 copias más del gen EPSPS que la población sensible. La amplificación del gen EPSPS es heredable (Powles y Yu, 2010). Aunque recientemente se ha relacionado el mecanismo de amplificación con un tipo de transposones, o elementos genéticos móviles, se desconoce el mecanismo concreto (Gaines *et al.*, 2013).

Amaranthus palmeri es una especie dioica que puede producir semillas mediante reproducción sexual o asexual (apomixis facultativa). Tras realizar cruzamientos recíprocos entre parentales resistentes y sensibles de esta especie, se observó que la transferencia de la resistencia se vio más influenciada por la hembra que por el progenitor masculino. A pesar del hecho de que las múltiples copias de la EPSPS se amplifican en el genoma nuclear, este asunto se relacionó con el rasgo apomítico de esta especie (Ribeiro *et al.*, 2014).

Igualmente, tras comprobar que la amplificación masiva del gen de la EPSPS en el nivel de la resistencia no conlleva costes asociados en la aptitud biológica, se consideran estos efectos aditivos como factores clave por los que, probablemente, la resistencia debido a la amplificación del gen de la EPSPS se convertirá en un mecanismo de resistencia al glifosato generalizado y llegará a ser mucho más evidente en especies de malas hierbas (Vila-Aiub *et al.*, 2014).

La evolución de la resistencia a glifosato en poblaciones de malas hierbas ha tenido lugar en aquellos agro sistemas donde el glifosato ejerce una fuerte y continua presión de selección (Vila-Aiub *et al.*, 2008). Así, se han descrito hasta 46 casos de resistencia a glifosato en *Amaranthus palmeri* (Heap, 2014), todas ellas en EEUU.

Las semillas utilizadas en este trabajo pertenecen a dos poblaciones de *North Carolina* (NC, USA). Si bien su caracterización génica no ha sido tan exhaustiva hasta el momento como lo ha sido la caracterización de la población de Georgia (GA, USA), sí se ha comprobado que la población resistente presenta una amplificación génica del gen que controla la EPSPS (Chandi *et al.*, 2012). En concreto, en 10 individuos de la población resistente se encontró que el número de copias oscilaba entre 22 y 63.

1.4. APLICACIÓN CONJUNTA DE HERBICIDAS

La aplicación conjunta de herbicidas ha sido una práctica muy empleada dirigida a cubrir distintas necesidades. Entre los objetivos de la aplicación conjunta de herbicidas está controlar malas hierbas con diferente sensibilidad, retrasar el desarrollo de biotipos resistentes (por menor presión selectiva) y reducir los costes de aplicación (Streibig *et al.*, 1997).

El continuo e intensivo uso de herbicidas con un único mecanismo de acción proporciona alta presión de selección de malas hierbas resistentes con consecuencias negativas directas. En primer lugar, aumenta la densidad de las especies tolerantes al herbicida utilizado y, en segundo lugar, favorece la evolución de poblaciones resistentes al mismo. (Vidal *et al.* 2010). El intenso empleo de glifosato tras el desarrollo de cultivos transgénicos tolerantes y la continua aplicación de herbicidas de la familia de las imidazolinonas ha contribuido al desarrollo de malas hierbas resistentes a los mismos.

Una medida preventiva para el control de malas hierbas tolerantes y resistentes es la combinación de herbicidas con diferentes mecanismos de acción. El conocimiento del mecanismo de acción de los diferentes herbicidas permite la posibilidad de plantear asociaciones de los mismos de manera racional, identificando de este modo oportunidades de sinergia o para evitar posibles antagonismos que afecten al control de las mismas.

Un isoblograma (Fig. 1.12) es una representación gráfica en la que se expresan las dosis de cada uno de los herbicidas que obtienen la misma respuesta fisiológica tras realizar una aplicación conjunta (Sørensen *et al.*, 2007). El resultado de la combinación de dos herbicidas puede ser *antagónico*, *sinérgico* o *aditivo*, también llamado efecto neutro. (Green, 1989; Vidal *et al.*, 2010). Estos resultados son consecuencia de las interacciones químicas, fisiológicas o cinéticas (absorción, translocación o metabolismo) entre los productos. Se dice que el resultado es aditivo o efecto neutro cuando se obtiene la misma respuesta al sustituir un herbicida por otro en tasas biológicas equivalentes (Vidal *et al.*, 2010). Al analizar las curvas-respuesta para un determinado porcentaje de control estas son lineales, ya que obtenemos la misma respuesta al sustituir uno por otro proporcionalmente. Es el resultado esperado al aplicar dos herbicidas con el mismo mecanismo de acción. Antagonismo es el nombre dado a la interacción negativa entre dos o más compuestos (Vidal *et al.*, 2010). La respuesta obtenida para esas mismas dosis es, por tanto, menor y la curva es convexa al sustituir uno por otro proporcionalmente. Se precisa de una mayor dosis de cada uno de los herbicidas para obtener la misma respuesta fisiológica. Sinergia es el efecto añadido o potencializado de los productos mezclados (Vidal *et al.*, 2010). La respuesta es, por tanto, mayor y la curva es cóncava cuando se sustituyen de la misma manera (Fig. 1.10).

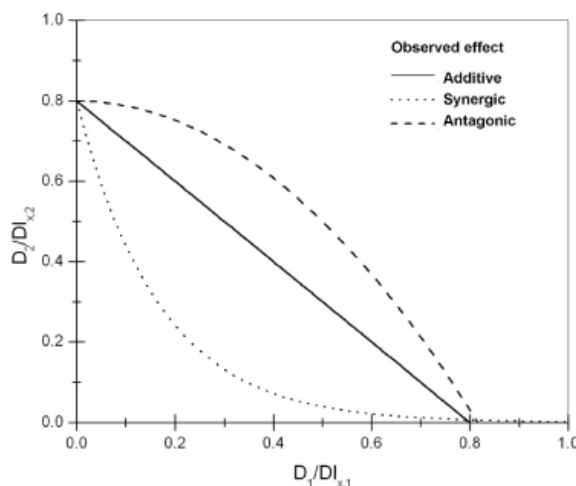


Figura 1.10. Ejemplo genérico de un isoblograma (curva-respuesta), que demuestra la presencia de sinergia o antagonismo entre dos herbicidas. Ejes X e Y: relación entre las dosis 1 y 2 de los herbicidas aplicados conjuntamente y las dosis 1 y 2 aplicadas por separado, para el mismo efecto biológico.

En estudios en los que se analizan aplicaciones conjuntas de herbicidas suele ser habitual emplear dosis bajas de herbicida, ya que de este modo los efectos fisiológicos que ocurren en la planta tras su aplicación se aprecian con mayor facilidad.

1.4.1. Aplicación conjunta de glifosato con inhibidores de ALS

Tal y como se ha comentado en puntos anteriores, en los últimos años han comenzado a desarrollarse biotipos de malas hierbas resistentes a glifosato, sobre todo por su utilización intensiva en cultivos transgénicos tolerantes.

Una característica del herbicida glifosato que le ha hecho granjearse la fama de “ambientalmente seguro” es su rápida eliminación en el suelo, fundamentalmente por degradación microbiana. Sin embargo, esta característica va ligada a que su acción no permanece a lo largo del tiempo, lo que implica que se necesitan nuevas aplicaciones de glifosato y esto lleva al citado incremento de la presión de selección sobre las malas hierbas.

Para poder continuar con los beneficios de las aplicaciones de glifosato pero no seguir incrementando la presión de selección, se está planteando en los últimos años la opción de aplicarlo conjuntamente con inhibidores de ALS, herbicidas con diferente mecanismo de acción y de mayor persistencia, lo que alargaría el tiempo de control de malas hierbas. Si bien, existen escasos estudios que analicen esta propuesta, para llevarla a cabo se debe valorar previamente los efectos de estos herbicidas, aplicados por separado y de forma conjunta, sobre la respuesta al control de las malas hierbas. De esta manera se pretende evitar ciertos riesgos que presenta la aplicación conjunta de herbicidas, como puedan ser el uso de herbicidas a dosis superiores de lo necesario o la utilización de mezclas antagonicas.

Objetivos



2. OBJETIVOS

Una de las estrategias que más se utiliza actualmente para hacer frente a las limitaciones que representa la aparición de malas hierbas resistentes es la aplicación de mezclas de materias activas con distintos mecanismos de acción y distintas persistencias. Esta es una estrategia general asumida por distribuidores, comercializadores y asesores de herbicidas que en sí misma no elimina las resistencias, incluso es una medida en entredicho para ello, pero se está utilizando y es imprescindible estudiar su eficacia y sostenibilidad antes de masificar su uso.

Dentro de este manejo se están recomendando aplicaciones conjuntas de glifosato con herbicidas inhibidores de ALS. Sin embargo, habría que hacer una valoración racional de su conveniencia, verificando su compatibilidad fisiológica, puesto que tras un tratamiento herbicida la respuesta de la planta es poco conocida pero es necesario comprenderlo para saber si parte de esta respuesta de la planta está implicando mayor tolerancia o mayor sensibilidad a otro herbicida que se aplicaría posteriormente o simultáneamente. Este tipo de estudios son imprescindibles para utilizar las dosis menores necesarias de cada componente, velando porque esta estrategia consiga un uso menor de herbicidas y sea más sostenible. La conveniencia de esta aplicación conjunta se complica aún más si se considera la hipótesis de que el modo de acción de los herbicidas es común.

Por esta razón, el objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es **valorar la aplicación conjunta de dos herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos con distinto mecanismo de acción**. Se pretende evaluar si presentan sinergia o antagonismo y profundizar en su modo de acción, tanto en una población de malas hierbas sensible y en otra resistente a glifosato, con el fin de determinar la conveniencia de esta aplicación conjunta. Dicha determinación se realizará de una manera novedosa, ya que se abordará utilizando los efectos de ambos herbicidas en los marcadores fisiológicos de su toxicidad.

La valoración de una aplicación conjunta debe de venir precedida de la caracterización de los efectos de cada herbicida por separado. En trabajos anteriores del grupo de investigación donde se ha realizado este TFG se había caracterizado la respuesta fisiológica de *A. palmeri* a glifosato, llegando a determinar, para cada una de las poblaciones, una dosis no excesivamente agresiva que permitirá una correcta evaluación de posibles efectos potenciadores en su aplicación conjunta. Con estos antecedentes se han planteado los objetivos específicos de este trabajo:

1. Determinar una dosis de imazamox no demasiado agresiva pero lo suficientemente efectiva como para observar, a corto plazo, los efectos fisiológicos característicos de su modo de acción, en las plantas del biotipo sensible.
2. Evaluar y comparar la respuesta de las plantas de ambos biotipos tratadas con imazamox y glifosato, analizando a corto plazo los efectos fisiológicos más comunes de los dos tipos de herbicidas.

Materiales y métodos



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DESCRIPCIÓN DE *Amaranthus palmeri* S. Watson

Amaranthus palmeri S. Watson es una especie C₄, anual y dioica; es originaria del sudoeste de los Estados Unidos y se ha extendido de forma rápida como mala hierba por el centro y este de ese país, alcanzando incluso la provincia de Ontario (CA). Su rápida expansión se debe a su alta fecundidad (hasta 250.000 semillas/planta según algunos autores) (Recasens, 2010).

Reino: *Plantae*
Subreino: *Tracheobionta*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Subclase: *Caryophyllidae*
Orden: *Caryophyllales*
Familia: *Amaranthaceae*
Subfamilia: *Amaranthoideae*
Género: *Amaranthus*
Especie: *Amaranthus palmeri* S. Watson



Las semillas de *A. palmeri* son de color marrón-rojizo oscuro a marrón, de aproximadamente 1 mm de diámetro. El sistema radicular de la planta es fibroso y consta de una raíz pivotante, a menudo de color rojizo, de la cual emergen raíces secundarias. La planta consta de un tallo grueso principal del cual brotan ramas laterales. Las hojas son desde ovaladas a rómbico-lanceoladas. Se caracterizan por su peciolo, cuya longitud es mayor que el largo de la lámina de la hoja. Las inflorescencias son largas, terminales y con escasas ramificaciones (Foto 3.1). Las femeninas poseen brácteas espinosas al tacto. Las masculinas son suaves y desprenden polen cuando se mueven.



Foto 3.1. Inflorescencia masculina (arriba) y femenina (abajo) de *Amaranthus palmeri* (Recasens, 2010).

A pesar de que las hojas, tallos y semillas de *A. palmeri* son comestibles y nutritivas (Castetter y Bell, 1951), rara vez se consumen hoy en día.

A. palmeri es una mala hierba altamente competitiva e invasiva en los cultivos. Esto es debido a su elevada tasa de crecimiento, al gran volumen que adquiere (Horak y Loughin, 2000) y a su prolífica producción de semillas (Culpepper *et al.*, 2006).

En comparación con otras amarantáceas, *A. palmeri* tiene mayores valores de volumen de planta, peso seco y área foliar (Horak y Loughin, 2000). Algunos ensayos muestran que las raíces de esta mala hierba son más finas y más alargadas que las de soja, lo que hace que ocupen un gran volumen de suelo. Esto facilita la adquisición de agua y nutrientes y, cuando estos elementos son limitados, es una ventaja competitiva para la mala hierba (Wright *et al.*, 1999). Otros ensayos realizados para probar la eficiencia fotosintética en condiciones humedad o sequía mostraron que *A. palmeri* tiene mecanismos de tolerancia a la sequía. Esto es una ventaja en hábitats de clima seco donde la probabilidad de lluvia es muy baja, puesto que esta mala hierba se adaptará mejor que otras plantas (Ehleringer, 1983). A pesar de que sus semillas germinan rápidamente cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables, pueden ser capaces de germinar durante todo el año (Keeley *et al.*, 1987). También pueden germinar gradualmente durante décadas aunque el suelo haya sufrido alteraciones (Sauer, 1988). El tamaño tan pequeño de las semillas hace que la diseminación y el transporte de las mismas sea sencillo (Horak y Loughin, 2000).

Asimismo, se ha demostrado que tiene efectos alelopáticos selectivos sobre las plantas de su alrededor; los residuos de la planta que son incorporados al suelo, inhiben el crecimiento del repollo, zanahoria, cebolla, y del sorgo en los ensayos de campo (Menges 1987, 1988).

La especie ha llegado a desarrollar mecanismos de resistencia a distintos grupos de herbicidas: inhibidores de la fotosíntesis (grupo C1/5), inhibidores de ALS (grupo B/2), dinitroanilinas (grupo K1/3), inhibidores de HPPD (grupo F2/27) y a glicinas (grupo G/9). En los últimos años han aparecido también biotipos que presentan resistencia múltiple a los inhibidores de ALS y a las glicinas (Heap, 2014). Precisamente, su resistencia a glifosato es la que mayores problemas está ocasionando en cultivos transgénicos como soja y algodón, y está considerada ya como una de las cinco malas hierbas más problemáticas en la mayoría de los estados del sudoeste de los Estados Unidos (Webster, 2005).

3.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

3.2.1. Germinación de las semillas

Las semillas de *A. palmeri* son originarias de North Carolina (NC, USA) y fueron facilitadas por el Dr. Todd Gaines (Bayer CropScience, Frankfurt, DE). Se corresponden con dos biotipos, uno sensible (NC-S) y otro resistente (NC-R).

Las semillas se esterilizaron en superficie según el método de Labhili *et al.* (1995). Para ello, fueron sumergidas en una mezcla de 1% de hipoclorito de sodio (v/v) y 0,01 % SDS (p/v) durante 40 minutos. Tras ser aclaradas con abundante agua desionizada se mantuvieron otros 10 minutos en una disolución 0,01 N de HCl, tras lo cual se aclararon de nuevo. Posteriormente fueron colocadas, una a una, en unas pequeñas piezas de plástico rellenas de agar al 0,65%, denominadas *seed-holders* (Foto 3.2) y éstas en contenedores rellenos con agua desionizada y envueltos con film plástico para mantener la humedad.



Foto 3.2. Seed-holder (Araponics®)

Para su germinación se colocaron en una cámara a 4 °C en oscuridad durante una semana. Tras ello, se inició un periodo de 48 h con luz continua y los siguientes ciclos de temperatura:

▪ 18 °C durante 6 h	24 h	48 h
▪ 30 °C durante 18 h		
▪ 18 °C durante 6 h	24 h	
▪ 30 °C durante 18 h		



Foto 3.3. Plántulas de *A. palmeri* germinadas en seed-holders rellenos de agar y sumergidos parcialmente en agua desionizada.

3.2.2. Condiciones de crecimiento

Una vez germinadas las plántulas (Foto 3.3), se retiró el film plástico que envolvía los contenedores y se colocaron sobre una bancada dentro de la cámara de crecimiento (Foto 3.4), con el fin de mantener una temperatura próxima a 30 °C y amortiguar el estrés que sufren las plántulas al cambiar las condiciones. Transcurridos 5 días y una vez estabilizadas las plántulas fueron trasplantadas (junto con los seed-holders) a contenedores con una menor densidad (7 plantas/contenedor), donde crecieron en un cultivo hidropónico puro con aireación forzada que se aplicó colocando en cada contenedor un difusor unido a una bomba de aireación de 1,85 W con un flujo de 750 cc min⁻¹ (Foto 3.4).

El crecimiento de las plantas se produjo en una cámara bajo las siguientes condiciones controladas:

Fotoperiodo:	16 h luz / 8 h oscuridad
Temperatura:	22 °C día / 18 °C noche
Humedad relativa:	60% día / 70% noche

La radiación fotosintéticamente activa (PAR) fue próxima a 600 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la solución nutritiva empleada fue la establecida por Hoagland y Arnon (1950), enriquecida con una concentración 15 mM de KNO₃.

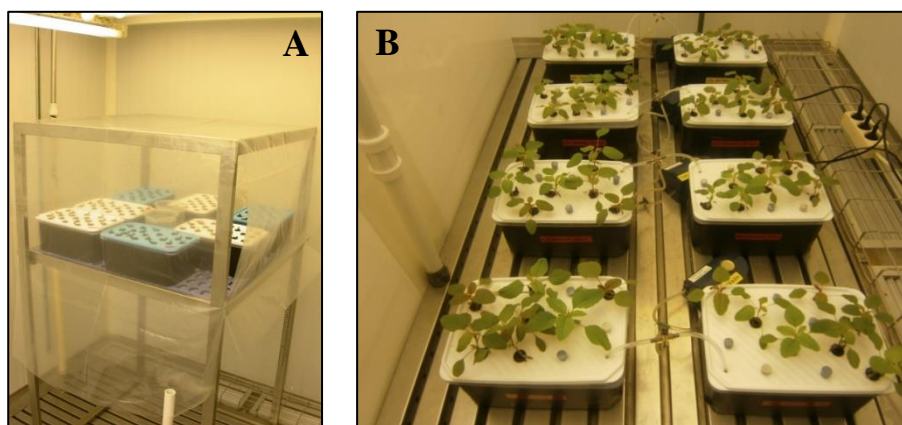


Foto 3.4. (A) Contenedores sobre una bancada cubierta con plástico. (B) Cultivo hidropónico puro de *A. palmeri* (biotipo NC-S) en contenedores con aireación forzada. Estado de las plantas en el día de la aplicación de los tratamientos.

3.2.3. Aplicación de los tratamientos

Se aplicaron dos herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos:

- El herbicida *glifosato* es un inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (IBAA) perteneciente a la familia química de las glicinas. El producto comercial utilizado en este trabajo se presenta en forma líquida como sal de isopropilamina, bajo el nombre comercial de *Bayer Garden Glyfos* (Bayer CropScience) y con una riqueza del 36% (p/v).
- El herbicida *imazamox* es un inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (IBAR) perteneciente a la familia química de las imidazolinonas. El producto comercial utilizado en este trabajo se presenta en forma de líquido soluble, bajo el nombre de *Pulsar[®] 40* (BASF Española) y con una riqueza del 10% (p/v).

Se realizaron dos experimentos, uno previo solo con imazamox y otro con la aplicación conjunta. En ambos experimentos los tratamientos fueron aplicados cuando las plántulas contaban con, aproximadamente, 20 días. A las plantas que formaban parte del tratamiento control no se les aplicó herbicida. Se hizo un seguimiento visual del estado de las plantas para determinar el tiempo que tardaba en producirse, si era el caso, la letalidad.

3.2.3.1. *Ensayo con imazamox*

De forma previa a la aplicación de los tratamientos definitivos, se realizó un experimento de aproximación con el objetivo de determinar la dosis de imazamox que permitiera una posterior aplicación conjunta con glifosato. Esta dosis debía ser inferior a la dosis letal pero lo suficientemente efectiva como para observar los efectos fisiológicos característicos de su modo de acción. La referencia que se consideró para determinar el rango de dosis de imazamox fue la dosis empleada con anterioridad en trabajos de investigación realizados con este mismo herbicida en plantas de *Sinapis alba* (Zulet¹, 2013) y de *Arabidopsis thaliana* (Zulet², 2013). Para ello se aplicaron 0,8 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹ y 1,5 mg l⁻¹ de imazamox en plantas del biotipo sensible (NC-S) a través de la solución nutritiva, lo cual facilitó el control de la concentración real (Foto 3.5). Se considera que los volúmenes añadidos no varían significativamente la concentración de nutrientes de la solución nutritiva.

En este experimento de aproximación se tomaron muestras de raíces y hojas a los 3 días desde la aplicación de los tratamientos. Se determinó la concentración de aminoácidos libres, proteína soluble, carbohidratos y las actividades enzimáticas de fermentación etanólica. A partir de dicho experimento se definió como dosis de estudio 1,5 mg l⁻¹ de imazamox.

3.2.3.1. *Ensayo de aplicación conjunta*

Una vez establecidas las dosis para la aplicación conjunta de los herbicidas se procedió a realizar el ensayo definitivo cuyos tratamientos fueron los que aparecen en la tabla 3.1. Los tratamientos fueron aplicados en ambos biotipos (NC-S) y (NC-R). Las dosis aplicadas de glifosato se decidieron en base a estudios previos realizados en plantas de *A. palmeri*, siendo la dosis recomendada para su control, en poblaciones sensibles, de 0,8 kg ha⁻¹ de glifosato (Culpepper *et al.*, 2006; Crespo, 2013). Así, se decidió aplicar dicha dosis, que es 1,6 g l⁻¹ (en función del volumen de caldo) y una dosis cuatro veces inferior (0,4 g l⁻¹). La aplicación de estos tratamientos se realizó vía foliar, por lo que el glifosato fue pulverizado en un volumen de 10 ml de caldo por cada contenedor, mediante un aerógrafo (Mod. Junior Start; Sagola) conectado a un compresor (Mod. Werther one, Brevettato, 60 W; 10 l m⁻¹; 2,5 bar) (Foto 3.5).



Foto 3.5. (A) Aplicación foliar del herbicida sobre plantas de *P. sativum* L. mediante un aerógrafo conectado a un compresor (Armendariz, 2011). (B) Aplicación del herbicida a través de la solución nutritiva del cultivo hidropónico puro.

Tabla 3.1. Aplicación de los tratamientos

Tratamiento	Modo de aplicación	Dosis
CONTROL (C)	-	-
GLIFOSATO (G1)	vía foliar	0,4 g l ⁻¹
GLIFOSATO (G2)	vía foliar	1,6 g l ⁻¹
IMAZAMOX (I)	vía radical	1,5 mg l ⁻¹
G1+I	vía foliar vía radical	0,4 g l ⁻¹ 1,5 mg l ⁻¹
G2+I	vía foliar vía radical	1,6 g l ⁻¹ 1,5 mg l ⁻¹

Se tomaron muestras de las plantas 3 días después de la aplicación de los tratamientos. El material vegetal obtenido fue utilizado posteriormente para las determinaciones analíticas.

3.2.4. Obtención de muestras

En el momento del muestreo se determinó el peso fresco de las muestras (hojas y raíces) y la mayor parte de ellas, tomadas en viales de 6 ml, fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C. Asimismo, parte de las muestras se secaron en una estufa con aire recirculado a 75-80 °C durante 48 horas para obtener el peso seco, con objeto de calcular la relación peso fresco/peso seco, que luego se utilizaría en los cálculos de las determinaciones analíticas. En el experimento de aplicación conjunta, también se obtuvieron discos de hoja de 4 mm de diámetro en fresco, con la ayuda de un micro-perforador Harris uni-core™ (Healthcore, Bucks, UK) y se congelaron para la determinación de la concentración de siquimato. Se tomaron 3 discos de la hoja más joven totalmente expandida.

Posteriormente, se pulverizaron las muestras utilizando un micro-desmembrador MM200 Restsch® (Retsch®, Haan, DE) (Foto 3.6) y manteniendo en todo momento la temperatura de congelación con nitrógeno líquido. Una vez trituradas se realizaron alícuotas de aproximadamente 0,1 g (0,05 g dependiendo del protocolo de referencia). Finalmente todas las alícuotas se conservaron a -80 °C para su posterior utilización en las determinaciones analíticas.

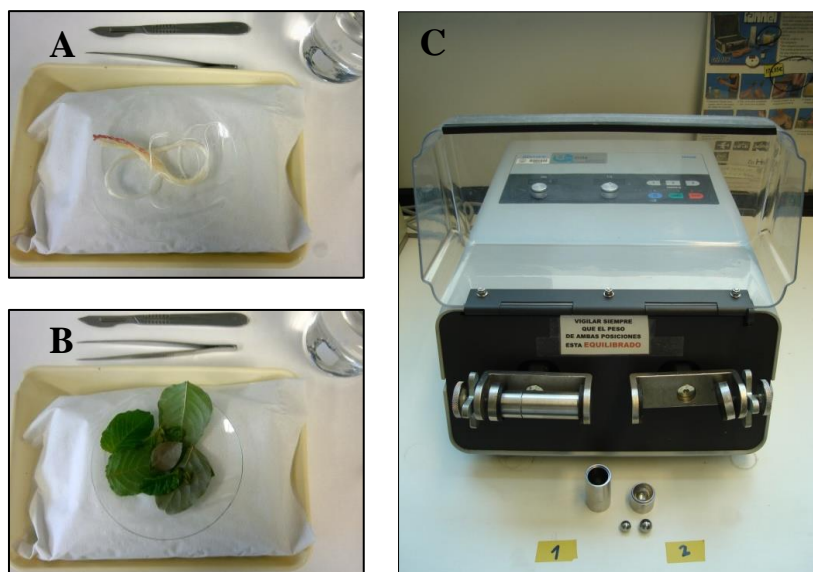


Foto 3.6. (A-B) Muestras frescas de raíces y hojas de *A. palmeri* en el momento del muestreo. (C) micro-desmembrador MM200 Restsch®.

3.3. DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES

3.3.1. Extracción

A muestras de material vegetal de 0,1 g (aprox.) ya triturado se añadió 1,5 ml de etanol 80%, tanto para raíces como para hojas, en el propio eppendorf. Se dejó hervir durante 30 segundos en un bloque calefactor y tras esto se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos, para llevar finalmente el sobrenadante a un tubo TurboVap. Se repitió esta acción 2 veces más y por último se realizó un cuarto lavado en frío. El sobrenadante total recogido fue llevado al evaporador TurboVap®LV Evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA) a 40 °C con aire comprimido a una presión de 1,2 bar, para eliminar completamente el etanol. La muestra seca obtenida desde el evaporador se resuspendió en 2 ml de agua desionizada y tras sonicar durante 10 min se centrifugó a 2.300g durante 10 min. El sobrenadante obtenido se congeló a -20 °C, para luego determinar el contenido de aminoácidos libres mediante espectrofotometría en lector de microplacas.

3.3.2. Determinación analítica de la concentración de aminoácidos libres

Para la determinación de aminoácidos libres se siguió el método propuesto por Yemm y Cocking (1955). Se tomaron 20 µl de muestra a los que se les añadieron 500 µl de tampón citrato (42 g de ácido cítrico anhidro y 16 g de NaOH en 250 ml de agua milliQ; pH 5,5) y 430 µl de reactivo ninhidrina (25 mg de ácido ascórbico en 2,5 ml de agua milliQ y 0,625 g de ninhidrina en 62,5 ml de 2-metoxi-etanol). La mezcla se incubó a 100 °C durante 20 min y se dejó enfriar en hielo. Se añadió 1 ml de etanol al 60% y, previa agitación se añadió 200 µl a cada pocillo de la micro-placa. Se leyó la absorbancia a 570 nm. Se utilizó L-glicina como patrón en un rango de calibrado de 0 a 15 nmol µl⁻¹. Los resultados se expresaron como µmoles de glicina g⁻¹ PS.

3.4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

El ensayo de proteína se realizó según el método propuesto por Bradford (1976). La determinación de la concentración de proteína soluble se realizó en los extractos utilizados para la determinación de las actividades enzimáticas fermentativas en raíces. A 60 μ l de muestra diluida (1:60) se le añadieron 200 μ l del reactivo de Bradford, Bio-Rad 500-0006 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) previamente diluido (1:5) y filtrado. Se esperó un mínimo de 2 minutos y se midió la absorbancia en un lector de microplacas modelo SinergyTM HT (BioTek[®] Instruments Inc., Winooski, VT, USA) a 595 nm. Se utilizó como patrón seroalbúmina bovina (BSA) en un rango de calibrado de 0 a 6 μ g.

3.5. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

3.5.1. Extracción

Los extractos para la determinación de la concentración de carbohidratos solubles se obtuvieron de la siguiente manera:

A muestras de material vegetal de 0,05 g (aprox.) se les añadió etanol 80 % (1,5 ml) y se sonicó 3 veces en un baño de ultrasonidos durante 25 minutos. Después de cada sonicación se centrifugó la muestra a 5.000 rpm, durante 5 min y el sobrenadante fue llevado a un tubo TurboVap. El sobrenadante total recogido fue llevado al evaporador TurboVap[®] LV Evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA) a 40 °C con aire comprimido a una presión de 1,2 bar, para eliminar completamente el etanol. La muestra seca obtenida desde el evaporador se resuspendió en 1 ml de agua desionizada y tras sonicar durante 10 min se recogió el sobrenadante y se congeló a -20 °C, para luego determinar el contenido de carbohidratos solubles mediante electroforesis capilar.

Los extractos para la determinación de la concentración de almidón se obtuvieron de la siguiente manera:

Para la determinación de almidón se utilizó el material vegetal insoluble en etanol, obtenido tras las sonicaciones en etanol 80 %, una vez secado en estufa a 70 °C durante 24 horas, según el procedimiento descrito por McRae (1971), modificado ligeramente. El tejido seco obtenido fue pesado y luego resuspendido directamente en el mismo eppendorf donde se secó con 1 ml de agua desionizada. El volumen total fue hervido durante 1 h, y después de enfriarse se le añadió 0,25 ml de solución de amiloglucosidasa (41 mg de enzima amiloglucosidasa en 50 ml de tampón acetato 8,55 mM, pH 4,5). Dicho enzima cataliza la hidrólisis de almidón a glucosa. Para asegurar la completa hidrólisis del almidón presente en la muestra a glucosa, la mezcla se agitó e incubó durante toda la noche en un baño a 50 °C. Una vez terminada la incubación, las muestras fueron agitadas y posteriormente centrifugadas durante 15 min a 5.000 rpm. El sobrenadante se conservó a -20 °C para la determinación de la concentración de glucosa en el mismo. Así, el contenido de almidón fue expresado como mg glucosa g⁻¹ PS.

3.5.2. Determinación analítica de la concentración de carbohidratos

La concentración de fructosa, sacarosa y glucosa de los extractos solubles en etanol y la concentración de glucosa proveniente de almidón fueron determinadas mediante electroforesis capilar en un equipo Beckman P/ACE 5500 según el método descrito por Warren y Adams (2000). Se utilizó un capilar de sílice fundida de 50 μ m de diámetro interno y 31,4/38,4 cm de longitud. El tampón utilizado fue 10 mM benzoato, 0,5 mM MTAB (pH 12, ajustado con NaOH). La detección fue indirecta a una longitud de onda de 225 nm y se trabajó a un voltaje de -15 KV.

3.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS FERMENTATIVAS *IN VITRO*

3.6.1. Extracción

Las muestras de tejido radical ya pulverizadas se homogeneizaron añadiendo un volumen de tampón [50 mM MOPS (pH 7); 5 mM MgCl₂; 20 mM KCl; 1 mM EDTA Na₂; 10 mM DTT y 0,08 % (p/v) β-mercaptoetanol] según la relación 1:4 (g PF:ml). Se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 minutos, la pastilla fue descartada y el sobrenadante se utilizó para la determinación de las actividades enzimáticas y de la proteína soluble. Todas las operaciones se realizaron a 4 °C.

El proceso de desalado del sobrenadante se llevó a cabo en placas de 96 pocillos UNIFILTER™ (800 µl) de Whatman Polyfilteronics® (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA) que contenían Sephadex® G-50. Dichas columnas fueron equilibradas previamente con 50 mM MOPS (pH 7); 5 mM MgCl₂ y 20 mM KCl.

Las actividades enzimáticas se determinaron en el lector de microplacas utilizando 20 µl de ese sobrenadante desalado en un volumen de reacción final de 170 µl. Todas las actividades enzimáticas se determinaron a 30 °C, 340 nm y durante un tiempo de ensayo de 10 minutos. El coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm es 6,22 M⁻¹ cm⁻¹.

3.6.2. Piruvato descarboxilasa (PDC)

La PDC se determinó en la dirección piruvato a acetaldehído y acoplándola a la ADH monitorizándose la desaparición de NADH a 340 nm (Bouny y Saglio, 1996) con modificaciones. La mezcla de reacción contenía 100 mM Tricina (pH 6,5); 2 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,2 mM NADH; 3 unidades ml⁻¹ ADH; 10 mM piruvato sódico; 25 mM oxamato (para inhibir el enzima LDH) y 1 mM TPP. La reacción se inició con la adición del piruvato y para todos los extractos se realizó un blanco sin él.

3.6.3. Alcohol deshidrogenasa (ADH)

Se determinó en la dirección etanol a acetaldehído y según el método descrito por John y Greenway (1976). El medio de reacción estaba compuesto por 50 mM Bicina (pH 8,8); 5 mM MgCl₂; 49 µM etanol absoluto y 1 mM NAD⁺. Se determinó la formación de NADH midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm. Para cada muestra se realizó un blanco sin etanol.

3.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SIQUIMATO MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

3.7.1. Extracción

Los extractos para la determinación de siquimato se obtuvieron añadiendo 300 μl de HCl 0,25 N a cada eppendorf que contenía 3 discos de hoja (100 μl /disco de hoja) (Koger *et al.*, 2005b). Tras agitar los eppendorf se dejaron reposar 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo los eppendorf se fueron agitando ocasionalmente.

3.7.2. Determinación analítica

El análisis se realizó mediante la técnica HPLC. El equipo disponía de un módulo de separación Waters 2690 (Milford, MA, USA) con una columna Waters Spherisorb 5 μm ODS1 (4,6 \times 250 mm) y con una pre-columna Waters Spherisorb 5 μm ODS1 (4,6 \times 30 mm) a una temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$. El solvente utilizado fue ácido fosfórico 3,33 mM (pH 2,7) a un flujo de 0,6 ml min^{-1} de manera isocrática durante 10 minutos. Para limpiar la columna, tras la detección del pico de siquimato, se sustituyó la composición del solvente por el 100% de metanol, y se aumentó el flujo hasta 1,5 ml min^{-1} . Se mantuvieron esas condiciones hasta el minuto 16. Del minuto 16 al 18 se sustituyó de nuevo el solvente a ácido fosfórico 3,33 mM (pH 2,7). En el minuto 23 se volvió a las condiciones iniciales de flujo 0,6 ml min^{-1} y se mantuvieron hasta el minuto 25. El volumen de inyección fue de 25 μl .

La detección del siquimato se llevó a cabo a 215 nm con un detector Waters 2487 (Milford, MA, USA) que permite medir a dos longitudes de onda a la vez. El compuesto fue identificado y cuantificado por comparación de sus tiempos de retención con estándares puros. Se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de la marca comercial Sigma-Aldrich[®] y a las concentraciones de 1, 3, 5, 10, 25, 50, 125, 250 y 500 mM.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del experimento de aplicación conjunta se evaluaron aplicando un análisis de la varianza (ANOVA) simple. Para cada parámetro y de forma independiente en cada biotipo, se compararon los datos de todos los tratamientos entre sí, es decir, utilizando como única variable independiente el tratamiento. La comparación de medias se realizó con la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS). Los resultados significativamente diferentes para una $P \leq 0,05$ se indican en las gráficas con letras diferentes para cada tratamiento. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 21 para Windows.

Resultados y discusión



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE IMAZAMOX Y ESTABLECIMIENTO DE LA DOSIS

El objetivo principal del trabajo es valorar la aplicación conjunta de dos herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos con distinto mecanismo de acción, por lo que se planteaba la necesidad de realizar una caracterización previa de los efectos de cada herbicida por separado. La caracterización de los efectos del glifosato aplicado de manera aislada ya se había realizado en el grupo de investigación donde se ha desarrollado este TFG (Crespo, 2013). Para completar la información sobre los efectos de los herbicidas aplicados por separado, se llevó a cabo un experimento previo con el fin de establecer la dosis de imazamox que permitiera una posterior aplicación conjunta con glifosato. Esta dosis debía ser inferior a la dosis letal pero lo suficientemente efectiva como para observar los efectos fisiológicos característicos de su modo de acción. La referencia que se consideró para la determinación de este rango fue la dosis empleada con anterioridad en trabajos de investigación realizados con este mismo herbicida en plantas de *Sinapis alba* (Zulet¹, 2013) y de *Arabidopsis thaliana* (Zulet², 2013). Esta dosis fue de 1,5 mg l⁻¹, capaz de provocar la muerte de la planta a los 20 días. Por ello, el rango de prueba no debía superar la dosis de referencia y se aplicaron 0,8 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹ y 1,5 mg l⁻¹ de imazamox a la población sensible de *A. Palmeri* (NC-S).

Se hizo un seguimiento visual del estado de las plantas para determinar el tiempo que tardaba en producirse, si era el caso, la letalidad. Éste, no se consideró un parámetro determinante para el establecimiento de la dosis de imazamox puesto que se trabajó con *A. palmeri*, una mala hierba, por lo que el crecimiento fue muy variable entre individuos. La Tabla 4.1 muestra el estado de las plantas en los días 3 y 20 posteriores a la aplicación del imazamox. El día en el que se realizó el muestreo las plantas no mostraron diferencias notables en el crecimiento. Las hojas más jóvenes de las plantas tratadas con herbicida presentaron cierta clorosis característica del modo de acción de este herbicida, siendo ligeramente menos notable en las plantas tratadas con la dosis de 1 mg l⁻¹. Transcurridos 20 días desde la aplicación de los tratamientos, las diferencias respecto de los controles sin tratar fueron muy evidentes, pero en ninguno de los casos todas las plantas llegaron a morir. La dosis más alta fue la que consiguió inhibir el crecimiento completo de las plantas y, en algún caso, hasta producir la muerte de algún individuo.

En este experimento previo se tomaron muestras de raíces y hojas a los 3 días desde la aplicación de los tratamientos. Se determinó la concentración de aminoácidos libres, proteína soluble, carbohidratos y las actividades enzimáticas de fermentación etanólica. A lo largo de este apartado se muestran las gráficas para cada parámetro, donde se representan los valores medios obtenidos, a día 3, referidos a las tres dosis de herbicida aplicadas y comparándolos siempre con los valores medios de las plantas que no han sido tratadas (control).

Respecto al contenido de *aminoácidos libres* (Fig. 4.1), sí que se vio un claro efecto del herbicida tanto en raíces como en hojas. En ambos casos aumentaron considerablemente respecto de las plantas control, no estableciéndose grandes diferencias entre las tres dosis aplicadas, pero alcanzándose la mayor acumulación con la dosis 1,5 mg l⁻¹. La concentración de aminoácidos libres en las hojas duplicó a la determinada en las raíces en todos los casos.

Resultados y discusión

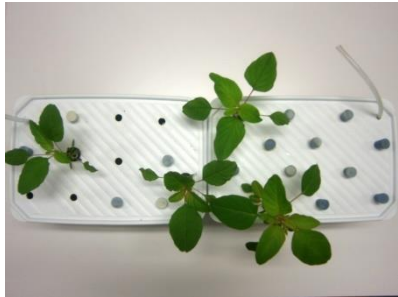







	CONTROL	Imazamox (0,8 mg l ⁻¹)	Imazamox (1 mg l ⁻¹)	Imazamox (1,5 mg l ⁻¹)
día 3				
día 20				

Tabla 4.1. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de *imazamox* sobre el crecimiento de plantas de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible) a los 3 y 20 días de tratamiento.

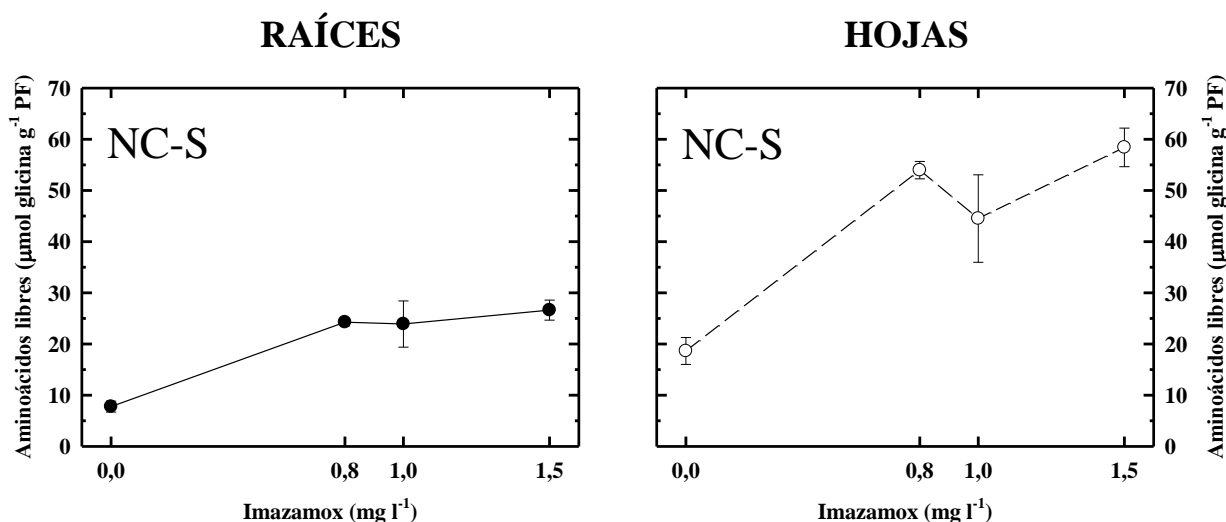


Figura 4.1. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de *imazamox* sobre el contenido de aminoácidos libres en raíces y hojas de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible) a los 3 días de tratamiento.

La concentración de proteína soluble en raíces de las plantas tratadas no presentó importantes modificaciones (Fig. 4.2). Se ha descrito un incremento en el contenido de aminoácidos libres correlativo con un descenso de proteína soluble en otras especies también, como maíz (*Zea mays*) y guisante (*Pisum sativum*) tratadas con herbicidas IBAR (Anderson y Hibberd, 1985a; Shaner y Reider, 1986; Zabalza *et al.* 2006). Se ha propuesto que la degradación de las proteínas a sus correspondientes aminoácidos aumenta los niveles de aminoácidos libres y disminuye la cantidad de proteína soluble; lo que permite mantener, en cierto modo, niveles de aminoácidos ramificados normales (Royuela *et al.*, 1991; Wittenbach y Abell, 1999). De hecho, se ha demostrado que los niveles inhibidores de ALS prácticamente anulan la síntesis *de novo* de proteínas (Zabalza *et al.*, 2006), por lo que la síntesis proteica en las plantas tratadas con herbicidas IBAR podría ser realizada mediante la utilización de aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas ya existentes.

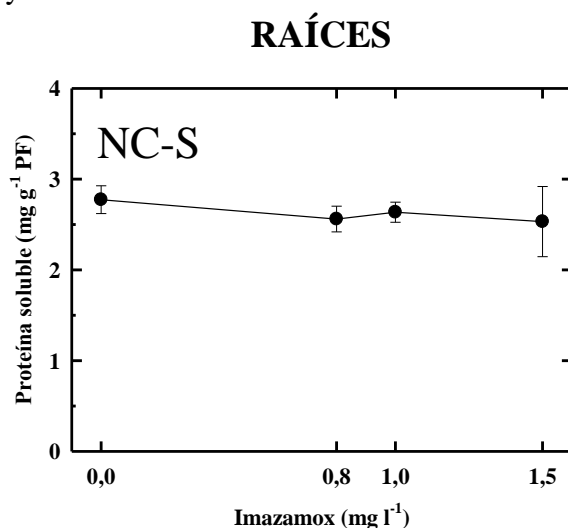


Figura 4.2. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de *imazamox* sobre el contenido de proteína soluble en raíces de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible) a los 3 días de tratamiento.

Los tratamientos con imazamox provocaron una acumulación de carbohidratos solubles en las plantas de *A. palmeri* (Fig. 4.3), no obstante dicho incremento en el contenido de azúcares resultó más evidente en las hojas que en las raíces.

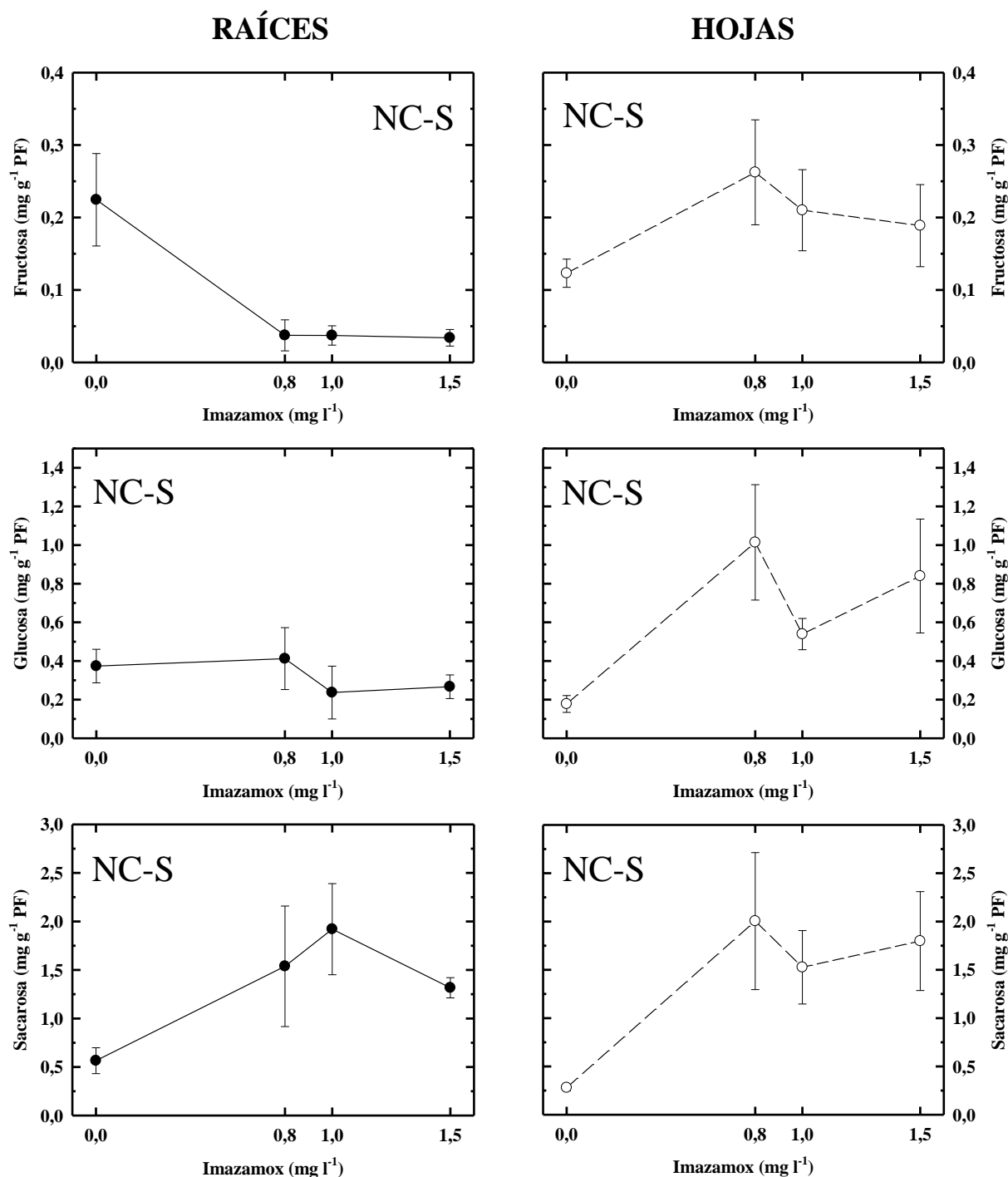


Figura 4.3. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de *imazamox* sobre los contenidos de fructosa, glucosa y sacarosa en raíces y hojas de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible) a los 3 días de tratamiento.

La variación de la concentración de *fructosa* en las raíces presenta un patrón de comportamiento diferente al de las hojas. En el primer caso, todos los tratamientos provocaron un descenso notable de este metabolito hasta valores situados, prácticamente, en el umbral de detección. Por el contrario, la concentración de fructosa en las hojas aumentó ligeramente con las tres dosis de herbicida, detectándose la mayor acumulación con la dosis más baja de imazamox. Si bien, el rango de valores oscila en 0,2 mg g⁻¹ PF, estas variaciones son consideradas muy pequeñas.

La concentración de *glucosa* en las raíces se mantuvo, respecto a las plantas control, con la dosis más baja de herbicida y disminuyó ligeramente con las otras dos dosis. En las hojas la *glucosa* aumentó en todos los casos, estableciéndose la mayor acumulación con la dosis más baja de imazamox, al igual que en el caso de la *fructosa*.

La aplicación de imazamox provocó un incremento acusado en el contenido de *sacarosa*, tanto en las raíces como en las hojas. El nivel máximo de este carbohidrato en raíces se alcanzó con la dosis de 1 mg l^{-1} , mientras que en las hojas siguió un patrón idéntico al de la *glucosa* y estableció la mayor acumulación con la dosis de $0,8 \text{ mg l}^{-1}$. No obstante, como se ha comentado anteriormente, la oscilación entre los valores obtenidos en las plantas tratadas con herbicida es muy pequeña.

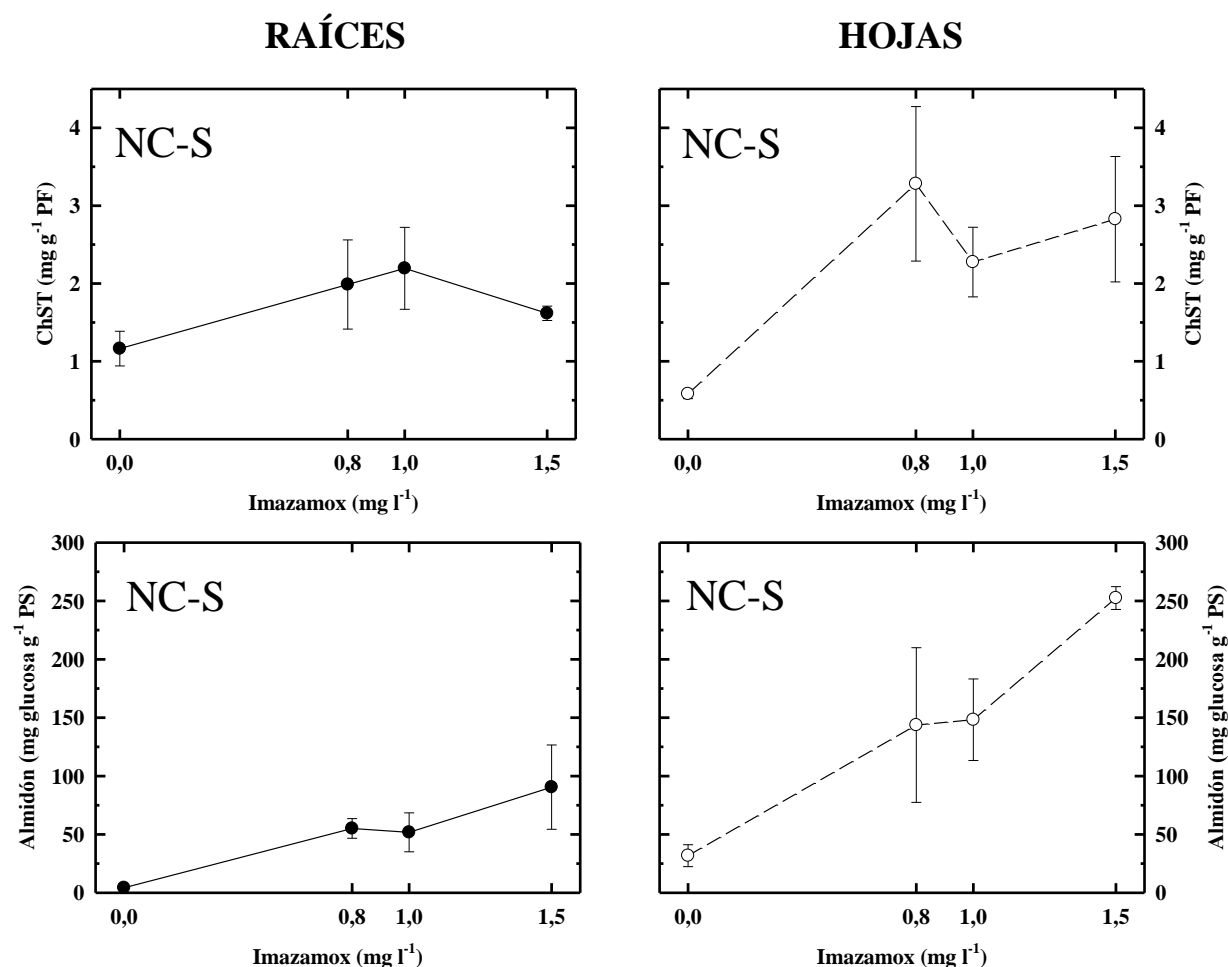


Figura 4.4. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de *imazamox* sobre los contenidos de carbohidratos solubles totales (ChST=fructosa+glucosa+sacarosa) y almidón en raíces y hojas de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible) a los 3 días de tratamiento.

Si nos referimos al conjunto de los *carbohidratos solubles*, el patrón que se observó fue similar al de la *sacarosa* en ambos casos. Se apreció un incremento destacado del contenido de azúcares debido al efecto del herbicida, necesiéndose una dosis mayor en el caso de las raíces que en el caso de las hojas para alcanzar el nivel máximo de acumulación. No obstante, si nos referimos al contenido de *almidón* sí que el efecto del imazamox se hizo más evidente, al mostrarse una acumulación progresiva en función de la dosis aplicada. En este caso el nivel máximo de acumulación se detectó con la dosis de $1,5 \text{ mg l}^{-1}$, tanto en raíces como en hojas.

La acumulación de carbohidratos en las raíces y hojas de *A. palmeri* provocada por el herbicida imazamox continua en la misma línea que otros herbicidas de su mismo grupo, ya que este efecto fisiológico ha sido ampliamente descrito para los inhibidores de ALS (Wittenbach y Abell, 1999; Gastón *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2004) y es independiente del lugar de aplicación del tratamiento herbicida (Zabalza *et al.*, 2004; Armendariz, 2011). Las alteraciones metabólicas que se desencadenan en los órganos sumideros de las plantas tratadas (raíces) impiden el crecimiento de las mismas mediante el uso de los carbohidratos disponibles. Al no usarse los carbohidratos, se llegan a acumular en las raíces. En consecuencia se originaría una falta de demanda de fotosintetizados de los sumideros provocaría la inhibición del transporte de carbohidratos por el floema, que acabarían acumulándose en las hojas (Gastón *et al.* 2002; Zabalza *et al.*, 2004).

En el caso de las actividades enzimáticas fermentativas determinadas *in vitro* (Fig. 4.5), las raíces de las plantas tratadas con imazamox experimentaron un ligero aumento de esta actividad enzimática. Si bien, en el caso de la enzima *piruvato descarboxilasa* (PDC) dicho incremento, prácticamente, no se observó, en el caso de la *alcohol deshidrogenasa* (ADH) sí que se advirtió un aumento progresivo en relación a la dosis herbicida, siendo máxima la actividad con la dosis de 1,5 mg l⁻¹.

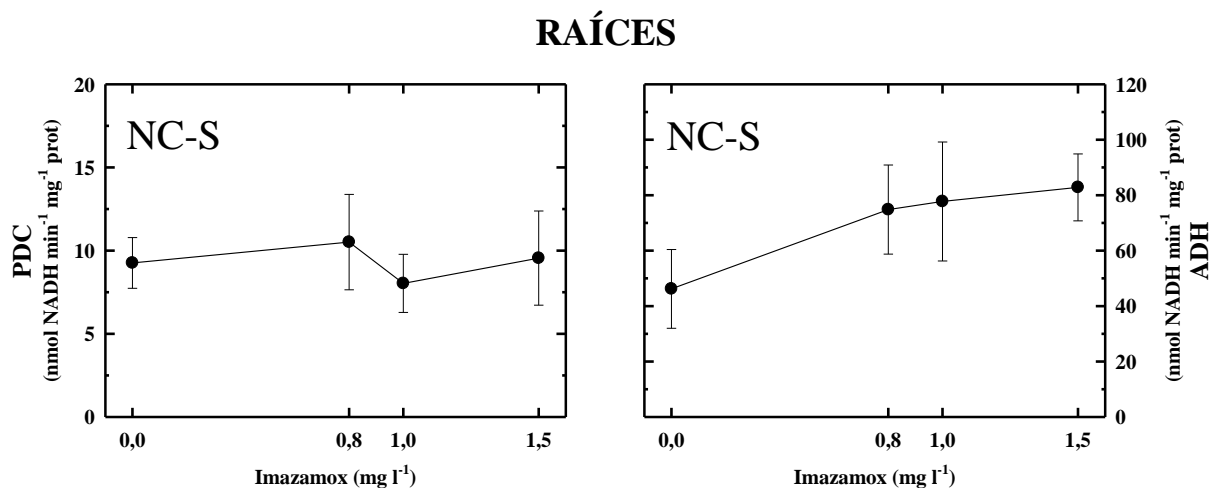


Figura 4.5. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de *imazamox* sobre las actividades enzimáticas específicas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH) en raíces de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible) a los 3 días de tratamiento.

No se llevó a cabo la determinación de estos parámetros en la parte aérea, puesto que en investigaciones llevadas a cabo con anterioridad no se detectaron actividades fermentativas en hojas, ni en plantas control ni tratadas con herbicidas (Gastón *et al.* 2003; Orcaray, 2008; Armendariz, 2011).

A pesar de que la inducción de la actividad de la enzima fermentativa PDC no se pudo observar, como tal, sí que se puede decir que el tratamiento con imazamox indujo la actividad enzimática fermentativa en raíces de *A. palmeri*, resultados que concuerdan con el hecho descrito anteriormente de que los inhibidores de ALS inducen la fermentación en condiciones de aerobiosis (Zabalza *et al.*, 2005).

Por causas que se desconocen o debido al error experimental, las plantas tratadas con la dosis de 1 mg l^{-1} parecieron sobreponerse, de alguna manera, al efecto del herbicida, hecho que se manifiesta en el aspecto visual de las plantas a los 20 días de tratamiento y en algunos de los resultados de los parámetros analizados anteriormente.

Una vez examinados los parámetros y con ayuda del análisis visual de las plantas, se determinó la dosis de imazamox para una posterior aplicación conjunta con glifosato en $1,5 \text{ mg l}^{-1}$, aplicados a través de la solución nutritiva. La caracterización fisiológica llevada a cabo en el biotipo sensible (NC-S) de *A. palmeri*, permitió comprobar que esta especie muestra los efectos fisiológicos característicos descritos en otras especies como *guisante* (Zabalza *et al.*, 2004; Zabalza *et al.*, 2005; Zulet *et al.*, 2013), *Sinapis alba* (Zulet¹, 2013) y *Arabidopsis thaliana* (Zulet², 2013). Asimismo, estas plantas presentan una serie de efectos fisiológicos comunes a otras plantas tratadas con glifosato (Crespo, 2013), validándose también en esta especie de mala hierba la hipótesis de que a pesar de tener dianas diferentes, ambos herbicidas provocan la muerte por un mecanismo similar y justificándose así la necesidad de un estudio fisiológicos de la aplicación conjunta.

4.2. ENSAYO DE APLICACIÓN CONJUNTA: GLIFOSATO E IMAZAMOX

Una vez establecida la dosis de imazamox, se evaluaron los efectos que provocaron estos dos herbicidas, por separado y aplicados de manera conjunta, sobre algunos de los efectos fisiológicos comunes de su modo de acción. En esta ocasión se realizó el estudio tanto en plantas del biotipo sensible (NC-S), como del biotipo resistente (NC-R). Las dosis aplicadas de glifosato se decidieron en base a estudios previos realizados en plantas de *A. palmeri*, siendo la dosis recomendada para su control, en poblaciones sensibles, de 0,8 kg ha⁻¹ de glifosato (Culpepper *et al.*, 2006; Crespo, 2013). Así, se decidió aplicar dicha dosis vía foliar, que es 1,6 g l⁻¹ (en función del volumen de caldo), lo que supondría una concentración de herbicida por debajo de la dosis letal para las plantas resistentes. También se aplicó una dosis cuatro veces inferior (0,4 g l⁻¹), que permitió observar de igual manera que la anterior, los efectos fisiológicos característicos del glifosato en las plantas sensibles. De esta forma se evaluó la existencia de sinergia, antagonismo o efecto neutro tras la aplicación conjunta de glifosato e imazamox, y se profundizó en su modo de acción, con el fin de determinar la conveniencia de esta aplicación.

Al igual que en el ensayo previo, en este experimento se tomaron muestras de raíces y hojas a los 3 días desde la aplicación de los tratamientos. Se determinó el contenido de siquimato, la concentración de aminoácidos libres y proteína soluble, y las actividades enzimáticas de fermentación etanólica.





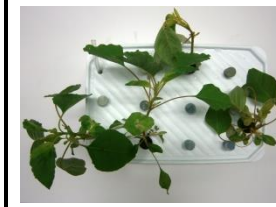







También se realizó un seguimiento visual del estado de las plantas para determinar en qué grado afectaban los tratamientos al crecimiento en el momento del muestreo y la evolución de los efectos largo plazo, tal y como se puede observar en la Tabla 4.2.

En el momento del muestreo las plantas de la población sensible tratadas con herbicida presentan una sintomatología con diferente intensidad. Las plantas tratadas únicamente con imazamox muestran una incipiente aparición de clorosis en las hojas más jóvenes. En el caso de las plantas tratadas solamente con glifosato se presentan los mismos síntomas, ligeramente más evidentes cuanto mayor es la dosis. En cambio, el efecto se intensifica en las plantas en las que los herbicidas se han aplicado de manera conjunta, resultando más agresiva la combinación con la dosis más alta de glifosato.

En ese mismo momento, las plantas de la población resistente presentan un aspecto más vigoroso. Las plantas control y las tratadas únicamente con glifosato no presentan síntomas, mientras que el resto de plantas presentan cierto amarilleamiento en las hojas más jóvenes, igual que el causado en las plantas de la población sensible tratadas solo con imazamox.

Transcurridos 20 días desde la aplicación de los herbicidas, las diferencias entre los distintos tratamientos son muy representativas. En la población sensible todos los tratamientos han provocado la parada del crecimiento y la mortalidad de las plantas. Mientras que, de forma aparente, el efecto menos agresivo fue percibido en las plantas tratadas solo con imazamox, el más agresivo fue el correspondiente a la aplicación conjunta con la dosis más alta de glifosato, presentando un aspecto muy similar al de su correspondiente aplicación aislada de glifosato.

En el caso de la población resistente, se pudo observar con claridad el efecto de la resistencia a glifosato, ya que tanto las plantas control como las plantas tratadas únicamente con glifosato no vieron obstaculizado su desarrollo. El resto de plantas presentaban idéntica sintomatología, lo que sugiere que el efecto de la letalidad fue únicamente debida al imazamox.

DÍA 3	C	G1	G2	I	G1+I	G2+I
NC-S						
NC-R						













DÍA 20	C	G1	G2	I	G1+I	G2+I
NC-S						
NC-R						

Tabla 4.2. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento de plantas de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible y NC-R: biotipo resistente) a los 3 y 20 días de tratamiento. C: Control; G1: Glifosato 0,4 g l⁻¹; G2: Glifosato 1,6 g l⁻¹; I: Imazamox 1,5 mg l⁻¹; G1+I: aplicación conjunta; G2+I: aplicación conjunta.

4.2.1. Contenido de siquimato en hojas

El siquimato es el compuesto que da nombre a la ruta donde se localiza la enzima EPSPS, que es la enzima inhibida por el herbicida glifosato. Como consecuencia de ello se produce una gran acumulación de siquimato en las hojas (Lydon y Duke, 1988; Becerril *et al.*, 1989; Hernández *et al.*, 1999; Orcaray *et al.*, 2010, 2012; Crespo, 2013). La acumulación de siquimato tras el tratamiento con glifosato podría deberse a una pérdida de la capacidad de regulación negativa de la vía del siquimato por uno o varios compuestos posteriores a la EPSPS, que regulan la actividad de la DAHPS. La falta de regulación de la DAHPS podría provocar un aumento del flujo de entrada a la ruta del siquimato provocando una acumulación de compuestos intermedios anteriores a la enzima bloqueada EPSPS, principalmente ácido siquímico (Jensen, 1986).

Así pues, este efecto es característico del modo de acción de los inhibidores de EPSPS y no de los inhibidores de ALS, por lo que, *a priori*, no resulta un parámetro eficaz para evaluar el efecto de la aplicación conjunta de estos dos herbicidas. En cambio, sí que resulta un parámetro verdaderamente útil a la hora de detectar y cuantificar la resistencia de malas hierbas a glifosato. La relación entre la aplicación de glifosato y la acumulación de siquimato es muy consistente y establece cierto paralelismo, ya que una baja o nula acumulación de este metabolito pondría de manifiesto, en mayor o menor medida, la resistencia a ese herbicida (Shaner *et al.*, 2005; Crespo, 2013).

HOJAS

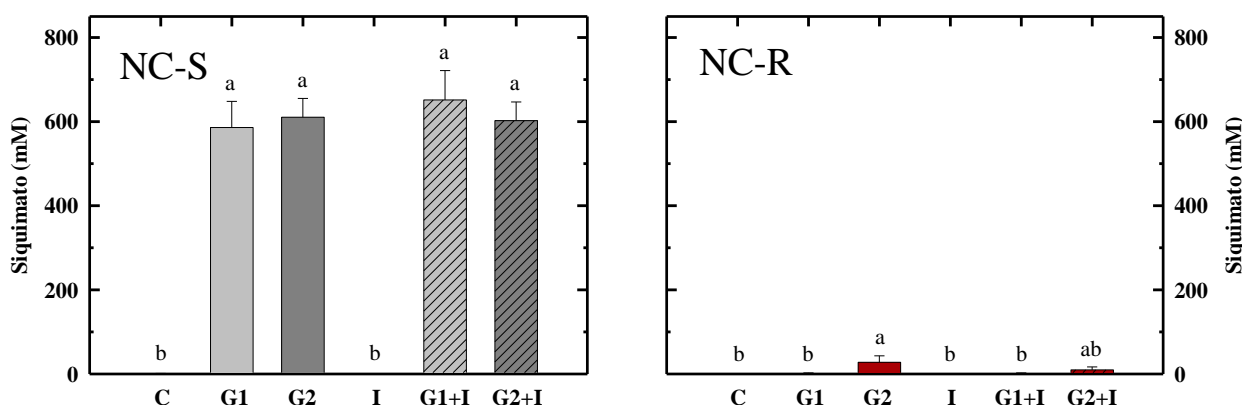


Figura 4.6. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el contenido de siquimato en hojas de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible y NC-R: biotipo resistente) a los 3 días de tratamiento. C: Control; G1: Glifosato 0,4 g l⁻¹; G2: Glifosato 1,6 g l⁻¹; I: Imazamox 1,5 mg l⁻¹; G1+I: aplicación conjunta; G2+I: aplicación conjunta. Los valores representan la media ± error estándar (n=4). Las diferentes letras indican diferencias significativas (P ≤ 0,05) entre los tratamientos.

En cuanto a los resultados del experimento llevado a cabo, se pudo observar claramente como la acumulación de siquimato solamente se produjo en las plantas de la población sensible tratadas con glifosato. Se evidenció un efecto nulo del imazamox y el resultado de las aplicaciones conjuntas fue idéntico al de las aplicaciones individuales. En la población resistente la acumulación de siquimato fue prácticamente inexistente. Tan solo se percibió un incremento muy pequeño en las plantas tratadas con la dosis más alta de glifosato (G2) y en la aplicación conjunta de esta misma dosis (G2+I). No obstante, en este segundo caso, el aumento de siquimato todavía resultó ser inferior.

4.2.2. Contenido de aminoácidos libres en hojas y raíces

Como se ha comentado anteriormente, se ha propuesto que la degradación de las proteínas a sus correspondientes aminoácidos aumenta los niveles de aminoácidos libres y disminuye la cantidad de proteína soluble. Por ello, se determinó la concentración total de estos aminoácidos en hojas y raíces de plantas controles y tratadas con herbicida (Fig. 4.7).

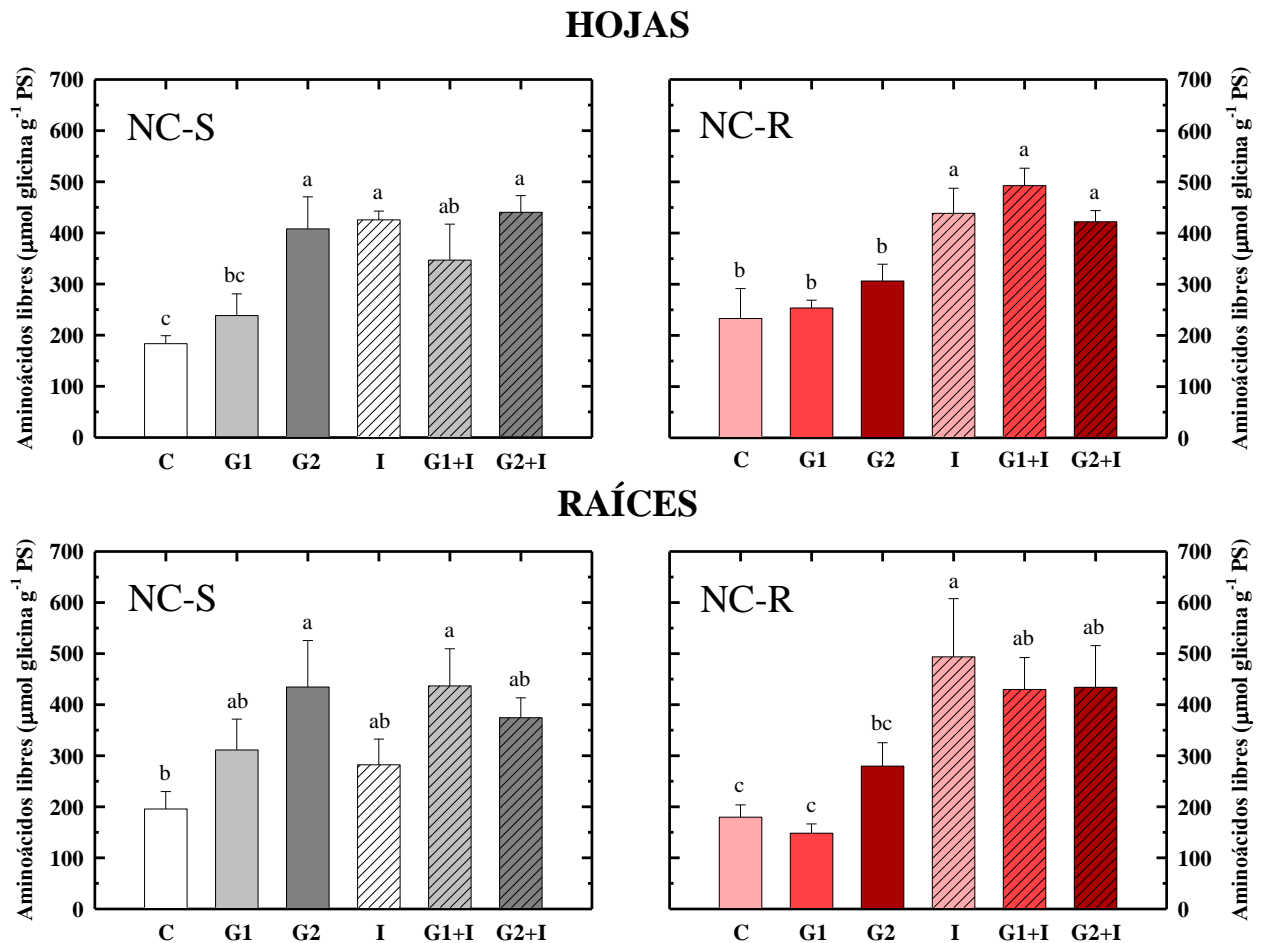


Figura 4.7. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el contenido de aminoácidos libres en hojas y raíces de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible y NC-R: biotipo resistente) a los 3 días de tratamiento. C: Control; G1: Glifosato 0,4 g l⁻¹; G2: Glifosato 1,6 g l⁻¹; I: Imazamox 1,5 mg l⁻¹; G1+I: aplicación conjunta; G2+I: aplicación conjunta. Los valores representan la media ± error estándar (n=4). Las diferentes letras indican diferencias significativas (P<0,05) entre los tratamientos.

Después de analizar los resultados obtenidos en las hojas, el incremento de aminoácidos libres observado en las plantas de la población sensible fue significativo tras la aplicación de los herbicidas, salvo en el caso del tratamiento G1. Las aplicaciones combinadas mostraron un efecto muy similar al que se había detectado con el tratamiento por separado que más efecto había producido.

En el caso de la población resistente, únicamente mostraron una acumulación de aminoácidos libres significativa respecto de los controles no tratados, aquellas otras plantas a las que se les había aplicado imazamox, bien de forma individual o bien de manera conjunta con glifosato.

Resultados y discusión

Las raíces de las plantas de la población sensible a las que se le aplicó herbicida, experimentaron un incremento generalizado en el contenido de aminoácidos libres respecto de las plantas control. La acción de algunos de los tratamientos por separado no llegó a establecer diferencias significativas respecto de los controles sin tratar. Solo la dosis más alta de glifosato (G2) llegó a incrementar de una manera significativa el contenido de aminoácidos libres. Sin embargo, la aplicación conjunta con la dosis más baja de glifosato (G1+I) alcanzó los mismos resultados, pero no llegó a mostrar diferencias significativas con los efectos de los dos herbicidas aplicados por separado. La combinación de herbicidas con la dosis más alta de glifosato (G2+I) indujo un incremento de los aminoácidos muy similar al de la aplicación sola del glifosato (G2).

Las raíces de las plantas resistentes tratadas con imazamox y con la aplicación conjunta de ambos herbicidas son las que mostraron diferencias significativas, respecto de las plantas control.

4.2.3. Contenido de proteína soluble en raíces

El efecto de los herbicidas sobre el contenido de proteína soluble en las raíces de las plantas sensibles, se observa en la siguiente figura.

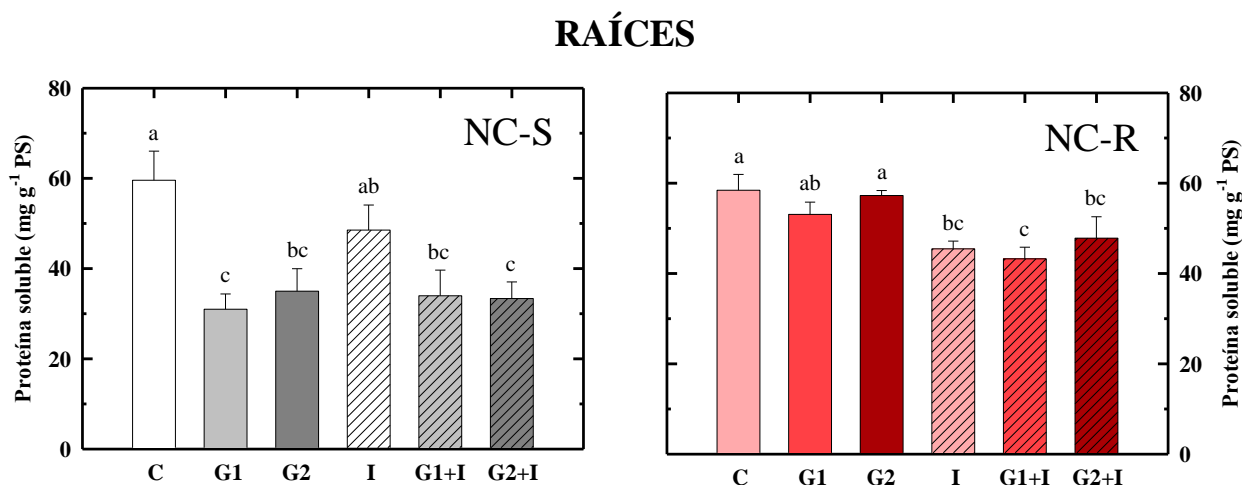


Figura 4.8. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el contenido de proteína soluble en raíces de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible y NC-R: biotipo resistente) a los 3 días de tratamiento. C: Control; G1: Glifosato 0,4 g l⁻¹; G2: Glifosato 1,6 g l⁻¹; I: Imazamox 1,5 mg l⁻¹; G1+I: aplicación conjunta; G2+I: aplicación conjunta. Los valores representan la media \pm error estándar (n=4). Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos.

Tal y como se había detectado en el experimento donde se aplicó imazamox de manera aislada, el contenido de proteína soluble no se vio modificado cuando este herbicida se aplicó de manera aislada en plantas de la población sensible. Las dos dosis aplicadas de glifosato sí que provocaron un descenso significativo de este parámetro. En el caso de las aplicaciones conjuntas, el contenido fue muy similar a la dosis correspondiente de glifosato aplicado de manera aislada. Las dos aplicaciones conjuntas muestran idénticos resultados, entre sí. Si hablamos de la población resistente, el efecto de los herbicidas aplicados por separado fue diferente al de la población sensible. Las dos dosis aplicadas de glifosato de manera aislada no provocaron un descenso significativo de este parámetro, en cambio la de imazamox sí que lo hizo. Las aplicaciones conjuntas también muestran diferencias significativas respecto de sus respectivas dosis de glifosato aplicadas de manera aislada, no así respecto de la de imazamox.

4.2.4. Actividades enzimáticas fermentativas en raíces

Se evaluaron *in vitro* las actividades PDC y ADH en plantas control, en plantas tratadas con imazamox, en plantas tratadas con dos dosis de glifosato y en plantas a las que se aplicó una combinación de los dos herbicidas. Los tratamientos fueron los mismos en ambas poblaciones de malas hierbas (Fig. 4.9). La PDC utiliza el piruvato como sustrato mientras que la ADH utiliza como sustrato el acetaldehído, producto de la reacción catalizada por la PDC.

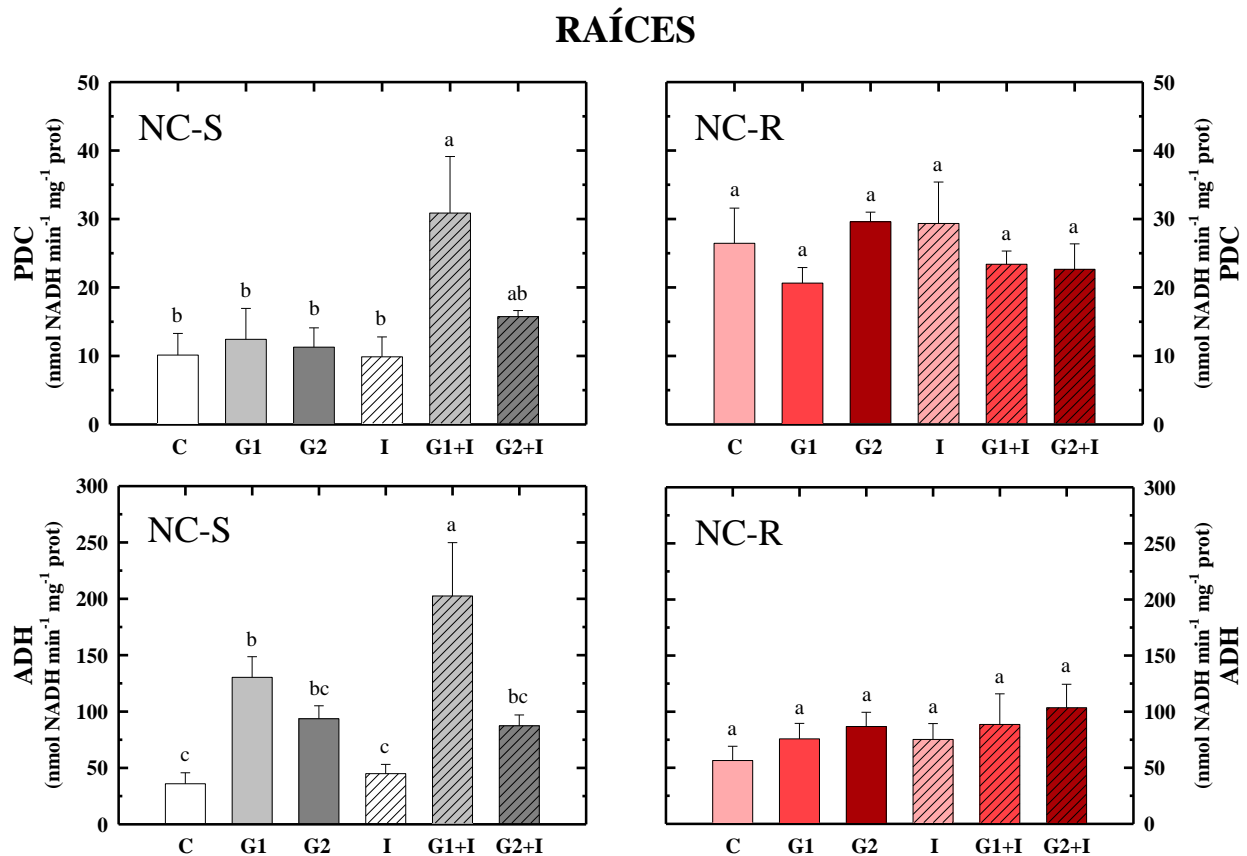


Figura 4.9. Efecto de los diferentes tratamientos sobre las actividades enzimáticas específicas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH) en raíces de *A. palmeri* (NC-S: biotipo sensible y NC-R: biotipo resistente) a los 3 días de tratamiento. C: Control; G1: Glifosato 0,4 g l⁻¹; G2: Glifosato 1,6 g l⁻¹; I: Imazamox 1,5 mg l⁻¹; G1+I: aplicación conjunta; G2+I: aplicación conjunta. Los valores representan la media ± error estándar (n=4). Las diferentes letras indican diferencias significativas (P<0,05) entre los tratamientos.

Las raíces de las plantas de la población sensible no vieron incrementada la actividad PDC con ninguno de los tratamientos aplicados por separado. No obstante, sí que se observó un aumento de esta actividad tras la aplicación conjunta de los dos herbicidas. Este aumento se hizo más notorio tras la combinación de imazamox con la dosis más baja de glifosato (G1+I), estableciéndose diferencias significativas con el resto de tratamientos. Respecto a la población resistente, ninguno de los tratamientos consiguió aumentar la actividad de este enzima.

En el caso de la ADH sí se observó una inducción de la actividad de este enzima con la aplicación, por separado, de la dosis más baja de glifosato (G1) en plantas de la población sensible. En cambio, no fue así con la de imazamox. En cuanto a las plantas tratadas con ambos herbicidas, al igual que en el caso de la PDC, también se observó un aumento de esta actividad, siendo el más significativo el de la combinación de imazamox con la dosis más baja de glifosato (G1+I). En las raíces de las plantas resistentes a glifosato no se indujo la actividad ADH en ningún caso.

4.3. DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de este trabajo se ha valorado el efecto de la aplicación conjunta de dos herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos con distinto mecanismo de acción: imazamox (IBAR) y glifosato (IBAA); llevándose a cabo en un biotipo de *A. palmeri* sensible y en otro resistente a glifosato. Para ello, se estudiaron una serie de parámetros fisiológicos que caracterizan de forma común el modo de acción de estos herbicidas. Dichos parámetros se eligieron por ser biomarcadores muy sensibles, a corto plazo, de los efectos de dichos herbicidas.

Después de un experimento previo se determinó la dosis de imazamox que se emplearía posteriormente en combinación con dos dosis de glifosato. Los resultados mantuvieron una buena reproducibilidad en relación con ensayos precedentes. Asimismo, los efectos comunes ya descritos de estos inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos en otras especies se repitieron en *A. palmeri*.

Aunque el contenido de siquimato en hojas no resultó un parámetro eficaz para evaluar el efecto de la aplicación conjunta de estos dos herbicidas, sí que resultó verdaderamente útil para confirmar la identidad del biotipo resistente y el diferente mecanismo de acción de los dos inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos.

Las interacciones entre dos herbicidas pueden ser *aditivas* (también llamadas *neutras*), *sinérgicas* o *antagónicas*. Una interacción se define como neutra cuando hay un efecto aditivo por la combinación de compuestos. Cada herbicida trabaja independientemente y el efecto neto es el mismo que la suma de cada herbicida aplicado por separado. En el caso de que el efecto neto sea mayor que la suma de los efectos independientes se dice que hay sinergia. Por el contrario, si el efecto neto es menor que la suma de los efectos aislados se dice que hay antagonismo (Colby, 1967). El punto crucial de estas definiciones es determinar cuál será la respuesta esperada con una relación neutra, para así poder valorar si la respuesta observada es mayor o menor al mismo.

Colby (1967) desarrolló una aproximación matemática para valorar la relación entre la respuesta esperada y la respuesta observada para mezclas de compuesto, y Flint (1988) propuso una adaptación al análisis de Colby. En este TFG se ha realizado la valoración de la aplicación conjunta de herbicidas siguiendo el análisis gráfico de Flint.

El análisis de Flint parte de los datos observados tras las aplicaciones de dos herbicidas A y B por separado, juntos (A,B), y comparando con un control no tratado (A0,B0). Se representan gráficamente los resultados obtenidos (en % control) para las plantas sin tratar (A0,B0), las plantas tratadas solo con un herbicida (Ax), tratadas con el otro herbicida (By) y tratadas con la mezcla (Ax,By). Se unen los puntos A0,B0 con el efecto de un herbicida solo (Ax) y el efecto aislado del otro herbicida (By) con el efecto de la mezcla (Ax,By). Se determina si existe paralelismo entre las dos líneas trazadas, en cuyo caso la relación será aditiva o neutra. En caso de que no sean paralelas, la relación será sinérgica o antagónica. La representación gráfica de dicha adaptación se muestra en la Fig. 4.10.

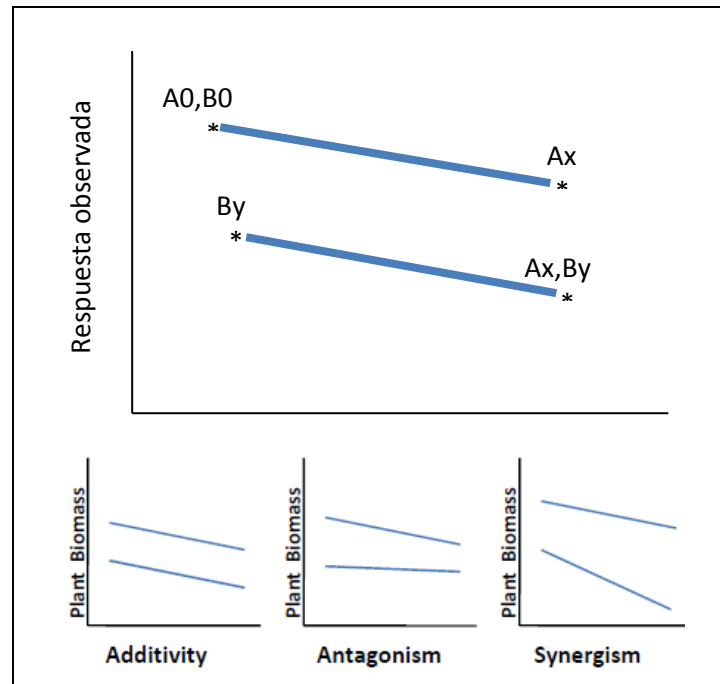


Figura 4.10. La adaptación de Flint (1988) utiliza la distancia vertical para ver si existe paralelismo.

En la siguiente tabla se recoge la respuesta de la población sensible de *A. palmeri* según cada uno de los parámetros analizados tras las aplicaciones individuales y conjuntas de los herbicidas. La valoración de estas respuestas por el método de Flint permite analizar si las aplicaciones conjuntas presentan sinergia o no una vez desarrollada dicha valoración gráfica (Anexo I).

Parámetro	G1	G2	I	G1+I	G2+I
	(% del control no tratado)				
Aminoácidos libres (hojas)	130	222	232	189 (A)	240 (A)
Aminoácidos libres (raíces)	159	222	144	223 (N)	191 (A)
Proteína soluble (raíces)	63	67	89	76 (A)	60 (N)
PDC (raíces)	123	111	98	305 (S)	155 (S)
ADH (raíces)	363	260	125	563 (S)	243 (A)

Tabla 4.3. Efecto de los tratamientos herbicidas Glifosato (G), Imazamox (I) y su aplicación conjunta (G+I) en cada uno de los parámetros expresado como % del control sin tratar. En cada caso se indica si la aplicación conjunta se considera neutra (N), sinérgica (S) o antagónica (A), siguiendo el análisis gráfico de Flint (1988).

Los resultados obtenidos para cada parámetro permiten concluir, que desde un punto de vista global, hay más efectos de tipo antagónico que de otro. No obstante, la aplicación conjunta con la dosis más baja (G1+I) muestra el mismo número de sinergias que de antagonismos, y un efecto neutro para un parámetro. En cambio, la aplicación conjunta con la dosis más alta (G2+I) muestra un mayor número de antagonismos que de sinergias.

Resultados y discusión

En la bibliografía existente no se ha podido encontrar un patrón claro en las mezclas o aplicaciones conjuntas de glifosato e inhibidores de ALS y se pueden hallar referencias contradictorias. Giménez *et al.* (1998) observaron los mismos efectos en el crecimiento de dos especies de malas hierbas aplicando glifosato aislado o mezclado con inhibidores de ALS (clorimuron e imazetapir). Así, se ha propuesto que las mezclas de glifosato con herbicidas IBAR no presentan antagonismo o sinergia, sino que se comportan según el modelo aditivo (Kudsk y Mathiassen, 2004). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que el efecto de la mezcla de glifosato con imazetapir varía en función de las especies vegetales evaluadas, pudiendo ser o bien antagónica o aditiva (Vidal *et al.*, 2010).

En la población sensible, la evaluación visual de la combinación G2+I evidenció un efecto aditivo. Sin embargo, este resultado debe ser considerado con cautela debido al poco número de individuos evaluados y a la alta variabilidad de tamaño entre ellos. Por otro lado, la evaluación de la interacción a nivel de parámetros fisiológicos ha resultado mayoritariamente antagónica. Tal y como se ha propuesto, parece que los herbicidas provocan la muerte por una serie de efectos fisiológicos similares, los cuales no aumentan al aplicarse los herbicidas conjuntamente, sino que únicamente alcanzan los valores del tratamiento aislado más agresivo. La interacción sería neutra o antagónica según se consideren los efectos visuales o fisiológicos, respectivamente. Debido a las limitaciones que presenta el análisis visual se considera más representativo el análisis fisiológico, que indica una interrelación antagónica.

En el caso del biotipo resistente las dosis de glifosato que se estimaron resultaron prácticamente inocuas, en cuanto a los efectos producidos por las aplicaciones aisladas. Esto determinó que el efecto que causaron las aplicaciones conjuntas se debiera, principalmente, a la acción del imazamox, tal y como se apoyó con el análisis visual de las plantas 20 días después. Así pues, no se ha realizado una evaluación detallada de la posible sinergia ya que se ha comprobado que el glifosato tiene efecto cero, es decir que el control que se realiza es con imazamox. Ya se había descrito que la mezcla de glifosato con otros herbicidas de post-emergencia o de efecto residual (entre ellos imazaquin e imazetapir, ambos inhibidores de ALS) podría ayudar a controlar la mayoría de las malas hierbas resistentes al glifosato en cultivos de soja tolerante al mismo (Knezević *et al.*, 2009). De hecho, en Argentina se está comercializando un producto, cuyo ingrediente activo es una mezcla de imazaquin y glifosato, cuyo nombre es ONESHOT® (BASF Argentina) para ser utilizado en pre-siembra o pre-emergencia de soja de primera siembra.

Sin embargo, el análisis fisiológico realizado en este trabajo para la población sensible indica que no tendría sentido aplicar de manera conjunta estos herbicidas, ya que el efecto neto observado es antagónico y contraviene los criterios de eficacia y sostenibilidad. Al no conseguir el efecto deseado, ni el uso menor de herbicidas, se está incrementando el coste del tratamiento y ejerciendo una mayor presión de selección sobre las malas hierbas, por lo que la probabilidad de aparición de nuevos casos de resistencia y de incrementar la contaminación del medio ambiente aumenta.

Conclusiones



5. CONCLUSIONES

1. Las plantas de *Amaranthus palmeri* tratadas con imazamox de manera aislada, mostraron los efectos fisiológicos característicos descritos en otras especies: acumulación de aminoácidos libres y carbohidratos en hojas y en raíces e inducción de las rutas fermentativas en raíces.
2. Únicamente las hojas de la población sensible mostraron acumulación de siquimato tras la aplicación de glifosato, y no así las de la población resistente, permitiendo confirmar la identidad de este segundo biotipo. La aplicación de imazamox no provocó ninguna alteración del contenido de siquimato.
3. El efecto que causaron las aplicaciones conjuntas en la población resistente se debió principalmente a la acción del imazamox, ya que el glifosato no tuvo efecto alguno. No se ha realizado una evaluación detallada de la interacción pero se ha podido comprobar la posibilidad del control de esta mala hierba resistente con el herbicida imazamox.
4. En la población sensible, la evaluación visual de la combinación de imazamox con la dosis alta de glifosato evidenció un efecto aditivo. La mayoría de los marcadores herbicidas evaluados presentaron antagonismo, si bien no es una respuesta unánime ya que se han detectado algún caso neutro y de sinergia en el caso de la actividad PDC.
5. De todas maneras, tomando como parámetro de decisión los marcadores fisiológicos, la aplicación conjunta de glifosato con herbicidas IBAR sería antagónica y no estaría justificada para el uso sobre poblaciones sensibles de *A. palmeri*, ya que los efectos fisiológicos detectados son muy similares a los que se observan con la aplicación individual del más agresivo de los dos tratamientos.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Abell LM. 1996.** Biochemical approaches to herbicide discovery: Advances in enzyme target identification and inhibitor design. *Weed Science* **44**: 734-742.
- Anderson PC y Hibberd KA. 1985a.** Evidence for the interaction of an imidazolinone herbicide with leucine, valine, and isoleucine metabolism. *Weed Science* **33**: 479-483.
- Armendariz O. 2011.** Efectos de la aplicación foliar o radical de herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos en el metabolismo del carbono. Mercedes Royuela y Ana Zabalza (dir.). Trabajo fin de máster. Universidad Pública de Navarra.
- Baerson SR, Rodríguez D, Tran M, Feng Y, Best N y Dill G. 2002.** Glyphosate-resistant goosegrass: identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3 phosphate synthase. *Plant Physiology* **129**: 1265-1275.
- Becerril JM, Duke SO y Lydon J. 1989.** Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry* **28**: 695-699.
- Beckie HJ, Harker KN, Hall LM, Warwick SI, Légère A, Sikkema PH, Clayton GW, Thomas AG, Leeson JY, Séguin-Swartz G y Simard M-J. 2006.** A decade of herbicide-resistant crops in Canada. *Canadian Journal of Plant Science* **86**: 1243-1264.
- Bestman HD, Devine MD y Vanden Born WH. 1990.** Herbicide chlorsulfuron decreases assimilate transport out of treated leaves of field pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seedlings. *Plant Physiology* **93**: 1441-1448.
- Blackshaw RE. 1998.** Postemergence weed control in pea (*Pisum sativum*) with imazamox. *Weed Technoogy* **12**: 64-68.
- Bouny JM y Saglio PH. 1996.** Glycolytic flux and hexokinase activities in anoxic maize root tips acclimated by hypoxic pretreatment. *Plant Physiology* **111**: 187-194.
- Bradford MM. 1976.** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Bukun B, Nissen SJ, Shaner DL y Vassios JD. 2012.** Imazamox Absorption, Translocation, and Metabolism in Red Lentil and Dry Bean. *Weed Science* **60**: 350-354.
- Castetter EF y Bell WH (Eds.). 1951.** *Yuman Indian Agriculture: Primitive Subsistence on the Lower Colorado and Gila Rivers*. Albuquerque, NM: University of New Mexico, pág. 200.
- Catizone P y Zanin G (Eds.). 2002.** *Malerbologia*. Bolonia, IT: Pàtron, pág. 925. ISBN 8855526243.
- Chandi A, Mila-Lewis SR, Giacomini D, Westra P, Preston C, Jordan DL, York AC, Burton JD y Whitaker JR. 2012.** Inheritance of Evolved Glyphosate Resistance in a North Carolina Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) Biotype. *International Journal of Agronomy*. Article ID 176108, 7 pages.
- Colby SR. 1967.** Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations. *Weeds* **15**: 20-22.

Bibliografía

- Cole DJ. 1985.** Mode of action of glyphosate - a literature analysis. En: *The Herbicide Glyphosate*. Eds. Grossbard E y Atkinson D. Londres, UK: LN Butterworths, pp 48-74. ISBN 0-408-11153-4
- CPRH. 2011.** Comité para la Prevención de Resistencias a Herbicidas. Sociedad Española de Malherbología [sitio web]. Valencia, ES: SEMh. [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://www.semh.net/descarga/resistencia-a-herbicidas/DipticoResistencias2011.pdf>
- Crespo A. 2013.** Caracterización fisiológica de *Amaranthus palmeri* resistente a glifosato. Ana Zabalza (dir.). Trabajo fin de carrera. Universidad Pública de Navarra.
- Culpepper AS, Grey TL, Vencill WK, Webster TM, Brown SM, Davis JW, Hanna WW. 2006.** Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Science* **54**: 620-626.
- Devine MD. 1989.** Phloem translocation of herbicides. *Reviews of Weed Science* **4**: 191-213.
- Devine M, Duke SO y Fedtke C. 1993b.** Secondary physiological effects of herbicides. En: *Physiology of herbicide action*. Eds. Devine M, Duke SO, Fedtke C. Englewoods Cliffs, NJ: PTR Prentice Hall, pp 333-355. ISBN 0-13-369067-9.
- Dill GM. 2005.** Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science* **61**: 219-224.
- Dill GM, Cajacob CA y Padgett SR. 2008.** Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Management Science* **331**: 326-331.
- Duke, SO. 2011.** Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 5835-5841.
- Duke, SO. 2012.** Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest Management Science* **68**: 505-512.
- Duke SO y Powles SB. 2008a.** Glyphosate-Resistant Weeds and Crops. *Pest Management Science* **64**: 317-318.
- Duke SO y Powles SB. 2008b.** Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* **64**: 319-325.
- Ehleringer J. 1983.** Ecophysiology of *Amaranthus palmeri*, a Sonoran desert summer annual. *Oecologia* **57**: 107-112.
- Flint JL, Cornelius PL y Barrett M. 1988.** Analyzing herbicide interactions: a statistical treatment of Colby's method. *Weed Technology* **2**: 304-309.
- Gaines TA, Shaner DL, Ward SM, Leach JE, Preston C y Westra P. 2011.** Mechanism of resistance of evolved glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 5886-5889.
- Gaines TA, Wright AA, Molin WT, Lorentz L, Riggins CW, Tranel PJ, Beffa R, Westra P y Powles SB. 2013.** Identification of Genetic Elements Associated with EPSPS Gene Amplification. *Plos One* **8**(6): e65819.doi:10.1371/journal.pone.0065819.

- García-Torres L y Fernández-Quintanilla C (Eds.). 1991.** *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. Madrid, ES: MAPA-SEA y Mundi-Prensa. ISBN: 84-7114-331-3
- Gastón S, Zabalza A, González EM, Arrese-Igor C, Aparicio-Tejo PM y Royuela M. 2002.** Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. *Physiologia Plantarum* **114**: 524-532.
- Gastón S, Ribas-Carbó M, Busquets S, Berry JA, Zabalza A y Royuela M. 2003.** Changes in mitochondrial electron partitioning in response to herbicides inhibiting branched chain amino acid biosynthesis in soybean. *Plant Physiology* **133**: 1351-1359.
- Gatford KL, Simpson RJ, Siever-Kelly C, Leury BJ, Dove H y Ciavarella TA. 1999.** Spray topping annual grass pasture with glyphosate to delay loss of feeding value during summer. I. Effects on pasture yield and nutritive value. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**: 453-464.
- Ge X, d'Avignon DA, Ackerman JJH, Sammons RD. 2010.** Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science* **66**: 345-348.
- Geiger DR, Kapitan SW y Tucci MA. 1986.** Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiology* **82**: 468-472.
- Giménez AE, York AC, Wilcut JW y Batts RG. 1998.** Annual Grass Control by Glyphosate plus Bentazon, Chlorimuron, Fomesafen, or Imazethapyr Mixtures. *Weed Technology* **12**: 134-136.
- Green JM. 1989.** Herbicide antagonism at the Whole Plant Level. *Weed Technology* **3**, **2**: 217-226.
- Gressel J. 2009.** Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest Management Science* **65**: 1164-73.
- Guyer D, Patton D y Ward E. 1995.** Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 4997-5000.
- Haderlie LC, Widholm JM y Slife FW. 1977.** Effect of glyphosate on carrot and tobacco cells. *Plant Physiology* **60**: 40-43.
- Haslam E (Ed.). 1993.** *Shikimate acid: metabolism and metabolites*. Chichester, UK: Wiley.
- Heap, I. 2014.** The International Survey of Herbicide Resistant Weeds [sitio web]. [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://www.weedscience.org>
- Hoagland DR y Arnon DI. 1950.** The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, CA: College of Agriculture, University of California, circular 347.
- Hofgen R, Laber B, Schuttke I, Klonus AK, Streber W y Pohlenz HD. 1995.** Repression of acetolactate synthase activity through antisense inhibition – Molecular analysis and biochemical analysis of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L Cv Desiree) plants. *Plant Physiology* **107**: 469-477.
- Hollander H y Amrhein N. 1980.** The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Physiology* **66**: 823-829.

Bibliografía

- Horak MJ y Loughin TM. 2000.** Growth analysis of four *Amaranthus* species. *Weed Science* **48**: 347-355.
- HRAC. 2014.** Herbicide Resistance Action Committee [sitio web]. [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://www.hracglobal.com>
- James C. 2006.** Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. *ISAAA Briefs* N° 35. ISAAA: Ithaca, NY.
- James C. 2011.** Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. *ISAAA Briefs* N° 43. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jasieniuk M. 1995.** Constraints on the evolution of glyphosate resistance in weeds. *Resistant Pest Management Newsletter* **7**: 31-32.
- Jasieniuk M, Ahmad R, Sherwood A, Firestone J, Perez-Jones A, Lanini WT, Mallory-Smith C y Stednick Z. 2008.** Glyphosate resistance in *Lolium multiflorum* of California: distribution, expression, and molecular evidence for an altered target enzyme. En: *International Weed Science Congress*, May 2008, IWSS/WWSA. Vancouver, CA: Proceedings, v.1, abstract No 58.
- Jensen RA. 1986.** The shikimate/arogenate pathway: Link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Plant physiology* **66**: 164-168.
- John CD y Greenway H. 1976.** Alcoholic fermentation and activity of some enzymes in rice roots under anaerobiosis. *Australian Journal of Plant Physiology* **3**: 225-236.
- Keeler SJ, Sanders P, Smith JK y Mazur BJ. 1993.** Regulation of tobacco acetolactate synthase gene-expression. *Plant Physiology* **102**: 1009-1018.
- Keeley PE, Carter CH y Thullen RJ. 1987.** Influence of planting date on growth of *Palmer amaranth* (*Amaranthus palmeri*). *Weed Science* **35**: 199-204.
- Kimmerer TW y Kozłowski TT. 1982.** Ethylene, ethane, acetaldehyde, and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiology* **69**: 840-847.
- Knezević SZ, Datta A, Scott J, Klein RN y Golus J. 2009.** Problem weed control in glyphosate-resistant soybean with glyphosate tank mixes and soil applied herbicides. *Weed Technoogy* **23**: 507-512.
- Koger CH, Shaner DL, Krutz LJ, Walker TW, Buehring N, Henry WB, Thomas WE y Wilcut JW. 2005b.** Rice (*Oryza sativa*) response to drift rates of glyphosate. *Pest Management Science* **61**: 1161-1167.
- Kudsk P y Mathiassen SK. 2004.** Joint action of amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. *Weed Research* **44**: 313-322.
- Labhili M, Joudrier P y Gautier MF. 1995.** Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Science* **112**: 219-230.
- Lydon J y Duke SO. 1999.** Inhibitors of glutamine biosynthesis. En: *Plant amino acids: Biochemistry and biotechnology*. Ed. Singh BK. Nueva York, NY: Marcel Dekker, pp 445-464. ISBN 0-8247-0204-2.

- MAGRAMA. 2014.** Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [sitio web]. Madrid, ES. [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es>
- MARM. 2011.** Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (España, 2008-2011) Madrid, ES: MAGRAMA [sitio web]. [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es>
- Mallory-Smith CA y Retzinger EJ. 2003.** Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technology* **17**: 605-619.
- McCourt JA y Duggleby RG. 2006.** Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids* **31**: 173-210.
- Menges RM. 1987.** Allelopathic effects of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and other plant residues in soil. *Weed Science* **35**: 339-347.
- Menges RM. 1988.** Allelopathic effects of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) on seedling growth. *Weed Science* **36**: 325-328.
- McRae JC. 1971.** Quantitative measurement of starch in very small amounts of leaf tissue. *Planta* **96**: 1110-1117.
- Mueller TC, Mitchell PD, Young BG y Culpepper AS. 2005.** Proactive versus reactive management of glyphosate-resistant or tolerant weeds. *Weed Technology* **19**: 924-933.
- Morgan T, Jackson P, McDonald L y Holtum J. 2007.** Chemical ripeners increase early season sugar content in a range of sugarcane varieties. *Australian Journal of Agricultural Research* **58**: 233-241.
- Nandula VK (Ed.). 2010.** *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*. Hoboken, NJ: Wiley. ISBN: 978-0-470-41031-8.
- Nelson K y Renner K. 1998.** Weed control in wide- and narrow-row soybean (*Glycine max*) with imazamox, imazethapyr, and CGA-277476 plus quizalofop. *Weed Technology* **12**: 137-144.
- Norsworthy JK, Ward SM, Shaw DR, Llewellyn RS, Nichols RL, Webster TM, Bradley KW, Frisvold G, Powles SB, Burgos NR, Witt WW y Barrett M. 2012.** Reducing the Risks of Herbicide Resistance: Best Management Practices and Recommendations. *Weed Science* **60**: 31-62.
- Orcaray L. 2008.** Fisiología de la letalidad en plantas inducida por herbicidas y su mimetización con compuestos naturales. Mercedes Royuela y Ana Zabalza (dir.). Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra.
- Orcaray L, Igal M, Marino D, Zabalza A y Royuela M. 2010.** The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science* **66**: 262-269.
- Orcaray L, Igal M, Zabalza A y Royuela M. 2011.** Role of exogenously supplied ferulic and p-coumaric acids in mimicking the mode of action of acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 10162-10168.

Bibliografía

- Orcaray L, Zulet A, Zabalza A y Royuela M. 2012.** Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *Journal of Plant Physiology* **169**: 27-33.
- Orson JH. 1999.** The cost to the farmer of herbicide resistance. *Weed Technology* **13**: 607-611.
- Owen MD. 1997.** Risks and benefits of weed management technologies. En: *Weed and Crop Resistance to herbicides*. Eds. De Prado R, Jorin J y García-Torres L. Dordrecht, NL: Kluwer, pp 291-297. ISBN 0-7923-4581-9.
- Perata P y Alpi A. 1993.** Plant responses to anaerobiosis. *Plant Science* **93**: 1-17.
- Powles S. 2008.** Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Management Science* **64**: 360-365.
- Powles SB y Preston C. 2006.** Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technology* **20**: 282-289.
- Powles SB y Yu Q. 2010.** Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annual Reviews in Plant Biology* **61**: 317-47.
- PPDB. 2014.** Pesticide Properties Database [sitio web]. Hatfield: University of Hertfordshire. [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>
- Ray TB. 1989.** Herbicides as inhibitors of amino acid biosynthesis. En: *Target sites of herbicide action*. Eds. Böger P y Sandman G. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 106-125. ISBN: 0-8493-4985-0.
- Recasens J. 2010.** *Amaranthus palmeri*, ¿una nueva amenaza?. Boletín de la SEMh **62**: 11.
- Ribeiro DN, Pan Z, Duke SO, Nandula VK, Baldwin BS, Shaw DR y Dayan FE. 2014.** Involvement of facultative apomixis in inheritance of *EPSPS* gene amplification in glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri*. *Planta* **239**: 199-212.
- Rhodes D, Hogan AL, Deal L, Jamieson GC y Haworth P. 1987.** Amino-acid metabolism of *Lemna minor* L. 2. Responses to chlorsulfuron. *Plant Physiology* **84**: 775-780.
- Royuela M, Arrese-Igor C, Muñoz-Rueda A y González-Murua C. 1991.** *In vitro* and *in vivo* effects of chlorsulfuron in sensitive and tolerant plants. *Journal of Plant Physiology* **139**: 235-239.
- Ryan G. 1970.** Resistance of common groundsel to simazina and atrazine. *Weed Science* **18**: 614-616.
- Sans FX y Fernández-Quintilla C (Eds.). 1997.** *Biología de las malas hierbas de España*. Valencia, ES: Phytoma España y SEMh. ISBN 8492191023.
- Sauer JD (Ed.). 1988.** *Plant migration: The dynamics of geographic patterning in seed plant species*. Berkeley - Los Angeles, CA: University of California, pág. 282. ISBN 0-520-06003-2
- Sawada Y, Nagai Y, Ueyama M y Yamamoto Y. 1988.** Probable toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate. *The Lancet* **331**: 299-299.

- Schmid J y Amrhein N. 1999.** The shikimate pathway. En: *Plant amino acids: Biochemistry and biotechnology*. Ed. Singh BK. Nueva York, NY: Marcel Dekker, pp 147-170. ISBN 0-8247-0204-2.
- Shaner DL. 1991.** Physiological effects of the imidazolinone herbicides. En: *The imidazolinone herbicides*. Eds. Shaner DL, O'Connor SL. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 129-138. ISBN 0-8493-5763-2.
- Shaner DL, Nadler-Hassar T, Henry WB y Koger CH. 2005.** A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science* **53**: 769-774.
- Shaner DL, Lindenmeyer RB y Ostlie MH. 2012.** What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us?. *Pest Management Science* **68**: 3-9.
- Shaner DL y Reider ML. 1986.** Physiological responses of corn (*Zea mays*) to Ac 243, 997 in combination with valine, leucine and isoleucine. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **25**: 248-257.
- Shaner DL y Robson P. 1985.** Absorption, translocation and metabolism of AC 252 214 in soybean (*Glycine max*), common cocklebur (*Xanthium strumarium*), and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Science* **33**: 469-471.
- Singh BK, Stidham MA y Shaner DL. 1990.** Imidazolinones and acetohydroxyacid synthase from plants. En: *Biosynthesis of branched chain amino acids*. Eds. Barak Z, Chipman DM, Schloss JV. Nueva York, NY: VCH Publishers, pp 357-372. ISBN 0-89573-961-5.
- Singh BK. 1999.** Biosynthesis of valine, leucine e isoleucine. En: *Plant amino acids: Biochemistry and biotechnology*. Ed. Singh BK. Nueva York, NY: Marcel Dekker, pp 227-247. ISBN 0-8247-0204-2.
- Sørensen H, Cedergreen N, Skovgaard IM y Streibig JC. 2007.** An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environmental and ecological statistics* **14, 4**: 383-397.
- Stidham MA y Singh BK. 1991.** Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. En: *The imidazolinone herbicides*. Eds. Shaner DL, O'Connor SL. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 71-91. ISBN 0-8493-5763-2.
- Storrie A. 2006.** *Herbicide resistance mechanisms and common HR misconceptions*. 2006 Grains research update for irrigation croppers [folleto divulgativo].
- Streibig JC, Kudsk P y Jensen JE. 1998.** A general joint action model for herbicide mixtures. *Pesticide Science* **53**: 21-28.
- Szamosi I, Shaner DL y Singh BK. 1993.** Identification and characterization of a biodegradative form of threonine dehydratase in senescing tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaf. *Plant Physiology* **101**: 999-1004.
- Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK y Shaner DL. 2005.** Imidazolinone tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* **61**: 246-257.
- Tan S, Evans RR y Singh BK. 2006.** Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* **30**: 195-204.

Bibliografía

- Vidal RA, Rainero HP, Kalsing A y Trezzi MM. 2010.** Prospección de las combinaciones de herbicidas para prevenir malezas tolerantes y resistentes al glifosato. *Planta Daninha* **28**, **1**: 159-165.
- Vila-Aiub MM, Vidal RA, Balbi MC, Gundel PE, Trucco F y Ghersa CM. 2008.** Glyphosate resistant weeds of South American cropping systems: An overview. *Pest Management Science* **371**: 366-371.
- Vila-Aiub MM, Goh SS, Gaines TA, Han H, Busi R, Yu Q y Powles SB. 2014.** No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive *EPSPS* gene amplification in *Amaranthus palmeri*. *Planta* **239**: 793-801.
- Wakelin AM y Preston C. 2005.** Target-site glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin). *Weed Research* **46**: 432-440.
- Warren CR y Adams MA. 2000.** Capillary electrophoresis for the determination of major amino acids and sugars in foliage: application to the nitrogen nutrition of sclerophyllous species. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1147-1157.
- Wright SR, Jennette MW, Coble HD y Ruffy TW. 1999.** Root morphology of young *Glycine max*, *Senna obtusifolia*, and *Amaranthus palmeri*. *Weed Science* **47**: 706-711.
- WSSA. 2014.** Weed Science Society of America [sitio web]. [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://www.wssa.net>
- Wiersma PA, Schmiemann MG, Condie JA, Crosby WL y Moloney MM. 1989.** Isolation, expression and phylogenetic inheritance of an acetolactate synthase gene from *Brassica napus*. *Molecular Gemonics and Genetics* **219**: 413-420.
- Wittenbach VA y Abell LM. 1999.** Inhibition of valine, leucine and isoleucine biosynthesis. En: *Plant amino acids: Biochemistry and biotechnology*. Ed: Singh BK. Nueva York, NY: Marcel Dekker, pp 385-416. ISBN 0-8247-0204-2.
- Yeem EW y Cocking EC. 1955.** The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* **80**: 209-214.
- Zabalza A, Orcaray L, Gastón S y Royuela M. 2004.** Carbohydrate accumulation in leaves of plants treated with the herbicide chlorsulfuron or imazethapyr is due to a decrease in sink strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 7601-7606.
- Zabalza A, González EM, Arrese-Igor C y Royuela M. 2005.** Fermentative metabolism is induced by inhibiting different enzymes of the branched-chain amino acid biosynthesis pathway in pea plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 7486-7493.
- Zabalza A, Gastón S, Ribas-Carbó M, Orcaray L, Igal M y Royuela M. 2006.** Nitrogen assimilation studies using ¹⁵N in soybean plants treated with imazethapyr, an inhibitor of branched-chain amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 8818-8823.
- Zhao J, Last RL y Williams CC. 1998.** Induction of Arabidopsis tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. *Plant Cell* **10**: 359-370.
- Zimdahl R. 2007.** *Fundamentals of weed science*. Academic Press, Elsevier.

- Zulet¹ A. 2013.** Estudio de la aplicabilidad del *quinato* en el control de malas hierbas. Ana Zabalza (dir.). Trabajo fin de carrera, Universidad Pública de Navarra.
- Zulet² A. 2013.** Modo de acción de herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos y su mimetización con quinato. Mercedes Royuela y Ana Zabalza (dir.). Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra.
- Zulet A, Gil-Monreal M, Villamayor JG, Zabalza A, van der Hoorn RAL y Royuela M. 2013.** Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. *Plos One*. 8(9):e73847.doi:10.1371/journal.pone.007384

OTRAS FUENTES

- IAPPS [2014]. International Association for the Plant Protection Sciences [sitio web]. [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://www.plantprotection.org/Contacts/IAPPSadministration.aspx>
- REGISTRO DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS [2014]. Registro de productos fitosanitarios [sitio web]. Madrid, ES: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>
- SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MALHERBOLOGÍA [2014]. Valencia, ES: SEMh [sitio web]. [Consulta: 11 junio 2014]. Disponible en: <http://www.semh.org/>

Anexo I



ANÁLISIS GRÁFICO DE FLINT (1988)

