



Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y BIOCENCIAS**  
***NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA  
BIOZIENTZIETAKO GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

*Control de poblaciones de amapola sensible y resistente a herbicidas  
sulfonilureas mediante el uso del compuesto orgánico quinato*

presentado por

***JOSU ENCINAS ULARTE***

*(e)k aurkeztua*

**GRADO EN INGENIERIA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL  
GRADUA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN ETA LANDA INGURUNEAREN  
INGENIERITZAN**

junio, 2020 / 2020, ekaina



## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR

El Trabajo Fin de Estudios titulado:

Master amaierako lan hau:

Control de poblaciones de amapola sensible y resistente a herbicidas sulfonilureas mediante el uso del compuesto orgánico quinato

Presentado por:

Nork aurkeztua:

Josu Encinas Ularte

Para optar al Grado en:

Gradu hau eskuratzeko:

Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Ha sido realizado en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Pública de Navarra, en el Departamento de:

Nafarroako Unibertsitate Publikoko Nekazaritza Ingeniarien Goi Mailako Eskola Teknikoko sail honetan:

Ciencias

Bajo la dirección del Dr./Dra.

Noren zuzendaritzapean:

Miriam Gil Monreal y Ana Zabalza Aznarez

En Pamplona, el día:

Iruñean, egun honetan:

29/05/2020

Fdo./Stua.:

Josu Encinas Ularte

Estudiante / ikaslea

Fdo./Stua.:

Miriam Gil Monreal y Ana Zabalza Aznarez

Director/a / zuzendaria





## Agradecimientos

En primer lugar, gracias a mis tutoras, Miriam Gil y Ana Zabalza, por lo atentas que han sido conmigo, por el apoyo y todo el esfuerzo que han puesto en mí, y también en este trabajo de fin de grado. Sobre todo, gracias por la constante motivación y buen rollo. Gracias por todo, ha sido un placer.

A todo el equipo del Departamento de Ciencias. A María, por su música; a Ainhoa, que me ha enseñado a ser muy muy precavido; a los Mikeles, a Gustavo, a todos los que han pasado por el laboratorio y me han ayudado a trabajar y a hacerlo con fundamento. Sin vosotros las horas de laboratorio no habrían sido tan divertidas. Por ser también mis profesores, por hacerme sentir uno más en el departamento y sobre todo por la buena onda constante.

Gracias Asier, Oscar, Aide, Izaskun, Aro y todos los amigos que me han apoyado. Qué han escuchado mis chapas sobre este trabajo, me han motivado y me han hecho el proceso más ameno. Por ponerme los pies en la tierra cuando mi dramatismo y nerviosismo han salido a la luz.

A toda mi familia. Por las ganas que tenían de que terminase y me han motivado para hacerlo. Esto ya está.

Gracias a mi perra Lar, por tener que salir a pasearla y forzarme a desconectar cuando no era consciente, aunque no fueran sus intenciones.

También a este trabajo, por ayudarme a comprender como funciona y se trabaja en investigación, por todo lo aprendido sobre métodos y herramientas de laboratorio y por todo el conocimiento adquirido sobre herbicidas y el mundo que los rodea. Por ayudarme a ser más crítico.

Para terminar, doy las desgracias a los pajarillos que se comieron mis semillas de amapola, al mal tiempo de noviembre, a las explosiones de muestras y a esta pandemia. Y aún con todo eso, aquí está el trabajo.

Va por todos vosotros. Gracias.





## RESUMEN

**Título:** Control de poblaciones de amapola sensible y resistente a herbicidas sulfonilureas mediante el uso del compuesto orgánico quinato

**Alumno:** Josu Encinas Ularte

*La aplicación de herbicidas es una práctica muy utilizada en agricultura para el control de malas hierbas. Sin embargo, el uso repetido de herbicidas con el mismo mecanismo de acción ha provocado la aparición de poblaciones resistentes a dichos compuestos, dificultando su control. La amapola (*Papaver rhoeas* L.) es una mala hierba muy problemática en cereales de invierno. El control de amapola por herbicidas se está viendo limitado por la aparición de poblaciones resistentes a herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados, como las sulfonilureas. Como alternativa, se buscan compuestos con nuevos mecanismos de acción. El quinato es un compuesto natural considerado una alternativa interesante, ya que trabajos anteriores mostraron que su aplicación tiene un carácter fitotóxico sobre la amapola.*

*En este trabajo se planteó la utilización de quinato para el control de poblaciones de amapola resistentes a las sulfonilureas. En un primer ensayo se determinó la dosis óptima y estado fenológico de aplicación. Después, se valoró su utilidad en el control de amapola, aplicado aisladamente o mezclado con una sulfonilurea. Se comparó el efecto en la biomasa y en el contenido de diversos metabolitos descritos que se ven afectados por las sulfonilureas.*

*El quinato (aplicado solo o combinado) resultó tóxico para la población resistente, aunque no se han podido establecer las razones fisiológicas de dicha toxicidad. Se abre la interesante posibilidad del uso del quinato en el control de las poblaciones resistentes, pero es necesario optimizar la dosis y profundizar en los efectos fisiológicos relacionados con su toxicidad.*

**Palabras clave:** herbicida, quinato, sulfonilureas, resistencias, amapola





## ABSTRACT

**Title:** Control of sensitive and resistant populations of corn poppy to sulfonylurea herbicides using the organic compound quinate

**Student:** Josu Encinas Ularte

*The application of herbicides is a common practice in agriculture for weed control to avoid crop yield loss. However, the repeated use of herbicides with the same mechanism of action boosts the emergence of resistant populations to these compounds, making their control more difficult. Corn poppy (*Papaver rhoeas* L.) is one of the most problematic weeds in winter cereals. The control of corn poppy by herbicides is being limited by the emergence of resistant populations to branched-chain amino acids inhibiting herbicides, like sulfonylureas. Products with new mechanism of action are needed as an alternative. Quinate is a natural compound that has been proposed as an interesting alternative. Previous works observed that exogenous application of quinate has a phytotoxic effect on corn poppy.*

*This work evaluates the use of quinate for the control of corn poppy resistant populations to sulfonylurea herbicides. First, the optimal dose of quinate and phenological status for corn poppy control were selected. After, the use of quinate corn poppy control was evaluated, applied alone or in combination with sulfonylureas. The effect of different treatment on the biomass and on the different physiological parameters known to be affected by sulfonilureas was evaluated.*

*Quinate (applied alone or in combination) had a phytotoxic effect on the resistant population, but the physiological reasons for that toxicity could not be explained. This study lays the framework for the application of quinate in the control of corn poppy, but more studies are needed to gain further information about the physiological markers related to quinate toxicity.*

**Key words:** herbicide, quinate, sulfonylureas, resistances, corn poppy



ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. GENERALIDADES SOBRE HERBICIDAS.....	1
1.1.1. Definición .....	1
1.1.2. Historia y situación actual de los herbicidas .....	1
1.1.3. Mecanismo y modo de acción.....	4
1.1.4. Clasificación de los herbicidas .....	5
1.1.5. Resistencia a herbicidas .....	7
1.2. HERBICIDAS QUE INHIBEN LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS.....	10
1.2.1. Aminoácidos de cadena ramificada .....	10
1.2.2. Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados o inhibidores de la actividad ALS .....	11
1.2.3. Sulfonilureas .....	12
1.2.5. Efectos fisiológicos de los inhibidores de la actividad ALS .....	12
1.2.5.1. Efectos en el crecimiento .....	12
1.2.5.2. Efecto sobre aminoácidos libres .....	13
1.2.5.3. Efectos sobre el metabolismo del carbono .....	13
1.2.5.4. Efectos sobre la ruta del shikimato y el quinato .....	13
1.2.6. Resistencia a los inhibidores de la actividad ALS.....	13
1.2.6.1. Mutaciones en la diana (TSR) .....	14
1.2.6.2. Mutaciones fuera de la diana (NTSR).....	15
1.2.6.3. Evolución de las TSR y NTSR .....	15
1.3. LA MALA HIERBA: <i>Papaver rhoeas</i> L.....	15
1.4. QUINATO .....	17
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. ESPECIE EMPLEADA.....	23
3.2. ENSAYO 1: Determinación de la dosis de quinato y estado fenológico de aplicación del tratamiento.....	23
3.2.1. Siembra.....	23
3.2.2. Condiciones de crecimiento .....	24
3.2.3. Aplicación foliar del quinato y diseño experimental .....	24
3.2.4. Determinación de la biomasa .....	25
3.2.5. Análisis estadístico .....	25
3.3. ENSAYO 2: Valoración de la aplicación de quinato, un herbicida sulfonilurea y su mezcla sobre poblaciones sensible y resistente de amapola.....	25

3.3.1. Siembra y condiciones de crecimiento.....	25
3.3.2. Aplicación foliar de los tratamientos .....	26
3.3.3. Contenido de clorofila, biomasa y muestreo .....	26
3.3.4. Determinación de clorofila.....	26
3.3.5. Determinaciones analíticas.....	27
3.3.5.1. Determinación de la concentración de shikimato .....	27
3.3.5.2. Extracción de aminoácidos libres .....	27
3.3.5.3. Determinación de aminoácidos libres por electroforesis capilar .....	27
3.3.6. Análisis estadístico .....	28
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
4.1. RESULTADOS DEL ENSAYO 1 .....	29
4.1.1. Efectos del quinato aplicado a plántulas con cuatro hojas verdaderas.....	29
4.1.2. Efectos del quinato aplicado a plántulas con 6-8 hojas verdaderas .....	30
4.2. RESULTADOS DEL ENSAYO 2 .....	33
4.2.1. Efecto de los tratamientos en la biomasa .....	33
4.2.2. Efecto sobre el contenido en clorofila .....	35
4.2.3. Efecto en el contenido en shikimato .....	36
4.2.4. Efectos en el contenido en aminoácidos libres, ramificados y aromáticos. ....	37
4.3. DISCUSIÓN .....	39
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. GENERALIDADES SOBRE HERBICIDAS

#### 1.1.1. Definición

Los herbicidas son compuestos que tienen como finalidad acabar con las malas hierbas, refiriéndose en general a todo producto químico que inhibe total o parcialmente el desarrollo y crecimiento de plantas no deseadas en el terreno; aquellas clasificadas como malas hierbas. El concepto de mala hierba es totalmente antropocéntrico, debido a que estas plantas obstaculizan las labores y propósitos del hombre, no teniendo ningún interés productivo. Estas plantas afectan a los sistemas agrícolas compitiendo con los cultivos por agua, luz, nutrientes del suelo y, además, pueden funcionar como atrayentes de otras plagas, como insectos y patógenos. Un sistema agrícola no es un sistema natural equilibrado, por ello, las malas hierbas crecen de manera predominante gracias a su alta capacidad de dispersión y de competencia. Fuera del sistema agrícola en cambio estas pueden pertenecer al equilibrio natural del ecosistema.

#### 1.1.2. Historia y situación actual de los herbicidas

Desde el inicio de la agricultura se ha intentado controlar las malas hierbas. Al principio, estos métodos eran manuales y después se fueron mecanizando, pero a mediados del siglo pasado, debido a los herbicidas todo cambió. Estos son una herramienta útil en el control de malas hierbas, reducen la mano de obra y los costes de cosecha eliminando las interferencias que suponen estas hierbas para el cultivo.

Antes del desarrollo de productos orgánicos para el control de malas hierbas se habían usado compuestos inorgánicos, como la sal común y sulfato de cobre o de hierro. Pero podemos considerar que el inicio de la síntesis y desarrollo de herbicidas viene marcado por el descubrimiento del 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en el principio de la década de los 40, 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 Gran Bretaña y Estados Unidos, pero durante la década siguiente todas las naciones industrializadas se vieron involucradas.

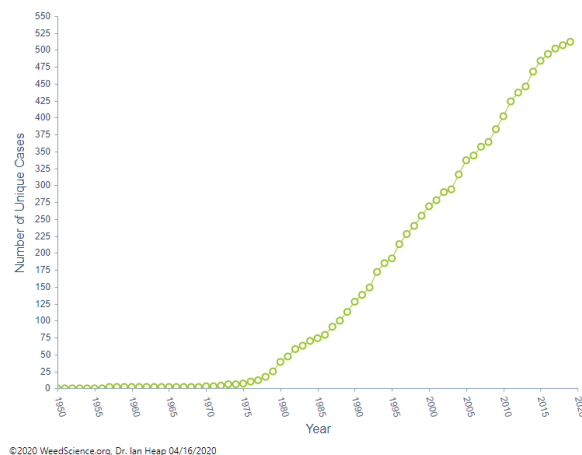
El impacto más inmediato de los nuevos herbicidas fue controlar malas hierbas de cereales. En la década de los 60 aparecieron nuevos herbicidas, muchos de los cuáles actuaban a través del suelo. A partir de ese momento se crearon herbicidas para controlar malas hierbas en toda especie de cultivos, consecuentemente se redujeron los métodos mecánicos de control de malas hierbas en todo el sector.

De 1970 en adelante se prestó atención al control de gramíneas que dificultaban la producción de cereales y otros cultivos. La continua investigación llevó a la aparición de nuevos herbicidas y técnicas de control. Los herbicidas en consecuencia dieron la posibilidad de crear nuevos sistemas de manejo, como la siembra directa, no teniendo que volver a remover la tierra para eliminar las malas hierbas.

Entre las décadas 70 y 90, distintas empresas patentaron herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados, aromáticos y de glutamina. Los primeros inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados eran químicamente distintos y fueron patentados por distintas empresas: las imidazolinonas (de Cyanamid America) y las **sulfonilureas** (de Dupont); además, dentro de las sulfonilureas se pueden encontrar numerosas materias activas. El glifosato y el glufosinato, herbicidas totales, inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y de la glutamina respectivamente, fueron una ventaja para los cultivos transgénicos ya que permitían utilizarlos como herbicidas selectivos (Powles, 2008).

El herbicida más utilizado a nivel mundial es el glifosato, un herbicida total, no selectivo. Se ha hecho muy conocido debido a su eficacia y beneficios económicos (O Duke & B Powles, 2008), y también ha sido causante de mucha controversia en cuanto a los problemas medioambientales y sociales. A partir de 1996, con los cultivos transgénicos, se comenzó a utilizar en postemergencia como herbicida selectivo, gracias a la resistencia que le confería al cultivo el gen del organismo externo contra el herbicida (en cultivos de soja, maíz, algodón y colza), pudiendo eliminar las malas hierbas emergentes sin dañar el cultivo (Powles, 2008). A pesar de ocupar el primer puesto a nivel mundial en el uso de herbicidas, no es el único que se utiliza, sobre todo en Europa donde la mayoría de los cultivos transgénicos no están permitidos.

Tras más de 50 años de uso de herbicidas, los herbicidas han eliminado los métodos manuales y mecánicos en control de plantas y han contribuido en el significativo crecimiento de la producción de la agricultura global. Al igual que los insecticidas no han acabado con las plagas, ni los antibióticos eliminado las enfermedades patógenas, los herbicidas no han supuesto la extinción de las malas hierbas, el uso indiscriminado ha supuesto la aparición de poblaciones de malas hierbas resistentes a la mayoría de los tipos de herbicidas, suponiendo un gran problema (Powles & Yu, 2010). La resistencia de las malas hierbas a los herbicidas es una respuesta adaptativa de estas plantas a la presión de selección ejercida por los compuestos químicos (Powles & Yu, 2010). Actualmente, 512 casos de malas hierbas son resistentes a herbicidas, un total de 262 especies (152 dicotiledóneas y 110 monocotiledóneas). Hay poblaciones que han desarrollado resistencias a 23 sitios de acción, de 26 que se conocen, y a 167 herbicidas distintos. Estas resistencias se han encontrado en más de 90 cultivos en 70 países. En el caso de España hay 37 especies de malas hierbas con poblaciones resistentes a herbicidas (Heap, 2020). La cantidad de malezas resistentes ha ido en aumento desde el año 1975, aunque ahora este desarrollo es menos pronunciado (FIGURA 1).



**FIGURA 1.** Evolución cronológica del incremento de poblaciones de malas hierbas resistentes a nivel global (Heap, 2020).

Es necesaria una diversidad suficiente en el sistema de control de malas hierbas para que las resistencias no se desarrollen o que en el caso de que lo hagan, se desarrollen muy lentamente (Powles, 2008). Esto puede suponer el encarecimiento del control de malas hierbas, por lo que los programas de manejo de resistencia a herbicidas deben volver a contemplar el uso de métodos culturales y mecánicos y trabajarlos en conjunto con los herbicidas disponibles, ajustándolos a cada situación siguiendo las buenas prácticas agrícolas (Norsworthy et al., 2012).

Los herbicidas también pueden generar problemas en cuanto a su persistencia en el medio ambiente, ya que pueden afectar negativamente a los lugares o áreas de aplicación, presentando así posibles efectos tóxicos sobre el medio ambiente y también sobre organismos vivos como para la salud humana. En los últimos años, debido a los crecientes problemas ambientales que se están sufriendo, la Unión Europea decidió reducir progresivamente el número de materias activas que se pueden utilizar como herbicidas, realizar un mayor control en su comercialización y conseguir un uso más sostenible de los productos fitosanitarios (CE 1107/2009). En el Estado español desde el 2011 al 2018 se han reducido las materias activas utilizadas para el control de malas hierbas, pero no la cantidad de estos (MAPA, 2018). Actualmente, un total de 287 materias activas son reconocidas con propiedades herbicidas (Heap, 2020), de las cuales, en España están autorizadas menos de 80.

Hace ya más de 30 años, a pesar de que se produzcan nuevos herbicidas, todos ellos utilizan los mismos mecanismos de acción (Beckie & Tardif, 2012), cuando hasta entonces aparecían nuevos mecanismos de acción cada tres años aproximadamente. Esta limitación en la aparición de mecanismos de acción y la desautorización progresiva de cada vez más materias activas ha originado que la cantidad de tipo de materias activas utilizadas con carácter herbicida se haya reducido. Sin embargo, la cantidad de herbicidas utilizados no ha disminuido y, en consecuencia, la presión de selección sobre las poblaciones de malas hierbas se ha incrementado, promoviendo así la aparición de resistencias. Existen diversas estrategias para minimizar el impacto que tiene la utilización reiterativa de los mismos productos herbicidas sobre la aparición de resistencias. Por un lado, se buscan nuevas alternativas, distintas materias activas, con distintos mecanismos de acción para disminuir la presión de selección sobre las poblaciones. En este contexto se plantea la utilización de productos naturales, ya que poseen una mayor diversidad estructural que los compuestos sintéticos. Esta diversidad puede ser útil para desarrollar nuevas clases de plaguicidas basados en productos naturales. Muchos de estos compuestos o derivados están estrechamente unidos al metabolismo secundario, y podrían presentar nuevos mecanismos de acción contra el organismo, lo que actualmente es de gran interés para evitar la evolución de las resistencias (Dayan, Cantrell, & Duke, 2009).

Por otro lado, se trata de diversificar los métodos de control de las malas hierbas, ya que el sistema de cultivo tiene mucho que ver con los problemas del uso de herbicidas, debido a que la mayoría son monocultivos, donde las resistencias pueden tener mayor ventaja para su desarrollo. La legislación actual promueve prácticas para mejorar los sistemas de cultivo y evitar estos problemas. En este contexto, mediante el RD 1311/2012 (BOE, 2012) para el uso sostenible de los productos fitosanitarios y los Planes de Acción Nacionales que se establecieron en base a este, se establecen las prácticas adecuadas para la utilización de estos productos, para evitar resistencias en plagas, enfermedades y malas hierbas. El Plan de Acción Nacional para el uso sostenible de productos fitosanitarios actual comprende desde el año 2018 al 2022. Este promueve una gestión integrada de las malas hierbas, el desarrollo de variedades más competitivas, y la reducción en el uso de las sustancias que puedan ser dañinas para la salud y el medio ambiente.

### 1.1.3. Mecanismo y modo de acción

Los herbicidas, una vez que entran en contacto con la planta y más concretamente, con las células, provocan diversas reacciones en las plantas dependiendo del herbicida que se utilice, la dosis empleada, la especie de planta a la que se le aplica, el estado fenológico de esta y las condiciones ambientales. Los herbicidas cumplen su objetivo debido a que interfieren en procesos fisiológicos esenciales de la planta interrumpiendo su crecimiento y desarrollo.

El lugar de acción donde el herbicida cumple su objetivo es su **mecanismo de acción**, llamado también diana, donde se encuentra el proceso primario, bioquímico o biofísico, que es específicamente bloqueado o destruido con la menor dosis de herbicida. Los procesos sucesivos a la influencia en el proceso primario mencionado y que se desarrollan hasta que la planta tratada muere, se denomina **modo de acción**. Es decir, las consecuencias fisiológicas del mecanismo de acción; estas pueden ser visuales, como, por ejemplo, que las hojas sufran clorosis.

Conocer los mecanismos y modos de acción de los herbicidas requiere años de investigación. Por lo general se conocen los mecanismos de acción, pero no se conocen en su totalidad los modos de acción. Aunque se sepa que tienen un efecto herbicida sobre las plantas, no son del todo conocidos los procesos que originan esa toxicidad. Todas las investigaciones sobre el efecto letal de los herbicidas han ayudado a conocer mucho mejor los procesos fisiológicos que ocurren en las plantas y al uso más racional de estos compuestos. Aun así, estos estudios deben continuar ya que ayudarían a un mejor manejo de los herbicidas, en al menos estos tres aspectos:

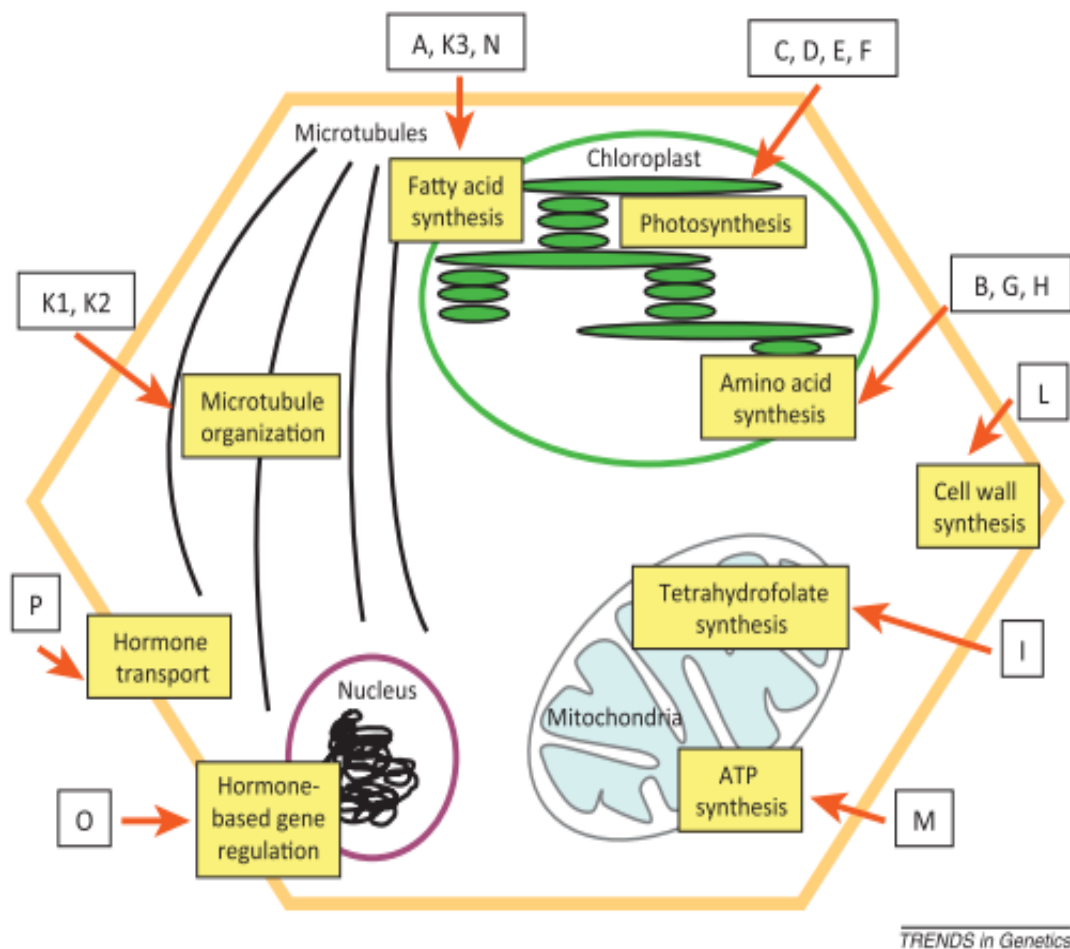
- En primer lugar, para mitigar el desarrollo de las resistencias, debido a la gran presión de selección que supone la continua utilización de los mismos mecanismos de acción (Powles & Yu, 2010). Conocer los modos de acción y aplicar distintos mecanismos de acción podría disminuir la aparición de malas hierbas resistentes (Duke, 2011). Desde hace más de 30 años no hay herbicidas con nuevos sitios de acción, por lo que es esencial utilizar compuestos que ejerzan su acción sobre distintos procesos metabólicos (Abell L., 1996), y conociendo los procesos metabólicos que generan la muerte de las plantas se podrían diseñar nuevos compuestos basados en esos procesos, desviando así la presión de selección.
- En segundo lugar, pudiendo conocer esos procesos, se podrían desarrollar nuevas moléculas de origen natural con acción herbicida. Los nuevos inhibidores podrían ser de síntesis natural, provenientes del propio metabolismo de las plantas. Utilizando materias activas basadas en compuestos naturales se podría desequilibrar los procesos fisiológicos de las plantas para su propia muerte, no teniéndose que preocupar por su degradabilidad y sus posibles impactos ambientales.
- En tercer lugar, conocer todos los procesos con objetivo preventivo. Pudiendo mediante los estudios conocer las respuestas de distintas especies de plantas o de otros organismos del agroecosistema pudiendo prever los efectos adversos que estos puedan conllevar.



#### 1.1.4. Clasificación de los herbicidas

La clasificación de los herbicidas puede ser muy amplia, debida a muchas características: según sus usos, modo de aplicación, estructura química o su comportamiento en la planta, o el suelo. La clasificación según su comportamiento en la planta puede establecerse 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 & Fernández-Quintanilla, 1991). En base a cómo se quieran utilizar los herbicidas o qué información se quiera obtener se puede utilizar una clasificación u otra. Para agricultores y servicios técnicos agrícolas es muy útil clasificarlos según sus mecanismos de acción, ya que pueden dar pautas para alternar herbicidas o realizar mezclas para diluir en lo posible la presión de selección.

A continuación, se muestran los mecanismos de acción de los herbicidas y la localización de la diana dentro de la célula vegetal (FIGURA 2).



**FIGURA 2.** Dianas de acción de los herbicidas y la clasificación por mecanismo de acción según el Comité de Acción contra la Resistencia a Herbicidas (HRAC) (Délye, Jasieniuk, & Le Corre, 2013)

La Herbicide Resistance Action Committee ha clasificado los herbicidas de la A a la Z en un total de 26 mecanismos de acción (TABLA 1). A cada grupo de herbicida con el mismo mecanismo de acción se le designa una letra, y dentro de cada uno de ellos puede haber más de una familia química de herbicidas. La TABLA 1 muestra los principales mecanismos de acción, agrupados por procesos fisiológicos son los siguientes.

## INTRODUCCIÓN

**TABLA 1.** Herbicidas agrupados según sus mecanismos de acción ((HRAC, 2020), Comité de Acción contra la Resistencia a Herbicidas).

GRUPO	MECANISMO DE ACCIÓN	FAMILIA QUÍMICA
A	Inhibición de la enzima acetil CoA carboxilasa (ACCase)	Cicloexanodionas
		Ariloxyfenoxipropionatos
		Fenilpirazolines
B	Inhibición de la acetolactato sintasa (ALS)	Pirimidil benzoatos
		Sulfonanilidas
		Triazolpirimidinas
		Sulfonilureas
		Imidazolinonas
		Triazolinonas
C1	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazinas
		Triazolinonas
		Triazinonas
		Uracilos
		Fenilcarbamatos
		Piridazinonas
C2	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Ureas
		Amidas
C3	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Nitrilos
		Fenil piridazinas
		Benzotiadiazinonas
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema I	Bipiridilos
E	Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difeniléteres
		Fenilpirazoles
		N-Fenil-oxadiazolonas
		N-Fenil-triazolinonas
F1	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	N-Fenil-imidas
		Feniléteres
		N-Fenil heterociclos
		Difenil heterociclos
F2	Decoloración: inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD)	Triketonas
		Pirazoles
		Isoxazoles
T	Inhibición de la homogentisato solanesil transferasa	Piridazinadiona
F4	Inhibición de Desoxi-D-Xilulosa fosfato sintasa	Isoxazolidinona
G	Inhibición de 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa	Glicina
H	Inhibición de la glutamino sintetasa (GS)	Ácidos fosfínicos
I	Inhibición del DHP (dihidropterato) sintetasa	Carbamato
K1	Inhibición de la unión de los microtúbulos de la mitosis	Dinitroanilinas
		Piridinas
		Fosforoamidatos
		Ácidos benzoicos
		Benzamidas
K2	Inhibición de la mitosis	Carbamatos
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Triazolocarboxamidas
		Benzamidas
		Alkilazinas
		Nitrilos
M	Desacopladores (alteración de la membrana)	Dinitrofenoles
K3	Inhibición de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga	Azolil-carboxamidas

		$\alpha$ -Tioacetamidas
		Isoxazolinás
		Oxiranos
		$\alpha$ -Cloroacetamidas
		$\alpha$ -Oxiacetamidas
		Tiocarbamatos
		Benzofuranos
<b>O</b>	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético)	Piridine-carboxilatos
		Piridiloxi-carboxilatos
		Fenoxi-carboxilatos
		Benzoatos
		Quinolin-carboxilatos
		Pirimidine-carboxilatos
		Fenil carboxilatos
<b>P</b>	Inhibición de AIA	Aril-carboxilatos
<b>Q</b>	Inhibición de la tiosterasa de ácidos grasos	Benzil éter
<b>R</b>	Inhibición de la proteína serina – treoina fosfatasa	Endothal
<b>S</b>	Inhibición de solanesil difosfato sintasa	Difenil éter
<b>F3</b>	Inhibición del licopeno ciclasa	Triazole
<b>Z</b>	Desconocido	Ácido acrilaminopropionico
		Acetamidas
		Benzamidas
		Fosforoditioato
		Ácido clorocarbonicos
		Trifluorometanesulfonilidas

### 1.1.5. Resistencia a herbicidas

Como se ha mencionado anteriormente, las resistencias a los herbicidas son hoy en día uno de los mayores problemas de los herbicidas. La primera especie resistente se encontró en 1957 (Hilton, 1957), hoy en día hay 262 especies con poblaciones resistentes a algún herbicida (Heap, 2020). La utilización indiscriminada de los herbicidas ha supuesto una gran presión de selección, provocando que las malas hierbas resistentes evolucionen limitando la actividad de los herbicidas.

La resistencia de las malezas a los herbicidas es un proceso evolutivo de respuesta de una población a un fenómeno de estrés. El desarrollo de la resistencia en campo es un proceso de selección, se supone que un pequeño número de plantas de cualquier población de malas hierbas es resistente de forma natural a cualquier herbicida, y que al aplicar repetidas veces el herbicida permitirá que estas sobrevivan y pueden reproducirse, permitiendo que la resistencia se extienda. Tras un largo periodo de varias selecciones así, el biotipo resistente puede dominar en la población.

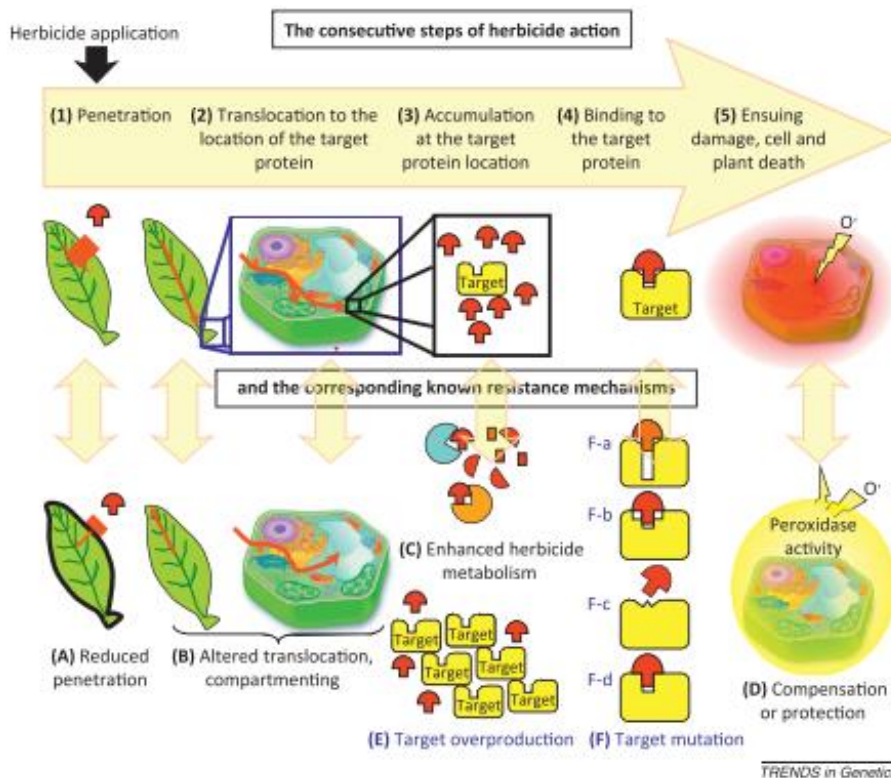
Las resistencias pueden darse a más de un herbicida en la misma planta, cuando es resistente a varios herbicidas de diferente familia química. Esta puede ser una **resistencia cruzada**, por la que es resistente a dos o más herbicidas debido a la presencia de **un único mecanismo de resistencia**, o una **resistencia múltiple**, cuando se desarrolla resistencia a varios herbicidas por **dos o más mecanismos de resistencia distintos** (Comité para la Prevención de Resistencias a Herbicidas, n.d.; HRAC, 2020).

La dinámica e impacto de las resistencias puede depender de varios factores, resumidos en la TABLA 2 (Powles & Yu, 2010).

**TABLA 2.** Factores que influyen en la evolución de resistencias en las poblaciones de malas hierbas (Powles & Yu, 2010).

<b>Genéticos</b>	Genes de resistencia frecuentes
	Número de genes resistentes
	Dominancia de los genes resistentes
	Costos de aptitud de los genes resistentes
<b>Biología de la planta</b>	Polinización cruzada vs autopolinización
	Capacidad de producción de semillas
	Longevidad de la semilla en el suelo
	Movilidad de las semillas/polen
<b>Herbicida</b>	Estructura química
	Mecanismo de acción
	Actividad residual
<b>Operacionales</b>	Dosis del herbicida aplicado
	Técnicas de manejo (maquinaria, momentos de aplicación, condiciones ambientales, etc.)
	Factores del agroecosistema (rotación de cultivos, otras técnicas de control, etc.)

Las malas hierbas pueden sobrevivir a las aplicaciones de herbicidas por una variedad de mecanismos, pero por lo general se dividen en dos categorías, **resistencia en la diana** (target-site resistance (TSR)) y **resistencia fuera de la diana** (non-target-site resistance (NTSR)) (FIGURA 3).



**FIGURA 3.** La acción de los herbicidas después de su aplicación y los mecanismos de resistencia identificados en las malezas que corresponden a cada paso de acción. Aplicación, (1) las moléculas herbicidas penetran en la planta, (2) se translocan a la localización de la proteína diana, (3) acumulación en la zona, (4) adhesión a la proteína y (5) interrumpe las rutas de biosíntesis esenciales o estructuras celulares provocando la muerte. Resistencia fuera de la diana (NTSR): (A) donde la molécula herbicida no penetra, (B) se altera la translocación del herbicida, (C) el herbicida es degradado, (D) mayor actividad de neutralización. Resistencia en la diana (TSR): (E) mutaciones regulatorias que sobreproducen la proteína diana compensando la acción inhibitoria del herbicida y (F) mutaciones estructurales que modifican la estructura 3D y las propiedades electroquímicas de las proteínas diana (Délye et al., 2013).

Las plantas con **diana resistente** (TSR) presentan modificaciones de carácter monogénico. Las primeras plantas resistentes se estudiaron entre los 80 y 90, donde la mayoría de los casos estaban determinados por alelos dominantes en el locus de un único gen; que confería resistencia sobre todo herbicidas de los grupos A, B y C (Beckie & Tardif, 2012; Powles & Yu, 2010). La resistencia es otorgada debido a cambios en la estructura 3D de las proteínas diana y la distribución de sus grupos polares, y dependiendo del herbicida los cambios pueden ser mayores o menores. Esto no depende del ingrediente activo del herbicida, depende de los compuestos en este y los cambios que pueden generar en la diana, cuanto más parecidos sean los herbicidas, más fácil será el desarrollo de la resistencia. Estas resistencias son muy específicas y permiten a la planta soportar dosis elevadas de herbicida.

Las malezas con **resistencia fuera de la diana** (NTSR) son de carácter poligénico, por lo tanto, mucho más complejas (FIGURA 3). Es considerada la resistencia predominante en herbicidas de los grupos G y B, y, además, es el único tipo de resistencias encontrado en los grupos D, N, O y Z. Lo más negativo y el mayor de los inconvenientes es que se le asocian resistencias cruzadas, que son impredecibles y no están sujetas al modo de acción del herbicida utilizado, incluso pueden conferir resistencias a herbicidas que todavía no han sido comercializados. La NTSR está asociada a mecanismos de resistencia como la translocación del herbicida, mejora del metabolismo respecto al herbicida y la protección frente a los daños fisiológicos que estos pretenden generar. Todavía no se sabe cómo se regulan esas vías implicadas en la detección del herbicida y el desencadenamiento de la respuesta al estrés y los estudios de la base genética de poblaciones NTSR son escasos. La rotación y mezcla de herbicidas podría suponer una mayor presión selección de resistencias NTSR como se describe en las estrategias de manejo contra las malas hierbas (Beckie & Tardif, 2012; Délye et al., 2013; Powles & Yu, 2010; Renton, Diggle, Manalil, & Powles, 2011).

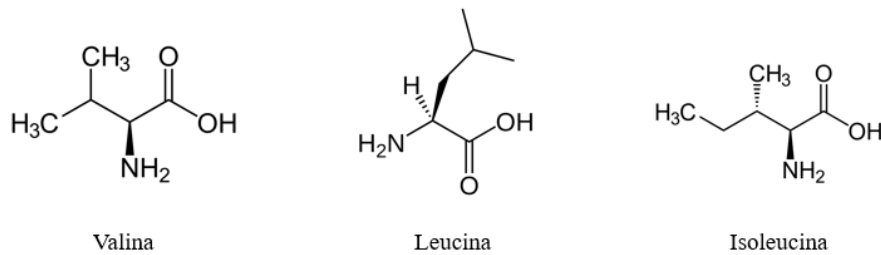
Que la planta sea resistente al herbicida no significa que le dé ventajas para sobrevivir, solo sobrevive frente al herbicida, a veces esto la beneficiará, pero el haber logrado esa resistencia puede suponer costos en cuanto a aptitud. Pueden ocurrir resistencias cruzadas negativas, esto es, que sea resistente a un herbicida pero que no lo sea frente a otro. Puede haber efectos pleiotrópicos que afectan directamente a la fisiología de la planta y sus procesos de desarrollo, aunque estos no tienen por qué ser muy graves. Estos efectos se estudian en momentos muy concretos de la fenología de la planta y no en ciclos completos por lo que es muy difícil determinar los efectos que puedan tener (Menchari, Chauvel, Darmency, & Délye, 2007; Pavlicev & Wagner, 2012; Purrington, 2000).

Las poblaciones de malas hierbas están acumulando mecanismos de resistencia, mostrando una resistencia múltiple a muchos herbicidas y planteando un gran desafío para la sostenibilidad tanto de los herbicidas como del sistema agrícola actual. La comprensión de la resistencia y la creación de soluciones sostenibles para la evolución de estas son retos necesarios (Powles & Yu, 2010).

## 1.2. HERBICIDAS QUE INHIBEN LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS.

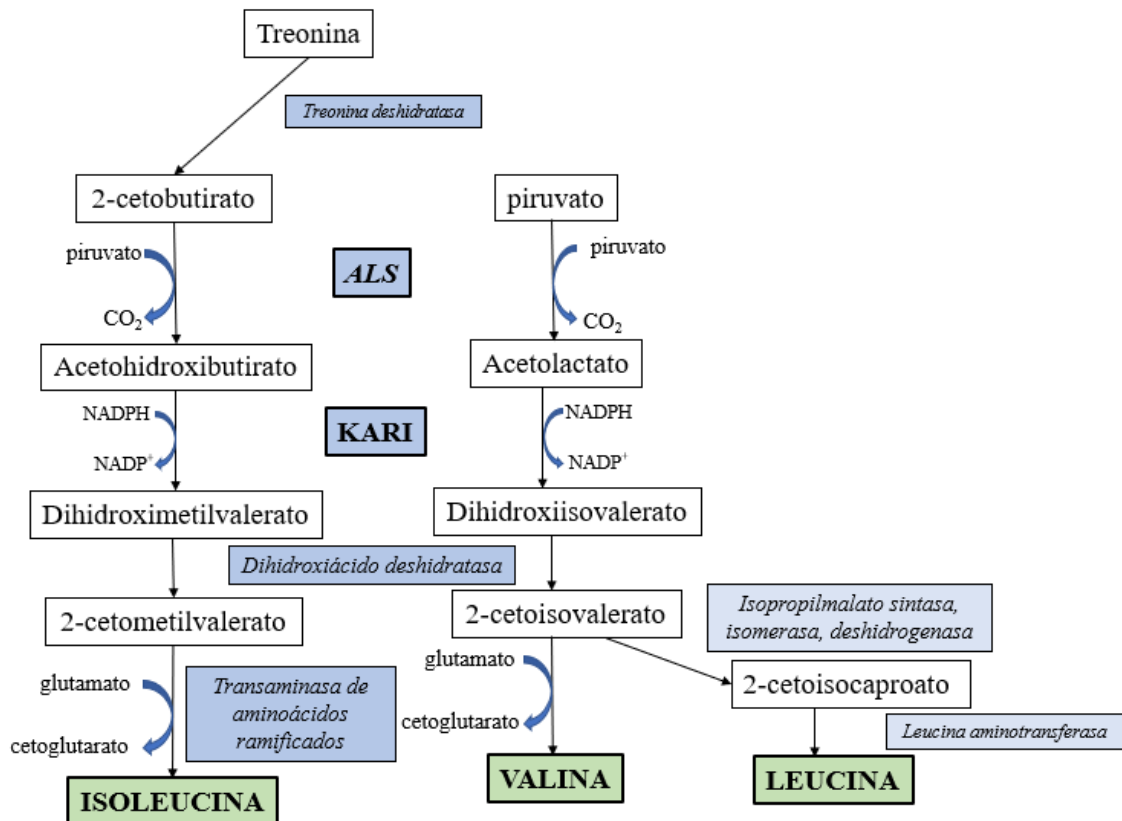
### 1.2.1. Aminoácidos de cadena ramificada

Existen 20 aminoácidos básicos, de todo ellos los mamíferos solo pueden sintetizar 11, por lo que el resto se suministran a través de la dieta, denominados aminoácidos esenciales. Los aminoácidos de cadena ramificada pertenecen a ese grupo, y son tres: **valina**, **leucina** e **isoleucina** (FIGURA 4).



**FIGURA 4.** Estructura química de los tres aminoácidos ramificados.

Estos aminoácidos son sintetizados mediante una ruta biosintética presente en microorganismos y en los plastidios de las plantas (Wittenbach & Abell, 1999) (FIGURA 5). La isoleucina y la valina son sintetizados en una serie de reacciones paralelas que comparten enzimas comunes. La leucina en cambio es sintetizada como una ramificación a partir de la ruta de síntesis de la valina. El primer paso de la síntesis de isoleucina es catalizado por la treonina deshidratasa. Este enzima lleva a cabo una desaminación de la treonina dando lugar a una molécula de 2-cetobutirato y amonio. La enzima acetolato sintasa (ALS) es la primera enzima común a ambas vías y cataliza dos reacciones a partir del piruvato y del cetobutirato. El enzima redutoisomerasa (KARI) reduce los acetoácidos sintetizados por el enzima ALS y produce dihidroxiácidos. Estos son transformados en derivados del ácido valérico por la actividad del siguiente enzima que se denomina dihidroxiácido deshidratasa. El último paso en la ruta biosintética de los tres aminoácidos necesita la acción de un enzima aminotransferasa.



**FIGURA 5.** Ruta biosintética de los aminoácidos ramificados. ALS: acetolactato sintasa; KARI: cetoácido reductoisomerasa.

Todos los órganos de una planta pueden sintetizar estos aminoácidos, pero es en los tejidos jóvenes donde se da preferentemente esta biosíntesis. Según varios estudios los tejidos jóvenes presentan mayor contenido de mRNA que codifica las enzimas de esta ruta (Wiersma, Schmiemann, Condie, Crosby, & Moloney, 1989), y estos tejidos presentan los mayores niveles de actividad de varias enzimas de esta ruta (Hofgen, Laber, Klonus, Streber, & Pohlenz, 1995; Stidham & Singh, 1991).

### 1.2.2. Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados o inhibidores de la actividad ALS

Los productos herbicidas que inhiben procesos únicos (fotosíntesis, interacciones planta-hormona o biosíntesis de aminoácidos esenciales) en la planta han estado en auge estos últimos años, ya que pueden tener un gran potencial. Los aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados por mamíferos, por lo que los herbicidas que afectan a su biosíntesis presentan potencialmente una baja toxicidad hacia estos. Los aminoácidos desempeñan funciones esenciales tanto en el metabolismo primario como en el secundario, por lo tanto, al inhibirse su producción se afecta en cadena a todo el metabolismo de la planta en general.

Los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos se pueden dividir en tres grupos, según su mecanismo de acción: inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, inhibidores de la biosíntesis de glutamina e **inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificado** (Ray, 1989). En su conjunto, estos suponen el 42% del mercado mundial de herbicidas, siendo del 16% perteneciente a los inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (Peters & Streck, 2018). Este grupo de herbicidas tiene un gran interés por su eficacia, pero también por su baja toxicidad anteriormente mentada y las dosis de campo aplicadas, que son muy bajas.

El mecanismo de acción de los inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados es la inhibición de la primera enzima común de la ruta (FIGURA 5), la **acetolactato sintasa** (ALS), y por eso también se les conoce con el nombre genérico de inhibidores de ALS. Dentro de este grupo de herbicidas encontramos seis familias químicas: sulfonilureas, imidazolinonas, triazolpirimidinas, sulfonanilidas, triazolinonas y pirimidiniltiobenzoatos.

### 1.2.3. Sulfonilureas

Las sulfonilureas (FIGURA 6) se comercializan desde el año 1982. Este grupo de herbicidas fue desarrollado en los 80, principalmente por las empresas DuPont, American Cyanamid Company (comprada por BASF en el 2000) y por CIBA-Geigy (fusionada en Sygenta AG). Dentro de las sulfonilureas hay numerosas materias activas, como el etil-clorimurón, clorsulfurón, metil-halosulfurón, metil-metsulfurón, nicosulfurón, metil-primisulfurón, prosulfurón, rimsulfurón, metil-sulfometurón, metil-tifensulfurón y metil-tribenurón.

Las sulfonilureas controlan un amplio espectro de malas hierbas dicotiledóneas y también de algunas gramíneas. Estas son inhibidoras de crecimiento, el crecimiento de los tallos y las raíces se detiene. Con ligeros cambios en la estructura de la molécula se modifica la selectividad de los cultivos. Estas se absorben mediante el sistema radicular y de la parte aérea de la planta y se transportan con facilidad. Por lo general, muestran una actividad en suelo relativamente prolongada, algunas de ellas pueden persistir hasta dos años, y su movilidad en el suelo varía según los compuestos y el pH. Pero debido a su toxicidad reducida este grupo de herbicidas es muy utilizado.

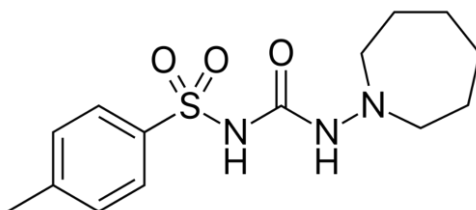


FIGURA 6. Estructura química de sulfonilureas.

### 1.2.5. Efectos fisiológicos de los inhibidores de la actividad ALS

Las sulfonilureas basan su control en la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada a través de la enzima ALS (FIGURA 5) y el proceso específico de inhibición se conoce con detalle (Duggleby, McCourt, & Guddat, 2008). Sin embargo, debido a que hay diferentes rutas metabólicas presentes en plantas y que interactúan entre sí, las consecuencias fisiológicas desde ese efecto primario hasta la muerte de la planta (es decir, lo que se conoce como modo de acción) no se conocen con exactitud. Hay diversos efectos fisiológicos como consecuencia de la aplicación de inhibidores de ALS que se han descrito en numerosos estudios y que pueden tener relación con la muerte de la planta. Por otro lado, también pueden presentar efectos secundarios, y que no tiene por qué suponer implicaciones en la letalidad provocada.

#### 1.2.5.1. Efectos en el crecimiento

Son los tejidos meristemáticos los que presentan los primeros síntomas tras la aplicación de estos herbicidas. La detención de la división celular da lugar a una inhibición en el crecimiento, tanto de la parte aérea como de la radicular (Wittenbach & Abell, 1999). Los tejidos maduros también se ven afectados, pero permanecen verdes y turgentes durante un largo periodo de tiempo, lo cual conlleva que la planta esté en estado de reposo de crecimiento durante semanas antes de morir. Esta diferencia en el tiempo de aparición de síntomas puede deberse a que los tejidos meristemáticos se ven afectados directamente, ya que requieren de altos niveles de aminoácidos para la división celular y el crecimiento, y tienen pocas reservas de proteínas. En cambio los



tejidos maduros al tener mayores reservas de proteínas pueden obtener aminoácidos, por lo que los síntomas tardan más en aparecer (Dale L. Shaner, 1991).

En estudios anteriores, la fotosíntesis no se vio afectada los primeros días de tratamiento, pero sí que se observó una inhibición a partir del quinto día en hojas de guisante si el herbicida es el clorsulfurón (Zabalza, Orcaray, Gaston, & Royuela, 2004).

#### **1.2.5.2. Efecto sobre aminoácidos libres**

Otro de los efectos producidos por los inhibidores de ALS es el incremento en el contenido de aminoácidos libres y una disminución de la proteína soluble (D.L. Shaner & Reider, 1986). Los herbicidas interfieren en los niveles de aminoácidos libres y proteína soluble, pero no mediante las proteínas preexistentes ni de las proteínas de nueva síntesis (Rhodes, Hogan, Deal, Jamieson, & Haworth, 1987), sino mediante el aumento de la tasa de renovación. Las plantas reaccionan rápidamente frente a los inhibidores renovando los niveles de aminoácidos degradando las proteínas ya existentes (Wittenbach & Abell, 1999). Por lo tanto, el contenido de proteínas disminuye aumentando así los niveles de aminoácidos libres. Para mantener las síntesis de nuevos polipéptidos se incrementa la degradación de los polipéptidos existentes, y el crecimiento es imposible en esas condiciones.

Esta inhibición tiene mayor efecto en los tejidos meristemáticos, ya que en estos la cantidad de proteínas es muy baja, y no pueden obtener aminoácidos de esa reserva tan reducida. Los tejidos maduros, al tener una mayor reserva de proteínas, pueden obtener aminoácidos durante un mayor tiempo, por ello los efectos no se ven en primera instancia, pero a la larga esa situación se vuelve insostenible.

#### **1.2.5.3. Efectos sobre el metabolismo del carbono**

Un efecto fisiológico descrito y muy discutido en plantas tratadas con inhibidores de ALS es la acumulación de carbohidratos en hojas, a pesar de no estar directamente relacionado con la biosíntesis de aminoácidos.

La acumulación de carbohidratos en las hojas podría ser causada por la disminución de las fuerzas de sumidero. Se ha observado que la acumulación total de azúcar soluble en las raíces se produce antes de la acumulación de almidón en las hojas tratadas tanto con imidazolinonas como sulfonilureas. El aumento de 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 esas condiciones, el gradiente de azúcares necesario para un transporte a larga distancia es anulado, y la carga de fotoasimilados en el floema se ve dañada. Todo esto indica que la acumulación de carbohidratos en las hojas es consecuencia de una disminución de las fuerzas sumidero (Zabalza et al., 2004).

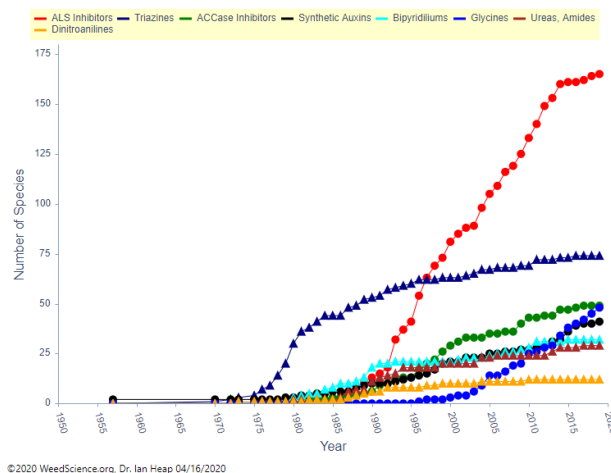
#### **1.2.5.4. Efectos sobre la ruta del shikimato y el quinato**

Se ha observado que los herbicidas que inhiben la biosíntesis de aminoácidos ramificados afectan a la vía del shikimato, acumulando ciertos metabolitos de metabolismo secundario. Uno de ellos es el quinato, un metabolito sintetizado en una ruta lateral de la ruta del shikimato. Además de la vía del shikimato, estudios anteriores también han demostrado un aumento de los metabolitos secundarios que se derivan de los aminoácidos aromáticos en plantas tratadas con sulfonilureas (Orcaray, Igal, Marino, Zabalza, & Royuela, 2010; Orcaray, Igal, Zabalza, & Royuela, 2011).

#### **1.2.6. Resistencia a los inhibidores de la actividad ALS**

Después de varios años de uso continuado surgieron algunas poblaciones con signos de resistencias (Wittenbach & Abell, 1999). Estas resistencias se atribuyen a la alta frecuencia de individuos resistentes en las poblaciones de malas hierbas, el uso repetido de un mismo herbicida y la actividad residual en el suelo de este grupo de herbicidas. Actualmente el número de especies

vegetales donde hay poblaciones resistentes a los inhibidores de la síntesis de aminoácidos ramificados es de 165 (Heap, 2020). La primera población resistente a los inhibidores ALS apareció el año 1982 (Heap, 2020). Algunos cultivos y malezas son tolerantes de manera natural debido a la rápida degradación del herbicida. Actualmente, los herbicidas inhibidores de la actividad de ALS son, entre todos los herbicidas, a los que mayor número de especies ha desarrollado alguna población resistente, y aunque parezca que esto se haya estabilizado siguen en aumento (FIGURA 7).



**FIGURA 7.** Crecimiento cronológico global del aumento de especies en las que hay por lo menos una población resistente, clasificadas por mecanismo de acción (Heap, 2020)

El principal mecanismo responsable de las resistencias en malas hierbas es distinto al descrito para la selectividad natural de los cultivos, y se debe a diferencias en el metabolismo. La resistencia de las malas hierbas a las sulfonilureas e imidazolinonas se debe a las mutaciones puntuales en el gen objetivo del enzima ALS, reduciendo su sensibilidad (Wittenbach & Abell, 1999). Se han descrito en varios casos la existencia de resistencias cruzadas, principalmente con las sulfonilureas y no tanto con las imidazolinonas. Cabe señalar que, en la mayoría de los casos detectados, los estudios se centraron únicamente en la identificación de la resistencia en la diana y no en lugares no diana. El rápido aumento de resistencias en comparación con otros modos de acción indica que estos pueden ser más propensos a las resistencias que otros (Yu & Powles, 2014).

**1.2.6.1. Mutaciones en la diana (TSR)**

En muchos casos, se han detectado mutaciones del gen ALS en la diana en la resistencia de malas hierbas a inhibidores de ALS, y la resistencia cruzada se infiere por la posición de esta en el gen. Se han descubierto mutaciones múltiples en un determinado lugar del gen de la ALS, por lo que las resistencias cruzadas también dependen de mutaciones específicas, de grupos químicos específicos dentro de los inhibidores de ALS y también de herbicidas específicos dentro de un grupo determinado, y en ocasiones de la propia especie que es tratada. Según estudios realizados, los niveles de resistencias cruzadas no pueden basarse en la respuesta a uno o dos herbicidas de un grupo químico concreto. Esto es importante en cuanto a las recomendaciones que se hacen de gestión de las resistencias para el control de malezas (Yu & Powles, 2014).

No todas las mutaciones de resistencia en la diana proporcionan una protección completa contra los daños causados por los herbicidas, especialmente a las tasas de aplicación en el campo. Algunas de esas resistencias se pueden dar de forma más débil, y hay que tenerlas en cuenta, hay que tener en cuenta todos los mecanismos de resistencia que permiten la supervivencia, tanto débiles como fuertes. Por ello, las mutaciones de resistencia débil permiten que el herbicida se una a la diana y estas plantas sufren más, su nivel de desarrollo es menor que los individuos con

una mutación más fuerte (Beckie, Warwick, Sauder, Lozinski, & Shirriff, 2011; Li, Yu, Han, Vila-Aiub, & Powles, 2013; Warwick, Xu, Sauder, & Beckie, 2008).

#### 1.2.6.2. Mutaciones fuera de la diana (NTSR)

En las plantas que muestran resistencia fuera de la diana, la cantidad de herbicida que alcanza al enzima ALS está por debajo de niveles letales, por lo que la planta sobrevive. Este tipo de resistencias puede ser conferida por varios mecanismos comentados en puntos anteriores, pero en este caso, se ha demostrado que no se trata de la translocación diferencial del herbicida. Lo que se ha podido observar ha sido que el aumento de la capacidad de metabolizar el herbicida es el mecanismo dominante de este tipo de resistencias (Délye, 2013; Délye et al., 2013; Powles & Yu, 2010; Preston, 2009). Ciertos estudios revelaron que la resistencia metabólica a herbicidas inhibidores de ALS en las malas hierbas imitan a los cultivos tolerantes a herbicidas. Algunas de las especies en las que se conoce este tipo de resistencia son: *Lolium rigidum*, *Sinapis arvensis* y *Echinochloa phyllopogon* (Park, Fandrich, & Mallory-Smith, 2004).

#### 1.2.6.3. Evolución de las TSR y NTSR

A concentraciones bajas de herbicidas inhibidores de la ALS se ha visto que estas mutaciones se han acumulado, confirmando la resistencia a este tipo de herbicidas. A esas bajas dosis a las malezas les da tiempo a asimilar el herbicida aplicado, acumulando tanto las resistencias débiles como las más fuertes. Cuando las dosis han sido altas en cambio (en casos estudiados con clorsulfurón) las plantas no son capaces de metabolizar tanta cantidad de herbicida y por lo tanto no sobreviven. Siendo así, la selección con un herbicida que se metaboliza puede dar lugar a una rápida evolución de la resistencia NTS si la tasa de selección del herbicida es lo suficientemente baja como para que algunos de los individuos sobrevivan. Por tanto, la selección de la TSR y la NTSR en una determinada población está relacionada con la frecuencia inicial de resistencia, los herbicidas seleccionados y las dosis de herbicidas empleadas. Dependiendo de la aptitud de esas resistencias y la ausencia de selección bajo diferentes ambientes, la frecuencia de las resistencias puede ser dinámica a través del tiempo (Christopher, Powles, & Holtum, 1992).

Por ello, hay que tomar medidas en el manejo de las malas hierbas, como alternar los herbicidas con otros componentes o herbicidas que tengan un mecanismo de acción diferente o rotación de cultivos. El conocer cómo funcionan los mecanismos de acción en profundidad es necesario para determinar el manejo adecuado y evitar la aparición de cualquier tipo de resistencias (Yu & Powles, 2014).

### 1.3. LA MALA HIERBA: *Papaver rhoeas* L.

La amapola, *Papaver rhoeas*, (FIGURA 8) es una planta diploide y dicotiledónea, considerada mala hierba en los cereales de invierno, afectando también a otros cultivos de invierno como colza y veza. Está distribuida como tal en el sudeste de Europa, en zonas con clima mediterráneo. La amapola es una maleza muy competitiva con el cultivo y es conocida por su gran capacidad de reducir el rendimiento de los cereales, pudiendo reducir el rendimiento del trigo hasta un 32% (Torra & Recasens, 2008). La capacidad de esta especie para invadir, crecer y persistir en los campos se le puede atribuir a su alta capacidad de formación de semillas, de 15.000 a 100.000 por planta, y que, además, son persistentes y presentan un periodo prolongado de germinación (Lezáun, Telletxea, & Goñi, 2018). En climas mediterráneos la amapola aparece en los cultivos en el mismo marco temporal, pero en climas templados la aparición de estas se da de forma escalonada, por lo que es muy importante conocer la dinámica poblacional a la hora de escoger los métodos de control, ya que dependiendo del marco temporal podría no haber competencia con el cultivo de interés (Colbach, Dürr, Roger-Estrade, Chauvel, & Caneill, 2006; Fernandez-Quintanilla et al., 2000; Norris, 1996). La temperatura, el suministro de agua, la sombra, la duración del día y la disponibilidad de nutrientes afectan a las plantas durante la producción de semillas, y pueden modificar el estado de latencia de las mismas. El fotoperiodo

durante la maduración de las semillas se ha relacionado con el estado de latencia de las semillas producidas (Donohue et al., 2005), y otros estudios han descubierto que las poblaciones con aparición más temprana producen semillas con mayor latencia (Mulugeta & Stoltenberg, 1998).



**FIGURA 8.** Flor de *Papaver rhoeas* (izquierda), fruto en cápsula donde se albergan las semillas (derecha) (UPNA, 2020).

**TABLA 3.** Poblaciones de *Papaver rhoeas* resistentes en España (Heap, 2020).

<b>Comunidades con poblaciones resistentes de <i>P. rhoeas</i></b>
Cataluña
Aragón
Rioja
Navarra
León
<b>Herbicidas a los que son resistentes</b>
Inhibidores de ALS
Auxinas sintéticas

La mejor manera de controlar *P. rhoeas* es mediante la aplicación de herbicidas, la más utilizada entre los agricultores, y entre ellos destacan los inhibidores de ALS. La utilización de los herbicidas desde los años 60 redujo las poblaciones de amapola, pero han desarrollado resistencias a los dos principales herbicidas que los controlaban, a las auxinas sintéticas (2,4-D) y a los inhibidores de ALS. La TABLA 3 muestra las comunidades donde se han encontrado poblaciones de amapola resistente y los grupos de herbicida a los que presentan resistencia. Debido al desarrollo de las resistencias, llevan más de 20 años produciendo graves infestaciones (Lezáun et al., 2018). El sistema de monocultivo ha dejado atrás los sistemas de control tradicionales y culturales, y como consecuencia, los agricultores se han visto obligados a renovar las técnicas de control más allá de la utilización de herbicidas.

La resistencia a los inhibidores de ALS en muchos casos se debe a una alteración en la enzima ALS, que provoca una menor sensibilidad al herbicida. La responsable de esta resistencia puede ser una mutación, como se identificó una sustitución de un solo nucleótido en uno de los dominios de la región del gen de ALS en *P. rhoeas*, donde la serina es sustituida por la prolina en la posición de aminoácido 197 (según la secuenciación en *Arabidopsis*), otorgando resistencia tanto a sulfonilureas como a auxinas sintéticas (Durán-Prado, Osuna, De Prado, & Franco, 2004; Scarabel, Pernin, & Délye, 2015). La resistencia a inhibidores de ALS ha continuado desarrollándose por la evolución de un conjunto de alelos mutantes de ALS y de mecanismos no

relacionados con la diana (Scarabel et al., 2015). En un estudio se vio que el 91,2% de la población resistente de amapola tratada contenía alelos de ALS mutado en el codón 197, pero aun y siendo así, otros estudios han demostrado que las plantas con genotipos idénticos en la ALS podrían mostrar distinta sensibilidad a las sulfonilureas (Délye, Pernin, & Scarabel, 2011; Scarabel et al., 2015), pudiendo no ser los únicos mecanismos de resistencia. Las plantas resistentes a los inhibidores de ALS sin poblaciones TSR, sugieren que los mecanismos de NTSR también se encuentran en esta especie y que pueden heredarse de generación en generación participando en la evolución de la resistencia. La prevalencia de NTSR en *P. rhoeas* podría estar subestimada porque estos mecanismos podrían estar presentes en la planta que también contienen alelos mutantes, y la presencia de alelos mutantes podría enmascarar los mecanismos NTSR (Délye et al., 2011; Scarabel et al., 2015). Los mecanismos NTSR pueden conferir resistencia cruzada o múltiple a herbicidas con diferentes mecanismos de acción (Délye et al., 2013). Aunque se han registrado resistencias a los inhibidores de ALS fuera de la diana, la detección de los alelos mutantes en la enzima ALS se considera la forma más rápida y precisa de diagnosticar la resistencia. Por ello, es importante identificar y conocer los mecanismos por los que se rigen las resistencias fuera de diana en *P. rhoeas*, y también para ayudar a la gestión de la resistencia y utilizar las técnicas de control adecuadas (Scarabel et al., 2015).

Las causas que pueden favorecer la aparición de resistencias son, no rotar cultivos, que el control sea únicamente químico y que se utilicen herbicidas con el mismo mecanismo de acción repetidamente (Comité para la Prevención de Resistencias a Herbicidas, n.d.). Para prevenir el desarrollo de nuevas resistencias a herbicidas en *P. rhoeas* es necesario utilizar prácticas de manejo integrado, tanto preventivas como culturales. Sin embargo, en cultivos de cereal en el mediterráneo el control químico y el laboreo son los principales métodos utilizados, y lo más común es la aplicación en postemergencia de herbicidas para todo tipo de malas hierbas, por lo general no se utilizan herbicidas preemergencia debido al sobrecosto o a la posible fitotoxicidad que puede transferirse a los cultivos (Torra, Cirujeda, Taberner, & Recasens, 2010). Varios métodos de cultivo que pueden prevenir la nascencia de esta planta son, el laboreo, ya que las semillas no pueden nacer si están a más de 2 cm de profundidad, utilizar la rotación de cultivos, el barbecho y el control mecánico o químico de la amapola en esas zonas y la utilización de densidades de siembra adecuadas para tener un cultivo competitivo (Comité para la Prevención de Resistencias a Herbicidas, n.d.).

#### 1.4. QUINATO

El denominado quinato es ácido quínico, (ácido 1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexanocarboxílico) (FIGURA 9) y está ampliamente distribuido en plantas tanto superiores como inferiores. A pH fisiológico, el ácido quínico se encuentra en su forma iónica, que es el quinato. El quinato se metaboliza en las plantas a partir de una ramificación lateral de la ruta del shikimato, el cual biosintetiza el corismato, precursor de aminoácidos aromáticos. La ruta del shikimato depende de la glucólisis y de la ruta de las pentosa fosfato, de donde toman el PEP y la eritrosa-4P, respectivamente, los dos compuestos iniciales que requiere la ruta del shikimato (Ghosh, Chisti, & Banerjee, 2012).

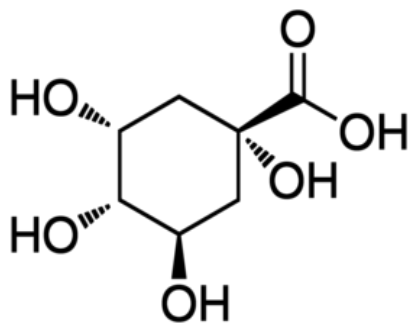


FIGURA 9. Estructura del ácido quínico (C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Sigma-Aldrich).

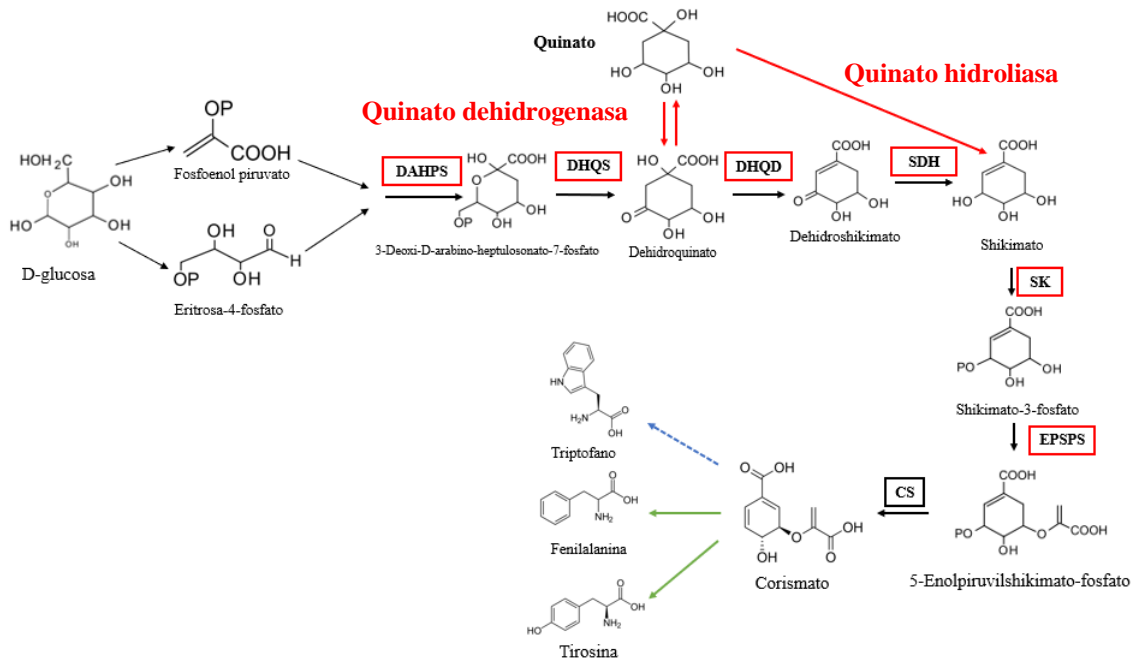
El ácido quínico es un metabolito ampliamente distribuido y abundante en plantas superiores, sobre todo en especies leñosas, donde su concentración puede superar el 8% de la masa seca de las hojas. Además, la mayoría de las especies que acumulan quinato no contienen una cantidad significativa de shikimato, y viceversa. El shikimato se acumula principalmente en gimnospermas y el quinato en angiospermas (Yoshida, Tazaki, & Minamikawa, 1975). Sin embargo, los dos ácidos alicíclicos presentan un patrón de acumulación similar a lo largo del año, con un pico en primavera durante el periodo de crecimiento intenso, y una disminución de su contenido en verano. Este patrón de comportamiento básico sugiere que estos compuestos podrían acumularse en el primer momento como resultado de la activa actividad fotosintética en las hojas y luego usados como fuente de carbono para la síntesis de una amplia gama de compuestos fenólicos y particularmente ligninas, que se acumulan sobre todo en las plantas leñosas.

El quinato es un precursor de dépsidos, como el ácido clorogénico, un compuesto ampliamente distribuido y acumulado en las plantas. El destino final del quinato, cuando se acumula en grandes cantidades, como ocurre en las hojas de las plantas leñosas, puede no estar restringido únicamente a la síntesis de dépsidos. Como se ha descrito anteriormente, una gran parte del flujo de carbono proveniente del quinato se transforma en fenilpropanoides y se utiliza probablemente para la síntesis de lignina (Boudet, 2012).

Las plantas pueden utilizar el quinato como fuente de carbono alicíclico para sintetizar aminoácidos aromáticos (Herrmann & Weaver, 1999; Carola Leuschner & Schultz, 1991). En un estudio con glucosa marcada radiactivamente se estudió la ruta del shikimato durante la iniciación de los tallos en callos de tabaco y se observó una elevada incorporación de glucosa en el quinato, lo que sugería el papel del quinato como reserva de carbono en la ruta del shikimato (Beaudoin-Eagan & Thorpe, 1983). Estudios posteriores de los autores dieron a conocer el papel del quinato como regulador de la ruta de la biosíntesis de corismato (Beaudoin-Eagan & Thorpe, 1984).

El catabolismo del quinato está bien caracterizado en microorganismos. Este compuesto, que representa hasta el 10% (p/p) del material vegetal en descomposición, puede ser utilizado como una fuente importante de carbono para los microorganismos del suelo, que no producen quinato, pero si pueden inducir una vía específica para catabolizarlo.

A pesar de la marcada acumulación de quinato en plantas superiores, su metabolismo no es del todo conocido. Las plantas pueden sintetizar quinato o incluirlo en la ruta a partir del dehidroquinato por la enzima reversible quinato dehidrogenasa, (Bentley & Haslam, 1990; C. Leuschner, Herrmann, & Schultz, 1995). Además, el quinato puede volver a entrar en la vía del shikimato como shikimato catalizado por la quinato hidrolasa (FIGURA 10).



**FIGURA 10.** Ruta del shikimato (Modificado de Ghosh et al. 2012). Abreviaturas de las enzimas: **DAPHS**: 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa; **DHQS**: dehidroquinato sintasa; **DHQD**: dehidroquinato deshidratasa; **SDH**: shikimato deshidrogenasa; **SK**: shikimato quinasa; **EPSPS**: 5-enolpiruvilshikimato-fosfato sintasa; **CS**: corimato sintasa.

En varios estudios se ha descrito que los herbicidas sulfonilureas estimulan el metabolismo secundario derivado de los aminoácidos aromáticos (J. C. Suttle & Schreiner, 1982; J. Suttle, Swanson, & Schreiner, 1983), en la cual participa el shikimato y esto lleva a una acumulación de ácidos hidroxicinámicos. Además, el quinato también se acumula en las hojas tratadas con herbicidas inhibidores de ALS (Orcaray et al., 2010). La acumulación de quinato puede desarrollar un efecto tóxico de los tratamientos con herbicida, y, por otra parte, el mismo quinato puede imitar un efecto herbicida (Orcaray et al., 2010).

## 1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El desarrollo incesante de las resistencias que han surgido contra los inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados ha intensificado los estudios sobre el funcionamiento de los mecanismos de acción de los herbicidas empleados para el control de las malezas. Esto ha arrojado luz sobre procesos fisiológicos no conocidos y pueden ayudar a entender mejor el comportamiento de los herbicidas en las plantas, a sintetizar herbicidas con modos de acción o utilizar otros compuestos con carácter herbicida y así poder evitar el desarrollo de más resistencias.

En estudios anteriores sobre el modo de acción de los inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados se han encontrado acumulaciones de ciertos metabolitos, como el quinato, acumulado sobre todo en las hojas (Orcaray et al., 2010). La acumulación de quinato es un efecto común detectado en los herbicidas inhibidores de aminoácidos, por ello el quinato podría ser el causante del efecto tóxico, o bien podría ser uno de los múltiples efectos secundarios que se desencadenan después de la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos. Por ello, se planteó su potencial utilización como compuesto herbicida. Se trata de una aproximación diferente a la aplicación de herbicidas, ya que se basaría en utilizar compuestos que se acumulan durante el proceso de la muerte de las plantas tras el tratamiento de herbicidas. La utilización de compuestos

naturales y no de síntesis presenta ventajas medioambientales, al presentar una menor persistencia sobre el suelo.

Estudios previos evaluaron la aplicación de este compuesto de forma exógena para evaluar su carácter fitotóxico (Zulet, Zabalza, & Royuela, 2013), comprobándose su fitotoxicidad en plantas de guisante. Estudios recientes también han valorado en *Amaranthus palmeri* si la aplicación de quinato exógeno mejoraba la eficiencia del glifosato, observando que aumentó la fitotoxicidad del herbicida (Zulet-González, Fernández-Escalada, Zabalza, & Royuela, 2019). Intentando avanzar en su aplicabilidad, en un trabajo anterior del grupo de investigación donde se ha desarrollado este Trabajo Fin de Grado se valoró la fitotoxicidad del quinato en diferentes especies de malas hierbas para estudiar su utilización en el control de las mismas. En dicho estudio se llevaron a cabo aplicaciones foliares para simular las condiciones de aplicación de campo sobre 6 especies de malas hierbas: *Sinapis alba*, *Lolium rigidum*, *Bromus diandrus*, *Cynodon dactylon* y *Papaver rhoeas*. De entre todas las especies evaluadas en este trabajo se observó que la aplicación de quinato tenía un mayor efecto sobre *Papaver rhoeas* (Zulet-González, 2013).

Con todos estos antecedentes, este estudio se enmarca en los retos actuales de la búsqueda de nuevos ingredientes activos con acción herbicida a partir de compuestos de síntesis natural, el control del desarrollo de resistencias y la comprensión de los procesos fisiológicos que ocurren mediante la aplicación de estos. Además de ayudar a la utilización de los herbicidas con mayor eficiencia, aliviar la presión de selección causada por los herbicidas actuales y el manejo sostenible en cuanto el medio ambiente.



## 2. OBJETIVOS

Desde su descubrimiento, los herbicidas han supuesto un gran avance en la historia de la agricultura contra las malas hierbas. Ayudando sobre todo en comodidad, y pudiendo aumentar las rentabilidad y rendimiento de sus cultivos. En cambio, todo esto que en un principio parecieron facilidades ha provocado varios problemas; el uso indiscriminado y repetido de estos compuestos químicos con mismo mecanismo de acción ha generado un aumento de la aparición de malas hierbas resistentes a estos compuestos, que en consecuencia imposibilitan su control. Sumándose que estos herbicidas pueden afectar negativamente a los suelos, las aguas superficiales y subterráneas y provocar contaminación ambiental. En este contexto una alternativa interesante es utilizar productos de origen natural, cuya mayor degradabilidad por los microorganismos del suelo los hacen más interesantes desde el punto de vista medioambiental.

El quinato es un metabolito secundario sintetizado en una rama de la ruta del shikimato que ha demostrado su potencial fitotóxico sobre plántulas de la mala hierba amapola (*Papaver rhoeas*). En este trabajo se plantea **optimizar dicho potencial fitotóxico sobre la amapola** estableciendo la dosis mínima de control según el estado fenológico en el momento de aplicación y **estudiar su aplicabilidad en el control de poblaciones de dicha mala hierba resistentes a herbicidas inhibidores de ALS.**

Para desarrollar este objetivo general se llevaron a cabo **dos ensayos específicos**, los cuales tienen relación directa y dependencia respectivamente.

- En el **primer ensayo**, el objetivo es conocer la dosis de quinato mínima para realizar un control sobre las poblaciones, para lo que se pulverizaron diferentes dosis del compuesto sobre plantas de una población sensible en diferentes momentos fenológicos, crecidas en invernadero en condiciones controladas.
- En el **segundo ensayo** se utilizaron poblaciones sensibles y resistentes y se les aplicó la dosis de quinato escogida según el primer ensayo, un herbicida sulfonilurea y una mezcla de ambos para ver los posibles diferentes efectos. El objetivo es evaluar la fitotoxicidad de los distintos tratamientos, utilizando como parámetros la biomasa y los principales marcadores fisiológicos descritos para los herbicidas inhibidores de la ALS.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. ESPECIE EMPLEADA

En el siguiente trabajo la especie empleada es la amapola (*Papaver rhoeas* L.). A continuación, se presenta la especie, su descripción botánica y sus características como mala hierba.

**Amapola *Papaver rhoeas* L.**

**Clase:** Magnoliopsida

**Familia:** Papaveraceae

**Género:** Papaver

**Especie:** *Papaver rhoeas* L.

La amapola es una planta anual, que germina en otoño-invierno, pero puede tener una nascencia escalonada que puede alargarse hasta primavera, puede alcanzar hasta 60 cm de altura. Nace en forma de roseta, con un tallo erecto, poco ramificado y con pilosidad simple. Cotiledones sésiles, lineares. Las hojas alternas y sin peciolo son pinnadas y muy dentadas, las tres primeras son muy pequeñas. Las hojas superiores son sentadas. Las plantas de esta familia son dicotiledóneas talamifloras con flores hermafroditas normalmente regulares y de colores vívidos, rojo, amarillo, violeta o blanco. Su cáliz está formado por dos sépalos herbáceos caducos, que se desprenden una vez la flor se abre. La corola formada por cuatro pétalos es muy frágil, se desprenden muy fácilmente (FIGURA 8). Su fruto es capsular, subglobosa, redondeada en la base con numerosas semillas, puede producir de 15.000 a 100.000 semillas por planta (FIGURA 8).

Actualmente, no se conoce el origen de esta especie, pero se encuentra distribuida por toda Europa, Asia y el norte de África. Esta planta ha tenido y tiene diversos usos, así como para consumo como alimento y elaboración de cosméticos, pero por lo que a nosotros compete es por ser una de las malas hierbas más frecuentes en cereales de invierno. La gran cantidad de semillas y su pequeño tamaño son un gran problema, ya que se pueden transportar grandes distancias y también pueden permanecer en latencia durante muchos años cuando están enterradas y germinar cuando salgan a la superficie. Por ello, su extinción en la parcela es muy complicada y el llevar a cabo labores profundas no ayuda al problema, y a esto se le suma la aparición de poblaciones resistentes a herbicidas.

#### 3.2. ENSAYO 1: Determinación de la dosis de quinato y estado fenológico de aplicación del tratamiento

##### 3.2.1. Siembra

Para la determinación de la dosis de quinato mínima para el control de amapola, se utilizó una población sensible a las sulfonilureas. Las semillas se compraron a una casa de semillas y se sembraron en bandejas de 0.125m<sup>2</sup> (50 x 25 x 7cm) con 9 orificios de drenaje, con perlita y turba fertilizada en relación 1:1. Para realizar la siembra se utilizaron viales de 7 mL con un tapón agujereado, asegurándose que por estos orificios pudieran pasar las semillas, estas se distribuyeron por cada bandeja al azar. En cada uno de los viales se estableció según el número de semillas en cuanto a su peso y una relación de semillas establecido según lo indicado en la TABLA 4 (Zulet-González, 2013).

**TABLA 4.** Dosis de siembra aplicada en cada una de las bandejas, expresada en g/m<sup>2</sup> y plantas/m<sup>2</sup>.

	g semillas m <sup>-2</sup>	DENSIDAD DE PLANTAS (plantas m <sup>-2</sup> )
<i>Papaver rhoeas</i>	1,6	19000

Una vez esparcidas las semillas por la parcela se aplicó un tratamiento de giberelinas (GB<sub>3</sub>) mediante pulverización, 10 mL por bandeja de una solución al 0,3% (p/v), después se cubrieron las semillas con la misma mezcla de perlita y turba.

### 3.2.2. Condiciones de crecimiento

Preparadas las bandejas se dejaron en las mesas de los invernaderos de la finca de prácticas la última semana de septiembre. Como se ha detallado anteriormente, el sustrato era una mezcla de perlita y turba fertilizada, y estas se regaron una vez al día durante un minuto mediante el riego automático (FIGURA 11).



**FIGURA 11.** Mesas del invernadero con las bandejas

### 3.2.3. Aplicación foliar del quinato y diseño experimental

La aplicación del compuesto quinato (Sigma-Aldrich) se realizó mediante pulverización con un compresor. Como en este caso se quería determinar qué dosis era la óptima para el control de la amapola, se aplicaron 5 dosis diferentes, de 25, 50, 100, 200 y 400 mM, junto con un surfactante (Biopower 27,65% (p/v), Bayer CropScience) al 0,2% (v/v), con el objetivo de que el quinato pudiera infiltrarse mejor. Las parcelas control, fueron pulverizadas únicamente con el surfactante.

Los tratamientos fueron aplicados en dos momentos fenológicos diferentes de las plántulas: con 4 hojas verdaderas y con 6-8 hojas verdaderas.

El número de bandejas utilizada fue 24, para los 6 tratamientos distintos y, para dos estados fenológicos distintos. Cada una de las bandejas representaba dos parcelas elementales, en total 48 parcelas. De cada tratamiento y estado fenológico se realizaron 4 réplicas.

Para la preparación de la solución, primero se preparó la de mayor dosis de quinato (400 mM), y de esta se fueron obteniendo las demás concentraciones por sucesivas diluciones. Se ajustó el pH de las soluciones debido a que al añadir quinato y/o surfactante el pH baja, por lo que se debía ajustar mediante NaOH entre 6-6,5. Se aplicó un volumen de caldo de 15 mL por cada mitad de bandeja.

#### 3.2.4. Determinación de la biomasa

El muestreo se realizó 18 días después de la aplicación foliar de los tratamientos. Se analizó visualmente el efecto del quinato sobre la población. Se determinó el peso fresco del material vegetal por cada parcela elemental, y una vez pesadas se secaron durante 48 horas a 75°C en una estufa para obtener el peso seco, también por cada uno de los tratamientos.

#### 3.2.5. Análisis estadístico

Para obtener la curva de dosis-respuesta y estimar la DE50 del tratamiento de quinato se utilizó el modelo log-logistic sigmoidal de 4 parámetros del programa Sigma Plot 14.0 (Seefeldt, Jensen, & Fuerst, 1995). La variable respuesta (y), en este caso, correspondía con el % de peso fresco de la parte aérea de plantas tratadas respecto al peso fresco de la parte aérea de las plantas control. La expresión matemática correspondiente al modelo no lineal utilizado es el siguiente:

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

Donde:

C: límite inferior

D: límite superior

b: pendiente

I<sub>50</sub>: dosis que da una respuesta del 50%

### 3.3. ENSAYO 2: Valoración de la aplicación de quinato, un herbicida sulfonilurea y su mezcla sobre poblaciones sensible y resistente de amapola

#### 3.3.1. Siembra y condiciones de crecimiento

En el segundo ensayo se procedió de la misma forma que en el ensayo 1, solo que esta vez utilizamos también una población resistente, con la misma densidad de plantación. Las semillas resistentes fueron facilitadas por el Dr. Montull y en ellas se había comprobado su resistencia a sulfonilureas mediante ensayos dosis-respuesta.

La siembra y las condiciones de crecimiento fueron las mismas que en el ensayo 1. Se utilizaron las mismas bandejas, el mismo sustrato y se aplicaron giberelinas para ayudar a la germinación. Las plantas crecieron en el invernadero de la finca de prácticas de la ETSIAB.

En este caso utilizamos 26 bandejas, 13 bandejas para la población sensible y 13 bandejas para la población resistente.

### **3.3.2. Aplicación foliar de los tratamientos**

Todos los tratamientos se realizaron mediante pulverización. A cada una de las poblaciones se les aplicó 4 tratamientos: un tratamiento control, la dosis de quinato seleccionada tras la valoración del ensayo 1, el herbicida sulfonilurea y la mezcla en la misma solución del quinato y herbicida. En este ensayo se aplicaron 15 mL en toda la bandeja (debido a que la cantidad de plantas es menor), lo que supuso un volumen de caldo de 1200 L/ha.

El primer tratamiento, el control, se basó en una solución al 0,2%, el mismo surfactante utilizado en el ensayo 1, (Biopower 27,65% (p/v), Bayer CropScience) el cual fue añadido en todos los tratamientos en la misma cantidad.

El segundo tratamiento, el de quinato, fue aplicado a la dosis de 100 mM junto con el surfactante. Se ajustó el pH entre 6-6,5.

El tercer tratamiento, fue únicamente la aplicación del herbicida Pacifica Plus (iodosulfuron-metil-sodio 1%, amidosulfuron 5% y mesosulfuron-metil 3%, Bayer CropScience). Según las instrucciones del fabricante, la dosis a aplicar es de entre 300-500 g/ha, por lo que se utilizó un valor medio, 400 g/ha. A dicha dosis de herbicida se le añadió el surfactante y se equilibró el pH.

El último tratamiento fue la aplicación conjunta del herbicida y el quinato, por lo que se pesaron las cantidades de los tratamientos anteriores en el mismo volumen establecido, con la misma cantidad de surfactante y con el pH equilibrado.

### **3.3.3. Contenido de clorofila, biomasa y muestreo**

Las bandejas del ensayo dos se dividieron en dos lotes, uno para muestrear a corto plazo (lote 1) y otro para evaluar la biomasa a los 18 días, análogamente a cómo se hizo en el ensayo 1 (lote 2).

El lote 1 se muestreó a los 3 días después de la aplicación del tratamiento, utilizándose solo la parte aérea. Se determinó el contenido de clorofila de las hojas verdaderas de las plantas de amapola. Además, se obtuvieron discos, 4-5 viales por tratamiento con 2 discos cada uno de una planta, para la determinación de shikimato. Los discos de 4 mm de diámetro se obtuvieron con un microperforador Harris uni-core™ (Healthcore, Bucks, UK). El resto de la parte aérea se muestreó en viales individuales (5-6 por tratamiento) y se congeló con nitrógeno líquido. Los viales con los discos y con el resto de material vegetal fueron conservados a -80 °C hasta su utilización para las determinaciones analíticas.

Las muestras congeladas en los viales fueron reducidas a polvo mediante un microdesmembrador MM200 Retsch® (Retsch®, Haan, Germany), siempre manteniéndolas a temperaturas muy bajas para impedir que el material vegetal se descongelase, utilizando para ello nitrógeno líquido. Una vez obtenido el polvo de las muestras, se prepararon alícuotas de 0,05 g aproximadamente, para utilizarlas en las diferentes determinaciones analíticas.

Del lote 2, 18 días tras la aplicación de los tratamientos se cosechó la parte aérea para la determinación de biomasa y algunas plantas se dejaron sin muestrear para poder ver la letalidad de los tratamientos. Las muestras cosechadas, después de anotar su peso fresco, se secaron en estufa a 75 °C durante 48 h, para su posterior utilización en la determinación del peso seco.

### **3.3.4. Determinación de clorofila**

La medición de clorofila de las plantas del lote 1 se realizó mediante la medición no destructiva con un medidor SPAD-502 (Konica-Minolta, Osaka, Japan) y fue expresada en

unidades arbitrarias. Todas las determinaciones se hicieron en hojas verdaderas de las plantas y se tomaron seis réplicas por tratamiento.

### **3.3.5. Determinaciones analíticas**

#### **3.3.5.1. Determinación de la concentración de shikimato**

Para la determinación del shikimato se utilizaron los discos obtenidos de las plantas del lote 1. Los discos de cada tratamiento, que se encontraban almacenados congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se incubaron en un medio de HCl 0,25 M durante 1,5 h (100  $\mu\text{l}$  por disco), agitando de vez en cuando. De esta forma se extrajo el shikimato de los discos (Koger et al., 2005). Los viales fueron conservados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización para la determinación de shikimato.

La determinación del shikimato se realizó mediante espectrofotometría según el método de (Cromartie & Polge, 2000). El extracto obtenido de los discos se dispuso en una microplaca (25  $\mu\text{L}$ , de cada eppendorf conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) donde en otros pocillos se realizaron diferentes soluciones con una concentración gradual de shikimato conocido (0, 3, 6, 12, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A todos los pocillos se les añadió ácido periódico: metaperiodato (0,25%/0,25%, p/v) (100  $\mu\text{L}$ ). La microplaca se incubó 1 h en oscuridad y después se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de NaOH:sulfito de sodio (0,6 M/0,22 M). Se determinó la absorbancia a 380 nm.

#### **3.3.5.2. Extracción de aminoácidos libres**

Para la extracción de aminoácidos libres se utilizó el método descrito por (Hacham, Avraham, & Amir, 2002). Se tomaron las muestras de 0,05 g y se les añadió 200  $\mu\text{L}$  de agua:cloroformo:metanol (3:5:12 v/v). seguidamente se centrifugaron a 16.000 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se repitió el mismo proceso dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos de cada centrifugación se recuperaron en un único vial, y se le añadió 250  $\mu\text{L}$  de una mezcla cloroformo:agua (2:3). Se centrifugó otros 2 minutos, y se obtuvieron dos fases. La fase superior fue descartada y la fase inferior se evaporó completamente en un baño de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  con aire comprimido a una presión de 1,3 bar durante 1 h (Turvo Vap LV Evaporator, Zymark, Hopkinton, MA). Una vez se hubo evaporado todo, el contenido se resuspendió en 750  $\mu\text{L}$  de agua, y se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en la determinación de aminoácidos.

#### **3.3.5.3. Determinación de aminoácidos libres por electroforesis capilar**

Para la determinación de la cantidad de cada aminoácido se añadieron a los extractos concentraciones conocidas de norvalina y ácido homoglutámico, aminoácidos que se utilizaron como estándares internos. A continuación, se derivatizaron con una solución de (FITC isotiocianato de fluoresceína) (1 mM) en acetona y se diluyeron (1:5) con tampón borato 20 mM, pH 10.

El contenido en aminoácidos libres de los extractos fue determinado mediante un equipo de electroforesis capilar Sciex MDQ Plus (compuesto por un capilar de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro y de longitud 43/53,2 cm). El tampón utilizado para la separación fue una solución de bórax (50 mM) y  $\alpha$ -ciclodextrina (45 mM, pH 9,2). La electroforesis se realizó a un voltaje de 30 kV y  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La detección por fluorescencia se realizó con un láser a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión.

### **3.3.6. Análisis estadístico**

A los resultados del ensayo 2 pertenecientes a las muestras control se les realizó la prueba t-Student para la determinación de las diferencias entre las medias de las poblaciones sensibles y resistentes. En caso de existir, ( $p < 0.05$ ) se detalla en las gráficas con un asterisco y se comenta en el texto.

Los resultados del ensayo 2 se evaluaron aplicando un análisis de la varianza (ANOVA) simple entre los 4 tratamientos aplicados para cada una de las poblaciones. Se realizó una comparación de medias según el test de Tukey de la mínima diferencia significativa. Los resultados significativamente diferentes dentro de una misma población para una  $P < 0,05$  se indican en las gráficas con letras diferentes. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 25.0 para Windows. Fue necesario transformar los datos de aminoácidos expresados en porcentaje a arcoseno  $\sqrt{x\%/100}$  antes del análisis de la varianza.



**4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**4.1. RESULTADOS DEL ENSAYO 1**

En el ensayo 1 se aplicaron diferentes concentraciones de quinato a plantas de amapola en dos estados fenológicos distintos. A continuación, se muestran los resultados de cada estado fenológico: 4 hojas verdaderas y 6-8 hojas verdaderas.

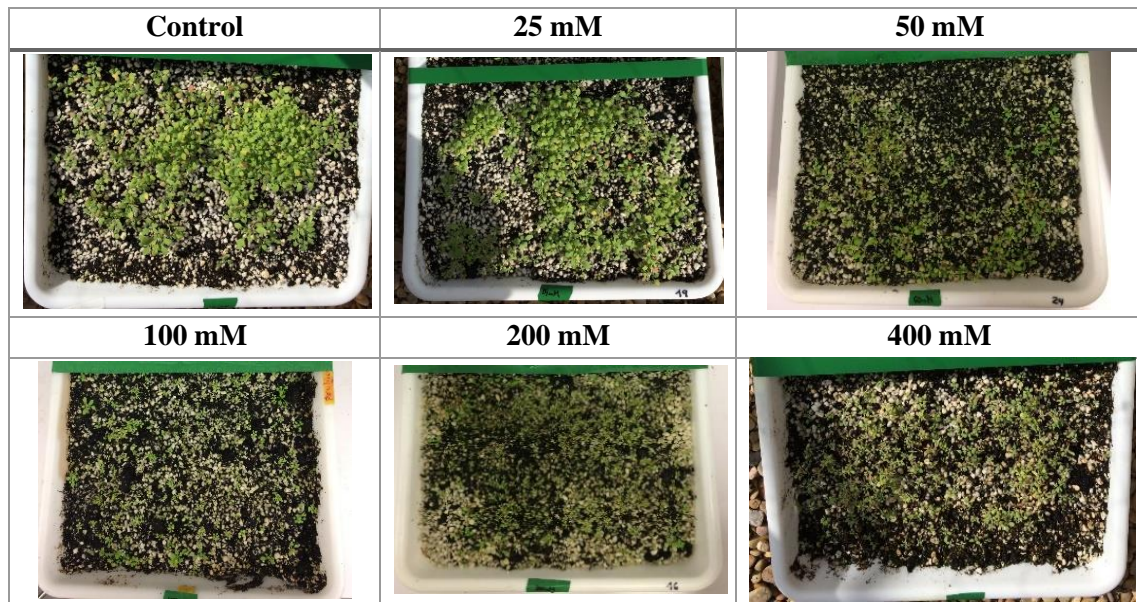
**4.1.1. Efectos del quinato aplicado a plántulas con cuatro hojas verdaderas**

Las plantas fueron muestreadas 18 días tras la aplicación del quinato (0, 25, 50, 100, 200 y 400 mM), que se había aplicado cuando se encontraban en un estado fenológico donde se habían desarrollado los 2 cotiledones y mostraban 4 hojas verdaderas.

Se comparó el peso fresco y el peso seco de las bandejas tratadas frente a las plantas control que únicamente contaban con el surfactante Biopower (Control). Sin embargo, al tratarse de plantas de tamaño pequeño los pesos obtenidos presentaron un gran error. No se pudieron procesar para evaluar diferencias significativas ni para realizar una curva de dosis-respuesta, por lo que solo se realizó un análisis visual.

En la TABLA 5 se muestran las imágenes tomadas a 18 días después de la aplicación de los tratamientos. Como se puede apreciar en las fotos, se detectó visualmente un descenso de la biomasa por superficie en presencia de las dosis más altas de quinato aplicadas.


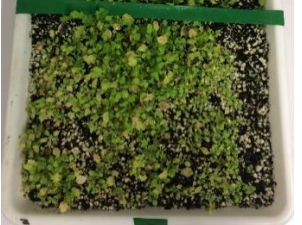
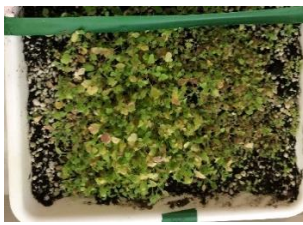
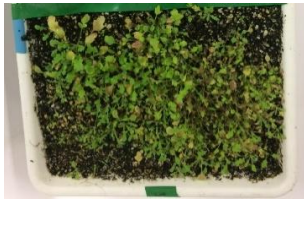


**TABLA 5.** Aspecto de las plantas a los 18 días tras la pulverización de diferentes dosis de quinato (0, 25, 50, 100, 200 y 400 mM) sobre plántulas de *Papaver roheas* L. sensible, aplicado cuando las plántulas contaban con 4 hojas verdaderas.



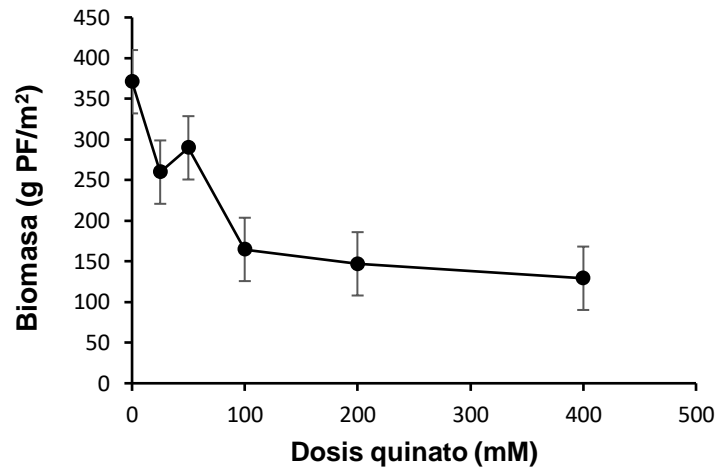
**4.1.2. Efectos del quinato aplicado a plántulas con 6-8 hojas verdaderas**

Con las plántulas de 6-8 hojas verdaderas se procedió de la misma forma que con las plántulas más jóvenes. A continuación, se muestran las imágenes tomadas 18 días después de la aplicación de los tratamientos (TABLA 6). Mediante los pesos obtenidos con estas plantas se realizaron los ensayos dosis-respuesta.

**TABLA 6.** Plántulas de *Papaver rhoeas* L. 18 días después de haber sido tratadas con quinato a las diferentes dosis aplicadas (0, 25, 50, 100, 200 y 400 mM). Los tratamientos fueron aplicados en el estado fenológico de 6-8 hojas verdaderas.

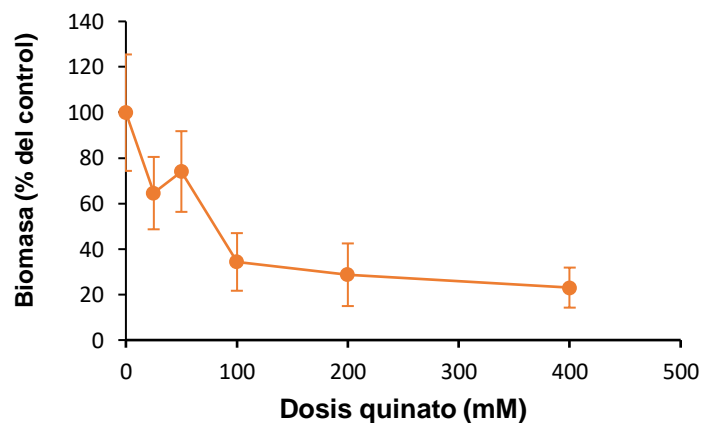
Control	25 mM	50 mM
		
Las plantas tratadas con Biopower no mueren.	Las plántulas han crecido, pero se ve una coloración amarilla en la mayoría de las plántulas.	Hay crecimiento, menos notable, se ve una coloración amarillenta y tonos rojizos en las hojas.
100 mM	200 mM	400 mM
		
Hay crecimiento, pero muchas plantas mueren.	No hay crecimiento, las plantas han perdido su color verde y muchas mueren.	La mayoría de las plantas mueren, las que no, han perdido su color o están deterioradas.

En el ensayo de dosis-respuesta después de aplicar el quinato se evaluó el peso fresco por unidad de superficie (FIGURA 12). A pesar de que la variabilidad era alta en el peso fresco de las hojas, se ve un descenso de la biomasa de la población proporcional a la dosis empleada.



**FIGURA 12.** Efecto de la pulverización de quinato sobre el control de *Papaver rhoeas*, expresado en **gramos de peso fresco por metro cuadrado**. Los tratamientos fueron aplicados en el estado fenológico de 6-8 hojas verdaderas (n =4). Para cada concentración se muestra la media  $\pm$  error estándar.

Se expresó la cantidad de biomasa en % respecto al tratamiento control (FIGURA 13), se observó partir de la dosis 100 mM que hay una notable disminución de biomasa, del 50% comparándola con la dosis 50 mM, y mayor del 60% comparándola con el tratamiento control.



**FIGURA 13.** Efecto de la pulverización de quinato sobre el control de *Papaver rhoeas*, expresado en **% en respecto al tratamiento control**. Los tratamientos fueron aplicados en el estado fenológico de 6 hojas verdaderas (n = 4). Para cada concentración se muestra la media  $\pm$  error estándar.

Los estudios de dosis-respuesta son muy importantes en estudios de malherbología, sobre todo desde el desarrollo de resistencias a los herbicidas. La relación dosis-respuesta se utiliza para evaluar la eficacia del herbicida y relaciona numerosos conceptos relacionados con la misma, como selectividad, tolerancia, resistencia, sinergismo y antagonismo.

Las líneas dosis-respuesta no son lineales y la curva típica es de forma sigmoideal. En nuestro estudio la biomasa no presentaba una respuesta lineal a la dosis de quinato, por lo que se consideró utilizar otro método para modelizar la respuesta del parámetro, un modelo en el que la correlación fuese mejor.

El método log-logistic es el más apropiado para analizar la mayoría de los estudios de dosis-respuesta. Este método se desarrolló originalmente en farmacología en la década de los 60 y se ha ido extendiendo a otros campos. En ensayos europeos de malherbología se ha utilizado con mucho éxito en los últimos años (Seefeldt et al., 1995). El método log-logistic permite comparar mejor los resultados entre experimentos, ya que todos se realizan utilizando los mismos parámetros (Green & Streibig, 1993).

La curva donde se representa la relación dosis-respuesta según este método se presenta el apartado 3.2.5. de Materiales y Métodos. Se representa bajo la siguiente fórmula:

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

Donde:

C=Límite inferior

D=Límite superior

b=Pendiente

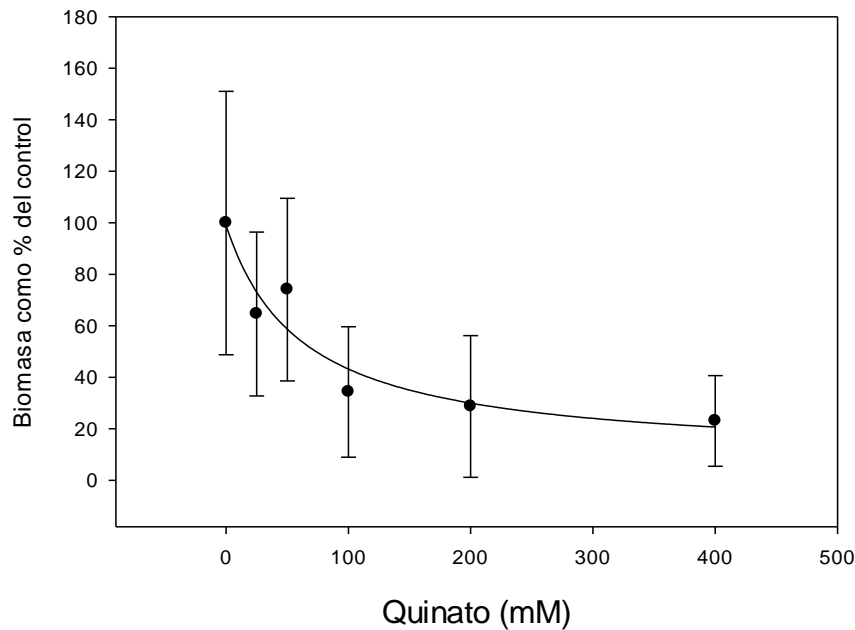
I50=Dosis que da una respuesta del 50%.

Una de las ventajas de este método es que los parámetros son biológicamente significativos: el límite superior (D) corresponde a la respuesta media a dosis muy altas y el límite inferior (C) es la respuesta media a dosis muy bajas. El parámetro b describe la pendiente de la curva alrededor del I50. Cuanto mayor es el valor de b, más pronunciada es la pendiente de la curva.

La dosis 50%, ya sea I50, para 50% de daño o inhibición; GR50 para reducción del crecimiento del 50%; LD50 para una dosis letal del 50%; o EC50 para el 50% de dosis efectiva; es muy utilizada. Se recurre mucho a ella ya que normalmente es la estimación de dosis más precisa de la sensibilidad de las plantas a un herbicida. Otras estimaciones de sensibilidad, como la I90, están sujetas a mayor error, a no ser que el experimento haya sido diseñado específicamente para esa estimación (Seefeldt et al., 1995).

Se aplicó, por tanto, el modelo log-logistic para el ajuste de la dosis-respuesta de la biomasa expresada en % y para la estimación de la EC50 (FIGURA 14). Evaluando los resultados obtenidos para las dosis anteriormente descritas se obtuvieron los siguientes valores para los parámetros que evalúa dicho modelo:

- Límite superior            90,4
- Límite inferior            1
- EC50                        62,2



**FIGURA 14.** Modelo log-logistic para el ajuste dosis-respuesta de la biomasa expresada en % correspondiente a la fórmula anterior, de la cual se obtuvo los valores de los parámetros evaluados (D, C y EC50).

El valor EC50 obtenido indica la dosis a la cual la población se reduce en un 50%, lo que indica un control. A partir de dosis de **62,2 mM** de quinato se puede controlar el crecimiento, por lo tanto, siendo la siguiente dosis testada mayor más próxima de **100 mM**, es la que se utilizó para realizar el segundo ensayo sobre las plántulas resistentes, ya que una de las variables para optimizar la aplicación de cualquier compuesto es utilizar la mínima dosis necesaria para tener el efecto deseado. La aplicación de 200 o 400 mM suponía aumentar la concentración de quinato mucho, con lo que se abordó el ensayo dos con 100 mM, una concentración más baja y que a priori controlaría el crecimiento de las plántulas de amapola, tratadas cuando presentan 6-8 hojas verdaderas.

## 4.2. RESULTADOS DEL ENSAYO 2

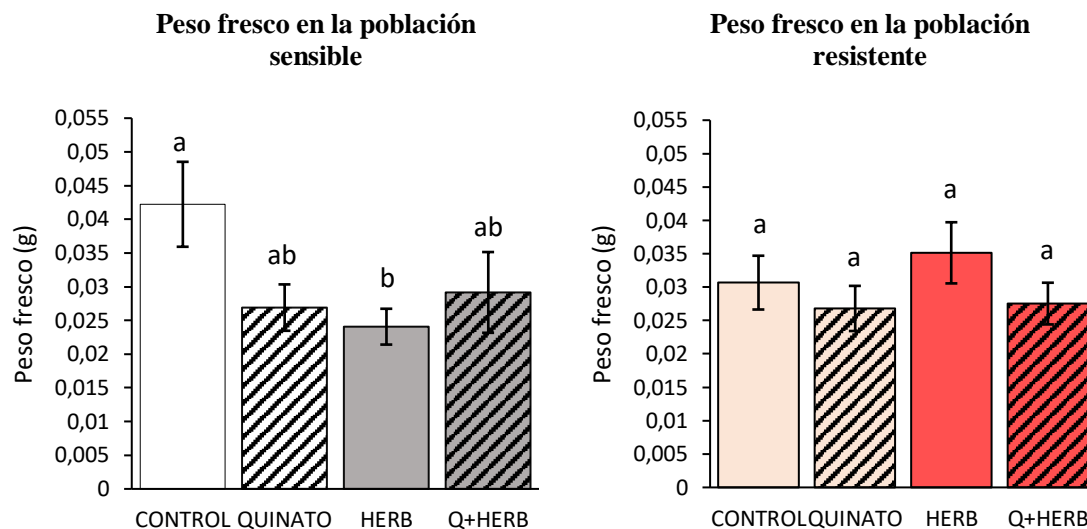
En el ensayo 2 se aplicaron cuatro tratamientos distintos, tanto en la población sensible como en la resistente: el control, la dosis de quinato establecida en el ensayo 1, el herbicida sulfonilurea y una mezcla entre el herbicida y el quinato. El estado fenológico en el que se trataron las plantas fue cuando estas contaban con 6-8 hojas verdaderas. A continuación, se muestran los resultados de todas las determinaciones realizadas.

### 4.2.1. Efecto de los tratamientos en la biomasa

La biomasa se evaluó 18 días después de la aplicación de los tratamientos. Se pesó la parte aérea en fresco y en seco, de la población sensible y de la resistente.

En las siguientes gráficas se muestran los efectos de cada uno de los tratamientos en el **peso fresco** de cada una de las poblaciones (FIGURA 15). En la población sensible, el análisis estadístico de la biomasa solo mostró diferencias entre el tratamiento control y el herbicida; y se pudo observar un descenso en la biomasa de las plantas tratadas con herbicida. A pesar de que la aplicación de quinato y la aplicación del quinato junto con el herbicida no tuvieron un efecto

estadísticamente significativo en la biomasa de las plantas, sí que se observa una tendencia descendente en la misma con ambos tratamientos.



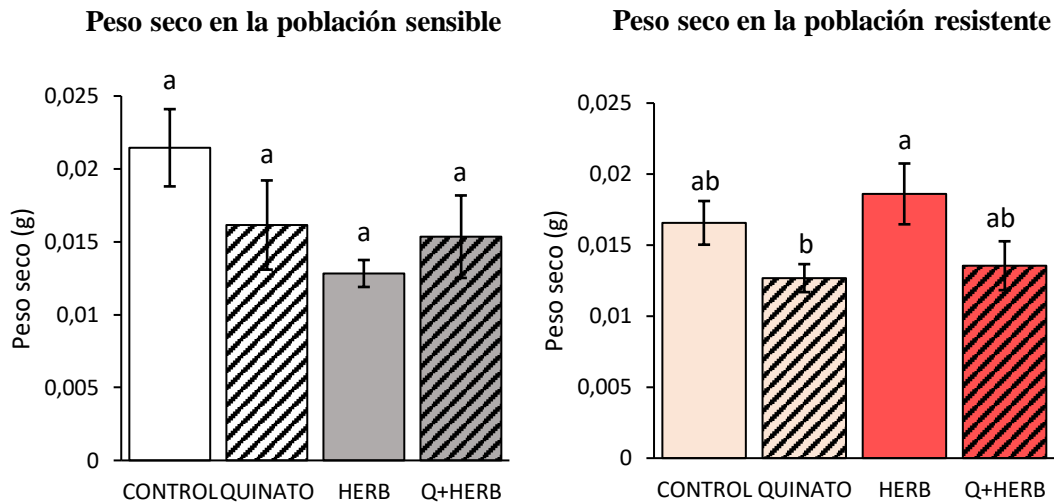
**FIGURA 15.** Efectos de los distintos tratamientos en la biomasa en fresco (expresada en gramos), a los 3 días de tratamiento, en la población sensible (izquierda) y en la resistente (derecha). Las plantas de *Papaver rhoeas* fueron tratadas con 100 mM, de quinato (QUINATO), 400g/ha del herbicida Pacifica Plus (Bayer Cropscience) (HERB), una mezcla de quinato y herbicida (Q+HERB), o solo con el surfactante Biopower (CONTROL). Diferentes letras indican diferencias significativas para  $P < 0,05$  (Tukey).

Por otro lado, en la población resistente el análisis estadístico no detectó ninguna diferencia entre los distintos tratamientos y la biomasa de esta población no se vio afectada por ningún tratamiento. En la población resistente el control y el tratamiento de herbicida muestran parecida cantidad de biomasa, lo que prueba que realmente la población resistente lo es. El tratamiento de quinato y la mezcla entre el quinato y el herbicida tampoco tuvieron ningún efecto en la biomasa de esta población.

En cuanto a las diferencias entre las dos poblaciones, no se observan diferencias, excepto en el tratamiento de herbicida, donde en la población resistente la biomasa es mayor, debido a que el herbicida no le afecta, demostrando su resistencia.

En los resultados del **peso seco** (FIGURA 16), en la población sensible el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí en la población resistente.

En la población sensible, a pesar de no observarse diferencias significativas, todos los tratamientos provocaron una tendencia descendente de la biomasa. El valor medio del peso seco de las plantas tratadas con herbicida fue el de menor valor, al ser la población sensible a este tipo de herbicidas, se observa que el crecimiento de las plantas tratadas con herbicida fue menor.



**FIGURA 16.** Efectos de los distintos tratamientos en la biomasa en seco (expresada en gramos), a los 3 días de tratamiento, en la población sensible (izquierda) y en la resistente (derecha). Las plantas de *Papaver rhoeas* fueron tratadas con 100 mM, de quinato (QUINATO), 400g/ha del herbicida Pacifica Plus (Bayer Cropscience) (HERB), una mezcla de quinato y herbicida (Q+HERB), o solo con el surfactante Biopower (CONTROL). Diferentes letras indican diferencias significativas para  $P < 0,05$  (Tukey).

En la población resistente, el tratamiento con herbicida no afectó la biomasa respecto al control, al ser la población resistente, el herbicida tiene el mismo efecto que el tratamiento control y no incide sobre el crecimiento de la planta. En cuanto al quinato, aunque ningún tratamiento (aplicado solo o mezclado con herbicida) afectó la biomasa de manera significativa respecto al control, sí se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con quinato y la aplicación del herbicida, siendo mayor la cantidad de biomasa en el tratamiento del herbicida que en el tratamiento con quinato.

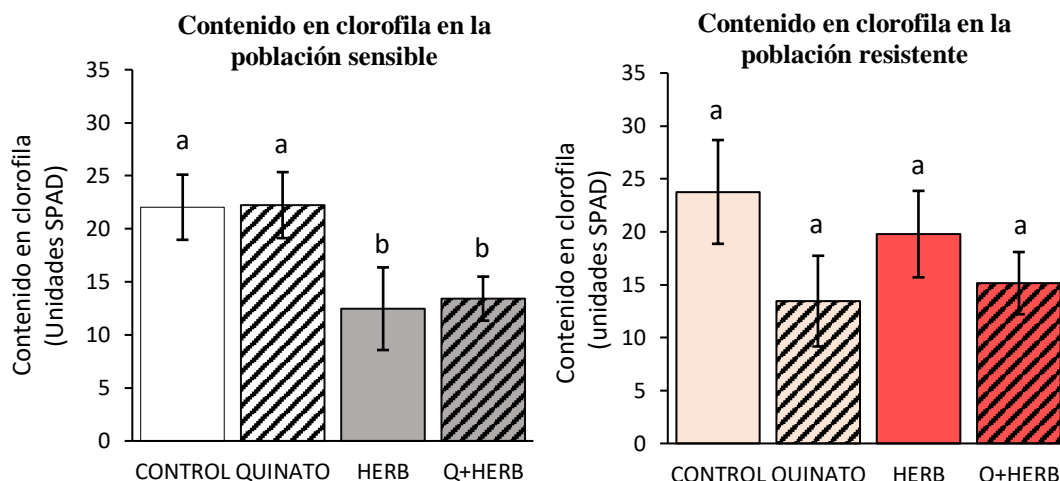
Comparando las dos poblaciones, se pudo observar que la población resistente control tuvo un promedio de crecimiento menor que la sensible, que puede ser debido a las diferencias poblacionales.

#### 4.2.2. Efecto sobre el contenido en clorofila

El contenido en clorofila se midió *in situ*, al mismo tiempo que se cosechó la parte aérea de las plantas. En las siguientes gráficas (FIGURA 17) se expresa el contenido en clorofila en unidades arbitrarias (SPAD).

La población sensible muestra diferencias significativas entre los tratamientos control y quinato respecto a los tratamientos de herbicida y la mezcla de quinato y herbicida, en la población resistente en cambio no hay diferencias entre tratamientos.

En la población sensible, el herbicida provocó un descenso en el contenido en clorofila. En cuanto al quinato, entre el tratamiento control y el quinato no hay ninguna diferencia en el contenido en clorofila, indicando que el quinato no ha tenido ningún efecto sobre este parámetro. Sin embargo, la mezcla con herbicida disminuyó el contenido en clorofila en un 50% comparando con el tratamiento control.

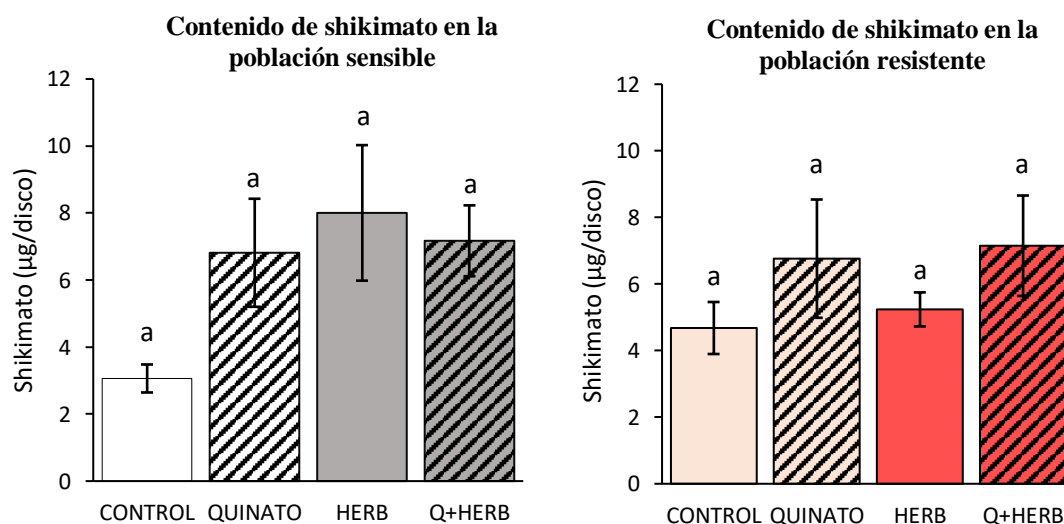


**FIGURA 17.** Efectos de los distintos tratamientos en el contenido de clorofila (expresada en unidades SPAD), a los 3 días de tratamiento, en la población sensible (izquierda) y en la resistente (derecha). Las plantas de *Papaver rhoeas* fueron tratadas con 100 mM, de quinato (QUINATO), 400 g/ha del herbicida Pacifica Plus (Bayer Cropscience) (HERB), una mezcla de quinato y herbicida (Q+HERB), o solo con el surfactante Biopower (CONTROL). Diferentes letras indican diferencias significativas para  $P < 0,05$  (Tukey).

En la población resistente, el tratamiento control y el de herbicida muestran valores cercanos, debido a la resistencia de esta población. En esta en cambio, comparando con la población sensible, el tratamiento de quinato sí que tuvo un efecto negativo, ya que disminuyó en un 50 % la cantidad de clorofila (aunque este descenso no fue estadísticamente significativo). La mezcla tuvo un comportamiento similar al quinato solo y provocó un descenso no significativo en el contenido en clorofila.

#### 4.2.3. Efecto en el contenido en shikimato

En las siguientes gráficas se muestra el contenido en shikimato de cada población y tratamiento (FIGURA 18).



**FIGURA 18.** Efectos de los distintos tratamientos en el contenido en shikimato en la parte aérea (expresada en µg shikimato/disco), a los 3 días de tratamiento, en la población sensible (izquierda) y en la resistente (derecha). Las plantas de *Papaver rhoeas* fueron tratadas con 100 mM, de quinato (QUINATO), 400 g/ha del herbicida Pacifica Plus (Bayer Cropscience) (HERB), una mezcla de quinato y herbicida (Q+HERB), o solo con el surfactante Biopower (CONTROL). Diferentes letras indican diferencias significativas para  $P < 0,05$  (Tukey).



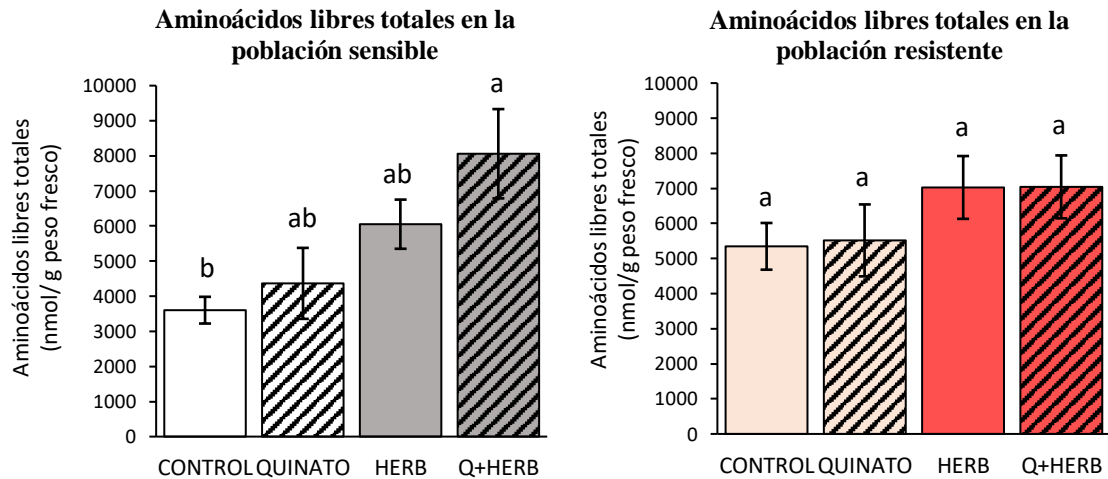
El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las poblaciones.

En ambas poblaciones el tratamiento control es el que presentó menor concentración de shikimato. El herbicida provocó un aumento no significativo en el contenido en shikimato, que no se observó en la población resistente.

En cuanto al efecto del quinato, se observó que en ambas poblaciones ejerció el mismo efecto, promoviendo una tendencia a una mayor acumulación de este compuesto. Además, no hay mayor diferencia entre los tratamientos únicamente con quinato y mezcla, y tampoco entre las dos poblaciones.

**4.2.4. Efectos en el contenido en aminoácidos libres, ramificados y aromáticos.**

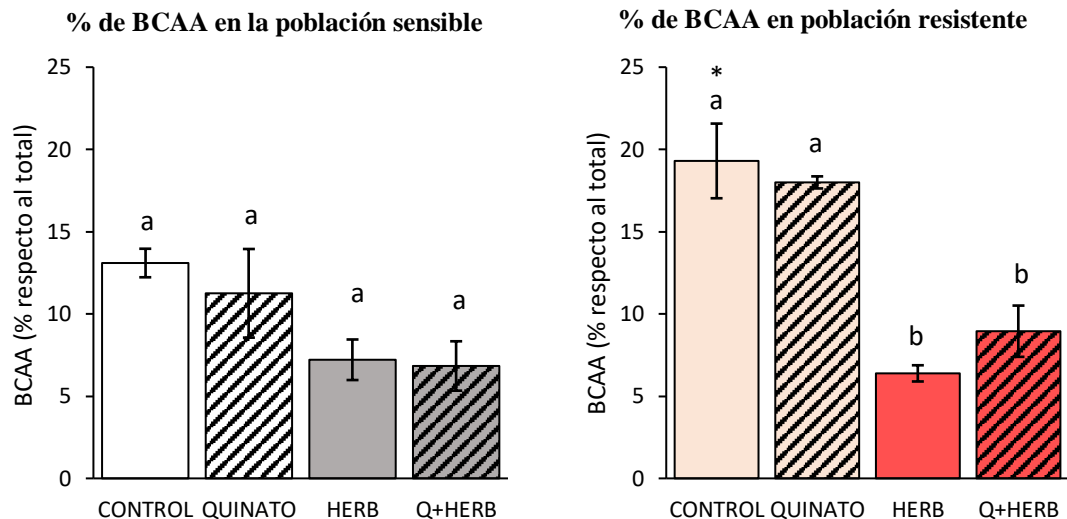
Se determinó el contenido de aminoácidos libres mediante electroforesis capilar de las dos poblaciones tratadas. La concentración de ellos se muestra en las siguientes gráficas, los aminoácidos libres totales (FIGURA 19), los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en porcentaje respecto al total de aminoácidos libres (FIGURA 20), y los aminoácidos aromáticos (AAA) también en porcentaje respecto al total de aminoácidos libres (FIGURA 21).



**FIGURA 19.** Efectos de los distintos tratamientos en el contenido en aminoácidos libres en la parte aérea (expresado en nmol/g PF), a los 3 días de tratamiento, en la población sensible (izquierda) y en la resistente (derecha). Las plantas de *Papaver rhoeas* fueron tratadas con 100 mM, de quinato (QUINATO), 400 g/ha del herbicida Pacifica Plus (Bayer Cropscience) (HERB), una mezcla de quinato y herbicida (Q+HERB), o solo con el surfactante Biopower (CONTROL). Diferentes letras indican diferencias significativas para  $P < 0,05$  (Tukey).

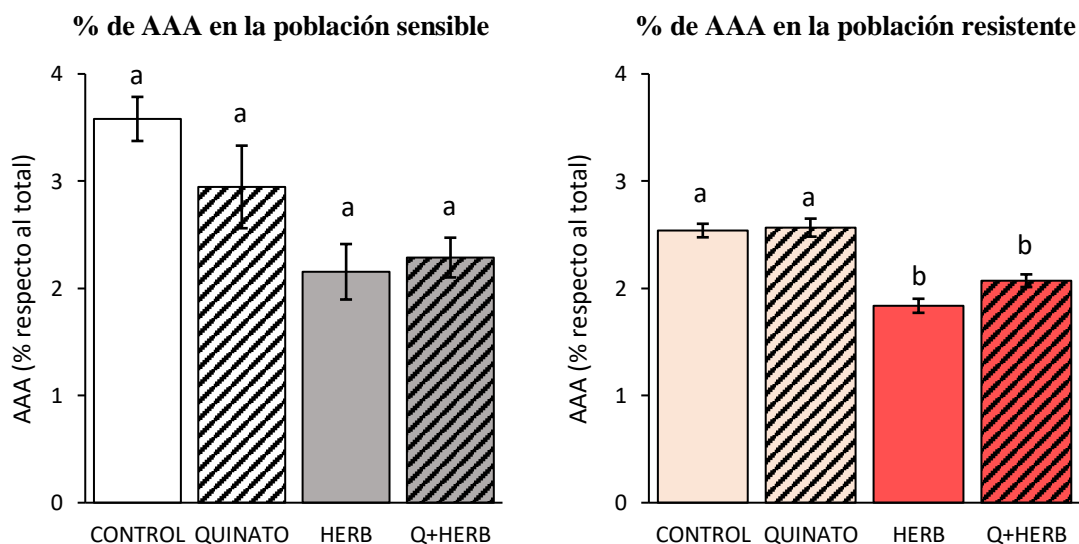
La aplicación de herbicida provocó un aumento en el contenido en aminoácidos libres en la población sensible, logrando un valor el doble de superior que el tratamiento control. El quinato no afectó al contenido en aminoácidos libres en la población sensible, mientras que se observa una acumulación de aminoácidos libres en las plantas tratadas con la mezcla de herbicida y quinato (FIGURA 19).

En la población resistentes no hay diferencias significativas en cuanto tratamientos, pero sí que se pudo observar una tendencia a la acumulación de aminoácidos libres en las plantas tratadas con herbicida o con la mezcla (FIGURA 19).



**FIGURA 20.** Efectos de los distintos tratamientos en el contenido en aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en la parte aérea (expresado en % respecto al total de aminoácidos libres), a los 3 días de tratamiento, en la población sensible (izquierda) y en la resistente (derecha). Las plantas de *Papaver rhoeas* fueron tratadas con 100 mM, de quinato (QUINATO), 400 g/ha del herbicida Pacifica Plus (Bayer Cropscience) (HERB), una mezcla de quinato y herbicida (Q+HERB), o solo con el surfactante Biopower (CONTROL). El asterisco (\*) indica diferencias entre el tratamiento control de las dos poblaciones ( $P < 0,05$ , t-Student). Diferentes letras indican diferencias significativas para  $P < 0,05$  (Tukey).

Las plantas control de la población resistente mostraron un nivel de BCAA respecto al total de aminoácidos libres mayor que las plantas control de la población sensible. En la población sensible el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, pero se vio como el contenido en los BCAA disminuyó con el herbicida y con la mezcla del herbicida y quinato (FIGURA 20).



**FIGURA 21.** Efectos de los distintos tratamientos en el contenido en aminoácidos aromáticos (AAA) en la parte aérea (expresado en % respecto al total de aminoácidos libres), a los 3 días de tratamiento, en la población sensible (izquierda) y en la resistente (derecha). Las plantas de *Papaver rhoeas* fueron tratadas con 100 mM, de quinato (QUINATO), 400 g/ha del herbicida Pacifica Plus (Bayer Cropscience) (HERB), una mezcla de quinato y herbicida (Q+HERB), o solo con el surfactante Biopower (CONTROL). Diferentes letras indican diferencias significativas para  $P < 0,05$  (Tukey).

En la población resistente, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos control y quinato sobre los tratamientos de herbicida y la mezcla, siendo mucho menores los niveles de BCAA en estos últimos. Por tanto, el quinato no modificó el contenido en BCAAs cuando se aplicó solo, mientras que provocó un descenso de los mismos cuando se aplicó junto con el herbicida (FIGURA 20).

La determinación de aminoácidos aromáticos en la población sensible no mostró diferencias entre los tratamientos según el análisis estadístico, pero al igual que en los BCAAs se observó una disminución (no significativa) de estos en las plantas tratadas con herbicida o la mezcla (FIGURA 21).

En la población resistente el análisis estadístico mostró diferencias entre los tratamientos control y quinato respecto a los tratamientos de herbicida y mezcla. En esta población, como en la población sensible, el tratamiento con herbicida y la mezcla mostraron un efecto similar, disminuyeron el contenido en AAAs (FIGURA 21).

### 4.3. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo era valorar la aplicabilidad de quinato para el control de poblaciones de amapola sensibles y resistentes a los herbicidas sulfonilureas. Para ello se realizaron dos ensayos. En el primer ensayo, el objetivo era determinar la dosis de quinato mínima necesaria para el control de amapola. Para ello se pulverizaron distintas dosis de quinato sobre una población de amapola sensible a sulfonilureas, en dos estados fenológicos diferentes, y mediante un curva dosis-respuesta se determinó cual era la dosis mínima de quinato necesaria para su control (FIGURA 14). Las dosis utilizadas fueron 25, 50, 100, 200 y 400 mM de quinato. Los resultados se midieron basándose en la biomasa y por estos, se estableció que la dosis mínima adecuada era de 100 mM aplicada cuando las plantas presentaban 6-8 hojas verdaderas, ya que era la siguiente de las concentraciones aplicadas inmediatamente superior a la DE50 del quinato en ese estado, según el ajuste log-logistic (FIGURA 14). Esta dosis y este momento de aplicación son los que se utilizaron en el segundo ensayo. En el segundo ensayo se valoró la aplicabilidad de esta dosis de quinato en el control de dos poblaciones de amapola: una era sensible, la misma que en el primer ensayo, pero la otra era resistente a herbicidas sulfonilureas. Se compararon los efectos en ambas poblaciones provocados por el quinato (dosis establecida en el primer ensayo, 100mM), un herbicida del grupo de las sulfonilureas (Pacífica Plus, Bayer Cropscience), y una mezcla de ambos, respecto a las plantas control. Para evaluar la fitotoxicidad de los distintos tratamientos, se utilizaron como parámetros la biomasa y los principales marcadores fisiológicos descritos para los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de BCAA.

Las dos poblaciones lograron alcanzar el mismo tamaño en el momento de la cosecha, pero observó que el porcentaje de BCAAs en la población resistente es mayor que en la población sensible (FIGURA 20). Esta diferencia puede deberse al mecanismo de resistencia, conferido por una mutación, y así, afectando a la regulación y al balance de la ruta de los aminoácidos de cadena ramificada, provocando un aumento en el porcentaje de estos respecto al total.

En la población sensible, el herbicida provocó los efectos típicos descritos para los herbicidas inhibidores de la ALS. Se observó un descenso en la biomasa (FIGURA 15) y en el contenido en clorofila (FIGURA 17). Es conocido que la inhibición de la ALS provoca un descenso en el crecimiento de las plantas por una detención de la división celular (Wittenbach & Abell, 1999). Los herbicidas inhibidores de la ALS, también provocan un descenso en la

fotosíntesis a largo plazo (Zabalza et al., 2004). Por el contrario, estos efectos fueron aliviados en la población resistente, ya que la aplicación de herbicida no disminuyó la biomasa (FIGURAS 15 y 16) ni el contenido en clorofila (FIGURA 17), demostrando así la resistencia de esta población al herbicida. Por otro lado, a pesar de no ser estadísticamente significativos, se observó una acumulación en los aminoácidos libres (FIGURA 19) y un descenso en los BCAA (FIGURA 20) y los AAA (FIGURA 21) en las plantas de la población sensible tratadas con la sulfonilurea. La inhibición de la síntesis de aminoácidos ramificados es el mecanismo de acción de las sulfonilureas, por lo cual un efecto directo sobre las plantas tratadas es la disminución de estos (Fernández-Escalada, Zulet-González, Gil-Monreal, Royuela, & Zabalza, 2019; Orcaray et al., 2010), efecto que se ha podido observar en las dos poblaciones utilizadas (FIGURA 20). En la población resistente tratada con sulfonilureas el nivel de BCAA también disminuyó, este resultado no concuerda con su carácter resistente, ya que la resistencia se basa en evitar la inhibición de la enzima ALS, y en consecuencia los valores de estos aminoácidos deberían ser parecidos a los del tratamiento control. Los aminoácidos libres en cambio aumentaron en la población sensible, así como se vio en anteriores estudios (Fernández-Escalada et al., 2019; Orcaray et al., 2010; Wittenbach & Abell, 1999), y más levemente en la resistente (FIGURA 19). Tras la inhibición de la ALS las plantas no mueren al instante, sino que estas reaccionan frente a la inhibición de la síntesis de aminoácidos degradando las proteínas ya existentes, haciendo subir los niveles de aminoácidos libres, para que los BCAA no puedan llegar a ser limitantes para la biosíntesis de proteínas (Wittenbach & Abell, 1999). Habría sido interesante medir el contenido en proteína soluble y poder hacer un balance entre la proporción de aminoácidos libres y proteína soluble. El contenido de AAA descendió en ambas poblaciones como consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de BCAA (FIGURA 21). Se ha propuesto que ambas rutas de síntesis de aminoácidos puedan tener una regulación cruzada (Orcaray et al., 2010). El hecho de que algunos de los efectos del herbicida no fueran estadísticamente significativos, puede deberse a que la dosis aplicada no fuera suficiente (400 g/ha), y que se tenga que aplicar una mayor dosis, teniendo en cuenta que la mayor dosis recomendada por el fabricante es de 500 g/ha.

En ambas poblaciones el tratamiento con quinato produjo un incremento en el contenido en shikimato (FIGURA 18), aunque no fue estadísticamente significativo. El quinato es un compuesto presente en la ruta del shikimato, que además, parte del quinato puede volver a entrar en la ruta por dos vías: como dehidroquinato por la acción de la enzima quinato dehidrogenasa, o en forma shikimato por la quinato hidrolasa (Bentley & Haslam, 1990; C. Leuschner et al., 1995). Por tanto, aunque para asegurarnos de que el quinato aplicado exógenamente se ha asimilado de manera correcta habría sido interesante medir el contenido en quinato en las plantas, el ligero aumento en shikimato en las hojas nos indica que el quinato se ha asimilado correctamente. La aplicación de quinato produjo un descenso en la biomasa de la población sensible (FIGURAS 15 y 16), y no tuvo efecto sobre el contenido en clorofila (FIGURA 17). En la población resistente, también descendió la biomasa como consecuencia de la aplicación de quinato (FIGURA 16) y, además, se vio un descenso en el contenido en clorofila (FIGURA 17). Esta diferencia del efecto del tratamiento con quinato entre las dos poblaciones, puede deberse al tamaño de las plantas, ya que, aunque ambas poblaciones se trataron cuando las plantas presentaban 6-8 hojas, la población resistente era más pequeña. A pesar de que en el segundo ensayo el quinato no modificó el contenido en clorofila de la población sensible, en las imágenes del primer ensayo (TABLA 6) se observa que, en esta población, a mayores dosis de quinato, además de provocar la muerte de las plantas, las hojas se volvían de color amarillo y rojizo. El descenso de la concentración de la clorofila es un indicador de lo letal que puede llegar a suponer el tratamiento y directamente una inhibición del crecimiento y desarrollo de la planta, debido a

que la fotosíntesis no se puede realizar, por tanto, disminuyendo a su vez los fotoasimilados. La planta puede continuar desarrollándose, pero de forma mucho más lenta hasta que la situación se vuelve insostenible. Este puede ser un efecto directamente relacionado con la cantidad de biomasa de las poblaciones, y que favorece la muerte de la planta. Por tanto, el descenso en la biomasa y en el contenido en clorofila, sugieren una fitotoxicidad del quinato, y apoyan su aplicación en el control de amapola. Estos resultados van en línea con lo observado para guisante, especie que también se ha evaluado para ser controlada con quinato (Zulet et al., 2013).

Estudios previos han observado un efecto del quinato en el perfil de los aminoácidos de las plantas tratadas (Zabalza, Orcaray, Fernández-Escalada, Zulet-González, & Royuela, 2017; Zulet et al., 2013). Se midió el contenido en aminoácidos libres y en los BCAA y AAA, con la intención de relacionar los efectos del quinato en el perfil de aminoácidos con su toxicidad en amapola. Sin embargo, la aplicación de quinato no modificó el perfil de los aminoácidos en ninguna de las poblaciones (FIGURAS 19-21). No se ha podido esclarecer la fisiología de la letalidad del quinato en amapola, ya que el quinato no afectó el perfil de aminoácidos en ninguna de las poblaciones y sería interesante medir el efecto del quinato en más parámetros fisiológicos, para valorar su relación con la toxicidad de este compuesto. Sería interesante haber realizado la determinación del contenido en carbohidratos, parámetro que se ha visto alterado en plantas de guisante tratadas con quinato (Zulet et al., 2013). La determinación de los metabolitos secundarios de la ruta del shikimato también podría dar información acerca de la fisiología de la toxicidad del quinato ya que, el quinato aplicado exógenamente es absorbido por la planta y se incorpora a la ruta del shikimato, provocando una desregulación de dicha ruta a varios niveles (Zabalza et al., 2017). Hay que tener en cuenta que, en la mayoría de los parámetros medidos, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas, por lo que los resultados solo se pueden interpretar de modo orientativo. Es necesario, por tanto, ampliar el tamaño muestral para tener resultados más robustos. La falta de significación puede ser debida a que la dosis de quinato no ha sido suficiente, y, por tanto, habría que ajustarla. Atendiendo a los resultados del primer ensayo, la aplicación del quinato en la población sensible redujo la biomasa en un 60%, aproximadamente (FIGURA 13), mientras que, en este segundo ensayo, el descenso en biomasa provocado por el quinato en la población sensible fue de aproximadamente del 35% (FIGURA 15). Esta diferencia en el efecto del quinato puede deberse a la diferencia en las condiciones climáticas de ambos ensayos, los cuales fueron realizados en invernaderos, donde no era posible controlar todas las variables climáticas. Sería interesante repetir el experimento en cámaras de condiciones controladas para conocer si las variables ambientales (temperatura, humedad, etc.) pueden alterar el efecto del quinato.

Se ha descrito que la mezcla de quinato con glifosato mejora la eficacia de este herbicida en el control de la mala hierba *Amaranthus palmeri*, hecho que se ha relacionado con el mayor efecto que tiene la mezcla en el perfil de aminoácidos de las plantas tratadas (Zulet-González et al., 2019). La mezcla de quinato y sulfonilurea provocó los mismos efectos que el herbicida sobre la población sensible en todos los parámetros medidos y la magnitud de estos efectos fue el mismo que el herbicida aplicado aisladamente, a excepción del contenido en aminoácidos donde la acumulación fue ligeramente mayor (FIGURAS 15-21). En la población resistente, la mezcla provocó un ligero descenso en el peso seco de las plantas y en su contenido en clorofila, similar al provocado por el quinato de manera aislada y que no se observó en las plantas tratadas con el herbicida (FIGURA 16). Sin embargo, el efecto de la mezcla en el perfil de aminoácidos de la población resistente fue el mismo que el herbicida. Ambos provocaron una acumulación de aminoácidos libres y descenso en el contenido en BCAA y AAA de igual magnitud (FIGURAS 19-21). Los resultados sugieren la aplicación de quinato junto con el herbicida, pueden controlar

la población resistente, ya que la mezcla provocó un descenso en la biomasa y en el contenido en clorofila, demostrando que las plantas tratadas crecen menos y peor, respecto al control. Sin embargo, su fisiología de la letalidad del tratamiento no pudo esclarecerse, por lo que, al igual que se ha comentado en el caso del tratamiento con quinato, es necesario estudiar el efecto de la mezcla sobre otros parámetros fisiológicos.

A la vista de estos resultados, se puede confirmar que el quinato (aplicado aisladamente o en combinación con el herbicida) sí tiene un efecto tóxico sobre *Papaver rhoeas* y que podría llevar a un mejor manejo de la resistencia que tiene la población a los herbicidas sulfonilureas. Además, según los resultados, utilizar el quinato como herbicida para el control de poblaciones sensible solo tendría sentido en cuanto a la prevención de desarrollo de resistencias y su menor daño hacia el medio ambiente, ya que el herbicida actúa en esta población de forma eficiente y la aplicación conjunta de ambos compuestos cubriría de manera eficaz el control de ambas poblaciones. No se ha podido determinar una relación clara en el causante de la mortalidad de las plantas. De todos modos, este trabajo da cabida a nuevas formas de control de malas hierbas, que, aunque no sean letales para la planta, puedan dar ventaja al cultivo, aumentando su competitividad.

## 5. CONCLUSIONES

- El estudio de la dosis mínima de aplicación de quinato para el control de amapola determino que dicha dosis es de 100mM aplicada cuando las plantas presentan 6-8 hojas verdaderas.
- La aplicación del herbicida sulfonilurea en la población sensible de *Papaver rhoeas* provocó los efectos fisiológicos ya descritos para este tipo de herbicidas (descenso de la biomasa y del contenido en clorofila, acumulación de aminoácidos libres y descenso del contenido en BCAA y AAA), pudiéndose utilizar estos como marcadores fisiológicos en amapola.
- La mayoría de los efectos típicos de los herbicidas inhibidores de la ALS observados en la población sensible de amapola desaparecen en la población resistente, demostrando así su resistencia.
- La aplicación del quinato en la parte aérea de la población sensible de *Papaver rhoeas* provocó un descenso en la biomasa, lo que sugiere que el quinato tiene un efecto fitotóxico en las plantas tratadas. Sin embargo, no se han podido establecer las razones fisiológicas de dicha toxicidad, por lo que es necesario realizar más determinaciones analíticas para entender mejor el papel del quinato en el control de amapola.
- La aplicación del quinato (tanto aplicado aisladamente o junto con el herbicida) en la parte aérea de la población resistente de *Papaver rhoeas* provocó un descenso en la biomasa y en el contenido en clorofila de las plantas, lo que sugiere que el quinato tiene un efecto fitotóxico sobre las mismas. Sin embargo, no se han podido establecer las razones fisiológicas de dicha toxicidad, por lo que es necesario realizar más determinaciones analíticas para entender mejor el papel del quinato en el control de amapola, como para conocer mejor el mecanismo de resistencia de la amapola.
- Se abre la interesante posibilidad del uso del quinato en el control de las poblaciones resistentes de amapola, pero es necesario optimizar la dosis y profundizar en los efectos fisiológicos relacionados con la toxicidad de este compuesto.





## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abell L. (1996). Biochemical Approaches to Herbicide Discovery : Advances in Enzyme Target Identification and Inhibitor Design. *Weed Science*, 44(3), 734–742.
- Beaudoin-Eagan, L. D., & Thorpe, T. A. (1983). Shikimate Pathway Activity during Shoot Initiation in Tobacco Callus Cultures. *Plant Physiology*, 73(2), 228–232. <https://doi.org/10.1104/pp.73.2.228>
- Beaudoin-Eagan, L. D., & Thorpe, T. A. (1984). Turnover of Shikimate Pathway Metabolites during Shoot Initiation in Tobacco Callus Cultures. *Plant and Cell Physiology*, 25(6), 913–921. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076806>
- Beckie, H. J., & Tardif, F. J. (2012). Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.018>
- Beckie, H. J., Warwick, S. I., Sauder, C. A., Lozinski, C., & Shirriff, S. (2011). Occurrence and Molecular Characterization of Acetolactate Synthase (ALS) Inhibitor–Resistant Kochia (*Kochia scoparia*) in Western Canada. *Weed Technology*, 25(1), 170–175. <https://doi.org/10.1614/WT-D-10-00067.1>
- Bentley, R., & Haslam, E. (1990). The Shikimate Pathway — A Metabolic Tree with Many Branche. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25(5), 307–384. <https://doi.org/10.3109/10409239009090615>
- BOE. (2012). Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. *Ministerio de La Presidencia*. *BOE-A-2012-11605*, 11–13.
- Boudet, A.-M. (2012). Polyphenols: From Plant Adaptation to Useful Chemical Resources. In *Recent Advances in Polyphenol Research* (pp. 41–70). Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118299753.ch2>
- Christopher, J. T., Powles, S. B., & Holtum, J. A. M. (1992). Resistance to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides in Annual Ryegrass ( *Lolium rigidum* ) Involves at Least Two Mechanisms. *Plant Physiology*, 100(4), 1909–1913. <https://doi.org/10.1104/pp.100.4.1909>
- Colbach, N., Dürr, C., Roger-Estrade, J., Chauvel, B., & Caneill, J. (2006). AlomySys: Modelling black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) germination and emergence, in interaction with seed characteristics, tillage and soil climate. *European Journal of Agronomy*, 24(2), 95–112. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.07.001>
- Comité para la Prevención de Resistencias a Herbicidas. (n.d.). Mecanismos de resistencia a herbicidas. Retrieved June 3, 2020, from <https://semh.net/resistencia-a-herbicidas/>
- Cromartie, T. H., & Polge, N. D. (2000). An improved assay for shikimic acid and its use as monitor for the activity of sulfosate. In *Weed Science Society of America Proceedings* (p. 40:291).
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022–4034. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>
- Délye, C. (2013). Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science*, 69(2), 176–187. <https://doi.org/10.1002/ps.3318>
- Délye, C., Jasieniuk, M., & Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), 649–658. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.001>

- Délye, C., Pernin, F., & Scarabel, L. (2011). Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Science*, *180*(2), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.10.007>
- Donohue, K., Dorn, L., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C., & Schmitt, J. (2005). Environmental and genetic influences on the germination of *Arabidopsis thaliana* in the field. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, *59*, 740–757. <https://doi.org/10.1554/04-419>
- Duggleby, R. G., McCourt, J. A., & Guddat, L. W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, *46*(3), 309–324. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.004>
- Duke, S. O. (2011). Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(11), 5835–5841. <https://doi.org/10.1021/jf102704x>
- Durán-Prado, M., Osuna, M. D., De Prado, R., & Franco, A. R. (2004). Molecular basis of resistance to sulfonylureas in *Papaver rhoeas*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *79*(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.01.003>
- Fernández-Escalada, M., Zulet-González, A., Gil-Monreal, M., Royuela, M., & Zabalza, A. (2019). Physiological performance of glyphosate and imazamox mixtures on *Amaranthus palmeri* sensitive and resistant to glyphosate. *Scientific Reports*, *9*(1), 18225. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54642-9>
- Fernandez-Quintanilla, Barroso, Recasens, Sans, Torner, & Arco, S. Del. (2000). Demography of *Lolium rigidum* in winter barley crops: analysis of recruitment, survival and reproduction. *Weed Research*, *40*(3), 281–291. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.2000.00187.x>
- García Torres, L., & Fernández-Quintanilla, C. (1991). *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. (Servicio de Extensión Agraria, Ed.). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat03043a&AN=bupn.00074913&site=eds-live>
- Ghosh, S., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2012). Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances*, *30*(6), 1425–1431. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.001>
- Green, J. M., & Streibig, J. C. (1993). Herbicide mixtures. *CRC Press*, 7:117-135.
- Hacham, Y., Avraham, T., & Amir, R. (2002). The N-terminal region of *Arabidopsis* cystathionine  $\gamma$ -synthase plays an important regulatory role in methionine metabolism. *Plant Physiology*, *128*(2), 454–462. <https://doi.org/10.1104/pp.010819>
- Heap, I. (2020). The International Herbicide-Resistant Weed Database. Retrieved from <http://www.weedscience.com/>
- Herrmann, K. M., & Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *50*(1), 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>
- Hilton, H. W. (1957). Herbicide tolerant strains of weeds. *Hawaiian Sugar Planters Association Annual Rep.*, 69–72.
- Hofgen, R., Laber, B., Klonus, A., Streber, W., & Pohlentz, H. (1995). Repression of Acetolactate Synthase Activity through Antisense Inhibition Molecular and Biochemical Analysis of, 469–477.

- HRAC. (2020). Herbicide Resistance Action Committee. Retrieved from <https://hracglobal.com/herbicide-resistance/overview>
- Koger, C. H., Shaner, D. L., Krutz, L. J., Walker, T. W., Buehring, N., Henry, W. B., ... Wilcut, J. W. (2005). Rice (*Oryza sativa*) response to drift rates of glyphosate. *Pest Management Science*, *61*(12), 1161–1167. <https://doi.org/10.1002/ps.1113>
- Leuschner, C., Herrmann, K. M., & Schultz, G. (1995). The metabolism of quinate in pea roots. Purification and partial characterization of a quinate hydrolyase. *Plant Physiology*, *108*(1), 319–325. <https://doi.org/10.1104/pp.108.1.319>
- Leuschner, Carola, & Schultz, G. (1991). Uptake of shikimate pathway intermediates by intact chloroplasts. *Phytochemistry*, *30*(7), 2203–2207. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83615-R](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83615-R)
- Lezáun, J. A., Telletxea, N., & Goñi, C. (2018). Amapola o ababol. *Navarra Agraria*, (226), 45–46.
- Li, M., Yu, Q., Han, H., Vila-Aiub, M., & Powles, S. B. (2013). ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. *Pest Management Science*, *69*(6), 689–695. <https://doi.org/10.1002/ps.3419>
- MAPA. (2018). Informes de Planes de Acción Nacional 2013-2017. Retrieved from <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/uso-sostenible-de-productos-fitosanitarios/>
- Menchari, Y., Chauvel, B., Darmency, H., & Délye, C. (2007). Fitness costs associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. *Journal of Applied Ecology*, *45*(3), 939–947. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01462.x>
- Mulugeta, D., & Stoltenberg, D. E. (1998). Influence of cohorts on *Chenopodium album* demography. *Weed Science*, *46*(1), 65–70. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0043174500090184>
- Norris, R. F. (1996). Morphological and Phenological Variation in Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in California. *Weed Science*, *44*(4), 804–814. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0043174500094753>
- Norsworthy, J. K., Ward, S. M., Shaw, D. R., Llewellyn, R. S., Nichols, R. L., Webster, T. M., ... Barrett, M. (2012). Reducing the Risks of Herbicide Resistance: Best Management Practices and Recommendations. *Weed Science*, *60*(SP1), 31–62. <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00155.1>
- O Duke, S., & B Powles, S. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, *63*(11), 1100–1106. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Orcaray, L., Igal, M., Marino, D., Zabalza, A., & Royuela, M. (2010). The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science*, *66*(3), 262–269. <https://doi.org/10.1002/ps.1868>
- Orcaray, L., Igal, M., Zabalza, A., & 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*(18), 10162–10168. <https://doi.org/10.1021/jf2025538>
- Park, K. W., Fandrich, L., & Mallory-Smith, C. A. (2004). Absorption, translocation, and metabolism of propoxycarbazone-sodium in ALS-inhibitor resistant *Bromus tectorum* biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *79*(1), 18–24.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2003.11.002>
- Pavlicev, M., & Wagner, G. P. (2012). A model of developmental evolution: selection, pleiotropy and compensation. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(6), 316–322. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2012.01.016>
- Peters, B., & Strek, H. J. (2018). Herbicide discovery in light of rapidly spreading resistance and ever-increasing regulatory hurdles. *Pest Management Science*, 74(10), 2211–2215. <https://doi.org/10.1002/ps.4768>
- Powles, S. B. (2008). Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Management Science*, 64(4), 360–365. <https://doi.org/10.1002/ps.1525>
- Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 317–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Preston, C. (2009). Herbicide resistance in weeds endowed by enhanced detoxification: Complications for management. *Weed Science*, 52, 448–453. <https://doi.org/10.1614/P2002-168B>
- Purrington, C. B. (2000). Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 305–308. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00085-6)
- Ray, T. (1989). Herbicides as inhibitors of amino acid biosynthesis. In P. Böger & G. Sandman (Eds.), *Target sites of herbicide action* (pp. 106–125). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Renton, M., Diggle, A., Manalil, S., & Powles, S. (2011). Does cutting herbicide rates threaten the sustainability of weed management in cropping systems? *Journal of Theoretical Biology*, 283(1), 14–27. <https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2011.05.010>
- Rhodes, D., Hogan, A. L., Deal, L., Jamieson, G. C., & Haworth, P. (1987). Amino acid metabolism of *Lemna minor* L.: III. responses to aminooxyacetate. *Plant Physiology*, 87(2), 447–453. <https://doi.org/10.1104/pp.87.2.447>
- Scarabel, L., Pernin, F., & Délye, C. (2015). Occurrence, genetic control and evolution of non-target-site based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) in the dicot weed *Papaver rhoeas*. *Plant Science*, 238, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.008>
- Seefeldt, S. S., Jensen, J. E., & Fuerst, E. P. (1995). Log-Logistic Analysis of Herbicide Dose-Response Relationships. *Weed Technology*, 9(2), 218–227. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00023253>
- Shaner, D.L., & Reider, M. L. (1986). Physiological responses of corn (*Zea mays*) to AC 243,997 in combination with valine, leucine, and isoleucine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 25(2), 248–257. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(86\)90051-9](https://doi.org/10.1016/0048-3575(86)90051-9)
- Shaner, Dale L. (1991). Physiological effects of the imidazolinone herbicides. In Dale L. Shaner & S. L. O'Connor (Eds.), *The imidazolinone herbicides* (pp. 129–137). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Stidham, M. A., & Singh, B. K. (1991). Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. In Dale L. Shaner & S. L. O'Connor (Eds.), *The imidazolinone herbicides* (pp. 71–91). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Suttle, J. C., & Schreiner, D. R. (1982). Effects of DPX-4189 (2-chloro-N-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)aminocarbonyl)benzenesulfonamide) on anthocyanin synthesis, phenylalanine ammonia lyase activity, and ethylene production in soybean hypocotyls. *Canadian Journal of Botany*, 60(6), 741–745. <https://doi.org/10.1139/b82-097>

- Suttle, J., Swanson, H., & Schreiner, D. (1983). Effect of chlorsulfuron on phenylpropanoid metabolism in sunflower seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2, 137–149. <https://doi.org/10.1007/BF02042242>
- Torra, J., Cirujeda, A., Taberner, A., & Recasens, J. (2010). Evaluation of herbicides to manage herbicide-resistant corn poppy (*Papaver rhoeas*) in winter cereals. *Crop Protection*, 29(7), 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.011>
- Torra, J., & Recasens, J. (2008). Demography of Corn Poppy (*Papaver rhoeas*) in Relation to Emergence Time and Crop Competition. *Weed Science*, 56(6), 826–833. <https://doi.org/10.1614/WS-07-077.1>
- UPNA. (2020). Flora arvense de Navarra. Retrieved June 3, 2020, from <https://www.unavarra.es/herbario/htm/inicio.htm>
- Warwick, S. I., Xu, R., Sauder, C., & Beckie, H. J. (2008). Acetolactate Synthase Target-Site Mutations and Single Nucleotide Polymorphism Genotyping in ALS-Resistant Kochia (*Kochia scoparia*). *Weed Science*, 56(6), 797–806. [https://doi.org/DOI: 10.1614/WS-08-045.1](https://doi.org/DOI:10.1614/WS-08-045.1)
- Wiersma, P. A., Schmiemann, M. G., Condie, J. A., Crosby, W. L., & Moloney, M. M. (1989). Isolation, expression and phylogenetic inheritance of an acetolactate synthase gene from *Brassica napus*. *Molecular and General Genetics*, 219(3), 413–420. <https://doi.org/10.1007/BF00259614>
- Wittenbach, V., & Abell, L. (1999). Inhibition of valine, leucine and isoleucine biosynthesis. In B. K. Singh (Ed.), *Plant amino acids: Biochemistry and biotechnology* (pp. 385–416). New York, USA: Marcel Dekker.
- Yoshida, S., Tazaki, K., & Minamikawa, T. (1975). Occurrence of shikimic and quinic acids in angiosperms. *Phytochemistry*, 14(1), 195–197. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85036-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85036-9)
- Yu, Q., & Powles, S. B. (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Management Science*, 70(9), 1340–1350. <https://doi.org/10.1002/ps.3710>
- Zabalza, A., Orcaray, L., Fernández-Escalada, M., Zulet-González, A., & Royuela, M. (2017). The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 141, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.12.005>
- Zabalza, A., Orcaray, L., Gaston, S., & 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(25), 7601–7606. <https://doi.org/10.1021/jf0486996>
- Zulet-González, A. (2013). *Estudio de la aplicabilidad del quinato en el control de malas hierbas. Trabajo Fin de Carrera*. Universidad Pública de Navarra.
- Zulet-González, A., Fernández-Escalada, M., Zabalza, A., & Royuela, M. (2019). Enhancement of glyphosate efficacy on *Amaranthus palmeri* by exogenous quinate application. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158(April), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.004>
- Zulet, A., Zabalza, A., & Royuela, M. (2013). Phytotoxic and Metabolic Effects of Exogenous Quinate on *Pisum sativum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(4), 779–788. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9345-5>