

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO PARA CONFIRMAR LA RESISTENCIA DE *LOLIUM PERENNE* A GLIFOSATO

Triviño M., Calha I.M.*

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP (INIAV), Av. da República, 2784-505 Oeiras, Portugal.

* *isabel.calha@iniav.pt*

Resumen: En 2012 se confirmó la resistencia de *Lolium perenne* a glifosato en viñedos en Douro (Portugal). Se trató de validar con *L. perenne* un método rápido desarrollado para reducir el tiempo de obtención de resultados de resistencia, anteriormente validado para *Lolium rigidum* por Ballot et al. (2009). Se midió cada coleóptilo, tras una semana de incubación de las plántulas en placa ELISA conteniendo diferentes concentraciones de glifosato hasta 50e.a.L⁻¹. Se seleccionaron dos poblaciones confirmadas como resistentes en ensayos de planta entera. Las plántulas de *L. perenne* crecieron más rápido que en *L. rigidum*, siendo más sensibles a glifosato. El periodo de preincubación fue más corto y las concentraciones más bajas marcaron mayor diferencia entre las poblaciones R y S. Se obtuvo una alta correlación entre los métodos de planta entera y en placa ELISA (R²=0,77).

Palabras clave: Resistencia a herbicida, viñedos, coleóptilo, placa ELISA, ballico.

Summary: Validation of a quick method to confirm *Lolium perenne* resistance to glyphosate. In 2012 glyphosate resistant *Lolium perenne* populations were confirmed in Douro vineyards (Portugal). This study intends to validate for *L. perenne* a quick test, to shorten the test duration for resistance confirmation, originally developed for *Lolium rigidum*. The method relies on measuring coleoptile length after a week incubation of seedlings in the wells of ELISA plates containing glyphosate concentrations until 50e.a.L⁻¹. Two populations already confirmed resistant with dose-response bioassays were selected for this validation. Seedlings growth of *L. perenne* was faster than *L. rigidum* and were more sensitive to glyphosate. The preincubation was shortened and the concentrations needed to discriminate between R and S populations were adapted to a narrower range in the lowest concentrations. High correlation (R²=0.77) was found by the two methods: pot bioassay and ELISA plate.

Keywords: Herbicide resistance, vineyards, coleoptile, ELISA plate, perennial ryegrass.

INTRODUCCIÓN

Las prácticas de manejo de malas hierbas en viñedos se basan principalmente en la aplicación de herbicidas en la línea de las cepas y cubierta vegetal entrelíneas. En los viñedos de Douro (Norte de Portugal) existe una intensa presión de selección impuesta por el herbicida glifosato que se ha estado aplicando desde hace más de 15 años, a menudo más de una vez al año (Portugal et al., 2012). Las aplicaciones de herbicida redujeron la población de muchas malas hierbas anuales, lo cual favoreció la expansión de malas hierbas perennes (inversión floral) y también la selección de biotipos resistentes de especies que previamente eran susceptibles. En 2012 se confirmó la resistencia de *Lolium perenne* a glifosato en estos viñedos (Portugal et al., 2011). *Lolium perenne* (ballico perenne) es una planta perenne longeva, cespitosa, nativa de Europa. Está clasificado como hierba que forma macollas, se propaga principalmente por semilla y presenta polinización alógama cruzada anemófila (Kloot, 1983). Se han llevado a cabo bioensayos de dosis-respuesta con glifosato para confirmar resistencia en poblaciones de *L. perenne* con planta entera (Calha et al., 2013). Para reducir el tiempo de obtención de resultados resistencia a herbicidas, se han desarrollado métodos rápidos con semillas, plántulas y clones (Moss, 2000; Cirujeda et al., 2001; Nadler-Hassar & Rubin, 2003; Boutsalis, 2004; Barroso et al., 2010; Kaundun et al., 2011).

El objetivo de este trabajo es: Validar con *Lolium perenne* un método rápido para reducir el tiempo de obtención de resultados de resistencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron tres poblaciones de *L. perenne*, dos resistentes a glifosato (P02 y P11) y una susceptible de referencia (PVIC) para ensayos de dosis-respuesta en maceta (Perez-Jones & Kogan, 2003) y placa ELISA (Ballot et al., 2009).

Experimento dosis-respuesta con planta entera

El herbicida glifosato (RoundUp Extra 360 g s.a.L⁻¹, SL, Bayer) fue aplicado en plantas de distintas poblaciones con 2 a 3 hojas (BBCH 12-13) en una escala logarítmica (0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 y 2000 g e.a. ha⁻¹) con un OPS (*Oxford Precision System*) calibrado para aplicar 169 L ha⁻¹ de herbicida (275 kPa) (Perez-Jones & Kogan, 2003). Las plantas

fueron cortadas a ras de suelo y se anotó el peso verde y el porcentaje de supervivencia 21 días después de la aplicación (DDA).

Método rápido en placa ELISA

El método seguido fue la medición de la longitud del coleóptilo, tras una semana de incubación de las plántulas en placa ELISA, conteniendo diferentes concentraciones de glifosato (0; 0,39; 0,78; 1,6; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e.a.L⁻¹). Se seleccionaron para este experimento dos poblaciones confirmadas como resistentes en ensayos de planta entera.

Análisis estadístico

Se ajustó un modelo de regresión no lineal de tipo logístico (Knezevic et al., 2007).

$$y = f(x) = c + \frac{d - c}{1 + (x / ED_{50})^b} b$$

En la expresión y corresponde al peso verde (g) o a la longitud del coleóptilo (mm); x a la dosis (e.a. ha⁻¹) o concentración (e.a. L⁻¹); d y c corresponden a las asíntotas superior e inferior de la curva dosis-respuesta respectivamente; b al declive de la curva obtenido al nivel del punto inflexión con valor de la dosis o concentración causante de un 50% de daño (ED₅₀ o EC₅₀). Los valores ED₅₀ (EC₅₀) para cada población se obtuvieron a partir de las curvas dosis respuesta representadas en los dos tipos de ensayo, así como el cálculo del respectivo factor de resistencia. ED₅₀ (EC₅₀) es la dosis (o concentración) de herbicida que causa el 50 % de reducción del crecimiento de las plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento dosis-respuesta con planta entera

Las poblaciones resistentes de *L. perenne* (P02 y P11) presentaron una reducción gradual del peso verde con respecto al aumento de la dosis de glifosato. De las poblaciones P02 y P11 se registraron, sin diferencias significativas entre sí, un peso verde significativamente superior al de PVIC para cada una de las dosis. Fue posible ajustar un modelo no lineal de tipo logístico en todas las poblaciones (Figura 1) y se obtuvieron los valores de ED₅₀ de 2,55 x 10³; 1,84 x 10³ g e.a. ha⁻¹ y unos Factores de Resistencia (FR método rápido = EC₅₀R/EC₅₀S; FR experimento con planta entera ED₅₀R/ED₅₀S) de 13,7 y 8,1 para P02 y P11 respectivamente (Tabla 1). Estos datos permitieron confirmar que se trata de poblaciones resistentes a glifosato.

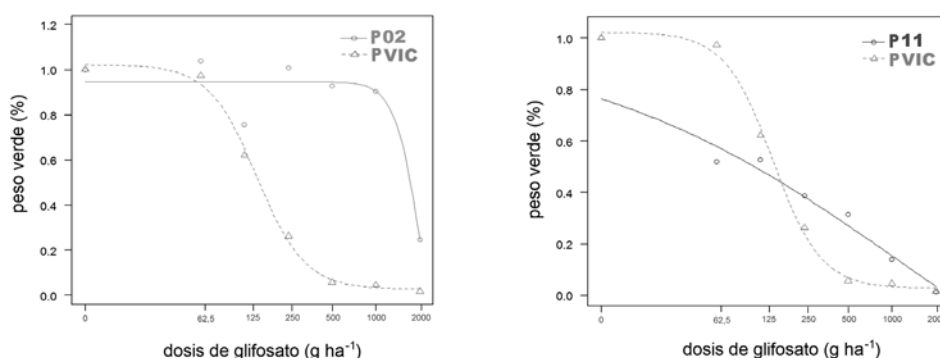


Figura 1. Curvas de dosis-respuesta a glifosato para las poblaciones P02 e P11 de *L. perenne*. Ensayo en maceta con planta entera.

Método rápido en placa ELISA

Todas las poblaciones presentaron una reducción gradual de la longitud de los coleóptilos con respecto al aumento de la concentración de glifosato (Figura 2). Se ajustó un modelo lineal tipo logístico en todas las poblaciones y se obtuvieron valores de EC_{50} de 0,43; 5,96 y 2,65 g e.a.L⁻¹ para PVIC, P02 y P11 respectivamente. Los valores de FR fueron similares a los encontrados para cada población en el ensayo con planta entera (Tabla 1) correspondiendo a una elevada correlación entre los dos métodos ($R^2=77\%$) como se demuestra en la Figura 3.

Tabla 1. Correlación entre los métodos con planta entera y en placa ELISA.

Población	FR	FR
	método rápido	experimento con planta entera
PVIC	-	-
P02	13,72	13,70
P11	6,05	8,10

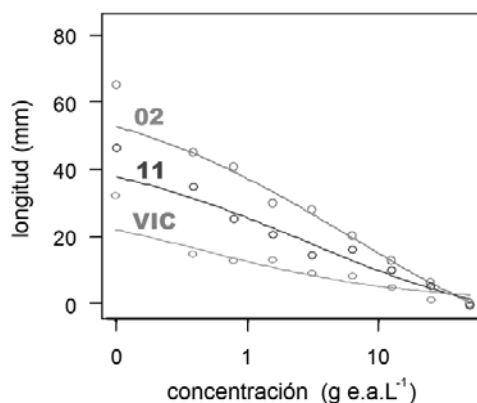


Figura 2. Curvas de dosis-respuesta a glifosato para las poblaciones P02, P11 y VIC de *L. perenne*. Método rápido en placa ELISA.

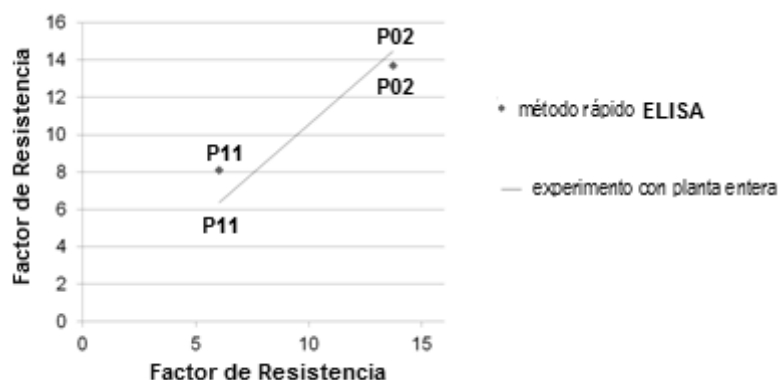


Figura 3. Correlación entre los métodos con planta entera y en placa ELISA.

CONCLUSIONES

La duración do método rápido (placa ELISA) con *Lolium perenne* fue de 10 días, revelando elevada sensibilidad al herbicida. Por ello, el periodo de preincubación en glifosato fue de solo dos días y la concentración discriminatoria de 0,39 e.a. L⁻¹ marcaba mayor diferencia entre las poblaciones R y S. Se obtuvo una alta correlación de los métodos con planta entera y placa ELISA ($R^2=0,77$) para confirmar la resistencia a glifosato. Concluimos así que este método permite reducir significativamente el tiempo de respuesta respecto a los ensayos de dosis-respuesta en estufa de 90 a apenas 10 días.

AGRADECIMIENTOS

Marina Triviño becada con Quercus VI - Programa Leonardo da Vinci (FUNDECYT, España).

BIBLIOGRAFÍA

BALLOT R, DESCHOMETS G & GAUVRIT C (2009) *A quick test of glyphosate resistance in ray-grass*. AFPP - XIIIème Colloque International sur la Biologie des Mauvaises Herbes - Dijon, France, 331-338.

BARROSO J, LOUREIRO I, ESCORIAL MC & CHUECA MC (2010) The response of *Bromus diandrus* and *Lolium rigidum* to dalapon and glyphosate I: baseline sensitivity. *Weed Research* 50, 312-319.

- BOUTSALIS P (2004) *The herbicide resistance quick test is back*. In V. Stewart (ed.) Department of Agriculture Western Australia e-weed 5, No. 4: 14-19.
- CALHA IM, PORTUGAL J, GONZALEZ-TORRALBA F, ROLDAN R & DE-PRADO R (2013) Management of *Lolium perenne* resistant to glyphosate. *Proc 20th Symp EWRS*: 238. 24-28 SanSun, Turquía.
- CIRUJEDA A, RECASENS J & TABERNER A (2001) A qualitative quick-test for detection of herbicide resistance to tribenuron in *Papaver rhoeas*. *Weed Research* 41, 523-534.
- KAUNDUN SS, HUTCHINGS SJ, DALE RP, BAILLY GC & GLANFIELD P (2011). Syngenta 'RISQ' test: a novel in-season method for detecting resistance to post-emergence ACCase and ALS inhibitor herbicides in grass weeds. *Weed Research* 51, 284-293.
- KLOOT PM (1983) The genus *Lolium* in Australia. *Australian Journal of Botany* 31, 421-435.
- KNEZEVIC SZ, STREIBIG JC & RITZ C (2007) Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology* 21, 840-848.
- MOSS (2000) *WSSA Annual Meeting*, 40, Abstract 102, Toronto, Canadá.
- NADLER-HASSAR T & RUBIN B (2003) Natural tolerance of *Cuscuta campestris* to herbicides inhibiting amino acid biosynthesis. *Weed Research* 43, 341-347.
- PEREZ A & KOGAN M (2003) Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Research* 43, 12-19.
- PORTUGAL J, CALHA IM, GONZALEZ-TORRALVA F & ROLDAN R (2012) Resistência ao glifosato em vinhas do douro. *9^o Simp. Vitiviníc. Alentejo*, 139-148 ATEVA. 15-17 Maio, Évora.