

RESISTENCIA DE *Fimbristylis miliacea* AL HERBICIDA

PIRAZOSULFURÓN-ETILO EN CAMPOS DE ARROZ

DEL ESTADO GUÁRICO-VENEZUELA

Aída Ortiz, Lorena Villarreal, Sandra Torres, María Dolores Osuna, Luis López, Rosana Figueroa, Cástor Zambrano, Marjorie Cásares y Albert Fischer

RESUMEN

Los arrozeros del estado Guárico, Venezuela, han venido observando fallas de pirazosulfurón-etilo para controlar *Fimbristylis miliacea* L. Vahl. A fin de evaluar la resistencia de *F. miliacea* a pirazosulfurón y conocer su mecanismo, se establecieron tres tipos de experimentos: un bioensayo de detección, uno de respuesta a dosis, y una prueba de sensibilidad de la actividad ALS a pirazosulfurón. En el de detección se empleó la dosis comercial recomendada de pirazosulfurón (25g·ha⁻¹ i.a.) y un testigo sin herbicida; a los 21 días de la aplicación se determinó el peso fresco como porcentaje sobre el testigo. Los resultados mostraron que dos accesiones (FM11 y FM58) fueron susceptibles (S) y diez (FM8, FM9, FM69, FM70, FM71, FM72, FM73, FM74, FM80 y FM94) resistentes (R). El experi-

mento de respuesta a dosis se realizó con FM58(S) y FM9(R) aplicando 0; 0,05; 0,10; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 y 25g·ha⁻¹ i.a.; y 0, 25, 50, 100, 200 400, 800 y 1600g·ha⁻¹ i.a. de pirazosulfurón, respectivamente. La relación de dosis para efecto medio (ED₅₀) reveló un índice de resistencia (ED₅₀R/ED₅₀S) fuera del rango de dosis estudiadas y tiende a valores muy elevados, no calculables (>1600g·ha⁻¹ i.a.). Una respuesta similar se observó en la prueba de sensibilidad de la ALS donde extractos de tejido de plantas R y S se incubaron con concentraciones 0, 10, 100, 1000, y 10000nM de pirazosulfurón. Estos resultados indican que el mecanismo de esta resistencia se debe a una alteración de la enzima ALS con pérdida de sensibilidad a este herbicida.

Introducción

Al inicio de la década de 1950, cuando en Venezuela se comenzó a sembrar el arroz bajo riego y en grandes superficies, se señalaba que las malezas gramíneas *Echinochloa colona* (L.) Link, *Ischaemum rugosum* Salisb, *Lepthochloa virgata* (L.) Beauv y el arroz rojo (*Oryza sativa* L.) eran las más importantes (Efferson y Walkers, 1953). Sin embargo, a partir

de los años 80 en las principales áreas arroceras, Portuguesa y Guárico, ya se mencionan a otras malas hierbas de relevancia, como lo es el 'pelo de indio' (*Fimbristylis miliacea*; Ohep, 1986; Páez y Almeida, 1994; Medina y Dorante, 1996; Martínez, 1998; Ortiz y Budowski, 1998; INIA, 2004).

Fimbristylis miliacea, una ciperácea adaptada al sistema de siembra directa del arroz (Rao *et al.*, 2007), está dentro

de las diez malezas consideradas más importantes de este cultivo, tanto en el sur de Asia (Moody, 1989; Juraimi *et al.*, 2010), como en América Latina y el Caribe (Rao *et al.*, 2007). En diversos países se reportan infestaciones con elevada dominancia (Azmi y Mashhor, 1995; Begum *et al.*, 2005; Ortiz, 2010) y con densidades de 5 a 4000 plantas/m² (Watanabe *et al.*, 1997b; Ortiz y Budowski, 1998; Abreu y Solórzano, 2006; Or-

tiz, 2010) en los campos de arroz, por lo que la falta de control de *F. miliacea* podría llegar a ocasionar pérdidas de rendimiento *paddy* del 42% (Juraimi *et al.*, 2009).

En Venezuela, *F. miliacea* ha sido considerada como maleza de mediana nocividad en los arrozales (Medina y Dorante, 1996). Estudios realizados por Anzalone *et al.* (2001) mostraron que el arroz es más sensible a la competencia intraespecífica que a la de *F.*

PALABRAS CLAVE / Arroz / *Fimbristylis miliacea* / Inhibidor de ALS / Pirazosulfurón / Resistencia a Herbicida /

Recibido: 04/08/2011. Modificado: 19/02/2012. Aceptado: 22/02/2012.

Aída Ortiz. Ingeniera Agrónoma y Doctora en Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesora, UCV, Venezuela. Dirección: Instituto de Agronomía, Av. Universidad, Maracay, Estado, Aragua, Venezuela. e-mail: ortiza@agr.ucv.ve

Lorena Villarreal. Ingeniera Agrónoma, UCV, Venezuela. Asesora, Syngenta Crop Protection S.A., Venezuela. e-mail: lorenavcv@hotmail.com.

Sandra Torres. Ingeniera Agrónoma, UCV, Venezuela. Asistente Técnico, UCV, Vene-

zuela. e-mail: sandratorr1@hotmail.com

María Dolores Osuna. Licenciada en Biología y Doctora en Bioquímica, Universidad de Córdoba, España. Directora del Laboratorio de Biotecnología. Departamento de Hortofruticultura, 'Finca La Orden-Valdesequera'. Badajoz, España. e-mail: mariadolores.osuna@juntaextremadura.net

Luis López. Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú. M.Sc. en Agronomía, University of the Philippines. Asesor, Proyecto

MIMA, Venezuela. e-mail: arrozluis@gmail.com

Rosana Figueroa. Ingeniera Agrónoma, UCV, Venezuela. Ph.D. en Mejoramiento Genético, University of Minnesota, EEUU. Profesora, UCV, Venezuela. e-mail: fuigueroar@agr.ucv.ve

Cástor Zambrano. Ingeniero Agrónomo y Magister en Agronomía, Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, Venezuela. Profesor, UCV, Venezuela. e-mail: castorzambrano@gmail.com

Marjorie Cásares. Ingeniera Agrónoma, UCV, Venezuela. Doctora en Economía Agroalimentaria, Universidad de Córdoba, España. Profesora, UCV, Venezuela. e-mail: canaruma@gmail.com

Albert Fischer. Ingeniero Agrónomo, Universidad de la República, Uruguay. Ph.D. en Ciencia de Cultivos, Oregon State University, EEUU. Asesor, Proyecto MIMA. Profesor, University of California-Davis, EEUU. e-mail: afischer@ucdavis.edu

PYRAZOSULFURON-ETHYL RESISTANT *Fimbristylis miliacea* IN RICE FIELDS OF GUÁRICO STATE, VENEZUELA

Aída Ortiz, Lorena Villarreal, Sandra Torres, María Dolores Osuna, Luis López, Rosana Figueroa, Cástor Zambrano, Marjorie Cásares and Albert Fischer

SUMMARY

Pyrazosulfuron-ethyl resistance was evaluated in twelve populations of *Fimbristylis miliacea* L. Vahl (globe fringerush) collected in paddy fields of Guárico state, Venezuela. Rice growers of this region have been observing failures to control *F. miliacea* with pyrazosulfuron. Bioassays were conducted to detect resistant accessions, quantify resistance levels, and assay differences in ALS sensitivity to pyrazosulfuron among resistant (R) and susceptible (S) *F. miliacea* accessions. For resistance detection, field-collected accessions were treated with 0 and 25g·ha⁻¹ i.a. pyrazosulfuron, which is the commercial rate. The above-ground plant fresh biomass was weighed 21 days after spraying. Fresh weight data were converted to percentages of the mean untreated control. This test detected two susceptible accessions (S)

(FM11 and FM58) and ten resistant (R) accessions (FM8, FM9, FM69, FM70, FM71, FM72, FM73, FM74, FM80 and FM94). To quantify resistance levels using a dose response experiment, the accession FM9(R) was treated with 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 and 1600g·ha⁻¹ i.a. pyrazosulfuron and the accession FM58(S) with 0, 0.05, 0.10, 0.19, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 and 25g·ha⁻¹ i.a. The ratio of R to S ED₅₀ from the dose-response experiments was extremely high (>1600g·ha⁻¹ i.a.) as was the ratio of R to S I₅₀ values obtained in the ALS activity assay (0, 10, 100, 1000, and 10000nM pyrazosulfuron). This indicates that repeated use of sulfonylurea herbicides for many years in rice fields of Guárico has selected ALS as target-site endowed resistance to pyrazosulfuron.

RESISTÊNCIA DE *Fimbristylis miliacea* AO HERBICIDA PIRAZOSULFURON-ETILO EM CAMPOS DE ARROZ DO ESTADO GUÁRICO, VENEZUELA

Aída Ortiz, Lorena Villarreal, Sandra Torres, María Dolores Osuna, Luis López, Rosana Figueroa, Cástor Zambrano, Marjorie Cásares e Albert Fischer

RESUMO

Resistência ao herbicida pirazosulfuron-ethyl foi avaliada em doze populações de *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl (tírica), coletadas em arrozais irrigados do estado de Guárico, Venezuela. Rizicultores desta região têm relatado controle ineficiente de *F. miliacea* com pirazosulfuron. Bioensaios foram conduzidos para: detectar populações resistentes, quantificar os níveis de resistência, e a sensibilidade da enzima ALS ao pirazosulfuron em plantas de *F. miliacea* resistentes (R) e susceptíveis (S). Amostras coletadas no campo foram tratadas com pirazulsuron a 0 e 25 g i.a. ha⁻¹ (dose comercial). A biomassa fresca da parte aérea das plantas foi pesada 21 dias após a pulverização; dados foram convertidos em porcentagens da média da testemunha sem herbicida. Este teste detectou duas

populações S (FM11 e FM58) e dez R (FM8, FM9, FM69, FM70, FM71, FM72, FM73, FM74, FM80 e FM94). Em experimento de dose-resposta, a população FM9 (R) foi tratada com pirazosulfuron a 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 g i.a. ha⁻¹ e o acesso FM58 (S) com pirazosulfuron a 0; 0,05; 0,10; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; e 25 g i.a. ha⁻¹. A relação R:S foi extremamente alta (>1600g·ha⁻¹ i.a.) como foi a relação R:S para os valores de I₅₀ obtidos no ensaio de atividade da ALS (0, 10, 100, 1000, e 10000nM pirazosulfuron). Isto indica que o uso repetido de sulfoniluréias por vários anos em campos de arroz de Guárico tem selecionado resistência herdada a pirazosulfuron por alteração no local de ação do herbicida.

miliacea, cuando se evaluaron a la densidad máxima de 137 plantas/m². Sin embargo, también se han determinado efectos alelopáticos en eluatos de exudados radicales, lavados foliares y estructuras reproductivas de *F. miliacea*, los que redujeron la altura de plantas de arroz en 18% y la longitud de sus radículas en 23% (Zambrano y Lazo, 2002). Más recientemente Begum *et al.* (2009) reportan que frente a una elevada densidad de *F. miliacea* (1000

plantas/m²) el rendimiento de arroz no se redujo cuando se aplicaron 170kg·ha⁻¹ de nitrógeno. Estas evidencias sobre el comportamiento de *F. miliacea* dan elementos importantes para entender las fallas sobre su control con pirazosulfuron en Guárico, Venezuela, ya que su uso frecuente y sistemático está seleccionando biotipos con resistencia en una especie de importancia secundaria que podría ahora sobrevivir al uso del herbicida, incrementarse y volverse

un problema, cuando originalmente no lo era.

En las zonas arroceras donde está presente *F. miliacea* se ha generalizado el uso de herbicidas para controlar esta maleza en altas infestaciones. El pirazosulfuron se comenzó a usar en Venezuela en 1992, mostrando en su inicio un excelente control a la dosis recomendada (25g·ha⁻¹ i.a.), de cortaderas (*Cyperus odoratus* (L.), *C. esculentus* (L.) y *C. iria* (L.) y pelo de indio (*F. milliacea*) (Ortiz, 2008; Ba-

yer, 2010). Pirazosulfuron es un herbicida de la familia de las sulfonilúreas que inhiben la enzima acetolactato sintetasa (ALS) o acetohidroxiácido sintetasa (AHAS, EC 2.2.1.6), lo que altera la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina (Devine *et al.*, 1993).

El uso continuo de herbicidas con similar mecanismo de acción o ruta de degradación puede ocasionar la evolución de malezas resistentes (Holt *et*

al., 1993; Heap y Lebaron, 2001; Gressel, 2002) y complicar considerablemente el manejo de malezas en arroz (Fischer *et al.*, 2000a, b; Osuna *et al.*, 2002; Yasuor *et al.*, 2010). El primer caso de resistencia en *F. miliacea* fue reportado con 2,4-D en 1989, en arrozales de Muda Plain, Malaysia, después de 23 años de uso continuo de este herbicida hormonal (Watanabe *et al.*, 1997a). Posteriormente, en 2001, se demostró la resistencia de esta maleza a pirazosulfurón-etil en Santa Catarina, Brasil (Noldin *et al.*, 2002).

En el manejo de malezas resistentes a herbicidas es necesario conocer el mecanismo de resistencia para poder implementar planes de control. Por ejemplo, si la resistencia es debida a alteraciones en el sitio de acción del herbicida (resistencia de sitio activo) el uso de herbicidas debe contemplar el empleo de mezclas, o secuencias de compuestos, que actúen sobre la maleza mediante diferentes mecanismos de acción (Fischer, 2000a, b). Herbicidas alternativos que pueden ser usados en programas para controlar *F. miliacea* en Venezuela son: oxadiazón, 2,4-D, ioxinilo, propanil, triclopyr y bentazona (Ortiz, 2008). La resistencia a pirazosulfurón podría complicar el uso de este herbicida, así como el de otros compuestos del mismo grupo químico actualmente disponibles en el mercado venezolano: azimsulfurón, halosulfurón y ethoxysulfurón. En Brasil se ha logrado un excelente control de *F. miliacea* resistente con 2,4-D, MCPA, bispiribac sodio y bentazona (Noldin *et al.*, 2002). En Guárico, Venezuela, la mezcla de glifosato+carfentrazona resultó exitosa para controlar *F. miliacea* en una finca de arroz donde su control con pirazosulfurón había fallado (Luis López, comunicación personal).

El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de accesiones de poblaciones de *F. miliacea* proveniente de arrozales del estado Guárico al herbicida pirazosulfurón, esta-

blecer los niveles de resistencia y detectar si el mecanismo de resistencia a este herbicida se debe a una alteración en el sitio activo.

Materiales y Métodos

En 2008 se recolectaron semillas de *F. miliacea* en arrozales del Sistema de Riego Río Guárico y sus adyacencias, haciendo énfasis en áreas donde los productores observaron fallas de control de esta maleza con pirazosulfurón, mientras que otras especies eran satisfactoriamente controladas. Se recolectaron, en forma masal, ~300g de semillas en cada campo visitado. Las núculas se almacenaron a 4°C y 65% de humedad relativa para preservar su viabilidad. En 2009, se realizaron tres tipos de bioensayos: uno preliminar de detección para identificar accesiones resistentes, un segundo ensayo de respuesta a dosis para confirmar y cuantificar la resistencia de la maleza *F. miliacea* a pirazosulfurón, y un tercer ensayo de actividad enzimática de la enzima acetolactato sintetasa (ALS) para investigar si la resistencia se debe a una pérdida de sensibilidad en el sitio de acción del herbicida.

Experimento preliminar de detección

Desde junio hasta octubre 2009, plantas de las doce accesiones recolectadas, al estado de cinco hojas, fueron tratadas con dos dosis de pirazosulfurón (0 y 25g·ha⁻¹ i.a.), bajo un diseño experimental completamente aleatorio con cinco repeticiones. El herbicida se aplicó utilizando una asperjadora de cámara con una descarga de 400l·ha⁻¹ a 250kPa y una boquilla de abanico plano 8002E (www.rittenhouse.ca/asp/Product.asp?PG=421). A la solución con herbicida se añadió un surfactante no iónico, siliconado, con regulador de pH (Agrotin®; Bayer; www.bayercropscience.com.ec/productdesc.aspx?prodid=45) a razón de 2500µl·l⁻¹. Las plantas correspondientes al testigo

sin tratar (dosis 0) fueron asperjadas con agua y surfactante al mismo volumen y presión que el resto de los tratamientos. Las condiciones de crecimiento en invernadero fueron: 30 a 35°C, 80% humedad relativa y fotoperiodo de 12h bajo irradiancia natural de 1300µmol·m⁻²·s⁻¹. Las núculas se colocaron directamente sobre la superficie de 500g de suelo (serie Maracay, Fluventic haplustolls, Francosa gruesa isohipertérmico, formación Mercedes; textura franca con pH 6,54) contenido en potes. Después de la emergencia, se raleó a cuatro plántulas iguales, espaciadas equidistantemente. Los potes fueron ubicados en una piscina bajo una lámina de agua constante de 10cm de alto, la cual no sobrepasaba la superficie del suelo en los potes, manteniendo el suelo saturado. Los experimentos se fertilizaron 72h después de la aplicación del herbicida con fórmula completa (Energy®, Sefloarca; www.sefloarca.com/agencias.htm). A los 21 días después de la aplicación (DDA) se cosechó la parte aérea de las plantas en cada pote y se midió el peso fresco inmediatamente después de cortar. Los datos de peso fresco se expresaron como porcentaje de crecimiento (peso fresco del tratamiento con herbicida expresado como porcentaje del promedio del tratamiento control sin herbicida).

Experimento de respuesta a dosis

Del experimento anterior se seleccionaron dos accesiones, una (FM9) que exhibió marcado nivel de resistencia (R) y otra (FM58) altamente susceptible (S) a fin de comparar las respuestas de ambas accesiones a dosis crecientes de pirazosulfurón y así poder calcular la dosis de efecto medio (ED₅₀, dosis para la cual se reduce el crecimiento de plantas tratadas a un 50% del de plantas no tratadas) para cada accesión y el índice de resistencia (ED₅₀R/ED₅₀S). Las dosis de pirazosulfurón utilizadas para la accesión FM9 (R) fueron: 0, 25, 50,

100, 200, 400, 800 y 1600g·ha⁻¹ i.a., mientras que para FM58 (S) se usaron: 0; 0,05; 0,10; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 y 25g·ha⁻¹ i.a. Los tratamientos se ubicaron bajo un diseño completamente aleatorio y se replicaron seis veces; el experimento se repitió para su validación. Las aplicaciones se efectuaron sobre plantas al estado de cinco hojas y ~2-3cm de altura. Tanto la aplicación del herbicida como la cosecha se realizaron de la misma manera que en el experimento anterior. Los datos de peso fresco se expresaron como porcentaje de crecimiento.

Experimentos de actividad de ALS

La respuesta a la inhibición de la enzima ALS al herbicida pirazosulfurón fue determinado *in vitro* utilizando extractos de proteína crudos de plantas 15 días después de sembradas de las accesiones FM9(R) y FM58(S) de *F. miliacea*. Las condiciones de siembra y crecimiento fueron tal como se detalló en la sección anterior. Se tomaron 2g de tejido foliar de plantas de cada accesión y se aplicó el método de Osuna *et al.* (2002) para la extracción y medición de la actividad de la enzima ALS, la cual se estimó cuantificando la conversión del producto acetolactato a acetoína por decarboxilación en presencia de ácido (nmol de acetoína/h por mg proteína; Ray, 1984). Los datos se expresaron como porcentaje de la media del tratamiento control sin herbicida. El máximo de actividad se midió en ausencia del herbicida pirazosulfurón. El experimento se realizó bajo un diseño experimental completamente aleatorio con tres réplicas. El experimento se repitió tres veces. Se calculó la dosis de efecto medio (I₅₀) en el punto de inflexión entre el efecto inhibitorio máximo y la actividad del control para cada accesión, y el índice de resistencia (I₅₀R/I₅₀S).

Análisis estadístico

Los datos del experimento preliminar de detección se

TABLA I
PESO FRESCO COMO PORCENTAJE DEL TESTIGO SIN TRATAR, DE ACCESIONES DE *Fimbristylis miliacea* PROVENIENTES DE ARROZALES DEL ESTADO GUÁRICO, VENEZUELA, EN RESPUESTA A 25g·ha⁻¹ i.a. DE PIRAZOSULFURÓN APLICADO SOBRE PLANTAS AL ESTADO DE CINCO HOJAS

Accesiones	Dosis (25g·ha ⁻¹ i.a.)	Coordenadas este ^b	Coordenadas norte ^b
FM73	140 ±15,27 ^a	622.656	953.450
FM74	128 ±6,70	622.656	953.450
FM69	111 ±5,55	660.428	982.142
FM80	111 ±1,40	660.382	972.316
FM70	110 ±15,24	660.428	982.142
FM71	110 ±5,85	660.428	982.142
FM94	109 ±5,76	655.437	967.181
FM9	75 ±2,54	660.350	972.427
FM72	73 ±7,47	622.656	953.450
FM8	62 ±4,11	660.382	972.361
FM11	0 ±0,00	667.986	986.441
FM58	0 ±0,00	650.912	985.234

^a Error estándar.

^b Datum RegVen, huso horario 19. Proyección de Coordenadas Universal Transversal de Mercator (UTM) www.sirgas.org/fileadmin/docs/regvenPDVSA.pdf

presentan como promedios y desviación estándar. En este experimento se consideró como resistente a aquellas accesiones que presentaron un peso fresco >30% del tratamiento testigo sin herbicida cuando fueron tratadas con la dosis comercial recomendada de pirazosulfurón (25g·ha⁻¹ i.a.), ya que con esta biomasa estas accesiones son capaces de completar su ciclo de crecimiento y producir semillas viables. Por otra parte, se consideró como susceptible a

aquellas cuyo peso fresco fue <30%. Los datos de respuesta a dosis y actividad ALS provenientes de experimentos repetidos se juntaron para el análisis; su distribución normal se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilks y diagramas de distribución de los errores permitieron inferir homogeneidad de varianzas. Se efectuó un análisis de regresión ajustando modelos que describían adecuadamente las tendencias y minimizaban el cuadrado medio del error.

Se ajustó un modelo de regresión no lineal log-logístico (Streibig *et al.*, 1993; Seefeldt *et al.*, 1995) a la respuesta de plantas enteras a dosis de herbicida:

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

donde Y: porcentaje de crecimiento, d: respuesta media cuando la dosis de herbicida tiende a cero, b: pendiente de la curva, ED₅₀: dosis de herbicida en el punto de inflexión, y x: dosis de herbicida y el índice de resistencia fue determinado dividiendo el ED₅₀ del FM9(R) entre el de FM58(S). La respuesta de actividad ALS a diferentes concentraciones de pirazosulfurón-etilo se describió usando un modelo exponencial decreciente (Yasuor *et al.*, 2009):

$$Y = a + b e^{-cx}$$

donde a, b, y c: coeficientes de regresión calculados. El análisis de regresión se realizó utilizando el programa Sigma Plot v. 11 (2009).

Resultados y Discusión

Todas las accesiones de *F. miliacea* recolectadas en las fincas donde los agricultores manifestaron tener problemas para su control con pirazosulfurón, mostraron pesos frescos muy superiores al 30% de las plantas no tratadas con la

dosis comercial (25g·ha⁻¹ i.a.), por lo que se consideraron como resistentes (Tabla I). Todas las plantas resistentes estaban en condiciones de completar su ciclo vital. Estos resultados indican que en la especie han evolucionado biotipos resistentes bajo la presión de selección ejercida por el uso continuo en las siembras de arroz de pirazosulfurón, el cual se expende en el país desde hace más de 17 años. Cabe destacar que las accesiones FM11 y FM58, provenientes de las dos fincas muestreadas donde no había fallas de control de *F. miliacea* con pirazosulfurón, mostraron una alta mortalidad en los tratamientos con herbicida a las dosis comercial de 25g·ha⁻¹ i.a. (Tabla I). En las áreas donde se recolectaron estas dos accesiones, no se había usado pirazosulfurón, anteriormente.

La dosis de herbicida requerida para inhibir el 50% del crecimiento (ED₅₀) de *F. miliacea* en el experimento de respuesta a dosis y los parámetros de las ecuaciones usados para estimar esta dosis se presentan en la Tabla II. Se comprueba que la accesión FM9 es resistente a pirazosulfurón, dado que ni siquiera a dosis 64 veces la comercial se consigue reducir apreciablemente su crecimiento (Figura 1). Por esta razón, los datos para esta

TABLA II
ECUACIONES DE REGRESIÓN UTILIZADAS PARA ESTIMAR LA DOSIS DE PIRAZOSULFURÓN REQUERIDA PARA REDUCIR AL 50% LA BIOMASA (ED₅₀) O LA ACTIVIDAD ALS (I₅₀) EN PLANTAS DE *F. miliacea* SUSCEPTIBLES (S) Y RESISTENTES (R) A ESTE HERBICIDA E ÍNDICES DE RESISTENCIA (R/S)

Experimento	Accesión	Ecuación [†]	Parámetros de regresión				ED ₅₀ (g·ha ⁻¹ i.a.)	I ₅₀ (nM)	R ²	P	R/S [‡]
			a	b	c	d					
Respuesta a dosis	FM58(S)	Y = d / [1 + (x / ED ₅₀) ^b]		18,6		97,8	0,46(0,05)		0,97	<0,0001	
	FM9(R)	Y = d / [1 + (x / ED ₅₀) ^b]		1,8		109,5	> 1600		0,21	0,0001	No calculable
Actividad ALS	FM58(S)	Y = a + b e ^{-cx}	52,8	44,9	0,02			27,6(26,5)	0,94	<0,0001	
	FM9(R)	Y = b e ^{-cx}		101,9	1,5 ^{-0,005}			>10000	0,33	0,02	No calculable

[†]Y: peso fresco o la actividad ALS específica expresados como porcentaje sobre del testigo sin herbicida, x es la variable independiente (dosis o concentración de pirazosulfurón); a, b, c y d: parámetros de regresión estimados; ED₅₀ e I₅₀: dosis o concentración de herbicida necesaria para reducir el crecimiento o la actividad ALS al 50%, respectivamente (Streibig *et al.*, 1993); valores entre paréntesis: intervalos de confianza al 95%; R²: estimación del coeficiente de determinación; P: nivel de significancia; R/S: índice de resistencia (ED₅₀ R/ED₅₀ S o I₅₀ R/I₅₀ S).

[‡]Como los valores de ED₅₀ e I₅₀ de la accesión resistente (FM9) se encuentran fuera del rango de dosis estudiadas, los R/S correspondientes no pueden ser calculados y tienden a valores muy elevados.

accesión no se ajustaron a una sigmoide decreciente y no fue posible estimar la ED_{50} dentro del rango de datos ($ED_{50} > 1600 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$ i.a.; Tabla II). Por otra parte, con una dosis de tan solo $0,78 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$ i.a. se suprimió completamente el crecimiento de plantas de la accesión FM58 (Figura 1). Esto lleva a que el índice de resistencia tienda a valores extremadamente elevados (Tabla II). Por otro lado, el experimento sobre actividad enzimática demostró que la ALS de la accesión FM9 (R) fue casi insensible a pirazosulfurón, mientras que la de la ALS extraída de FM58 (S) fue drásticamente inhibida a concentraciones de pirazosulfurón superiores a 10 nM (Figura 2). Tampoco fue posible calcular un valor R/S para la respuesta de la ALS debido a la insensibilidad de la accesión R (Tabla II), por lo que se comprueba que el mecanismo de resistencia de *F. miliacea* a pirazosulfurón se debe a una modificación en el lugar de acople del herbicida en su sitio activo. Esto puede deberse a una mutación en el gen que codifica la enzima ALS, tal como lo sugieren estudios que relacionan elevados índices de resistencia con alteraciones en el sitio de acción de herbicidas inhibidores de la ALS. Tal es el caso de *Cyperus difformis* L., con resistencia a los herbicidas imazosulfurón, bensulfurón-metilo, ciclosulfurón y pirazosulfurón en Korea (Kuk *et al.*, 2003a); *Monochoria vaginalis* resistente a imazosulfurón en Korea (Kuk *et al.*, 2003b) y *Sorghum bicolor* resistente a primisulfurón en Ohio, EEUU (Brenly-Bultemeir *et al.*, 2010). Resistencia de sitio activo a sulfonilúreas como imazosulfurón puede resultar de mutaciones en el gen que codifica a la enzima ALS en las posiciones prolina 197 (secuencia de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), asparagina 376, triptófano 574, mientras que resistencia moderada puede resultar de mutaciones en alanina 205 y glicina 654 (Tranel *et al.*, 2010). Otros mecanismos de resistencia a este grupo de herbicidas incluyen la elevada detoxificación

metabólica en biotipos resistentes, como reportan Osuna *et al.* (2000) para bensulfurón en *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss. La resistencia de esta gramínea a penoxsulam, otro inhibidor de la ALS, se debe en parte a una sobreexpresión de la enzima ALS, lo cual también constituye resistencia de sitio activo (Yasuor *et al.*, 2009). Sin embargo, en este caso, y en los casos de resistencia metabólica, los niveles de resistencia suelen ser inferiores (índices de resistencia < 10) a los que fueron observados en el presente experimento y en los casos comprobados de mutaciones específicas en el gen de la ALS (Tranel *et al.*, 2002). Con otros grupos de herbicidas también se ha observado que altos índices de resistencia están relacionados con modificaciones en el sitio activo, tal como se encontró en *Lolium temulentum* (L.) proveniente de Arkansas, EEUU, con resistencia a herbicidas inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa; Kuk *et al.*, 2000).

Si bien *F. miliacea* no es una maleza muy competitiva con el arroz, su resistencia a uno de los grupos de herbicidas más usados para el control de ciperáceas y otras malezas relevantes de este cultivo podría convertirse en un serio problema en los campos de arroz. La resistencia permitirá que *F. miliacea* incremente su importancia dentro de la flora infestante del arroz a medida que las especies arvenses susceptibles se desplazan bajo la selección por uso repetido de ciertos herbicidas, y pueda adquirir así mayor peligrosidad para el cultivo en el futuro (Culpepper, 2006).

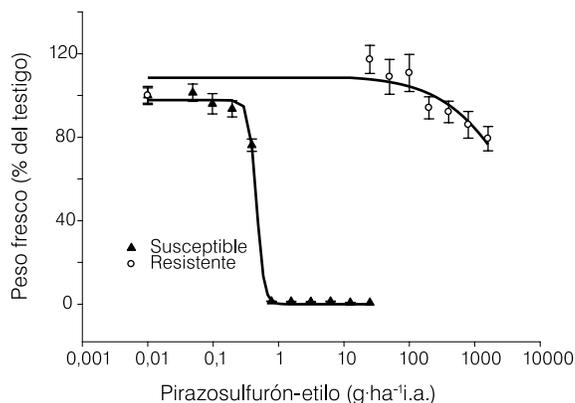


Figura 1. Respuesta de las accesiones de *F. miliacea* FM9 (resistente) y FM58 (susceptible) a dosis crecientes de pirazosulfurón. Cada punto es la media y desviación estándar de 12 observaciones provenientes de dos experimentos. El herbicida fue aplicado cuando las plantas tenían cinco hojas y el peso fresco fue determinado a los 21 días después de la aplicación. La dosis comercial de pirazosulfurón fue $25 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$ i.a. Los parámetros de las regresiones ajustadas se presentan en la Tabla II.

Las poblaciones resistentes a herbicidas por alteración del sitio de acción pueden ser manejadas usando herbicidas con otros mecanismos de acción, lo que incluye herbicidas no selectivos usados en presiembra. También pueden emplearse prácticas culturales como la falsa siembra, que consiste en humedecer el suelo para, luego de emerger las malezas, aplicar un herbicida como glifosato. También pueden emplearse pases de rastra o efectuar batido del suelo para evitar la producción de semillas de estas malezas. En Brasil, *F. miliacea* resistente a pirazosulfurón es

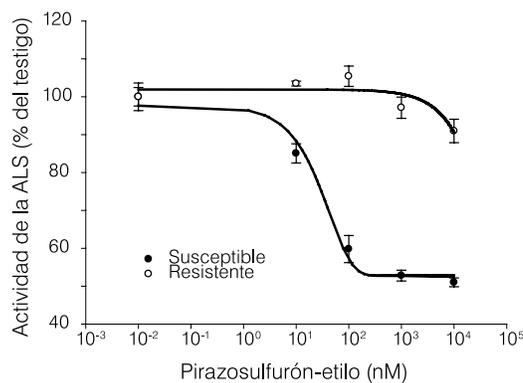


Figura 2. Actividad específica de la enzima ALS ($\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1}$ de acetoina por mg proteína) medida en extractos de plantas susceptibles y resistentes de *F. miliacea*; los datos se presentan como porcentajes de la media del testigo sin herbicida. Cada punto es la media y desviación estándar de nueve observaciones provenientes de tres experimentos. Los parámetros de las regresiones ajustadas se presentan en la Tabla II.

controlado usando 2,4-D, MCPA, bentazona y bispiribac sodio (Noldin *et al.*, 2002). El empleo de este último herbicida (pertenece al grupo de los pirimidinilbenzoatos) es desaconsejable para controlar *F. miliacea* resistente a pirazosulfurón, dado que se trata de un herbicida con su mismo mecanismo de acción (Fischer *et al.*, 2000a) y mutaciones en prolina 197, alanina 205, asparagina 376 y triptófano 574 pueden resultar en resistencia cruzada a sulfonilúreas y pirimidinilbenzoatos, e incluso otros grupos químicos inhibidores de la ALS (Tranel *et al.*, 2010). Butacloro, carfentrazona, clomeprop, dithiopyr, esprocarbo, mefenacet, oxadiazón, pretilacloro, pyrazolate y tiobencarbo son otros herbicidas que controlan ciperáceas. Estos herbicidas se emplean para el control de *C. difformis* resistente a inhibidores de la ALS (Kuk *et al.*, 2003a). *F. miliacea* es una maleza de ambiente acuático; por lo tanto, alternando la siembra en agua con siembra en suelo seco Fischer *et al.* (2009) consiguen alterar el ambiente de reclutamiento (pasando de una cama anaeróbica o saturada, a una cama de siembra aireada) y desfavorecer así la germinación de malezas acuáticas tal como el *Schoenoplectus mucronatus* (L.) Palla, con resistencia a herbicidas del grupo de las sulfonilúreas.

El presente trabajo reporta por primera vez en Venezuela la resistencia de algunas accesiones de *F. miliacea* provenientes de arrozales del estado Guárico al herbicida pirazosulfurón. La importancia de esta maleza y las pérdidas causadas a la

producción de arroz pueden incrementarse en fincas bajo tratamiento repetido con este herbicida o con otros del mismo grupo químico o modo de acción. Es necesario implementar prácticas de manejo integrado de malezas que comprendan la alternancia o secuenciación de herbicidas con diferente modo de acción, conjuntamente con otras prácticas culturales, tales como laboreo, falsa siembra y alternancia de sistemas de establecimiento de arroz.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte del Proyecto UCV-Sociedad PSU003-2008 'Manejo Integrado de Malezas en Arroz' (MIMA) del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV), así como a las empresas AGROISLEÑA y AGROTEBOR (aportes LOCTI).

REFERENCIAS

Abreu AA, Solórzano EJ (2006) Estudio del banco de semilla de arroz rojo (maleza) del suelo en la finca "Soledad de Armo" ubicada en el estado Portuguesa. Tesis. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 120 pp.

Anzalone AL, Zambrano CL, Lazo JV (2001) Evaluación de la interferencia entre *Fimbristylis* sp y *Oryza sativa* L., mediante el uso de series de reemplazo. *Anal. Bot. Agric.* 8: 5-15.

Azmi M, Mashhor M (1995) Weed succession from transplanting to direct-seeding method in Kemubu rice area, Malaysia. *J. Biosci.* 6: 143-154.

Bayer (2010) *Productos*. www.bayercropscience.com.ve/eb/index.aspx?articulo=907. Cons. 12/08/2010.

Begum M, Juraimi AS, Azmi M, Rajan A, Omar SRS (2005) Weed vegetation of direct seeded rice-fields in Muda rice granary areas of Peninsular Malaysia. *Pak. J. Biol. Sci.* 8: 537-541.

Begum M, Juraimi AS, Amartalingum R, Omar SRS, Man AB (2009) Effect of *Fimbristylis miliacea* competition with MR220 rice in relation to different nitrogen levels and weed density. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 183-187.

Brenly-Bultemeier TL, Stachler J, Harrison SK (2010) Confirma-

tion of shattercane (*Sorghum bicolor*) resistance to ALS-inhibiting herbicides in Ohio. Plant Management Network. www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/shattercane/Cons. 08/2010.

Culpepper AS (2006) Glyphosate-Induced Weed Shifts. *Weed Technol.* 20: 277-281.

Devine MD, Duke SO, Fedtke C (1993) *Physiology of Herbicide Action*: Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, EEUU. 441 pp.

Efferson J, Walkers R (1953) *Informe sobre el Programa Experimental del Arroz Desarrollado en Venezuela en 1953*. Instituto de IBEC de Investigaciones Técnicas. Caracas, Venezuela. sn/p.

Fischer AJ, Ateh CM, Hill JE (2000a) Herbicide-resistant *Echinochloa oryzoides* and *E. phyllopogon* in California *Oryza sativa* fields. *Weed Sci.* 48: 225-230.

Fischer AJ, Bayer DE, Carriere MD, Ateh CM, Yim KO (2000b) Mechanisms of resistance to bispyribac-sodium in an *Echinochloa phyllopogon* accession. *Pest. Biochem. Physiol.* 68: 156-165.

Fischer AJ, Moechnig M, Mutters RG, Hill JE, Greer CA, Espino LA, Eckert JW (2009) Using alternative rice stand establishment techniques to manage herbicide resistance and weed recruitment. En *XII Congress of the Spanish Weed Science society/XIX Congress of the Latin American Weed Science Society/II Iberian Congress of Weed Science*. 10-13/11/2009. ISA Press. Lisboa, Portugal. pp. 459-464.

Gressel J (2002) *Molecular Biology of Weed Control*. Taylor and Francis. Londres, RU. 520 pp.

Heap IM, Lebaron HM (2001) Introduction and overview of resistance. En Powles SB, Shaner DL (Eds.) *Herbicide Resistance and World Grains*. CRC. Boca Raton, FL; EEUU. pp. 1-22.

Holt JS, Holtum JM, Powles SB (1993) Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 203-229.

INIA (2004) *El Cultivo del Arroz en Venezuela*. Orlando Páez (Comp.); Ed. Alfredo Romero (Ed.). Serie Manuales de Cultivo N° 1. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Maracay, Venezuela. 202 pp.

Juraimi AS, Najib M, Begum M, Anuar A, Azmi M, Puteh A (2009) Critical period of weed competition in direct seeded rice under saturated and flood-

ed conditions. *Pertanika. J. Trop. Agric. Sci.* 32: 305-316.

Juraimi AS, Begum M, Najib M, Azmi M (2010) Efficacy of Herbicides on the Control Weeds and Productivity of Direct Seeded Rice under Minimal Water Conditions. *Plant Protect. Quart.* 25: 19-25.

Kuk YI, Burgos NR, Talbert RE (2000) Cross- and multiple resistance of diclofop-resistant *Lolium* spp. *Weed Sci.* 48: 412-419.

Kuk YI, Kim KH, Kwon OD, Lee DJ, Burgos NR, Jung S, Guh JO (2003) Cross-resistance pattern and alternative herbicides for *Cyperus difformis* resistant to sulfonylurea herbicides in Korea. *Pest Manag. Sci.* 60: 85-94.

Kuk YI, Burgos NR, Talbert RE (2000) Cross- and multiple resistance of diclofop-resistant *Lolium* spp. *Weed Sci.* 48: 412-419.

Kuk YI, Jung H, Kwon OD, Lee DJ, Burgos NR, Guh JO (2003) Rapid diagnosis of resistance to sulfonylurea herbicides in monochoria (*Monochoria vaginalis*). *Weed Sci.* 51: 305-311.

Martínez P (1998) *Diagnóstico del Cultivo del Arroz en Venezuela*. Fundación Nacional del Arroz y Fundación Polar. Caracas, Venezuela. 67 pp.

Medina DJ, Dorante IA (1996) *Manual de Identificación de Maleza en el Cultivo de Arroz Bajo Riego en Venezuela*. Asociación de Productores de Semilla Certificada de Arroz de los Llanos Occidentales. Acarigua, Portuguesa, Venezuela. 20 pp.

Moody K (1989) Weeds reported to occur in rice in South and Southeast Asia. In *Weeds Reported in South and Southeast Asia*. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 80 pp.

Noldin JA, Eberhardt DS, Rampe-lotti FT (2002) *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl resistente a herbicidas inibidores da ALS em Santa Catarina. *Anais Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas*. Londrina, Brasil. p. 199.

Ohep J (1986) Manejo y control de malezas en el cultivo de arroz. *El Malezólogo* 6(32).

Ortiz A (2006) Herbicidas usados en el cultivo de arroz en Venezuela. *El Malezólogo* 2: 17-19.

Ortiz A (2010) *Evaluación de Métodos de Control de Arroz Rojo en el Cultivo del Arroz en Venezuela*. Tesis. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 187 pp.

Ortiz A, Budowski T (1998) Estudio preliminar de la incidencia de arroz rojo y otras malezas en el arrozal venezolano. *Rev. Inv. Agric. Fund. Agric. DANAC* 3: 1-15

Osuna MD, Vidotto F, Fischer AJ, Bayer DE, De Prado R, Ferrero A (2002) Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfurón-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pest. Biochem. Physiol.* 73: 9-17.

Páez O, Almeida N (1994) Control integrado de malezas en arroz bajo riego en el estado Portuguesa. *Agron. Trop* 44: 245-262.

Rao AN, Johnson DE, Sivaprasad B, Ladha JK, Mortimer AM (2007) Weed management in direct-seeded rice. *Adv. Agron.* 93: 153-255.

Ray TB (1984) Site of action of chlorsulfurón. *Plant Physiol.* 75: 827-831.

Seefeldt SS, Jensen JE, Fuerst EP (1995) Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technol.* 9: 218-227.

Streibig JC, Rudemo M, Jensen JE (1993) Dose-response curves and statical models. En Streibig JC, Kudsk P (Eds) *Herbicide Bioassays*. CRC. Boca Raton, FL, EEUU. pp. 29-55.

Tranel PJ, Wright TR (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci.* 50: 700-712.

Tranel PJ, Wright TR, Heap IM (2010) *ALS Mutations from Herbicide-Resistant Weeds*. www.weedscience.com. Cons. 08/2012.

Watanabe HM, Ismail MZ, Naikin HO (1997a) Response of 2,4-D resistant biotype of *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl. to 2,4-D dimethylamine and its distribution in the Muda Plain, Peninsular Malaysia. *J. Weed Sci. Technol.* 42: 240-249.

Watanabe HM, Azmi MZ, Ismail MZ (1997b) Emergence of major weeds and their population change in wet-seeded rice fields of the MUDA area, Peninsular Malaysia. En Rajan A (Ed.) *Proc. 16th Asian Pacific Weed Science Society Conf.* Kuala Lumpur, Malaysia. pp. 246-250.

Yasuor H, Osuna M, Ortiz A, Saldain N, Eckert J, Fischer AJ (2009) Mechanism of Resistance to Penoxsulam in Late Watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stafp) Koss.]. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3653-3660.

Zambrano CL, Lazo JV (2002) Evaluación del potencial alelopático de *Fimbristylis miliacea*, sobre algunas especies de malezas de importancia económica en los sistemas de producción de arroz en Venezuela. *Anal. Bot. Agric.* 9: 15-25.