

## Primer caso de resistencia a glifosato en la República Dominicana

Francisco Jiménez<sup>1</sup>, Pablo Fernández<sup>1</sup>, Jesús Rosario<sup>1</sup>, Fidel Gonzales<sup>1</sup> y Rafael De Prado<sup>2</sup>

La República Dominicana posee un área de más 30,000 hectáreas dedicadas a la producción de cítricos, con una producción estimada de 493,000 toneladas métricas. El control de malezas constituye una de las actividades más importante en el mantenimiento de la producción, siendo el glifosato el herbicida más utilizado como método de control químico, durante los últimos 20 años. Sin embargo, se reportan fallas en el control de *Parthenium hysterophorus* L. (*Ph*) y *Phaseolus lathyroides* L. (*Pl*), especialmente en campos de cítricos. Con el objetivo de evaluar la respuesta de estas especies y confirmar la posible resistencia a glifosato, se realizaron ensayos dosis-respuesta (ED<sub>50</sub>) y acumulación de ácido shiquímico en 5 poblaciones sospechosas, las cuales fueron comparadas con una población sensible. Los resultados de ED<sub>50</sub> de los biotipos de *Ph*, fueron de 409.9, 294.6, 159.7 y 41.5 g ae ha<sup>-1</sup>, para los biotipos *Ph*<sub>10</sub>, *Ph*<sub>7</sub>, *Ph*<sub>8</sub> y *Ph*<sub>16</sub>, respectivamente; en tanto que para los biotipos *Pl*<sub>1</sub> y *Pl*<sub>2</sub> fueron similares, 85.1 y 81.8 g ae ha<sup>-1</sup>, respectivamente. La velocidad de acumulación de ácido shiquímico fue 0.006, 0.018, 0.027, 0.035, 0.038 y 0.066 mg g pf<sup>-1</sup> (peso fresco) h<sup>-1</sup> para *Ph*<sub>10</sub>, *Ph*<sub>7</sub>, *Ph*<sub>8</sub>, *Pl*<sub>1</sub>, *Pl*<sub>2</sub> y *Ph*<sub>16</sub>, respectivamente. El orden de resistencia es *Ph*<sub>10</sub> > *Ph*<sub>7</sub> > *Ph*<sub>8</sub> > *Pl*<sub>1</sub> ≥ *Pl*<sub>2</sub> > *Ph*<sub>16</sub>. *Pl* presenta una tolerancia natural, en tanto que el factor de resistencia para *Ph*<sub>10</sub> fue 9.5, lo cual confirma el primer caso de resistencia a glifosato en la República Dominicana.

**Palabras clave:** dosis-respuesta, ácido shiquímico, *Parthenium hysterophorus* L., *Phaseolus lathyroides* L.

### INTRODUCCIÓN

La aplicación repetida de herbicidas con el mismo ingrediente activo, del mismo grupo químico o con igual sitio de acción, ejerce una presión de selección en la comunidad de malezas, la cual en interacción con el suelo, el clima, las prácticas culturales, el sistema de cultivo, la especie de maleza y la no aplicación de medidas alternativas de control, favorecen el desarrollo y la aparición de biotipos resistentes en una especie de maleza (Tharayil-Santhakumar 2004).

La resistencia a un herbicida sucede cuando un individuo dentro de una población de una especie de mala hierba, sobrevive y se reproduce después de la aplicación de la dosis agrícola recomendada, que controla normalmente la población. La resistencia puede ocurrir de manera natural y tener por origen mutaciones genéticas responsables de alteraciones en el sitio de acción del herbicida, en el proceso de metabolismo del herbicida en la planta, en la penetración, en la translocación y en la compartimentalización de la molécula herbicida en el individuo resistente (Tharayil-Santhakumar 2004; Friesen *et al.* 2000).

El estudio de resistencia a herbicidas en malas hierbas constituye una herramienta de suma importancia para determinar el comportamiento de las mismas ante el uso de moléculas herbicidas, así como el establecimiento de medidas de manejo ante detección de resistencia. El control químico es el método más utilizado, siendo el glifosato el herbicida de mayor uso, principalmente en fincas o explotaciones frutícolas.

Determinadas especies de plantas cultivadas, y también de malas hierbas, son capaces de vivir y crecer a las dosis recomendadas de aplicación agrícola del herbicida, aunque puedan ser controladas a dosis varias veces superiores. Este tipo de respuesta se conoce generalmente como tolerancia natural y ha sido definida por la HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) como la habilidad/aptitud heredable de una especie vegetal a sobrevivir y reproducirse después de un tratamiento.

Al momento se han registrado, a nivel mundial, 403 casos de resistencia a herbicidas, de los cuales 132 especies son resistentes a herbicidas cuyo sitio de acción es la enzima acetolactato sintasa (ALS), 74 a inhibidores de la fotosíntesis en el fotosistema II, 43 inhibidores de la enzima acetil CoA carboxilasa (ACCase), 30 auxinas sintéticas, 28 actúan en el fotosistema I, 24 son inhibidores de la enzima 5-Enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) y 23 inhibidores de la fotosíntesis, entre otros, (Heap 2013).

En Centro América y el Caribe, se ha detectado resistencia a glifosato en Colombia y México (Heap 2013). En la República Dominicana, no se tiene reporte de casos de resistencia científicamente demostrado, pese a que los productores agrícolas se quejan de la ineficacia de algunos de los herbicidas utilizados, principalmente glifosato, en el control de las malas hierbas. El objetivo de esta investigación fue determinar la posible resistencia a glifosato de *Parthenium hysterophorus* L. (*Ph*) y *Phaseolus lathyroides* L. (*Pl*), mediante ensayos de dosis-respuesta (ED<sub>50</sub>) y acumulación de ácido shiquímico.

<sup>1</sup> Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

<sup>2</sup> Universidad de Córdoba, España.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para la realización de los ensayos se prospectaron semillas de *Parthenium hysterophorus* L. (*Ph*) y *Phaseolus lathyroides* L. (*Pl*) en campos de cítricos del Consorcio Cítricos Dominicanos del Grupo Rica, en Villa Altigracia, San Cristóbal, República Dominicana, con sospecha de resistencia a glifosato y en veredas de carreteras en las provincias Monseñor Nouel y María Trinidad Sánchez. Para la verificación de resistencia de *Ph* se compararon con un biotipo sensible procedente de México. En tanto que para comparar *Pl* se prospectaron semillas en un área donde no se ha utilizado el herbicida.

Las semillas fueron pre germinadas y colocadas en macetas de 320 cm<sup>3</sup> de volumen, conteniendo una mezcla de turba-arena en una relación v/v 1:1, y mantenida en invernadero a temperatura noche/día de 27/18°C y fotoperiodo de 14/10 h.

### Dosis-respuesta

Los tratamientos para dosis-respuesta se realizaron cuando las plantas alcanzaron de 3 a 5 hojas de desarrollo, utilizando una máquina de aplicación experimental de herbicida (Devries Manufacturing, Hollandale, Minnesota, USA), equipada con boquillas de abanico plano Tee Jet 80.02 EVS (apertura uniforme de 80°), ajustada a 200 kPa y volumen de aplicación de 200 L ha<sup>-1</sup>. Las dosis evaluadas fueron 20, 40, 60, 80, 160, 320, 640 y 1,280 gramos de ácido equivalente (g ae ha<sup>-1</sup>) de glifosato, bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones (plantas).

Las plantas fueron cortadas a nivel del suelo, 21 días después del tratamiento (DDT) para cuantificar el peso fresco. Estos datos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal log-logistic, con el paquete estadís-

tico Sigma Plot 8.0 (Seefeldt *et al.* 1995). Los valores de ED<sub>50</sub> correspondientes fueron usados para calcular el factor de resistencia (FR) de cada especie y biotipos, dividiendo la ED<sub>50</sub> del biotipo R entre la ED<sub>50</sub> del S (FR=ED<sub>50</sub> R/ ED<sub>50</sub> S).

### Ácido shiquímico

Para determinar la acumulación de ácido shiquímico, las plantas de cada especie y biotipos fueron tratadas en el estadio de 3 a 5 hojas con glifosato a 300 g ae ha<sup>-1</sup> y un volumen de derivación de 200 L ha<sup>-1</sup>. Se conformó un muestra compuesta de las ocho plantas de 50 mg de tejido cortada a 12, 24, 48, 72 y 96 horas después del tratamiento (HDT) y congeladas en nitrógeno líquido, utilizando la metodología descrita por Perez-Jones *et al.* (2005). La acumulación de ácido shiquímico fue determinada mediante un espectrofotómetro a 380 nm, los resultados se expresaron en miligramos por gramos de peso fresco (mg g pf<sup>-1</sup>). Se calculó la velocidad de acumulación de ácido shiquímico mediante la pendiente (m) de la recta en una sección de la misma;  $m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$ ;  $m = \text{mg gpf}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Dosis-respuestas

Los datos de peso fresco de los cultivares se ajustaron al modelo de regresión no lineal log-logistic con un nivel de significancia según se describe en la Tabla 1, el cual estima la dosis efectivas que reduce en un 50% (ED<sub>50</sub>) el peso fresco de los cultivares tratados con glifosato (Tabla 1 y Figura 1).

Los resultados muestran una respuesta diferencial entre los valores de ED<sub>50</sub> de los diferentes biotipos de *Ph*. La dosis capaz reducir el peso fresco en 50% de los biotipos de *Ph* fue de 402.2, 294.6, 149.7 y 41.5 g ae ha<sup>-1</sup> para los biotipos *Ph*<sub>10</sub>, *Ph*<sub>7</sub>, *Ph*<sub>8</sub> y *Ph*<sub>16</sub>. La ED<sub>50</sub> para

Tabla 1. Parámetros de la ecuación <sup>1</sup>usada para calcular la dosis de glifosato requerida para reducir en un 50% la masa fresca (ED<sub>50</sub>) en las poblaciones de *Parthenium hysterophorus* y *Phaseolus lathyroides*

Cultivars	Respuesta	U	L	b	Pseudo r <sup>2</sup> <sup>3/</sup>	ED50 (SE) <sup>2/</sup>	FR <sup>4/</sup>	Valor p
<i>Ph</i> <sub>7</sub>	R	92.3	0.0	1.72	0.98	294.6	7.09	0.001
<i>Ph</i> <sub>8</sub>	R	89.4	0.0	1.6	0.93	149.7	3.60	0.001
<i>Ph</i> <sub>10</sub>	R	94.7	0.0	1.83	0.96	402.2	9.69	0.001
<i>Ph</i> <sub>16</sub>	S	94.3	2.2	1.6	0.98	41.5	----	0.001
<i>Pl</i> <sub>1</sub>	T	144.1	0.0	1.02	0.98	85.2	2.05	0.005
<i>Pl</i> <sub>2</sub>	T	127.5	0.0	1.1	0.98	81.8	1.97	0.005

<sup>1</sup>Ecuación Log-logistic  $Y = L + \{(U-L) / [1 + (x/ED50)^b]\}$ , donde Y es la masa fresca, expresada como porcentaje con respecto al control no tratado; x (variable independiente) es la dosis de glifosato (g ae ha<sup>-1</sup>), U es el valor máximo de la asíntotas, L es el valor mínimo, b es el punto de inversión de la curva, y ED50 es la dosis efectiva requerida para reducir en 50 % la masa fresca de las poblaciones. Los datos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal. Los datos representan el promedio de diez (plantas) repeticiones. <sup>2/</sup> SE= error estándar. <sup>3/</sup> coeficiente de determinación. <sup>4/</sup> FR = factor de resistencia = ED50 R/ ED50 S).

$PI_1$  y  $PI_2$  fue de 85.2 y 85.8 g ae ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 1 y Figura 2). El factor de resistencia (FR) calculado para cada biotipo con respecto al biotipo sensible ( $Ph_{16}$ ) es como sigue; 9.69, 7.09, 3.60, 2.05 y 1.97, para los biotipos  $Ph_{10}$ ,  $Ph_7$ ,  $Ph_8$ ,  $PI_1$  y  $Ph_2$ , respectivamente, (Tabla 1). El biotipo  $Ph_{10}$  requiere 9.69 veces la dosis del biotipo sensible ( $Ph_{16}$ ) para reducir su peso fresco, lo que muestra que este biotipo tiene un alto nivel de resistencia a glifosato.

Los biotipos del género *Parthenium* muestran una resistencia diferencial, lo que permite clasificar el nivel de resistencia de estos biotipos en altamente resistente ( $Ph_{10}$ ) y resistentes ( $Ph_7$  y  $Ph_8$ ), respectivamente. Esta resistencia está asociada a la presión de selección que conlleva el uso prolongado de un herbicida en el mismo

sitio de acción, en este caso glifosato, por lo que uno o más mecanismos de resistencia, como mutación en el sitio de enlace (EPSPS) con el herbicida, procesos metabólicos, una menor absorción y/o translocación del herbicida al sitio de acción.

Los biotipos del género *Phaseolus* mostraron un FR de 2.05 y 1.97 para  $PI_1$  y  $PI_2$ , respectivamente, (Tabla 1). Estos biotipos muestran valores similares, lo que pudieran ser consideradas como moderadamente resistentes. Las semillas del biotipo  $PI_2$  fueron prospectadas en una zona donde no se ha utilizado glifosato para establecer la comparación con el biotipo prospectado en campos de cítricos ( $PI_1$ ). Estos resultados sugieren que este biotipo posee una tolerancia natural dado el mismo factor de resistencia en ambos.

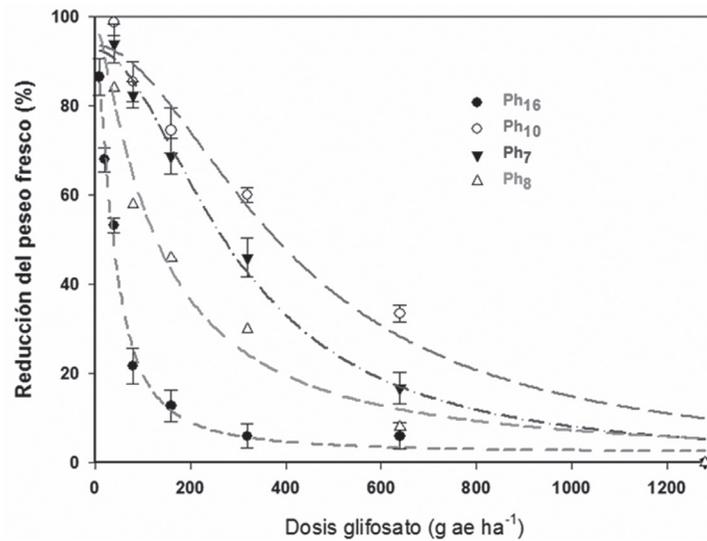


Figura 1. Curvas dosis-respuesta ( $ED_{50}$ ) de cuatro biotipos de *Parthenium hysterophorus* tratadas con glifosato.

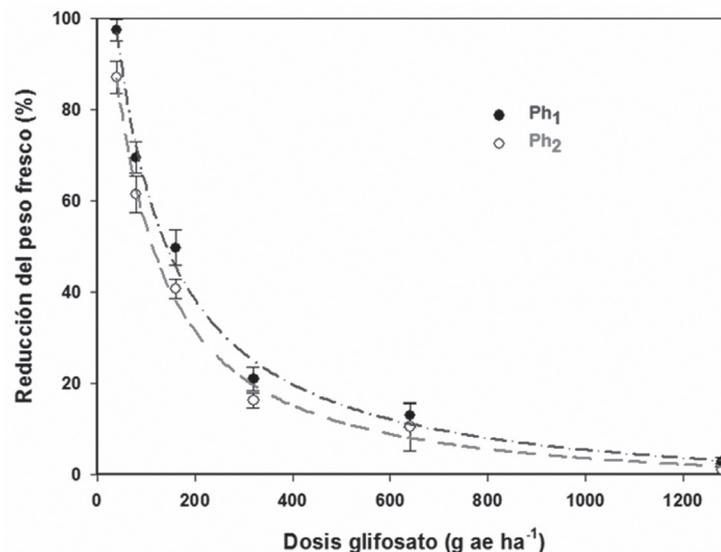


Figura 2. Curvas dosis-respuesta ( $ED_{50}$ ) de dos biotipos de *Phaseolus lathyroides* tratadas con glifosato.

### Acumulación de ácido shiquímico

Los cambios en los niveles de ácido shiquímico en las plantas son específicamente el resultado de la inhibición de la EPSPS (Amrhein *et al.* 1980). En plantas sensibles, como consecuencia de esta inhibición se produce un incremento de ácido shiquímico, después de ser tratadas con glifosato. Esta inhibición ha sido usada como un marcador para determinar la sensibilidad al herbicida (Mueller *et al.* 2008).

La población con mayor velocidad de acumulación correspondió a  $Ph_{16}$ , seguido por  $Ph_8$ ,  $Ph_7$  y  $Ph_{10}$  con 0.066, 0.027, 0.018 y 0.006 mg g pf<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, Figura 3. El biotipo  $Ph_{16}$  muestra una velocidad de acumulación 11 veces superior al biotipo  $Ph_{10}$ , lo que muestra que  $Ph_{10}$  tiene una alta resistencia al herbicida. Los demás biotipos muestran una resistencia intermedia.

La acumulación de ácido shiquímico en los biotipos de *PI* describen un ecuación lineal hasta las 96 HDT Figura 4, con una velocidad de acumulación de 0.035 y 0.038mg g pf<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para  $Ph_1$  y  $Ph_2$ , respectivamente, los cuales muestran valores de acumulación muy similares. A partir de las 96 HDT la velocidad comienza a declinar en ambos biotipos, lo que sugiere una reactivación en la producción de aminoácidos aromáticos, en la enzima EPSPS, imprescindibles para el desarrollo de las plantas.

El biotipo  $Ph_2$  no había sido sometido a tratamientos con glifosato y la misma se utilizó para compararla con  $Ph_1$ , procedente de campos de cítricos tratados por más de 15 años, sin embargo muestran el mismo comportamiento. Esto sugiere que el nivel de resistencia mostrado por *PI* no ha sido el resultado de la presión de selección inducida por la aplicación del glifosato, más bien es

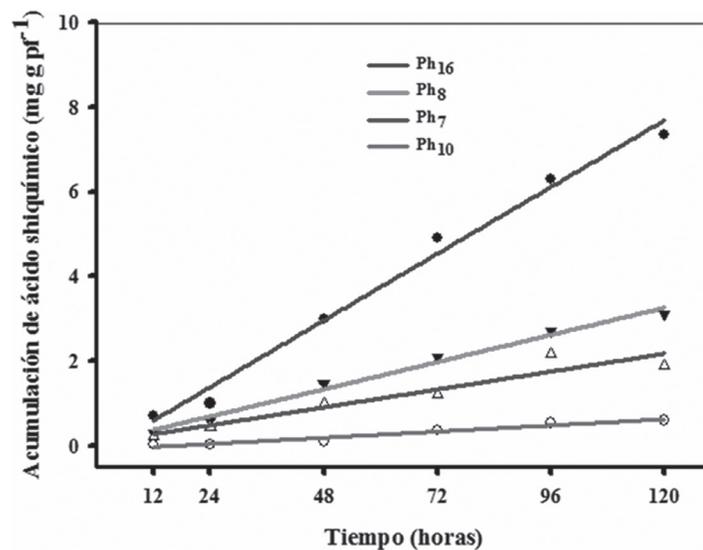


Figura 3. Acumulación de ácido shiquímico en cuatro biotipos de *Parthenium hysterophorus* tratadas con glifosato.

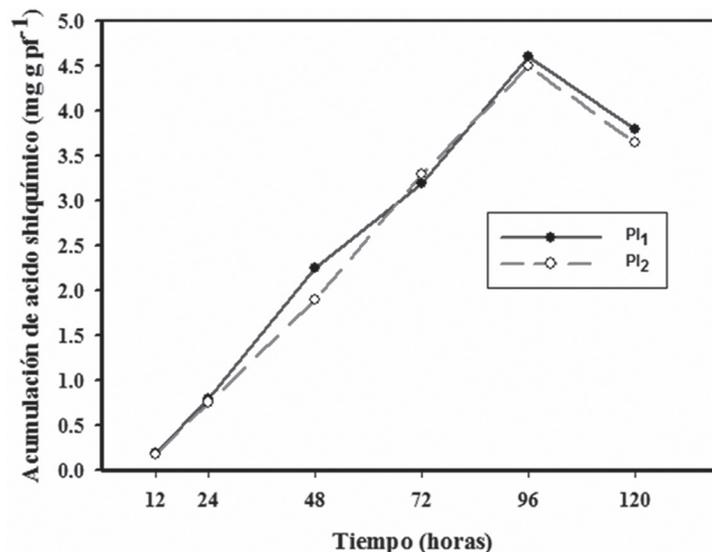


Figura 4. Acumulación de ácido shiquímico en dos biotipos de *Phaseolus lathyroides* tratadas con glifosato.

debido a una tolerancia natural de esta leguminosa, la misma pudiera deberse a procesos metabólicos a compuestos no tóxicos del herbicida para la planta u otros mecanismos asociados a la resistencia.

### CONCLUSIONES

Se confirma el primer caso de resistencia al herbicida glifosato en la República Dominicana en biotipos de la especie *Parthenium hysterophorus*. En tanto que *Phaseolus lathyroides* muestra cierto nivel de resistencia a glifosato, descartándose que esta resistencia sea debido a la presión de selección impuesta por el uso prolongado de glifosato, lo que sugiere que esta especie tiene tolerancia natural a este herbicida.

### AGRADECIMIENTO

Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencias e Innovación de España, a través del proyecto AGL2010-16774. Agradecemos la colaboración del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) y el Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF), así como la colaboración técnica de Rafael A. Roldán-Gómez.

### LITERATURA CITADA

Amrhein, N.; Deus, B.; Gehrke, P.; Steinrücken, H. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiology* 66: 830-834.

Friesen, L.; Jones, T.; Van Acker R.; Morrison, I. 2000. Identification of *Avena fatua* populations resistant to imazamethabenz, flumetrol, and fenoxaprop-P. *Weed Science*, 48:532-540.

Heap, I. 2013. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. (En Línea) Consultado el 6 de septiembre del 2013. Disponible en: <http://www.weedscience.org/summary/home.aspx>

Mueller, T.; Ellis, A.; Beeler, J.; Sharma, S.; Singh, M. 2008. Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application. *Weed Research* 48: 455-460.

Seefeldt S.; Jensen J.; Fuerst E. 1995. Log-logistic analysis of dose-response relationships. *Weed Technology* 9: 218-227

Tharayil-Santhakumar, N. 2004. Mechanism of Herbicides Resistance in Weeds. Plant & Soil Sciences University of Massachusetts Amherst, MA. (En Línea). Consultado el el 6 de septiembre del 2013. Disponible en: <http://www.weedscience.com>

