



Tesis Doctoral

**Resistencia de malas hierbas a herbicidas en el cultivo del arroz y
en cultivos leñosos: Estudios de mecanismos de resistencia**

Ignacio Amaro Blanco

Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos

2019

Conformidad de los directores:



Mª Dolores Osuna Ruiz



Julio Menéndez Calle

**UNIVERSIDAD DE
EXTREMADURA**



**CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS DE
EXTREMADURA**



Departamento de Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos

Instituto de Investigaciones Agrarias
Finca La Orden - Valdesequera

Tesis Doctoral

**Resistencia de malas hierbas a herbicidas en el cultivo del arroz y
en cultivos leñosos: Estudios de mecanismos de resistencia**

Ignacio Amaro Blanco

Conformidad de los directores:

A blue ink signature in cursive script, appearing to read 'Dolores Osuna Ruiz'.

Mª Dolores Osuna Ruiz

A blue ink signature in cursive script, appearing to read 'Julio Menéndez Calle'.

Julio Menéndez Calle

Para la realización de este trabajo se ha contado con el apoyo institucional del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) con la Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI-INIA) (Resolución de 18 de marzo de 2015, BOE N° 95, martes 21 de abril de 2015, 4318), el proyecto INIA “Manejo integrado de infestaciones de *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp. en arroz cultivado en inundación” (RTA2014-00033-C03-01) y el apoyo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del proyecto AGROS (CCESAGROS).

Agradecimientos

Mi más sincero y amplio agradecimiento a la Dra. M^a Dolores Osuna Ruiz y al Dr. Julio Menéndez Calle, directores de esta Tesis, pero también al Dr. Rafael de Prado Amián que, a efectos prácticos, también lo ha sido. A ellos les debo el haber terminado el difícil reto de desarrollar una tesis doctoral y tener la posibilidad de convertirme en Doctor. Gracias por su dedicación, paciencia, consejos y por todos los conocimientos que me han transmitido a lo largo de todos estos años. Ha sido un privilegio poder contar con vuestra experiencia, guía y ayuda. Muchas gracias.

Quiero mostrar mi gratitud al Dr. Martin Vila-Aiub del Instituto de Investigaciones y ecológicas vinculadas a la agricultura (IFEVA) de Buenos Aires, a la Dra. Marie Jasieniuk de la Universidad de California en Davis y a la Dra. Ana Caicedo de la Universidad de Massachusetts en Amherst. Agradezco profundamente que me hayan aceptado en sus laboratorios para aprender otras maneras de trabajar durante mis estancias en Argentina y Estados Unidos.

También me gustaría agradecer al departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba. Allí no sólo tuve compañeros, sino que hice amigos durante mis colaboraciones con el laboratorio de "Acción de los pesticidas sobre el ecosistema". Muchas gracias a Rafael Roldán Gómez, a Pablo Fernández Moreno, a Ricardo Alcántara de la Cruz y a Antonia Rojano Delgado.

Muchas gracias al grupo de malherbología del CICYTEX y a todas las personas que han pasado por él durante el desarrollo de mi tesis. Quiero agradecer en especial a Yolanda Romano por su ayuda y sus clases de biología molecular que me han permitido entender mejor el mundo de las resistencias. Igualmente quiero agradecer a los compañeros y amigos del IFEVA, de la Universidad de California y de la Universidad de Massachusetts por intentar hacerme sentir como en casa.

A todos los compañeros del CICYTEX que me han ayudado durante esta etapa de mi vida y que me ha permitido realizar el trabajo que no podría haber hecho yo solo.

Asimismo, me gustaría hacer constar mi agradecimiento al CICYTEX y al grupo AGROS, sin cuyos medios no hubiera sido posible realizar este trabajo. Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), por concederme la beca que me ha permitido desarrollar esta Tesis Doctoral (Resolución de 18 de marzo de 2015, BOE N° 95, martes 21 de abril de 2015, 4318) y al proyecto INIA "Manejo integrado de infestaciones de *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp. en arroz cultivado en inundación" (RTA2014-00033-C03-01).

Querría hacer una mención especial a mi familia, por ayudarme día a día, apoyándome y celebrando de manera muy especial cada logro conseguido. A mis padres y hermano por haberme apoyado en todas mis decisiones, ayudándome a madurar y a crecer como persona día a día.

Finalmente, a Alba por estar siempre a mi lado, dándome ánimos y cariño para seguir adelante. Gracias por comprenderme, por su paciencia y por enseñarme a aceptar las cosas que vienen en la vida. Por el largo camino que en el que me ha acompañado y el que nos queda por recorrer, gracias.

Índice

I. Resumen	1
I. Summary	9
II. Contextualización.....	19
II.1. Referencias.....	22
III. Introducción General.....	25
III.1. Malas hierbas. Generalidades	25
III.2. Control de malas hierbas	25
III.3. Herbicidas.....	28
III.3.1. Principales herbicidas utilizados en esta tesis	31
III.4. Resistencia	37
III.4.1. Resistencia cruzada y múltiple	38
III.4.2. Casos de resistencia.....	39
III.4.3. Mecanismos de resistencia.....	40
III.5. Control integrado de malas hierbas (CIM)	42
III.6. Referencias bibliográficas.....	44
IV. Objetivos	51
V. Metodología General	55
V.1. Prospecciones	55
V.2. Identificación de especies con marcadores moleculares.....	56
V.2.1. Extracción del ADN	56
V.2.2. Amplificación del ADN	56
V.3. Screening y ensayos dosis-respuesta	56
V.3.1. Screening	57
V.3.2. Ensayos dosis-respuesta	57
V.4. Estudio de mecanismos de resistencia involucrados	58
V.4.1. Absorción y translocación del ¹⁴ C-glifosato	58
V.4.2. Visualización del ¹⁴ C-Glifosato	59
V.4.3. Estudio del metabolismo	59
V.4.4. Secuenciación del gen EPSPS	59
V.4.5. Secuenciación del gen ALS y ACCasa en <i>Echinochloa</i> spp. y <i>Leptochloa</i> spp..	60

VI. Bloque I: Cultivos leñosos	65
VI.1. Introducción	65
VI.2. Malas hierbas en cultivos leñosos	65
VI.2.1. <i>Conyza</i>	66
VI.3. Herbicidas autorizados en cultivos leñosos	68
VI.4. Casos de resistencia	69
VI.5. Estructura de la investigación realizada sobre <i>Conyza</i> spp	71
Capítulo 1. Estudio sobre poblaciones de <i>Conyza</i> spp. en Extremadura	73
Capítulo 1.1. Distribución de <i>Conyza</i> spp. en cultivos leñosos en Extremadura y evaluación de la eficacia de varios herbicidas en <i>Conyza</i> spp. a diferentes estadios de desarrollo	75
Capítulo 1.2. Distribución de especies de “ <i>Conyza</i> ” spp. en zonas urbanas de la provincia de Badajoz	95
Capítulo 2. Publicaciones de <i>Conyza</i> con factor de impacto indexadas en JCR	105
Capítulo 2.1. Mechanisms of glyphosate resistance and response to alternative herbicide-based management in populations of the three <i>Conyza</i> species introduced in southern Spain	109
Capítulo 2.2. Selection for glyphosate resistance in <i>Conyza</i> spp occurring in the railway network of the Southern Spain	141
VI.6. Referencias Bibliográficas	154
VII. Bloque II: Arroz	161
VII.1. Introducción	161
VII.2. Malas hierbas en el cultivo del arroz	161
VII.2.1. <i>Echinochloa</i>	162
VII.2.2. <i>Leptochloa</i>	163
VII.2.3. <i>Cyperus</i>	165
VII.2.4. <i>Oryza sativa</i> var.	166
VII.3. Herbicidas autorizados en el cultivo del arroz	167
VII.4. Casos de resistencia	168
VII.5. Estructura de la investigación realizada sobre malas hierbas del arroz	170
Capítulo 3. Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campaña 2017)	173
Capítulo 4. Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura " <i>Echinochloa</i> spp." y " <i>Leptochloa</i> spp."	181

Capítulo 5. Distribution and characterisation of target-site resistance to ALS and ACCase-inhibiting herbicides in <i>Echinochloa</i> spp. from Spanish rice fields	189
Capítulo 6. Caracterización de la resistencia a inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y a inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) en <i>Leptochloa</i> spp. de arrozales de Extremadura	223
VII.6. Referencias Bibliográficas	240
VIII. Discusión General	245
VIII.1. Discusión de los estudios de <i>Conyza</i> spp. (Capítulos 1 y 2)	245
VIII.2. Discusión de los estudios de <i>Echinochloa</i> spp. y <i>Leptochloa</i> spp. (Capítulos 3, 4, 5 y 6).....	247
IX. Conclusiones Generales	251
IX. General Conclusions	253

Índice de Tablas

Tabla 1. Grupos de herbicidas según la HRAC según el modo de acción.....	29
Tabla 2. Propiedades físico-químicas del glifosato	31
Tabla 3. Propiedades físico-químicas del imazamox	34
Tabla 4. Propiedades físico-químicas del penoxsulam	35
Tabla 5. Propiedades físico-químicas del profloroxim	36
Tabla 6. Propiedades físico-químicas del cihalofop-butilo	37
Tabla 7. Materias activas herbicidas autorizadas en cultivos leñosos (2018) y modo de acción .	68
Tabla 8. Casos de resistencia descritos en Heap (2018) para malas hierbas en cultivos leñosos	70
Tabla 9. Reducción del peso fresco de la biomasa de la parte aérea en biotipos de <i>Conyza</i> spp. 21 después del tratamiento con glifosato a una dosis de 1080 g ia ha ⁻¹ . Datos de 2016-2017 de prospección al azar.....	76
Tabla 10. Reducción del peso fresco de la biomasa de la parte aérea en biotipos de <i>Conyza</i> spp. 21 después del tratamiento con glifosato a una dosis de 1080 g ia ha ⁻¹ . Datos de 2016-2017 de prospección dirigida.....	78
Tabla 11. Coordenadas de las poblaciones utilizadas en el primer ensayo.....	79
Tabla 12. Materias activas, nombres comerciales y dosis empleadas durante el tratamiento	79
Tabla 13. Herbicidas y dosis empleadas durante el tratamiento.....	89
Tabla 14. Zona y lugar de las muestras de <i>Conyza</i> spp.....	100
Table 15. Coordinates of putative glyphosate-resistant (R) and glyphosate-susceptible (S) <i>Conyza</i> spp. populations collected.....	114
Table 16. Inter-simple sequence repeat (ISSR) primers used in <i>Conyza</i> populations	116
Table 17. Herbicide treatments tested <i>in situ</i> for control effectiveness of glyphosate-resistant <i>Conyza</i> spp. populations over three seasons (2014-2016).....	120
Table 18. Parameter estimates from the logistic analysis of plant survival (LD ₅₀), growth reduction (GR ₅₀) and EPSPS enzyme activity (I ₅₀) of resistant (R) and susceptible (S) <i>Conyza bonariensis</i> , <i>C. canadensis</i> , and <i>C. sumatrensis</i> populations under increasing glyphosate rates.....	123
Table 19. ¹⁴ C glyphosate uptake and translocation in the resistant (R) and susceptible (S) <i>Conyza bonariensis</i> , <i>C. canadensis</i> , and <i>C. sumatrensis</i> populations at 96 h after treatment (HAT).	126

Table 20. Glyphosate metabolism expressed as a percentage of total glyphosate and their metabolites in the resistant (R) and susceptible (S) <i>Conyza bonariensis</i> , <i>C. canadensis</i> , and <i>C. sumatrensis</i> populations at 96 h after treatment (HAT).....	128
Table 21. Effectiveness in reducing standing R populations and seed production of surviving plants of the different herbicide treatments that were tested during three years for in situ control in the glyphosate-resistant <i>C. bonariensis</i> , <i>C. canadensis</i> , and <i>C. sumatrensis</i>	131
Table 22. Species, location and coordinates of every collected population	146
Table 23. Parameters of the log-logistic equations ^a used to calculate the glyphosate rates (g ae ha ⁻¹) required for reduction fresh weight by 50% (GR ₅₀) and the distance in km of the populations for <i>C. canadensis</i>	148
Table 24. Parameters of the log-logistic equations ^a used to calculate the glyphosate rates (g ae ha ⁻¹) required for reduction fresh weight by 50% (GR ₅₀) and the distance in km of the populations for <i>C. bonariensis</i>	148
Tabla 25. Materias activas herbicidas autorizadas en el cultivo del arroz (2018) y modo de acción	167
Tabla 26. Casos de resistencia descritos en Heap (2018) para malas hierbas en el cultivo del arroz	169
Tabla 27. Herbicidas autorizados y autorizaciones excepcionales en el cultivo de arroz en España en 2017.....	178
Tabla 28. Algunos de los fragmentos diferenciadores de las dos especies del género <i>Leptochloa</i> spp. encontrados tras los análisis moleculares con marcadores AFLP	188
Table 29. Herbicide treatments applied for the dose–response tests.	198
Table 30. Amino-acid substitution identified in each collected population.....	201
Table 31. Parameter estimates from the logistic analysis of growth reduction (ED ₅₀) of selected resistant (R) (ALS and ACCase-inhibiting herbicides) and susceptible (S) biotypes under increasing ALS and ACCase-inhibiting herbicide rates.	201
Tabla 32. Bandas presentes/ausentes en <i>L. fascicularis</i> y <i>L. uninervia</i>	228
Tabla 33. Herbicidas inhibidores de la ACCasa y la ALS usados en los ensayos dosis-respuesta	229
Tabla 34. Resultados de la caracterización de las poblaciones recolectadas.....	232
Tabla 35. Dosis efectiva que causa 50% de inhibición del crecimiento (GR ₅₀) en <i>Leptochloa</i> spp. frente a Profoxidim, Cihalofop-butil, Penoxsulam e Imazamox	233
Tabla 36. Alineación de secuencias para el gen ALS. En negrita y resaltado, los nucleótidos que codifican Pro-197 en la población susceptible (S) y la mutación en los resistentes.....	234

Tabla 37. Aminoácido intercambiado para las posiciones correspondientes a Ile1781, Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Ser2088 y Gly2096 en el gen ACCasa de las poblaciones <i>Leptochloa</i> spp. recolectadas.....	235
---	-----

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrativo de la tesis	21
Figura 2. Grupos de herbicidas según su modo de acción según la clasificación del Comité de Acción de Resistencia a los Herbicidas (siglas en inglés HRAC).	30
Figura 3. Fórmula química del glifosato	31
Figura 4. Inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa por el.....	32
Figura 5. Familia de los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS).....	33
Figura 6. Modelo de simulación de la estructura de ALS de <i>Arabidopsis</i> con el herbicida	34
Figura 7. Fórmula química del imazamox	35
Figura 8. Fórmula química del penoxsulam	35
Figura 9. Familia de los herbicidas inhibidores de la acetil coenzima A.....	36
Figura 10. Fórmula química del profoxidim	37
Figura 11. Fórmula química del cihalofop-butilo	37
Figura 12. Número de casos de resistencia a lo largo de los años (A); y número de especies resistentes a diferentes modos de acción (Códigos WSSA) (B)	39
Figura 13. Clasificación de los herbicidas por modos de acción según el riesgo de desarrollar resistencia (Códigos HRAC)	40
Figura 14. Mecanismos de resistencia dependientes del sitio de acción (mecanismos TSR)	41
Figura 15. Mecanismos de resistencias independientes del sitio de acción (mecanismos NTSR)	42
Figura 16. Prospecciones realizadas en Extremadura. A, prospección dirigida de <i>Conyza</i> spp. en campos de frutales; B, prospección dirigida de malas hierbas del arroz	55
Figura 17. Esquema resumen para la identificación de especies con marcadores moleculares .	56
Figura 18. Especies de <i>Conyza</i> catalogadas como malas hierbas en España. Parte superior de la figura estado adulto y parte inferior estado roseta: (A) <i>C. canadensis</i> , (B) <i>C. bonariensis</i> , (C) <i>C. sumatrensis</i>	66
Figura 19. Prospección al azar realizada en el Término Municipal de Corte de Peleas perteneciente a la comarca de Tierra de Barros.....	75
Figura 20. Prospecciones al azar realizadas en campos de olivar tradicional durante los años 2016 y 2017. El color azul corresponde a la comarca de Tierra de Barros y la verde a la comarca de La Serena, ambas en la provincia de Badajoz.....	76

Figura 21. Prospecciones dirigidas realizadas en campos de cultivos leñosos durante los años 2016 y 2017. 00 corresponde a la finca “El Freixal” en Villareal de Olivenza; 00 corresponde a la finca la “La Adelantada” en Badajoz; 00 corresponde a la finca la Orden en Guadajira; 00 corresponde a la Cooperativa “San José” en Calamonte; 00 corresponde a diferentes fincas de “Frugalia” en Medellín, Valdetorres, Santa Amalia y Valdivia; 00 corresponde a la finca de “Alimentos y Confituras” en Obando.	77
Figura 22. Reducción del peso fresco de cada población tratada con carfentrazona-etil (0,3 y 0,9 l/ha) y cafentrazona-etil+glifosato en los 4 estadios a los 21 días después del tratamiento (DDT).	80
Figura 23. Reducción del peso fresco de cada población tratada con flazasulfuron+glifosato, ácido pelargónico, glifosato y flazasulfuron en los 4 estadios a los 21 días después del tratamiento (DDT).	82
Figura 24. Reducción del peso fresco de cada población para cada uno de los herbicidas ensayados en cada uno de los estadios a los 21 días después del tratamiento (DDT)	92
Figura 25. Efecto visual de los herbicidas en cada estadio para la población Tany-13 a los 21 días después del tratamiento (DDT)	92
Figura 26. Mapa de recolección de las muestras de <i>Conyza</i> spp.	100
Figura 27. Zonas Urbanas de Badajoz donde se realizó la prospección de <i>Conyza</i> spp.	101
Figura 28. Supervivencia a los 21 DDT respecto al control no tratado de poblaciones de <i>Conyza</i> spp. recolectadas en zonas urbanas y tratadas con 1080 g i.a./ha de glifosato.	101
Figura 29. % peso fresco a los 21 DDT respecto al control no tratado de poblaciones de <i>Conyza</i> spp. recolectadas en zonas urbanas y tratadas con 1080 g i.a./ha de glifosato.	102
Figure 30. Spanish map with the different <i>Conyza</i> spp. populations collected. Symbols in white represent susceptible populations of <i>Conyza</i> spp. Symbols in black represent the three putative resistant populations of <i>Conyza</i> spp. and the field studies.....	114
Figure 31. Plant survival 50% (LD ₅₀) in five populations of each species of <i>Conyza</i> spp. Vertical bars correspond to standard errors. CB01 to 05: <i>C. bonariensis</i> populations. CC01 to 05: <i>C. canadensis</i> populations. CS01 to 05: <i>C. sumatrensis</i> populations.....	115
Figure 32. Glyphosate dose response on (A, C, E) survival and (B, D, F) fresh weight reduction expressed as percentage of the mean untreated control of the R (●) and S (○) populations of <i>C. bonariensis</i> , <i>C. canadensis</i> and <i>C. sumatrensis</i> . Symbols denote mean ($n=8$) \pm standard errors of the mean.....	124

Figure 33. Dendrogram of the genetic similarities among <i>Conyza</i> species after UPGMA analysis performed with ISSR marker data.....	125
Figure 34. Shikimic acid accumulation expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight at 1000 μM of glyphosate in the R and S populations of the three species of <i>Conyza</i> spp. Vertical bars correspond to standard errors.	125
Figure 35. Visible movement of ^{14}C -glyphosate in the R and S populations of the three species of <i>Conyza</i> spp. 96 hours after an application to treated leaf.	127
Figure 36. EPSPS enzyme activity expressed as a percentage of the untreated control in the R and S populations of the three species of <i>Conyza</i> spp. Values represent mean ($n=5$) and vertical bars represent \pm standard errors (A). EPSPS activity for R and S populations of the three species of <i>Conyza</i> spp. was estimated in the absence of glyphosate. Histograms represent treatment means \pm standard errors of the mean ($n=5$) (B).	129
Figure 37. Partial sequence of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) DNA isolated from the R and S populations of the three species of <i>Conyza</i> spp.	129
Figure 38. Representation of the <i>Conyza</i> spp. samples collected at each point in Andalusia. On the left <i>C. bonariensis</i> and on the right <i>C. canadensis</i> . Numbers refer to the number samples collected at every location.....	145
Figura 39. (A) Distribución de la superficie de arroz por CCAA 2016/17 (ha), (B) Distribución de la producción de arroz por CCAA 2016/17(t). Fuente MAPAMA (2017)	161
Figura 40. Panículas de: (A) <i>E. cruz-galli</i> , (B) <i>E. colona</i> . Fuente: Michael (1983)	163
Figura 41. Inflorescencia <i>Leptochloa</i> spp.	164
Figura 42. Semillas de <i>Leptochloa</i> spp.: sin arista (A) <i>L. fusca</i> subespecie <i>uninervia</i> , con arista (B) <i>L.fusca</i> subespecie <i>fascicularis</i>	165
Figura 43. <i>Cyperus difformis</i> . (A) Plantas típicas, (B) Inflorescencia	166
Figura 44. Distribución por CCAA de la superficie de arroz cultivada a nivel nacional en 2017.	176
Figura 45. Variedades de arroz expresadas en porcentaje utilizadas en Extremadura en 2017 (datos de septiembre de 2017).	176
Figura 46. Productos obtenidos tras las digestiones con Ecor I, Dra I y Alu I una vez realizadas las PCR con las parejas de cebadores Trn-a/Trn-b1 y Trn-c/Trn-d. Se muestran poblaciones pertenecientes al GRU- PO 1 (calles 1, 2, 4, 5, 8, 10, 14, 15) y al GRUPO 2 (calles 3, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 16).....	187
Figura 47. Distribution (%) of <i>Echinochloa</i> spp. populations sampled in the different areas of Extremadura.	195

Figure 48. Partial sequencing chromatograms of ALS fragments of a susceptible (left) and a resistant (right) plant of <i>E. oryzicola</i> / <i>E. oryzoides</i> populations Ech5-09 and Ech114-10, respectively. The codon highlighted indicates position 197 of the ALS gene; the C to T change causes the substitution of Pro to Ser.	200
Figura 49. Profoxydim, cyhalofop-butyl, penoxsulam, imazamox, azimsulfuron and bysipiribac-sodium dose–response on fresh weight reduction expressed as percentage of the mean untreated control of the R (ech114-10 and ech3-14) and S (ech5-09) populations. Symbols denote mean (n=6) ± SEM.	202
Figura 50. Semillas de las dos especies de <i>Leptochloa</i> . A, <i>L. uninerva</i> ; B, <i>L. fascicularis</i>	232
Figura 51. Distribución de poblaciones de <i>Leptochloa</i> spp. con mutación en gen de la ALS, ACCasa o en ambos en Extremadura.....	236



I. RESUMEN/SUMMARY



I. Resumen

La agricultura juega un papel importante en la economía mundial, generando desarrollo y riqueza en todo el mundo. Entre los elementos que dañan a la agricultura se encuentran las enfermedades, las plagas y las malas hierbas. Por éstas últimas se entiende toda planta que crece en escenarios alterados por el ser humano y que, al mismo tiempo, no son deseables para él en un lugar y momento determinado.

Por lo tanto, las malas hierbas son plantas que crean un peligro para las actividades del hombre y que están preadaptadas a un agroecosistema o han desarrollado un conjunto de caracteres que aseguran la persistencia de las especies.

Las malas hierbas producen un descenso notorio del rendimiento de los cultivos cuando compiten por luz, agua y nutrientes en los cultivos leñosos pudiendo causar pérdidas que oscilan entre el 28 y 68% en el caso de las especies de malas hierbas de *Conyza*.

El carácter invasivo de las malas hierbas, se deben a una serie de características fisiológicas que les confieren mayor capacidad de adaptación, supervivencia y crecimiento con respecto a los cultivos. Entre ellas podemos destacar:

- a) Fase vegetativa corta y capacidad de reproducción en un estadio muy corto, lo que tiene lugar antes de que se produzca la recolección del cultivo.
- b) Más de un modo de propagación o dispersión de las diásporas o propágulos.
- c) Semillas con letargo y gran longevidad.
- d) Germinación discontinua (escalonada).
- e) Gran capacidad de producción de semilla
- f) Semillas de tamaño similar a las del cultivo.
- g) Capacidad de regenerarse a partir de tejidos vegetativos.
- h) Alta capacidad de crecer bajo condiciones adversas.
- i) Aspecto poco llamativo, olor y sabor desagradable
- j) Gran capacidad de competitividad por luz, agua y nutrientes.
- k) Producción de toxinas (aleloquímicos)
- l) Hospederas de plagas de las plantas cultivadas.
- m) De difícil control, con muchos casos de resistencia a herbicidas

El control de las malas hierbas en el cultivo es un tema que preocupa a los agricultores. Éstos tienen a su disposición una gama amplia de métodos de control diferentes:

1. Métodos preventivos: evitan la introducción, el establecimiento y el desarrollo de las malas hierbas en áreas no infectadas. Un ejemplo sería usar semilla certificada libre de semillas de malas hierbas.
2. Métodos culturales: prácticas agrícolas que benefician la especie cultivadas. Se incluyen, por ejemplo, la rotación de cultivos y las cubiertas vegetales.
3. Métodos físicos: aquí se incluyen los métodos mecánicos para la eliminación de malas hierbas como labrar, quemar, segar, etc.
4. Métodos biológicos: se basan en el uso de enemigos naturales para eliminar las malas hierbas. Como ejemplos se pueden destacar, el pastoreo, el uso de microherbicidas, alelopatía, etc.
5. Métodos químicos: es el método de control más rentable y el más usado por los agricultores: suponen el uso de herbicidas. Supone el uso de herbicidas, que aplicados en época y dosis adecuadas inhiben el desarrollo o matan a las plantas indeseadas. Entre las ventajas que ofrecen este método se encuentra el control temprano de la mala hierba, el amplio espectro de acción y el control residual de las malas hierbas al aplicar un herbicida de gran persistencia en el suelo.

La aplicación repetida de un mismo herbicida, herbicidas con el mismo ingrediente activo, mismo grupo químico o con igual sitio de acción, en interacción con otros factores (bióticos y abióticos) como el suelo, clima, prácticas culturales, sistema de cultivo, especie de mala hierba, y el no uso de otras medidas alternativas de control ha conducido a la evolución de resistencia en las poblaciones de especies infestantes.

Es importante tener en cuenta que las malas hierbas pueden presentar resistencia cruzada y resistencia múltiple. La resistencia cruzada ocurre cuando un único mecanismo de resistencia confiere resistencia a varios herbicidas. Debido a que la mayoría de los herbicidas están diseñados para unirse a enzimas específicas, el tipo más común de resistencia cruzada es la resistencia cruzada del sitio de acción, donde un sitio diana alterado (enzima) confiere resistencia a muchos o todos los herbicidas de la misma familia química. Por otra parte, la resistencia múltiple ocurre cuando dos o más mecanismos de resistencia ocurren dentro de la misma planta, a menudo debido a la selección secuencial por diferentes modos de acción de herbicida.

A día de hoy, en el mundo se han descrito 500 casos de resistencia en 256 especies (149 dicotiledóneas y 107 monocotiledóneas) en 93 cultivos y 70 países.

Un manejo adecuado de las resistencias conlleva la prospección en zonas donde se sospecha fallos en el control con herbicidas, ensayos para confirmar dicha resistencia y, por último, el estudio del mecanismo responsable de dicha resistencia para, de esta forma, desarrollar sistemas de control alternativo.

Para dar respuesta a estas preguntas, el Grupo de Investigación de Malherbología de CICYTEX (Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura) lleva a cabo diferentes proyectos que intentan dar soluciones al problema aquí expuesto de las malas hierbas y que perjudica al sector agrícola.

Esta tesis ha sido financiada por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) con la Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI-INIA) (Resolución de 18 de marzo de 2015, BOE N° 95, martes 21 de abril de 2015, 4318), el proyecto INIA “Manejo integrado de infestaciones de *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp. en arroz cultivado en inundación” (RTA2014-00033-C03-01) y el apoyo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del proyecto AGROS (CCESAGROS). Se ha dirigido conjuntamente por el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX) y la Universidad de Huelva. Además, ha colaborado activamente el servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura, que tiene un contacto más directo con la realidad del sector agrícola. Por otra parte, se han desarrollado estancias y trabajo conjunto con cuatro centros de referencia internacional en el mundo de la malherbología (la Universidad de Córdoba, la Universidad de Buenos Aires, la Universidad de California, la Universidad de Massachusetts) donde se ha profundizado en distintas tecnologías relacionadas con malas hierbas.

Los estudios de esta tesis se han centrado en malas hierbas problemáticas en cultivos leñosos (olivos y frutales) y arroz, de interés para Extremadura y Andalucía principalmente: *Conyza* spp., *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp..

Dentro de los cultivos leñosos, la producción de frutas y aceite de oliva suponen un gran porcentaje de la Producción de la Rama Agraria (PRA). *Conyza* spp. se encuentran entre las especies de malas hierbas más problemáticas en todo el mundo. Hay muchas especies del género *Conyza* reconocidas como malas hierbas, pero las únicas introducidas en España como tales son *C. canadensis*, *C. bonariensis* y *C. sumatrensis*. Entre ellas, *C. canadensis* y *C. bonariensis* son las más importantes, teniendo en cuenta el impacto y los daños causados por ellas.

Asimismo, el arroz es un cultivo que tiene una gran importancia a nivel mundial. Atendiendo al arroz cultivado en España, Extremadura es la segunda Comunidad Autónoma con mayor producción, solo por detrás de Andalucía. Dentro de la Comunidad Autónoma de Extremadura, *Leptochloa* y *Echinochloa* son los géneros que más problemas generan a los agricultores de la región y que pueden desarrollar resistencias a herbicidas.

La tesis comprende varias publicaciones de índole divulgativa o de investigación con factor de impacto. El valor de esta tesis radica en ser la primera sobre resistencia de malas hierbas a herbicidas en Extremadura.

Como se ha mencionado, la tesis abarca malas hierbas de dos cultivos diferentes, cultivos leñosos y arroz, con lo cual se ha dividido en dos grandes bloques.

El primer bloque trata sobre *Conyza* spp., una mala hierba de hoja ancha que afecta al rendimiento de cultivos leñosos. Se han desarrollado cuatro estudios relacionados, tanto con la distribución de *Conyza* spp. en zonas de cultivo y áreas urbanas, como su respuesta a herbicidas y el estudio de los mecanismos de resistencia. Un resumen de cada uno de ellos se explica a continuación:

1. Distribución y evaluación de la eficacia de varios herbicidas en *Conyza* spp. a diferentes estadios de desarrollo.

Para realizar las prospecciones se escogieron dos zonas de tradición olivarera en Extremadura, la comarca de Tierra de Barros y la comarca de La Serena, situadas en la provincia de Badajoz. *Conyza* spp. es una mala hierba que aparece en gran cantidad de cultivos, especialmente en cultivos leñosos. Este género representa un serio problema debido a la gran capacidad de dispersión de sus semillas principalmente por el viento. Uno de los métodos más utilizados para el control de esta mala hierba es el uso de herbicidas. Un uso adecuado de los herbicidas disponibles en el mercado es primordial para evitar la aparición de resistencias. En este trabajo se muestra la efectividad de varios herbicidas utilizados en diferentes estadios de crecimientos en poblaciones de *Conyza* spp. procedentes de cultivos leñosos de la zona de Extremadura. Los resultados obtenidos confirman que la mayoría de los herbicidas utilizados presentan mayor eficacia cuanto menor es el estadio de la planta. En general, de todos ellos, la pendimentalina no mostró gran efectividad y el glufosinato fue el que más redujo el peso fresco de las plantas de *Conyza* spp. respecto al control. Asimismo, la tónica general fue que cuanto menor es el estadio de desarrollo en que se trata la planta, mayor es la eficiencia del herbicida sobre la misma.

2. Distribución de especies de “*Conyza*” spp. en zonas urbanas de la provincia de Badajoz

Conyza spp. es una mala hierba de hoja ancha que puede aparecer tanto en los cultivos como en las zonas urbanas: jardines, medianas de calzadas, parques, etc. Debido a la gran dispersión de sus semillas, la colonización de esta planta por la ciudad puede ser muy rápida. El uso del glifosato en el pasado fue habitual, por lo que la resistencia de *Conyza* spp. a este herbicida puede aparecer también en zonas de tránsito público. En este trabajo se muestran los primeros resultados de la prospección por zonas urbanas de la provincia de Badajoz. Después de la prospección se realizó un ensayo para ver la respuesta de estas poblaciones a la dosis de campo de glifosato. Por último, se llevó a cabo su caracterización usando marcadores moleculares para ver la distribución por

especies en la ciudad. Los resultados mostraron que la dosis comercial de glifosato controlaba un alto porcentaje las poblaciones recogidas y que la especie predominante en las zonas urbanas es *Conyza bonariensis* frente a *Conyza canadensis* y *Conyza sumatrensis*.

3. Mecanismos de resistencia al glifosato y respuesta al manejo alternativo basado en herbicidas en poblaciones de las tres especies de *Conyza* introducidas en el sur de España.

En los cultivos perennes, el método más común de control de malas hierbas es mediante la aplicación de herbicidas, y el glifosato es la primera opción de los agricultores. Tres especies de del género *Conyza* se encuentran entre las malas hierbas más problemáticas para los agricultores, y muestran resistencia al glifosato. Los objetivos de este estudio fueron evaluar los niveles y mecanismos de resistencia y probar alternativas de control químico en poblaciones potencialmente resistentes (R) de *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* y *Conyza sumatrensis*. Plantas de las tres poblaciones R de *Conyza* spp. sobrevivieron a dosis altas de glifosato en comparación con plantas de poblaciones susceptibles (S). La tasa de movimiento de glifosato ¹⁴C de entre las hojas tratadas en plantas de poblaciones S fue mayor que en plantas de poblaciones R. Solo las plantas de la población R de *C. sumatrensis* mostraron en un punto del gen EPSPS (5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintasa) una mutación Pro106-Thr. Las respuestas en campo a los diferentes tratamientos herbicidas alternativos probados indicaron lesiones y alta efectividad en la mayoría de los casos. Los resultados indican que los mecanismos resistentes independientes del sitio de acción (NTSR) explican la resistencia en *C. bonariensis* y *C. canadensis*, mientras que los mecanismos NTSR y los dependientes del sitio de acción (TSR) contribuyen a la resistencia en *C. sumatrensis*. Los resultados obtenidos en las pruebas de campo sugieren que el problema de resistencia se puede resolver a través del control integrado de malas hierbas.

4. Selección de resistencia al glifosato en *Conyza* spp en la red ferroviaria del sur de España

Las especies de *Conyza* son malas hierbas de hoja ancha que se producen en muchos cultivos, pero también aparecen en sistemas de no cultivo, como carreteras y en vías ferroviarias. *Conyza* ha ido adquiriendo resistencia a glifosato a lo largo de las vías ferroviarias del sur de España, debido al mal uso de este herbicida y la alta tasa de dispersión de semillas de estas especies. Veintitrés muestras del género *Conyza* (11 *C. canadensis* y 12 *C. bonariensis*) fueron recolectadas en los márgenes de las vías de diferentes rutas de la red ferroviaria de Andalucía que pasa adyacente a los campos de cultivo cercanos. El nivel de resistencia a glifosato de las poblaciones de *Conyza* fue evaluada mediante GR₅₀ (tasa que causa una reducción del crecimiento del 50%) y el factor de resistencia (RF) en cada población recolectada. Los GR₅₀ más altos fueron 1851.2 g

a.e. ha⁻¹ (RF=52.53) en *C. canadensis* (ruta Málaga-Córdoba) y 1972.4 g a.e. ha⁻¹ (RF=35.20) en *C. bonariensis* (ruta Sevilla-Córdoba) y la más baja fue de 46.9 g a. ha⁻¹ (RF=1.33) en *C. canadensis* (ruta Sevilla-Córdoba) y 23.2 g a.e. ha⁻¹ (RF=0,41) en *C. bonariensis* (ruta Sevilla-Córdoba). Los resultados mostraron que, entre todas las poblaciones de *C. canadensis* recolectadas, el 18.2% era resistente al glifosato (RF > 10), el 45.5% mostró tendencia a desarrollar resistencia (RF 2.5-5) y el 36.4% fue susceptible (RF < 2.5). El 25% de las poblaciones de *Conyza bonariensis* tenía resistencia al glifosato, el 16,7% tenía una resistencia moderada (RF 5-10) y el 58,3% era susceptible. Este estudio determinó que ya existen *Conyza* spp. resistentes a glifosato a lo largo de la red ferroviaria del sur de España. Esto podría llevar a un posible intercambio de semillas entre las vías ferroviarias y los lugares adyacentes. Por lo tanto, es vital tener en cuenta la red ferroviaria cuando se planifican medidas de control de resistencia.

El segundo de los bloques se centra en dos especies de malas hierbas que crecen en el cultivo del arroz: *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp.. Los dos primeros estudios se centran en aspectos generales de estas malas hierbas: el primero versa sobre la problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz y, el segundo, sobre la importancia de identificar las especies de *Echinochloa* y *Leptochloa* en un estado de desarrollo precoz usando marcadores moleculares. Por otra parte, los dos estudios siguientes abordan el análisis de mutaciones en los genes de la Acetolactato sintasa (ALS) y la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) en poblaciones de Extremadura. El resumen de cada uno de ellos es el siguiente:

1. Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campaña 2017)

El arroz es uno de los principales cultivos a nivel mundial. En España, Extremadura es la segunda comunidad autónoma con más producción de arroz después de Andalucía, aunque este año la superficie que se ha dedicado al cultivo ha disminuido. El control de las malas hierbas en el cultivo es un tema que preocupa a los agricultores, siendo para ello su principal y más eficaz herramienta los herbicidas. En la actualidad, los herbicidas autorizados en España para el cultivo del arroz pertenecen principalmente a dos modos de acción: inhibidores de la ALS y de la ACCase, con lo que su uso repetido y continuado está dando lugar a la aparición y propagación de malas hierbas resistentes. Como método alternativo de control cabe destacar el aumento producido durante esta campaña de la práctica de la siembra en seco. Así, se puede estimar que, del total de la superficie del cultivo del arroz, entre un 30-35% del mismo ha sido utilizando esta técnica. Hay que resaltar que este año las condiciones climáticas de altas temperaturas, tanto diurnas como nocturnas, y prolongadas en el tiempo, han favorecido que el rendimiento del cultivo no haya sido el esperado.

2. Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura: *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp.

Los géneros *Echinochloa* y *Leptochloa* son las malas hierbas más problemáticas actualmente para el cultivo del arroz en Extremadura. Para controlarlas adecuadamente es imprescindible una identificación temprana, ya que las diferentes especies de ambos géneros muestran diferentes respuestas frente a un mismo herbicida. Una herramienta útil para discriminar las especies de dichas malas hierbas en estadios tempranos son los marcadores moleculares, que ayuda a planificar antes las estrategias de control adecuadas para el agricultor. En este trabajo se muestran las técnicas moleculares empleadas para diferenciar las especies del género *Echinochloa* más habituales en Extremadura: *E. oryzicola*, *E. oryzoides*, *E. crus galli*, *E. hispídula* y *E. colona* utilizando la técnica molecular PCR-RFLP. Por otro lado, para diferenciar las especies del género *Leptochloa* (*L. fascicularis* y *L. uninervia*) se han utilizado marcadores tipo AFLP.

3. Distribución y caracterización de la resistencia en el sitio de acción de los herbicidas inhibidores de la ALS y la ACCasa en *Echinochloa* spp. de arrozales españoles

Echinochloa spp. Es una de las malas hierbas más invasivas en los campos de arroz en todo el mundo. Los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) son dos de los grupos más utilizados para controlar estas plantas. Su uso excesivo puede dar lugar a *Echinochloa* resistente debido a mecanismos de resistencia dependientes del sitio de acción (TSR). En este trabajo, se recolectaron diferentes poblaciones de *Echinochloa* spp. en campos de arroz en Extremadura donde se sospechaba fallos de control con herbicidas inhibidores de la ALS y la ACCasa. Se llevaron a cabo estudios del sitio acción y de dosis-respuesta en esas poblaciones. Se encontró que Pro197Ser era la sustitución de aminoácidos más común en la secuencia del gen ALS y confirió resistencia a las familias triazolopirimidina, imidazolinona, sulfonilurea y pirimidiniltiobenzoato. En el estudio de secuencia de ALS, también se observó evidencia de heterocigosidad a partir de los resultados de la secuenciación. En la secuenciación del gen ACCase, se encontró una mutación Ile1781Leu, que confiere resistencia a las familias ariloxifenoxipropionato y ciclohexanodiona. De los herbicidas autorizados, el 87.5% pertenece a estas familias. Por lo tanto, es importante que los agricultores lleven a cabo un sistema de control integrado que combine herramientas químicas y no químicas.

4. Caracterización de la resistencia a inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y a inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) en *Leptochloa* spp. de arrozales de Extremadura

Leptochloa spp. es una mala hierba presente en los campos de cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). En Extremadura, las dos especies que más abundan son *L. uninervis* y *L. fascicularis*. Los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y de la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) se han utilizado extensivamente para controlar malas hierbas en el arroz. En el presente estudio, confirmamos la resistencia a los inhibidores de la ALS y la ACCasa utilizados comunmente en el arroz y caracterizamos el mecanismo de resistencia en tres biotipos de Extremadura (Lp102-09, Lp5-14, Lp2-16). Se realizó un experimento de dosis-respuesta en el invernadero usando profoxidim, cihalofop-butil, penoxsulam, imazamox, azimsulfuron y bispiribac-sodio para determinar el índice de resistencia (resistencia/susceptibilidad [R/S]) basado en las estimaciones de GR₅₀. Los genes ALS y ACCasa del sitio acción se amplificaron a partir de plantas R y S, y se analizaron las secuencias para detectar mutaciones que se sabe que confieren resistencia a los inhibidores de la ALS y la ACCasa. La secuenciación del gen ALS de las plantas R reveló una mutación previamente descrita en otras especies (Pro197Ser) en Lp102-09 y Lp5-14. La secuenciación del gen ACCasa mostró un intercambio de aminoácidos en Lp2-16. Se encontró que los biotipos Lp102-09 y Lp5-14 fueron resistentes al penoxsulam, imazamox, azimsulfuron y bispiribac-sodio. Por su parte, el biotipo Lp2-16 mostró resistencia frente a profoxidim y cihalofop-butil. Respecto a los resultados de distribución, de las 42 muestras estudiadas, 5 de ellas mostraron mutación en el gen de la ALS (3 con Pro197Ser y 2 con Pro197Leu; 13 poblaciones con mutaciones en el gen de la ACCasa (12 con Ile1781Leu y 1 con Trp1999Cys) y 3 poblaciones que presentaron mutaciones al mismo tiempo en ambos genes (2 poblaciones con Pro197Ser en el gen ALS y Trp1999Cys en el gen ACCasa y 1 población con Pro197Ser en el gen ALS y Trp2027Cys en el gen ACCasa). Estos casos de resistencia son los primeros descritos a inhibidores de ALS y la ACCasa en *Leptochloa* spp. en España.

I. Summary

Agriculture plays a vital role in the world economy, generating employment and wealth. Diseases, plagues and weeds are some of the elements that can cause damage to agricultural crops. A weed is essentially any plant that grows in a setting that has been changed by mankind but which is unwanted in that particular setting and at that particular time.

Weeds are therefore plants which interfere with the activities of mankind. They are pre-adapted to a particular agroecosystem or have developed a set of characteristics which ensure the persistence of the species.

Weeds can result in lower crop yield as they compete for light, water and nutrients, causing losses in woody crops that range between 28% and 68% in the case of *Conyza* weed species.

The invasive nature of weeds is due to a series of physiological characteristics which confer on them a greater capacity for adaptation, survival and growth compared to the actual crops. Most notable among these physiological characteristics are:

- a) short vegetative stage and capacity for reproduction at a very early stage, which takes place before the crop is harvested.
- b) More than one means of propagation or dispersal of spores or propagules.
- c) Seeds with properties of dormancy and longevity.
- d) Discontinuous germination (staggered).
- e) High seed production capacity.
- f) Seeds similar in size to those of the crop.
- g) Regenerative capacity from vegetative tissue.
- h) High growth capacity under adverse conditions.
- i) Unremarkable appearance, unpleasant smell and taste.
- j) High capacity to compete for light, water and nutrients.
- k) Toxin production (allelochemicals).
- l) Hosts of pests of the crop plants.
- m) Difficult to control, with many cases of resistance to herbicides.

Controlling weeds in a crop is a question of great concern for farmers. A wide range of different control methods can be used:

1. Preventative methods: avoiding the introduction, establishment and development of weeds in uninfected areas. One such way is to use weed-free certified seeds.
2. Growing methods: agricultural practices which benefit the species being grown. These include, for example, crop rotation and vegetation cover.
3. Physical methods: these include mechanical methods, like tilling, burning or roguing, for the elimination of weeds.
4. Biological methods: these are based on the use of a weed's natural enemies to eliminate it. Examples include grazing, the use of mycoherbicides, allelopathy, etc.
5. Chemical methods: this is the most profitable control method and the one most commonly used by farmers. They entail the use of herbicides which, applied at the correct time and dosage, inhibit the development of undesired plants or kill them. The advantages offered by chemical methods include the early control of a weed, a wide field of action and residual control of the weed through the application of a persistent herbicide in the soil.

The repeated application of the same herbicide, herbicides with the same active ingredient, from the same chemical group or with the same site of action, in interaction with other factors (biotic or abiotic) such as the soil, climate, crop system, weed species, and the non-use of alternative control methods have led to the evolution of resistance in populations of infesting species.

It is important to keep in mind that weeds can develop cross resistance and multiple resistance. Cross resistance occurs when a single resistance mechanism confers resistance to various herbicides. As most herbicides are designed to bind to specific enzymes, the most common type of cross resistance is cross resistance of the site of action, where an altered target site confers resistance to many or all the herbicides of the same chemical family. Multiple resistance occurs when two or more resistance mechanisms occur within the same plant, often as the result of sequential selection by different herbicide modes of action.

At the present time, 500 cases of resistance have been described in the world in 256 species (149 dicotyledons and 107 monocotyledons) in 93 crops and 70 countries.

Proper management of resistances entails surveying in areas where failures are suspected in controls undertaken with herbicides, tests to confirm resistance and, finally, a study of the mechanism responsible for the resistance so that alternative control systems can be developed.

In this regard, the Weed Control Research Group based at CICYTEX (Spanish initials of the Extremadura Scientific and Technological Research Centre) carries out various projects to find solutions to the weed problem as described here and the damage caused by it to the agricultural sector.

The present thesis was financed through the INIA (Spanish initials of the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology) through a research post-doc training grant (Resolution dated March 18 of 2015, Spanish State Gazette No. 95, April 21 of 2015, 4318), the INIA project titled “Integrated Management of infestations of *Echinochloa* spp. and *Leptochloa* spp. in flooded rice crops” (RTA2014-00033-C03-01) and the support of the European Regional Development Fund (ERDF) through the AGROS project (CCESAGROS), jointly managed by CICYTEX and the University of Huelva. The Governing Council of the Autonomous Community of Extremadura also actively collaborated through its Plant Health service, which has direct contact with the realities of the agricultural sector. Visits to and collaborative work with four international reference centres in the field of weed control (Universities of Cordoba, Buenos Aires, California and Massachusetts) were also undertaken to undertake in-depth studies of different weed control technologies.

The studies carried out for this thesis concentrated on problematic weeds in woody crops (olive and fruit trees) and rice, of particular interest in Extremadura and Andalusia: *Conyza* spp., *Echinochloa* spp. and *Leptochloa* spp..

With regard to woody crops, a high percentage of agricultural production corresponds to fruit and olive oil. *Conyza* spp. are among the most problematic weed species throughout the world. Many species of the genus *Conyza* are acknowledged as weeds, but the only such ones introduced in Spain are *C. canadensis*, *C. bonariensis* and *C. sumatrensis*. Of these, *C. canadensis* and *C. bonariensis* are the most important in terms of impact and damage.

Rice is a crop of enormous importance worldwide. With respect to rice grown in Spain, the Autonomous Community of Extremadura is second in terms of production, only behind Andalusia. Within the Autonomous Community of Extremadura, *Leptochloa* and *Echinochloa* are the genera which cause the biggest problems for farmers, especially given their capacity to develop resistance to herbicides.

This thesis includes various informative- and research-based impact factor publications. This thesis is the first to specialise in weed resistance to herbicides in Extremadura.

As mentioned above, the thesis considers weeds affecting two different crop types, woody crops and rice. Consequently, the thesis is divided into two major sections.

The first section deals with *Conyza* spp., a broadleaf weed which affects the production of woody crops. Four related but separate studies were undertaken in this respect, centring on the distribution of *Conyza* spp. in crop fields and urban areas, their response to herbicides and a study of their resistance mechanisms. A summary of each study is given below:

1. Distribution and evaluation of the efficacy of various herbicides in *Conyza* spp. at different growth stages.

To carry out the surveys, two areas which are traditional olive-growing areas in Extremadura were chosen, the region of Tierra de Barros and the region of La Serena, both situated in the province of Badajoz.

Conyza spp. is a weed which appears in a large number of crops, especially woody crops. This genus represents a serious problem due to its high seed dispersal capacity, mainly windborne. One of the most common methods to control this weed is the use of herbicides. The proper use of the herbicides available on the market is crucial to avoid the appearance of resistances. In this work, the efficacy is shown of various herbicides used at different growth stages in populations of *Conyza* spp. found in woody crops in the Extremadura zone. The results confirm that the efficacy of most of the herbicides used is higher at earlier growth stages of the plant. In general, of the tested herbicides, pendimethalin did not show high levels of efficacy and glufosinate produced the biggest fresh weight reduction of *Conyza* spp. plants compared to the control. The general trend was for herbicide efficacy to be higher at earlier growth stages of the plant.

2. Distribution of “*Conyza*” spp. in urban area in Badajoz province.

Conyza spp. is a broadleaf weed which can appear both in crops and urban areas, including gardens, parks, verges, etc. Due to high seed dispersal, colonisation of the city by this plant can take place very quickly. The use of glyphosate was common in the past, and so the resistance of *Conyza* spp. to this herbicide can also appear in areas of public transit. This work shows the first results of a survey of urban areas conducted in the Badajoz province. After the survey, a test was undertaken to determine the response of these populations to glyphosate at field dose. Finally, their characterisation was undertaken using molecular markers to determine their distribution by species in the city. The results show that the commercial dose of glyphosate controlled a high percentage of the collected populations and that the predominant species in urban areas is *Conyza bonariensis* as opposed to *Conyza canadensis* and *Conyza sumatrensis*.

3. Mechanisms of glyphosate resistance and response to alternative herbicide-based management in populations of the three *Conyza* species introduced in southern Spain.

In perennial crops, the most common method of weed control is to spray herbicides, and glyphosate has long been the first choice of farmers. Three species of the genus *Conyza* are among the most problematic weeds for farmers, exhibiting resistance to glyphosate. The objectives of this study were to evaluate resistance levels and mechanisms, and to test chemical control alternatives in

putative resistant (R) populations of *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* and *Conyza sumatrensis*. Plants from the three R populations of *Conyza* spp. survived high doses of glyphosate compared with plants from susceptible (S) populations. The rate of movement of ¹⁴C glyphosate out of treated leaves in plants from S populations was higher than in plants from R populations. Only plants from the R population of *C. sumatrensis* contained the known target site 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutation Pro106-Thr. Field responses to the different alternative herbicide treatments tested indicated injury and high effectiveness in most cases.

The results indicate that non-target site resistant (NTSR) mechanisms explain resistance in *C. bonariensis* and *C. canadensis*, whereas both NTSR and target site resistant (TSR) mechanisms contribute to resistance in *C. sumatrensis*. The results obtained in the field trials suggest that the resistance problem can be solved through integrated weed management.

4. Selection for glyphosate resistance in *Conyza* spp. occurring in the railway network of southern Spain.

Conyza are broadleaf weeds that occur in many crops but are also common in non-crop systems such as roadsides and railways. *Conyza* have developed resistance to glyphosate along railway tracks in southern Spain, due to the misuse of this herbicide and the high seed dispersal rate of these species. Twenty-three samples of the genus *Conyza* (11 *C. canadensis* and 12 *C. bonariensis*) were collected from the margins of railways in different routes of the Andalusia railway network running adjacent to nearby crop fields. The glyphosate resistance level of the *Conyza* populations was evaluated through GR₅₀ (rate causing 50% growth reduction) and the resistance factor (RF) was calculated in each collected population. The highest GR₅₀ values were 1851.2 g a.e. ha⁻¹ (RF=52.53) in *C. canadensis* (Malaga-Cordoba route) and 1972.4 g a.e. ha⁻¹ (RF=35.20) in *C. bonariensis* (Seville-Cordoba route) and the lowest were 46.9 g a.e. ha⁻¹ (RF=1.33) in *C. canadensis* (Seville-Cordoba route) and 23.2 g a.e. ha⁻¹ (RF=0.41) in *C. bonariensis* (Seville-Cordoba route). Results showed that, among all the *C. canadensis* populations collected, 18.2% were glyphosate resistant (RF>10), 45.5% showed a tendency to develop resistance (RF 2.5-5) and 36.4% were susceptible (RF<2.5). Of the *Conyza bonariensis* populations, 25% had resistance to glyphosate, 16.7% had a moderate resistance (RF 5-10), and 58.3% were susceptible. This study found that there are already glyphosate resistant *Conyza* spp. in the railway network in southern Spain. As this could lead to a seed exchange between tracks and adjacent crop fields, it is vital to consider the railway network when planning control measures against resistance.

The second of the two sections in this thesis focusses on two weed species which grow in rice crops: *Echinochloa* spp. and *Leptochloa* spp.. The first two of the four studies summarised below centred on general aspects related to these weeds: the first concentrated on the problems caused by weeds in rice crops and the second on the importance of identifying the species of *Echinochloa* and *Leptochloa* at an early growth stage using molecular markers. The focus of the next two studies was on analysing acetolactate synthase (ALS) and acetyl-CoA carboxylase (ACCase) gene mutations in Extremadura populations. A summary of all four studies is given below:

1. Weed problem in rice crops in Extremadura (2017 season).

Rice is one of the most important crops in the world. In Spain, the autonomous community of Extremadura has the highest rice production after Andalusia, although this year the amount of land dedicated to this crop has fallen. Weed control is a question of major concern for farmers. Herbicides are the main and most effective weapon available to farmers. At the present time, the herbicides that are authorised for use in Spain have two principal modes of action: ALS and ACCase inhibition. The continued and repeated use of the herbicides is giving rise to the appearance and propagation of resistant weeds. During the 2017 crop season, an increased use of the practice known as dry seeding was employed as an alternative weed control method. Of the total rice crop land, it is estimated that around 30-35% was cultivated using this technique. It should be noted that, in the season in question, the meteorological conditions of high and prolonged day-time and night-time temperatures resulted in a lower than expected crop yield.

2. Use of molecular markers for characterisation of rice crop weeds in Extremadura: *Echinochloa* spp. and *Leptochloa* spp.

At the present time, the most problematic rice crop weeds in Extremadura pertain to the genera *Echinochloa* and *Leptochloa*. Their early identification is crucial for appropriate weed control, as the different species of the two genera display different responses to the same herbicide. Molecular markers are a useful tool to discriminate between these weed species at early growth stages. They can be used to help plan suitable control strategies for the farmer. In this work, the PCR-RFLP molecular technique was employed to differentiate between the most common species of the genus *Echinochloa* in Extremadura: *E. oryzicola*, *E. oryzoides*, *E. crus-galli*, *E. hispídula* and *E. colona*, and AFLP-type markers were used to differentiate between species of the genus *Leptochloa* (*L. fascicularis* and *L. uninervia*).

3. Distribution and characterization of target-site resistance to ALS- and ACCase-inhibiting herbicides in *Echinochloa* spp. from Spanish rice fields.

Echinochloa spp. is one of the most invasive weeds in rice fields worldwide. Acetolactate synthase (ALS) and acetyl-CoA carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides are two of the most widely used herbicide groups to control these plants. Their excessive use can lead to herbicide-resistant *Echinochloa* due to target-site resistance (TSR) mechanisms. In this work, different *Echinochloa* spp. populations were collected in different rice fields in Extremadura (western Spain) where resistance to ALS and/or ACCase herbicides was suspected. Target-site and dose-response studies were carried out in those populations. It was found that Pro197Ser was the most common amino acid substitution in ALS gene sequencing and conferred resistance to triazolopyrimidine, imidazolinone, sulfonyleurea, and pyrimidinyl benzoate families. In the ALS sequence study, evidence of heterozygosity was also observed from the sequencing results. In the ACCase gene sequencing, Ile1781Leu substitution was found, conferring resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione families. Of the authorized herbicides, 87.5% belong to these families. It is therefore important that farmers carry out an integrated control system that combines both chemical and non-chemical tools.

4. Characterisation of resistance to acetolactate synthase (ALS) and acetyl-CoA carboxylase (ACCase) inhibitors in *Leptochloa* spp. In rice fields of Extremadura.

Leptochloa spp. are weed species found in rice crop (*Oryza sativa* L.). In Extremadura, the two most abundant species are *L. uninervia* and *L. fascicularis*. Acetolactate synthase (ALS) and acetyl-CoA carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides have been extensively used to control rice crop weeds. In the present study, we confirm resistance to the ALS and ACCase inhibitors commonly used in rice and we characterise the resistance mechanism in three biotypes of Extremadura (Lp102-09, Lp5-14, Lp2-16). A greenhouse dose-response trial was performed using profoxydim, cyhalofop-butyl, penoxsulam, imazamox, azimsulfuron and bispiribac-sodium to determine the resistance index (resistance/susceptibility [R/S]) based on estimations of GR₅₀. The ALS and ACCase genes of the site of action were amplified from the R and S plants, and the sequences were analysed to detect mutations that are known to confer resistance to ALS and ACCase inhibitors. Sequencing of the ALS gene of the R plants revealed a mutation previously described in other species (Pro197Ser) in Lp102-09 and Lp5-14. Sequencing of the ACCase gene showed an amino acid exchange in Lp2-16. It was found that biotypes Lp102-09 and Lp5-14 were resistant to penoxsulam, imazamox, azimsulfuron and bispiribac-sodium, while the Lp2-16 biotype showed

resistance to profoxydim and cyhalofop-butyl. This is the first report of resistance to ALS and ACCase inhibitors in *Leptochloa* spp. in Spain.



I. CONTEXTUALIZACIÓN



II. Contextualización

El trabajo de tesis que aquí se trata concierne a la evaluación de la resistencia de malas hierbas que se encuentran en cultivos leñosos (principalmente olivar y frutales) y arroz. Estos tipos de cultivos tienen gran relevancia en Extremadura en un contexto nacional e internacional, como se explicará de forma más extensa a continuación.

Actualmente el olivo se encuentra en todos los países de la cuenca mediterránea, especialmente en el centro y sur de España, Italia, Grecia, Turquía, Túnez y Marruecos. La superficie mundial de olivar es de aproximadamente 10 millones de hectáreas (FaoStat, 2013). De toda esta superficie, el 98% se encuentra en esta área de la cuenca mediterránea. España es el país líder en superficie cultivada a nivel mundial con casi un 25% del total, por delante de Italia (17,6%) y Túnez (11%) (FaoStat, 2013).

Si atendemos al cultivo del olivar en España, éste se encuentra en todas las Comunidades Autónomas, en donde Extremadura ocupa el tercer lugar en superficie ocupada con más de 270 mil ha (un 10,4% del total), por detrás de Andalucía con más de 1,5 millones (el 60,1% del total) y Castilla-La Mancha con más de 400 mil ha (un 15,7% del total) (INE, 2016).

Por otro lado, Extremadura ocupa un lugar relevante en la fruticultura a nivel nacional. Los principales mercados nacionales e internacionales, sobre todo los centroeuropeos, están cada vez más interesados por las frutas de esta región española (Bernet, 2006). La producción alcanzada en 2017 superó las 270 mil toneladas, teniendo como máximo exponente la producción de ciruela, la cual representa el 63% a nivel nacional (ieex, 2017).

El arroz es uno de los principales cultivos a nivel mundial. Los dos principales países productores a nivel mundial son China e India con 212,7 y 168,5 millones de toneladas respectivamente y una superficie cultivada de 30,8 millones de ha en China y 43,8 en la India (FaoStat, 2017). A nivel europeo, Italia y España son los dos principales países productores de arroz con más del 75% de la superficie cultivada con 212.500 y 113.200 ha respectivamente (FaoStat, 2013). En España, Extremadura ocupa el segundo puesto en cuanto a producción después de Andalucía con una superficie cultivada de 24.700 ha y una producción de 175.000 toneladas (MAPAMA, 2017).

En todos los cultivos citados anteriormente, como en la mayoría de cultivos, hay un factor común que preocupa a todos los agricultores: las malas hierbas. Éstas afectan al rendimiento de la cosecha por lo que su control es vital desde el punto de vista económico. Algunos son el control mecánico, colocación de plásticos, etc., pero es el control químico el que mejor relación coste/eficacia tiene en las agriculturas desarrolladas (Amaro-Blanco et al., 2019). Un uso indebido

de los herbicidas (continuado y repetido) puede dar lugar a resistencias de las malas hierbas a estos productos y por tanto, reducir un medio efectivo en la lucha contra ellas (Romano-García et al., 2017).

Por todo ello, el sector agrícola en Extremadura debe contar con trabajos de investigación o divulgación que sirvan como guía de buenas prácticas agrícolas y como herramienta a la hora de tomar decisiones. Sin embargo, existe muy poca bibliografía sobre este problema en Extremadura (Osuna Ruiz et al., 2015; Palmerín Romero and Osuna Ruiz, 2016; Romano García et al., 2017). Hay que destacar la importancia pionera de esta tesis, ya que es la primera sobre resistencia de malas hierbas a herbicidas en esta Comunidad Autónoma.

Lo que se plantea con el desarrollo de esta tesis es arrojar luz sobre los problemas de resistencias de malas hierbas que aparecen en cultivos leñosos (*Conyza* spp.) y en el cultivo del arroz (*Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp.). Las especies de *Conyza* y *Echinochloa* están catalogadas dentro de las más resistentes a nivel mundial (Heap, 2019a). A nivel de Extremadura son dos de los géneros que ocasionan más problemas a los agricultores (Amaro-Blanco et al., 2018).

Para conseguirlo, hay que llevar a cabo prospecciones de dichas malas hierbas en campos extremeños donde el agricultor haya manifestado un escape al control con herbicida, identificar las especies de malas hierbas en un estado precoz mediante el uso de técnicas moleculares, conocer el nivel de resistencia en el caso de que se haya desarrollado y, por último, conocer el mecanismo responsable de dicha resistencia para, de esta forma, desarrollar sistemas de control alternativo.

En el primer paso, las prospecciones son necesarias tanto para conocer el grado de infestación como para ayudar al desarrollo e implementación de planes de manejo de malas hierbas (Rankins et al., 2005). Con el segundo de los pasos enumerados, decidimos qué herbicida se ha de utilizar: un mismo herbicida puede afectar de diferente manera a distintas especies. El empleo de técnicas moleculares en los casos concretos de *Conyza* y *Echinochloa* está justificado por su complicada identificación en estadios de desarrollo temprano, momento en el que hay que planificar el tratamiento herbicida. En tercer lugar, hay que asegurarse el poder distinguir entre un problema de malas hierbas resistentes en los campos de cultivo y no sólo un mal uso de los herbicidas. Por último, es muy importante conocer el mecanismo responsable porque cada uno confiere diferentes niveles de resistencia (Amaro-Blanco et al., 2018).

Para dar respuesta a estas preguntas, nuestro grupo de investigación ha realizado varios estudios que intentan dar soluciones a los problemas aquí expuestos que viven los agricultores a diario. Vivimos en un mundo cada vez más global, por lo que las colaboraciones están a la orden

del día. En esta tesis se ha querido que los resultados estuvieran más a disposición de los agricultores, por lo que para su realización han trabajado conjuntamente el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), el servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura, la Universidad de Huelva, la Universidad de Córdoba y empresas relacionadas con el sector. Asimismo, se ha contado con el apoyo institucional del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) con una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador y el proyecto RTA2014-00033, así como el apoyo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del proyecto AGROS (CCESAGROS).

Esta tesis, abarca estudios de diferentes tipos de malas hierbas pertenecientes a cultivos distintos. Sin embargo, es ineludible seguir trabajando y seguir realizando estudios que ayuden a los agricultores a llevar a cabo una práctica agrícola más responsable con el medio ambiente sin renunciar a una merma en la productividad.

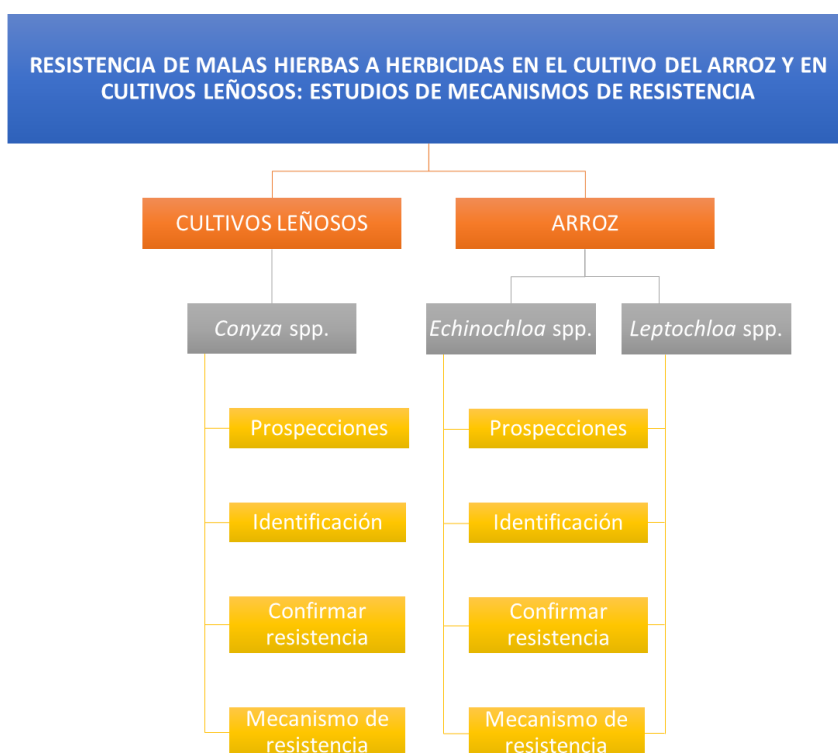


Figura 1. Esquema ilustrativo de la tesis

II.1. Referencias

- Bernet, M. Á. G.-C. (2006). La fruticultura extremeña. *Boletín económico de ICE, Información Comercial Española*, (2889), 75-84.
- FaoStat, F. A. O. (2017). Agriculture data. *Agricultural production*.
- FaoStat, F. A. O. (2013). Agriculture data. *Agricultural production*.
- Heap, I. (2019). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Recuperado 14 de febrero de 2019, de <http://www.weedscience.org>
- ieex. (2017). ieex. Recuperado de <https://ciudadano.gobex.es/web/ieex/>
- INE. (2016). INE. Recuperado 8 de agosto de 2018, de http://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/categoria.htm?c=Estadistica_P&cid=1254735727106
- Korres, N. E., Norsworthy, J. K., Bagavathiannan, M. V., & Mauromoustakos, A. (2015). Distribution of arable weed populations along eastern Arkansas–Mississippi Delta roadsides: factors affecting weed occurrence. *Weed Technology*, 29(3), 596-604.
- MAPAMA. (2017). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Recuperado 8 de agosto de 2018, de <https://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/arroz/>
- Osuna Ruiz, M. D., Palmerín Romero, J. A., & Quiles Pecos, J. M. (2015). Principales problemas fitosanitarios del cultivo del arroz en España. *Agricultura: Revista agropecuaria*, (990), 862-865.
- Palmerín Romero, J. A., & Osuna Ruiz, M. D. (2016). Control de malas hierbas en el cultivo del arroz. Resistencia a herbicidas. *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, 35(392), 115-117.
- Rankins, A., Byrd, J. D., Mask, D. B., Barnett, J. W., & Gerard, P. D. (2005). Survey of soybean weeds in Mississippi. *Weed technology*, 19(2), 492-498.
- Romano García, Y., Mendoza, F., Palmerín Romero, J. A., Quiles Pecos, J. M., Amaro-Blanco, I., & Ruiz, M. D. O. (2017). Resistencia de malas hierbas a herbicidas en el cultivo de arroz: Casos confirmados en Extremadura. *Agricultura: Revista agropecuaria*, (1012), 960-963.
- Romano-Garcia, Y., Amaro-Blanco, I., Quiles-Pecos, J. M., Palmerín-Romero, J. A., Torcea, L., & Osuna Ruiz, M. D. (2017). Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campana 2017). *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, (406), 378-381.



III. INTRODUCCIÓN GENERAL



III. Introducción General

III.1. Malas hierbas. Generalidades

La agricultura juega un papel importante en la economía mundial, generando desarrollo y riqueza en todo el mundo. Sin embargo, el sector está condicionado por diferentes elementos o factores. Éstos pueden ser bióticos o abióticos y dan lugar a pérdidas en el rendimiento y costes en los cultivos (Oerke, 2006).

Entre los componentes bióticos que dañan a la agricultura están las enfermedades, las plagas y las malas hierbas. Por éstas últimas se entiende toda planta que crece en escenarios alterados por el ser humano y que, al mismo tiempo, no son deseables para él en un lugar y momento determinado (Pujadas and Hernández, 1988). Las malas hierbas son plantas que son un peligro para las actividades del hombre y que están preadaptadas a un agroecosistema o han desarrollado un conjunto de caracteres que aseguran la persistencia de las especies (Powles, 2018).

Las malas hierbas producen un descenso notorio del rendimiento de los cultivos cuando compiten por luz, agua y nutrientes en los cultivos anuales, tales como el trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*), o soja (*Glycine max*) entre otros, pudiendo causar pérdidas que oscilan entre el 34 y 70% (Loureiro et al., 2010).

En cultivos perennes, como el olivo (*Olea europaea*), la vid (*Vitis vinifera*), o los cítricos (*Citrus* spp.), las mermas económicas se aprecian en el incremento de los costes del cultivo, ya que dificultan los trabajos de recolección y al mismo tiempo son cobijo para plagas y enfermedades (Liebman et al., 2001).

III.2. Control de malas hierbas

El control de malas hierbas se basa en encontrar la información y las herramientas necesarias para eliminar su presencia en los cultivos, plantaciones forestales, etc., es decir, donde no son deseable. Para el control de malas hierbas se utilizan medios preventivos, mecánicos, culturales, biológicos y/o químicos. Estas actividades dan lugar a la modificación o alteración del hábitat de otros organismos, tanto plagas como no plagas. Por otra parte, la presencia de malas hierbas también influye en los hábitats de estos organismos.

- Preventivo:

Es uno de los métodos más antiguos, trata de evitar que las malas hierbas entren en una parcela. Un ejemplo sería la limpieza de la maquinaria (antes de realizar las labores), con el fin de introducir semillas de malas hierbas de otras zonas.

También cabe destacar que en los próximos 20 años habrá un incremento en el uso de cultivos resistentes que han sido modificados genéticamente. En la actualidad ya existen un buen número de cultivos transgénicos resistentes a herbicidas (Berner et al., 1997).

- Cultural:

Se refiere a utilizar prácticas agronómicas usadas para minimizar la competencia del cultivo frente a las malas hierbas. Dentro de este método encontramos:

- a) Rotación de cultivos: muy usada antes de la aparición de los herbicidas y permite controlar las malas hierbas anuales. Se provoca un cambio en la comunidad de malas hierbas debido a que estas difieren en las fechas de siembra, hábito de desarrollo y competitividad con el nuevo cultivo establecido (Fernández Moreno, 2017).
- b) Fecha de siembra: Para utilizar este método es esencial la rápida emergencia del cultivo a sembrar frente a las malas hierbas que compiten con él. Si se aplaza la siembra, por ejemplo, dos semanas, las malas hierbas emergerán pudiendo controlarlas con herbicidas no selectivos antes de la siembra (Walsh and Powles, 2007).
- c) Cultivos de cobertura: Crean un ambiente desfavorable para que las malas hierbas no germinen y no se establezcan debido a la competencia por recursos naturales como agua y nutrientes, o a través de efectos alelopáticos. La utilización de centeno (*Secale cereale*) es uno de los mejores cultivos de cobertura, utilizado en viña. Otra opción es la utilización de trébol (*Trifolium pretense*) el cual no solo inhibe la emergencia de malas hierbas, sino que además produce la fijación de nitrógeno (Fernández Moreno, 2017).
- d) Aumentar la densidad de siembra: Incrementar la población en el momento de siembra aumenta la competencia del cultivo frente a las malas hierbas. Esta estrategia es usada en trigo frente a vallico resistente a glifosato, además de reducir la biomasa en avena (Gill and Holmes, 1997).

- Mecánico:

Este método es importante, ya que, el número de malas hierbas resistentes a herbicidas se está incrementando a un ritmo exponencial en los últimos años. Se incluyen dentro de este método la labranza a 3-10 cm de profundidad y el corte mecánico de las malas hierbas. Como inconvenientes a este método, se puede destacar el daño radicular del cultivo durante la labranza que favorece enfermedades y la erosión excesiva del terreno (se debe evitar este método cuando la inclinación del terreno sea mayor del 15%).

- Biológico:

En este tipo de control se utilizan enemigos naturales para eliminar especies de malas hierbas. Dentro de este método destacan:

- a) Pastoreo. De manera tradicional distintos tipos de animales, como por ejemplo rumiantes, se emplean para consumir las malas hierbas como alimento.
- b) Los micoherbicidas: Los patógenos de plantas han sido ampliamente usados para el control de malas hierbas y tienen la ventaja de que estos organismos se obtienen en medios artificiales de una forma barata y fácil. Además, estos patógenos pueden aplicarse en el campo de la misma forma que los herbicidas. Si el organismo es un hongo recibe el nombre de micoherbicida.
- c) Alelopatía: utilizando plantas para causar daños sobre otras mediante la producción y liberación de sustancias al medio e inhibiendo su crecimiento.

- Químico:

Los productos químicos se llevan utilizando desde hace mucho tiempo. Sustancias como el nitrato de sodio, el ácido sulfúrico o el sulfato de amonio ya estaban presentes en el control de las malas hierbas en cereales desde el 1900. El uso de otros productos químicos de amplio espectro como son las sales o los subproductos industriales, ya se habían empleado antes del siglo XX para el control de hierbas no deseables en zonas urbanas. La expansión de sustancias químicas con fines de control de malas hierbas tuvo lugar con el descubrimiento de varias sustancias sintéticas que eliminaban la vegetación.

Es la Malherbología la ciencia que tiene como objetivo el estudio de las malas hierbas y su control. Junto a la entomología agrícola y a la fitopatología, conforma la protección de cultivos. Esta disciplina, comienza sobre 1940, en el mismo momento que tiene lugar el descubrimiento del 2,4-D, el primer herbicida orgánico sintetizado.

En la actualidad, en la mayoría de las ocasiones se utiliza este método independientemente de haber utilizado los anteriores porque es barato (respecto a los anteriores), es más rápido y generalmente, es más efectivo si no hay casos de resistencias descritos. A pesar de los inconvenientes, presentan gran cantidad de ventajas:

1. Control de la mala hierba antes de que nazca (preemergencia) o en estadios de desarrollo precoces.
2. Con un herbicida no selectivo o de amplio espectro se pueden controlar malas hierbas de diferente especie.
3. Control de malas hierbas perennes con reproducción asexual (bulbos, rizomas, etc.).
4. Control residual de malas hierbas al aplicar un herbicida de gran persistencia en el suelo.

III.3. Herbicidas

Los herbicidas son productos químicos que pueden alterar la fisiología de la planta produciendo su muerte. Los herbicidas son usados extensivamente en la agricultura, industria y en zonas urbanas, debido a que si son utilizados adecuadamente proporcionan un control eficiente de malas hierbas a un bajo coste (Peterson et al., 2010). No obstante, si no son aplicados correctamente los herbicidas pueden causar daños a las plantas cultivadas, al medio ambiente, e incluso a las personas que los aplican. En la agricultura, los herbicidas han sido una herramienta importante para el manejo de malas hierbas por muchos años. Desde la década de los 40, los herbicidas han sido cada vez más sofisticados en el espectro de control de malas hierbas, duración del período de control y selectividad a los cultivos. Son muchas las razones que justifican el incremento en el uso de estas moléculas (Coble, 1996):

1) Son productos fiables y eficaces. Ofrecen un control aceptable sobre un amplio abanico de especies, a la vez que resultan prácticamente inocuos en los cultivos que protegen. La opción de control que ofrecen sobre los cultivos es mayor que las otras alternativas.

2) Son de fácil manejo. No requieren de una maquinaria especial o de prácticas culturales antes y después de su aplicación.

3) Son económicamente rentables. Los herbicidas producen un menor coste por unidad de superficie que cualquiera de los otros métodos utilizados.

4) Son agrónomicamente versátiles. Ofrecen al agricultor la posibilidad de elegir cuándo y cómo controlar el problema de las malas hierbas, permitiendo un margen de uso que va desde la preemergencia hasta la postemergencia.

A pesar de estas características, en la actualidad existe gran controversia sobre los efectos dañinos que producen los herbicidas.

Pueden clasificarse atendiendo a diferentes puntos de vista: por cultivo (olivar, arroz, trigo, remolacha), modo de aplicación (en pre-emergencia, post-emergencia), familia química, cómo se mueve en la planta (contacto, sistémico), y, por último, por su modo de acción.

El punto de vista más utilizado a la hora de escoger una clasificación es el modo de acción. Se entiende por modo de acción la secuencia de eventos que ocurren desde la absorción del herbicida hasta la muerte de la planta. Dentro del modo de acción hay varias clasificaciones: la clasificación WSSA (Weed Science Society of America), la clasificación australiana y la clasificación HRAC (Herbicide-Resistance Action Committee). Sin embargo, esta última es utilizada en todos los países. Dentro de esta clasificación basada en letras, hay 22 grupos (WSSA, 2018; HRAC, 2018). El resto de modos de acción de los herbicidas acorde a esta clasificación se pueden resumir en la siguiente Tabla 1 y Figura 2:

Tabla 1. Grupos de herbicidas según la HRAC según el modo de acción

Grupo	Modo de acción
A	Inhibición de la enzima acetil coenzima carboxilasa (ACCase)
B	Inhibición de la enzima acetolactato sintetasa (ALS)
C₁	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II
C₂	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II
C₃	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema I
E	Inhibición de la enzima protoporfirinógeno oxidasa (PPO)
F₁	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)
F₂	Decoloración: inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD)
F₃	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides (punto desconocido)
F₄	Inhibición de la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP)
G	Inhibición de la 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSP sintetasa)
H	Inhibición de la glutamino sintetasa
I	Inhibición del DHP (dihidropteroato) sintetasa
K₁	Inhibición de la unión de los microtúbulos en la mitosis
K₂	Inhibición de la mitosis
K₃	Inhibición de la división celular
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)
N	Inhibición de la síntesis de los lípidos
O	Auxinas sintéticas
P	Inhibición del transporte de auxinas
Z	Desconocido

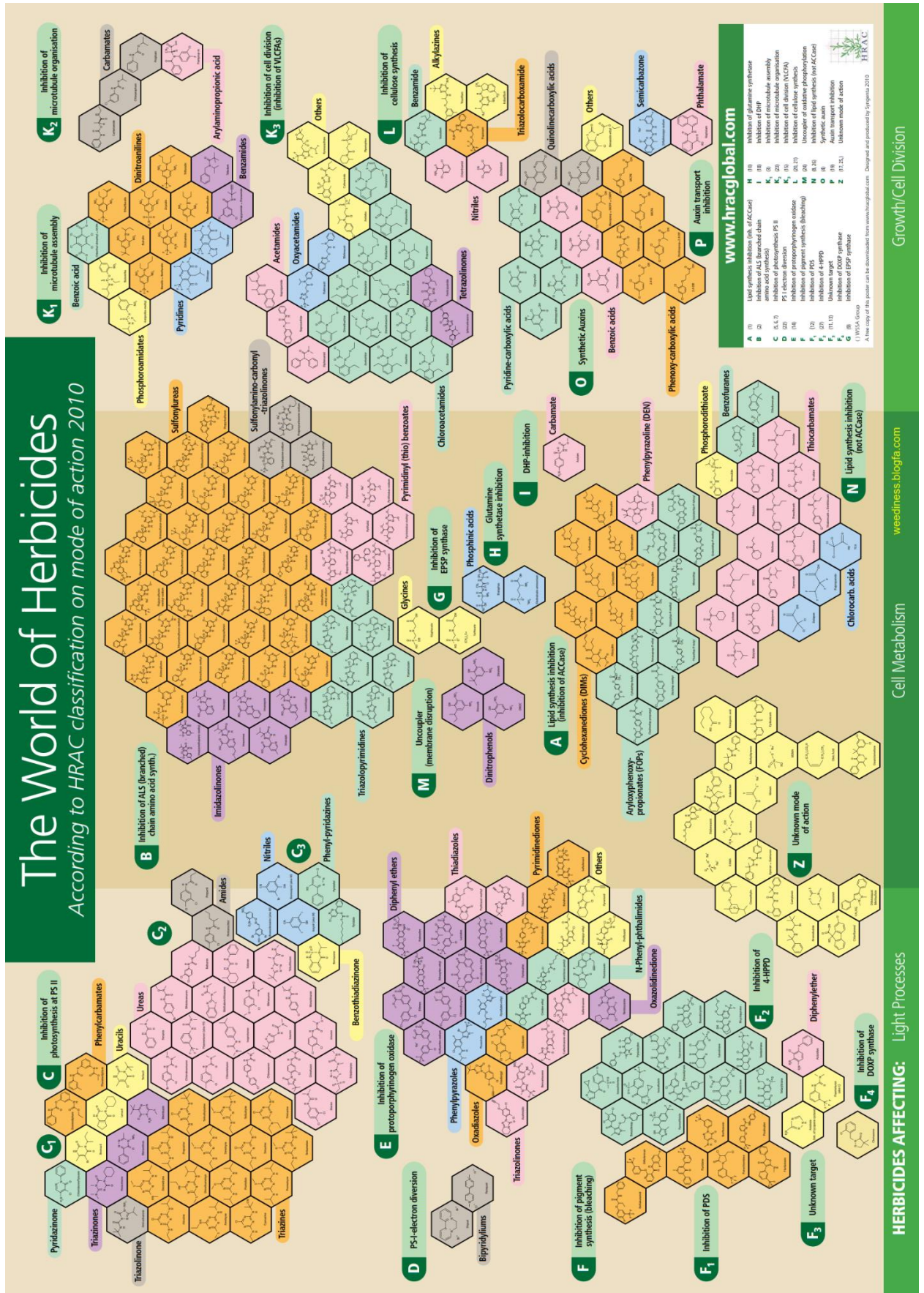


Figura 2. Grupos de herbicidas según su modo de acción según la clasificación del Comité de Acción de Resistencia a los Herbicidas (siglas en inglés HRAC).

Eliminando aproximadamente el 99% de las malas hierbas (Délye et al., 2013), actualmente, estos productos químicos son parte esencial en la lucha contra las malas hierbas, siendo el instrumento más poderoso que jamás se haya desarrollado. Desgraciadamente, el periodo en el que se empleaban los herbicidas como única herramienta de control se ha acabado debido a la emergencia de malas hierbas resistentes a ellos por su uso continuado y repetido (Fernández et al., 2017). Cuando la presión de la selección se produce en poblaciones suficientemente grandes, los individuos no afectados o menos afectados que el resto de la población tendrá el dominio y, por lo tanto, sobrevivirán y se perpetuarán en posteriores generaciones (Fernández Moreno, 2017).

III.3.1. Principales herbicidas utilizados en esta tesis

III.3.1.1. Glifosato

El glifosato (N-fosfometilglicina, $C_3H_8NO_5P$) es un herbicida no selectivo, de amplio espectro, desarrollado para eliminación de malas hierbas en especial las perennes. Es absorbido por las hojas y no por las raíces. Se puede aplicar a las hojas, inyectarse a troncos y tallos, o pulverizarse como herbicida forestal.

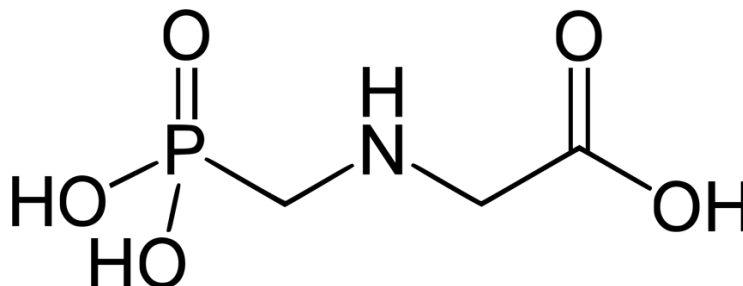


Figura 3. Fórmula química del glifosato

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del glifosato

Peso molecular	346,41 g/mol
Estado físico	Polvo blanco
Densidad	1,7 g/ml
Solubilidad	1,05X10 ⁶ mg/l a 25°C en agua desionizada

Este herbicida inhibe la enzima del cloroplasto 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que interrumpe la vía del shikimato dando lugar a la inhibición de la producción de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Estos aminoácidos aromáticos son los precursores de numerosos productos secundarios en la planta, como antocianos, lignina, promotores del crecimiento (hormonas), inhibidores del crecimiento y fenoles, así como de la producción de proteínas (Franz et al., 1997). Además, entre el 20 y el 35% del carbono fijado por la fotosíntesis se utiliza en esta ruta.

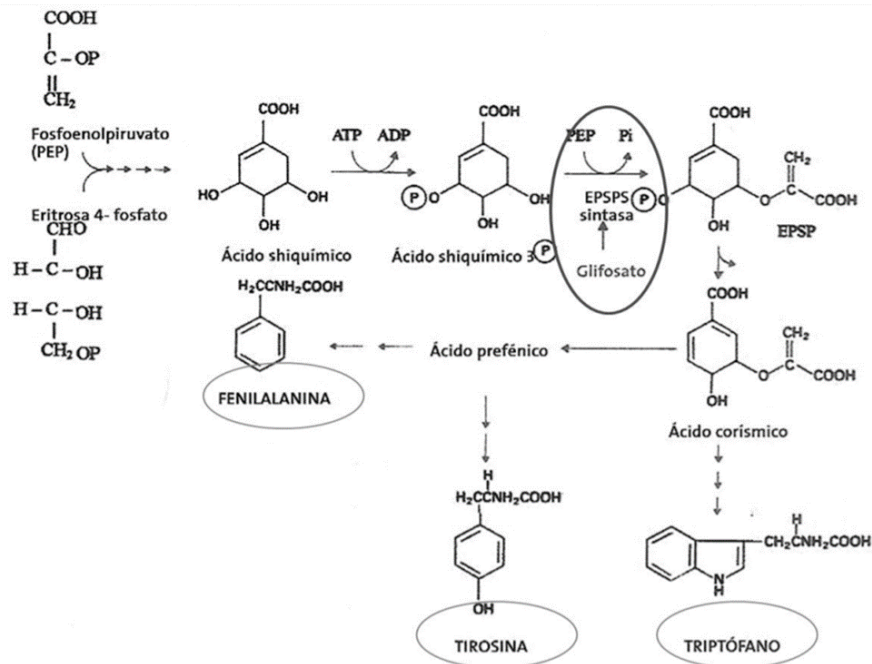


Figura 4. Inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa por el herbicida glifosato

El glifosato ha sido utilizado durante más de 25 años para controlar una amplia variedad de malas hierbas mono y dicotiledóneas (Atkinson, 1985^a; Anderson y Johnson, 1990; Coble, 1996). En los últimos 15 años, la expansión de cultivos modificados genéticamente para su resistencia a glifosato ha incrementado su uso (Padgett et al., 1995). Además de la alta eficacia del glifosato en el control de numerosas malas hierbas, tiene otras características favorables para el medioambiente como es su fuerte adsorción a los coloides del suelo (lo que dificulta su percolación y consiguiente contaminación de las aguas subterráneas), la similitud con los aminoácidos y baja toxicidad para mamíferos, aves y peces (Padgett et al., 1995). Estos factores, unidos a su éxito en el control de malas hierbas perennes, constituyen muchas veces la única herramienta eficaz para su control, y la rápida inactivación en suelos, que permite la siembra de cualquier cultivo casi inmediatamente después del tratamiento, y explican que el glifosato sea el herbicida más utilizado en el mundo

El primer caso de resistencia al glifosato fue el de *Lolium rigidum* de un huerto de manzanas en Australia en 1996.

Las malas hierbas han desarrollado resistencia al glifosato a través de la disminución de la translocación/ secuestro (Feng et al., 2004), mutaciones en el sitio de acción (Kaundun et al., 2008) y sobreexpresión génica (Gaines et al., 2010).

III.3.1.2. Inhibidores de la ALS

Las imidazolinonas, los pirimidiniltiobenzoatos, las sulfonilaminocarboniltiazolinonas, las sulfonilureas y las triazolopirimidinas son familias de herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa (ALS), también llamada acetohidroxiácido sintasa (AAS). Esta es una enzima clave en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) al inhibir la enzima acetolactato sintasa en las plantas (Ray, 1984). La muerte de la planta es consecuencia de eventos que ocurren en respuesta a la inhibición de la ALS y la baja producción de aminoácidos de cadena ramificada, pero la secuencia real de los procesos fitotóxicos no está clara.

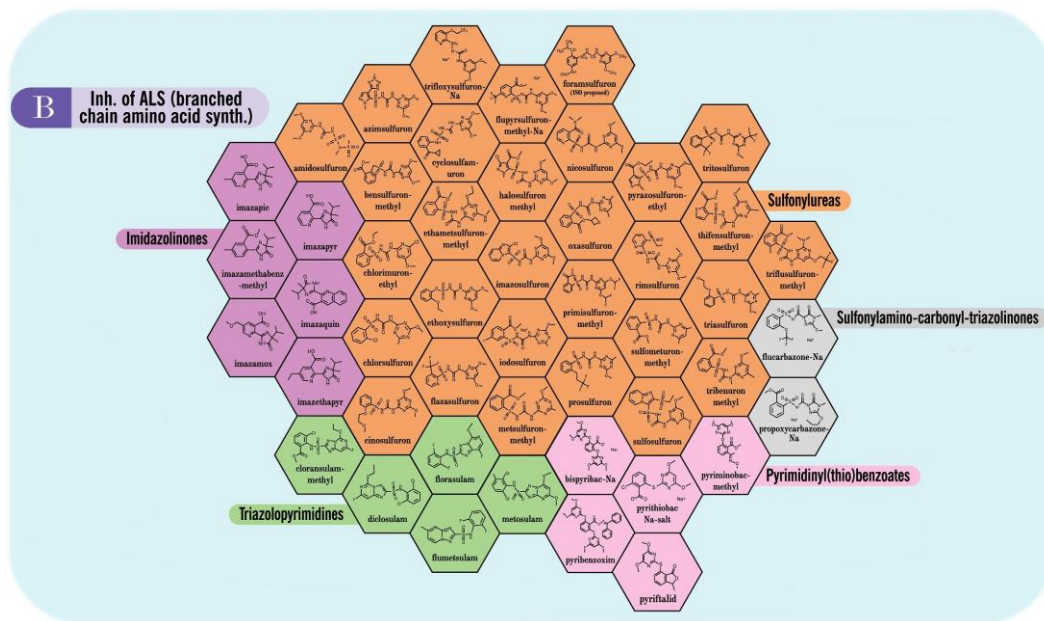


Figura 5. Familia de los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS)

Aunque la mayoría de estos herbicidas actúan a dosis bajas, obteniéndose buenos resultados con unos cuantos gramos por hectárea, son el grupo de mayor riesgo para el desarrollo de resistencia. Los primeros casos de resistencia se identifican solo cuatro años después de su introducción. Se han detectado casos de resistencia por mecanismos TSR (Target site Resistance) y NTSR (Non-Target site Resistance). El primer caso reportado de resistencia a los inhibidores de la ALS fue la resistencia por metabolismo al clorosulfurón en *Lolium rigidum* en Australia (Heap and Knight, 1982, 1986), seguido de la resistencia por modificación del sitio de acción en 1987 en *Lactuca serriola* (Mallory-Smith et al., 1990) en Estados Unidos.

Los herbicidas inhibidores de la ALS estructuralmente diferentes se orientan también de manera diferente en el dominio de unión al herbicida, con superposición parcial (Figura 6). Por lo tanto, una sustitución de aminoácidos dentro del dominio de unión puede conferir resistencia a algunos, pero no a otros herbicidas.

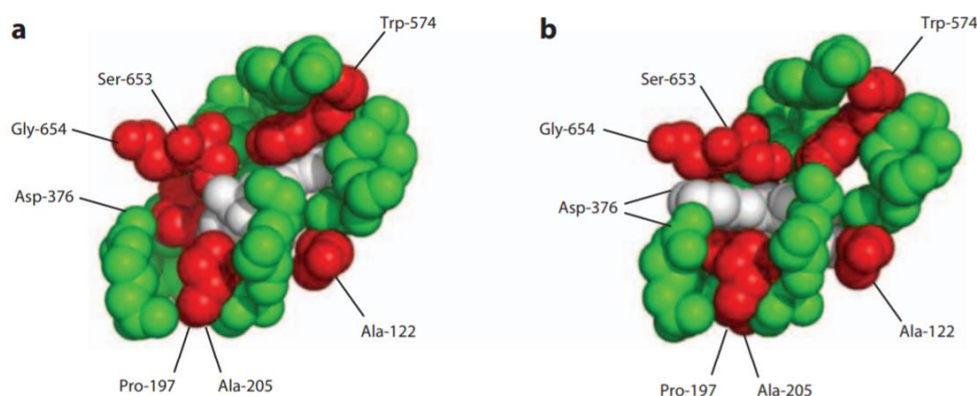


Figura 6. Modelo de simulación de la estructura de ALS de *Arabidopsis* con el herbicida clorsulfurón (a) y el herbicida imazaquin (b). Los herbicidas son de color blanco, las sustituciones de los residuos que han desarrollado resistencia son de color rojo. Hay que tener en cuenta que el herbicida clorsulfurón se une más y tiene más contacto con el sitio catalítico de lo que lo hace el herbicida imazaquin. Se observa en las imágenes que las moléculas de los herbicidas en la parte inferior izquierda son las que están en la entrada del canal, y las que están en la parte superior derecha se encuentran dentro del canal, que conduce al sitio catalítico. (Powles and Yu, 2010a)

Dentro de los inhibidores de la ALS, las materias activas más utilizadas de cada familia son las siguientes:

III.3.1.2.1. Imazamox

Esta materia activa pertenece a la familia de las imidazolinonas. Desde su aparición en los años 80 (Shaner et al., 1984), han tenido un gran éxito y repercusión en los cereales y leguminosas. Esto no fue debido sólo a su enorme eficacia, sino también por su baja toxicidad a los mamíferos y bajo impacto ambiental (Aichele and Penner, 2005) y amplia selectividad de cultivos y gran número de formulaciones en pre y postemergencia (Shaner and O'Connor, 2017).

En 1998 apareció una nueva imidazolinona conocida con el nombre de imazamox (Brady et al., 1998). Este herbicida presenta gran efectividad en campo debido a que es fácilmente absorbido por las hojas y por las raíces; además, presenta translocación y bajo metabolismo. Las imidazolinonas tienen en su estructura un núcleo 4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il unido en la posición 2 a un anillo aromático (usualmente heterocíclico). Actúan principalmente como inhibidores de la ALS.

Las propiedades físico químicas del imazamox son:

Tabla 3. Propiedades físico-químicas del imazamox	
Peso molecular	305,334 g/mol
Estado físico	Sólido en polvo blanquecino
Densidad	1,39 g/ml
Solubilidad	4,160 mg/l a 20°C en agua desionizada

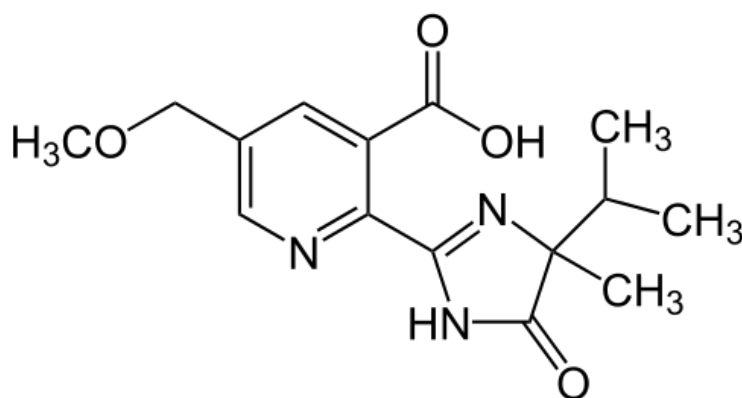


Figura 7. Fórmula química del imazamox

III.3.1.2.2. Penoxsulam

El penoxsulam ((2-(2,2-difluoroetoxi)-N-(5,8-dimetoxi-[1,2,4] triazolo [1,5-c] pirimidin-2-il)-6-(trifluorometil) bencenosulfonamida) es una triazolopirimidina sulfonamida dentro de los herbicidas inhibidores de la ALS. Es un ingrediente activo diseñado para el control postemergente de gramíneas anuales, juncias y malas hierbas de hoja ancha en el cultivo de arroz como *Echinochloa* spp., *Cyperus difformis*, *Alisma plantago-aquatica*, *Scirpus mucronatus*, *Polygonum persicaria*, *Typha angustifolia*, *Heteranthera limosa*, *Lindernia dubia*, *Nasturtium officinale*, entre otras (Roberts et al., 2003). Es absorbido principalmente por las hojas, pero también puede ser absorbido por las raíces siendo traslocado por el xilema y el floema (Sorribas et al., 2006).

Tabla 4. Propiedades fisico-químicas del penoxsulam

Peso molecular	483,37 g/mol
Estado fisico	Sólido en polvo blanquecino
Densidad	1,61 g/ml a 20°C
Solubilidad	408 mg/l a 20°C en agua desionizada y pH 7

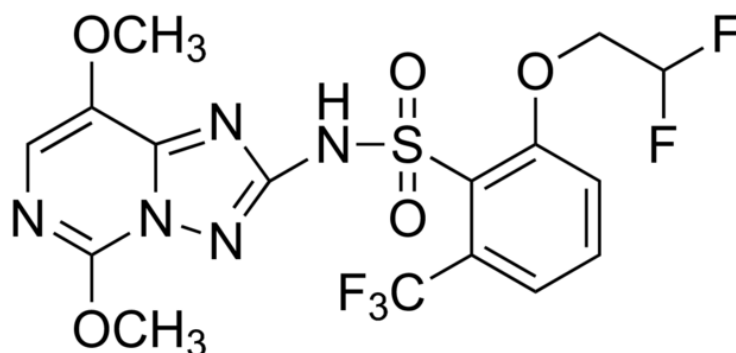


Figura 8. Fórmula química del penoxsulam

III.3.1.3. Inhibidores de la ACCasa

Los herbicidas inhibidores de la ACCasa tienen como enzima objetivo la acetil CoA carboxilasa (ACCasa) que cataliza el primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos (Buchanan et al., 2015).

Este grupo de herbicidas comprenden dos familias: los Ariloxifenoxi propiónicos y las ciclohexanodionas. Los tejidos jóvenes en expansión y los meristemos resultan ser los más sensibles. Se afecta esencialmente el sistema interno de membranas, de manera que las enzimas oxidativas e hidrolíticas del comportamiento lisosomal, son liberadas y actúan sobre los constituyentes citoplasmáticos, por esto, ocurre una completa destrucción de la célula.

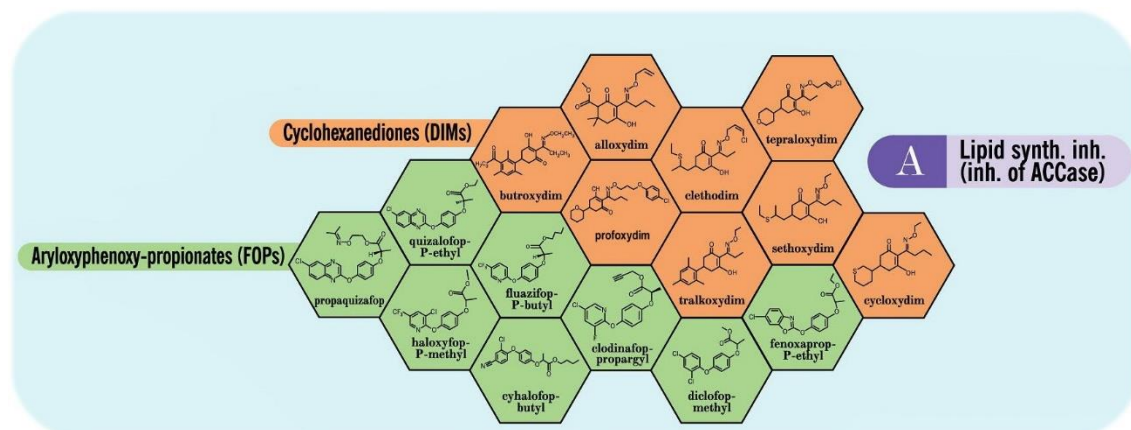


Figura 9. Familia de los herbicidas inhibidores de la acetil coenzima A

El uso generalizado de los herbicidas inhibidores de la ACCasa comenzó en la década de 1980 tanto en cultivos de hoja ancha como en cereales. Aunque se han identificado casos de resistencia por metabolismo y sobreexpresión del sitio de acción de la enzima, la causa predominante de resistencia a este grupo de herbicidas se debe a una forma insensible y alterada de la enzima ACCasa (Brown et al., 2002).

Dentro de los inhibidores de la ACCasa, podemos destacar los siguientes herbicidas:

III.3.1.3.1. Profoxydim

El profoxydim (2-[1-(2-(4-clorofenoxi)propoxiimino)butil]-3-hidroxi-5-tian-3-ilcicloex-1-enona) es una ciclohexanodiona sistémica con actividad herbicida de postemergencia, que se absorbe rápidamente por las partes verdes de la planta y se trasloca por toda ella hasta los tejidos meristémicos. Es un inhibidor de la acetil CoA carboxilasa en los cloroplastos e interfiere la biosíntesis de los lípidos en las gramíneas sensibles. Resulta efectivo en el control de gramíneas en cultivos de arroz. Entre las especies sensibles se destacan: *Echinochloa* spp., *Eleusine indica*, *Leptochloa fascicularis*, entre otras. Su selectividad en el arroz se debe a que se metaboliza rápidamente a metabolitos no fitotóxicos.

Tabla 5. Propiedades fisico-químicas del profoxydim

Peso molecular	471.97 g/mol
Estado fisico	Sólido en polvo blanquecino
Densidad	1,19 g/ml a 20°C
Solubilidad	27,8 mg/l a 20°C en agua desionizada

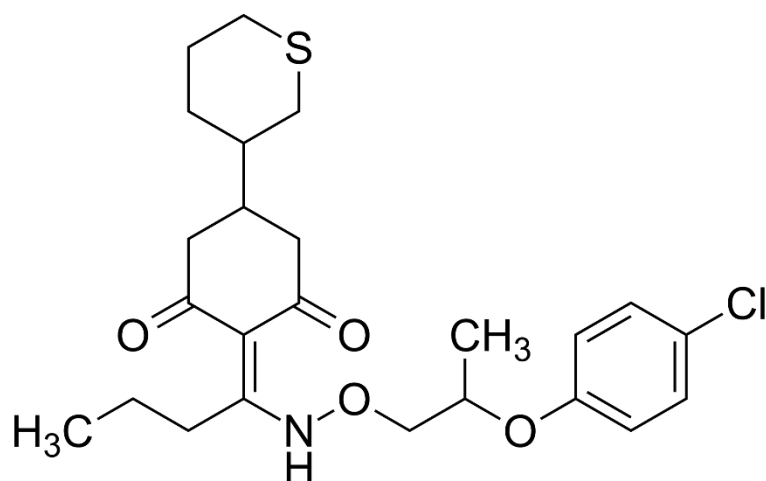


Figura 10. Fórmula química del proflorfenidim

III.3.1.3.2. Cihalofop-butilo

El cihalofop-butilo ((R)-2-[4-(4-ciano-2-fluorofenoxi)fenoxi]propionato de butilo), es un herbicida de ariloxifenoxipropionato para el control en post-emergencia de malas hierbas en arroz, principalmente contra especies de *Echinochloa* y *Leptochloa* (Gu, 2000). Es absorbido rápidamente por los tejidos de las plantas. Tiene movilidad en el xilema y el floema y se acumula en las zonas meristémicas (Liu, 2002). El ácido actúa por inhibición de la ACCasa que cataliza los primeros pasos de la síntesis de los ácidos grasos.

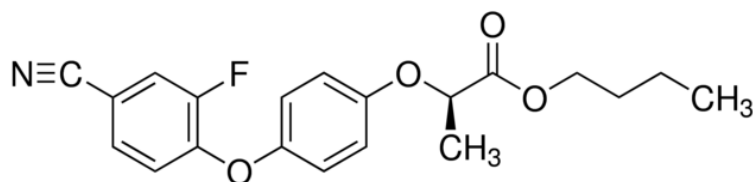


Figura 11. Fórmula química del cihalofop-butilo

Tabla 6. Propiedades físico-químicas del cihalofop-butilo

Peso molecular	357,38 g/mol
Estado físico	Sólido cristalino blanco
Densidad	1,17 g/ml a 20 °C
Solubilidad	0,44 mg/l a 20°C en agua desionizada y pH 7

III.4. Resistencia

“La resistencia a herbicidas es la capacidad natural y heredable de algunos biotipos de malas hierbas, de una población determinada, para sobrevivir a un tratamiento herbicida, que debería controlar con eficacia esa población en las condiciones normales de uso” (Heap, 2018). No se debe confundir con “tolerancia”, que es la capacidad natural heredable de una especie para

sobrevivir y reproducirse después de la aplicación de ese herbicida. Es decir, las especies tolerantes a un herbicida nunca antes fueron controladas por ese herbicida.

La resistencia a herbicidas, por tanto, es el resultado de la selección de rasgos que permiten a las especies de malas hierbas sobrevivir a prácticas de manejo específicas que de lo contrario causarían mortalidad. Por lo tanto, es sin duda una de las principales preocupaciones en la agricultura moderna (Evans et al., 2016).

III.4.1. Resistencia cruzada y múltiple

Desde una perspectiva de manejo de resistencia a herbicidas, es importante tener en cuenta que las malas hierbas pueden presentar resistencia cruzada y resistencia múltiple (Fernández et al., 2016, 2017).

La resistencia cruzada ocurre cuando un único mecanismo de resistencia confiere resistencia a varios herbicidas. Debido a que la mayoría de los herbicidas están diseñados para unirse a enzimas específicas, el tipo más común de resistencia cruzada es la resistencia cruzada del sitio de acción (Amaro-Blanco et al., 2018), donde un sitio diana alterado (enzima) confiere resistencia a muchos o todos los herbicidas de la misma familia química.

La resistencia múltiple ocurre cuando dos o más mecanismos de resistencia ocurren dentro de la misma planta, a menudo debido a la selección secuencial por diferentes modos de acción de herbicida. Un ejemplo de este tipo de resistencia es el publicado por Fernández et al., (2017), a glifosato (5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)) y a oxifluorfen (inhibidores de la protoporfirinogeno oxidasa (PPO)). Por lo tanto, un diagnóstico de resistencia múltiple requiere un conocimiento de los mecanismos de resistencia (Powles and Shaner, 2001).

El número de casos de malas hierbas con resistencia múltiple/cruzada es cada vez más mayor, ya que, durante los últimos 25 años no se ha avanzado en la producción de herbicidas con diferentes modos de acción. Esto se traduce en que el agricultor necesita un mayor conocimiento de lo que está pasando, ya que la producción está en juego. Por un lado, deberá saber que la resistencia múltiple/cruzada se está produciendo. Esto dará lugar a un mayor coste porque deberá utilizar herbicidas de otros modos de acción. También deberá diversificar con otros controles no químicos para luchar contra las malas hierbas.

La normativa europea, en relación al uso de herbicidas, es cada vez más restrictiva y la comunidad malherbóloga está preocupada sobre la pérdida potencial de las materias activas como herramientas eficaces y económicas de la agricultura moderna.

Esta situación se agrava con la dependencia a un solo herbicida. La aplicación repetida de un mismo herbicida, herbicidas con el mismo ingrediente activo, mismo grupo químico o con igual

sitio de acción, en interacción con otros factores (bióticos y abióticos) como el suelo, clima, prácticas culturales, sistema de cultivo, especie de mala hierba, y el no uso de otras medidas alternativas de control ha conducido a la evolución de resistencia en las poblaciones de especies infectantes (Gressel and LeBaron, 1982; Tharayil-Santhakumar, 2003). En muchas ocasiones, los agricultores utilizan herbicidas de la misma familia química para evitar este problema, pero el problema no queda resuelto al poder desarrollar resistencia cruzada. Cuando cambian a herbicidas con diferente modo de acción no es alternado con otros herbicidas en tratamientos sucesivos, por lo que aparece de nuevo la resistencia y en este caso, es más grave porque se acotan el número de modos de acción que se pueden utilizar.

Para prevenir la aparición de resistencias a herbicidas, la legislación (Real Decreto 1311/2012) recoge la Gestión Integrada de Plagas que en materia de Gestión Integrada de Malas Hierbas insiste en un control integrado de malas hierbas (CIM) que aúne diferentes estrategias incluyendo el control químico racional.

III.4.2. Casos de resistencia

A día de hoy, en el mundo se han descrito 500 casos de resistencia en 256 especies (149 dicotiledóneas y 107 monocotiledóneas) en 93 cultivos y 70 países (Heap, 2019) (Figura 12).

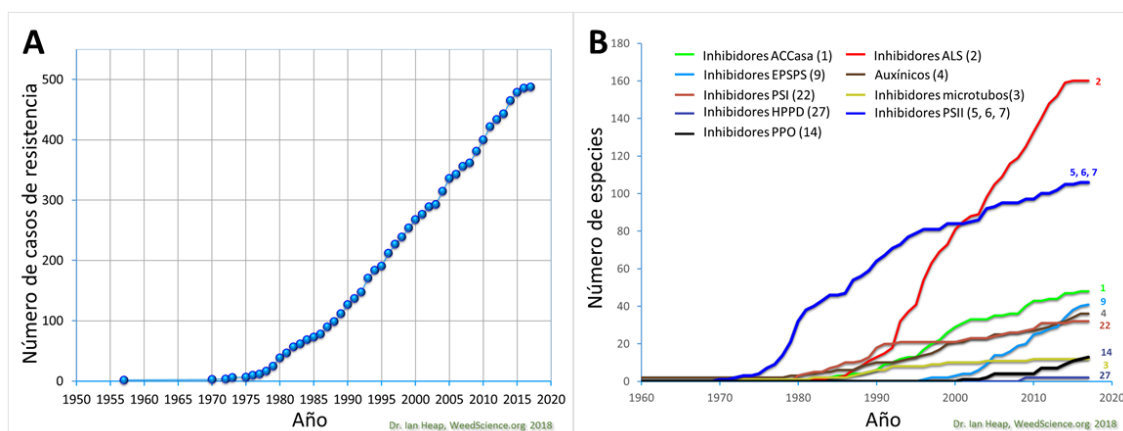


Figura 12. Número de casos de resistencia a lo largo de los años (A); y número de especies resistentes a diferentes modos de acción (Códigos WSSA) (B)

Alguno de los factores clave que influyen en la evolución de la resistencia son la presión de selección (frecuencia y eficacia del uso de herbicida), la actividad residual del herbicida, la base genética de la resistencia (grado de dominancia del rasgo de resistencia y el sistema de reproducción del mala hierba), cuánto de prolífica es la mala hierba para producir semilla, la longevidad de la semilla en el suelo y la adaptación del rasgo de resistencia (Heap, 2014).

La capacidad de las malas hierbas a desarrollar fenómenos de resistencia a herbicidas fue ya anticipada en los primeros estudios de desarrollo de herbicidas (Harper, 1956). Sin embargo, no fue hasta 1970 cuando se documentó por primera vez el caso de una hierba resistente. Éste fue

el de *Senecio vulgaris* resistente a triazina que apareció como resultado del uso repetido de simazina durante 10 años en un vivero de plantas en el estado de Washington y fue reportado por Ryan (1970).

El primer caso documentado es a triazinas porque era el producto herbicida que había en aquel momento y todavía no se habían descubierto (y usado) otros herbicidas con mayor presión de selección. Estos casos de resistencia a otros grupos con mayor presión de selección no se desarrollaron hasta más tarde. En este sentido, los herbicidas pertenecientes al grupo de los inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) y los inhibidores de la acetolactato sintetasa (ALS) se presentan como los grupos que encabezan la lista de herbicidas con alto riesgo de desarrollar resistencia en pocos años: con un uso de 5 años, estos dos grupos puede desarrollarla (Figura 13). En el extremo opuesto tenemos al glifosato, un herbicida, cuyo uso está extendido a nivel mundial desde 1974 (Baylis, 2000; Woodburn, 2000), tiene riesgo bajo de que las malas hierbas desarrollen resistencia frente a él (más de 15 años de tratamientos continuados).

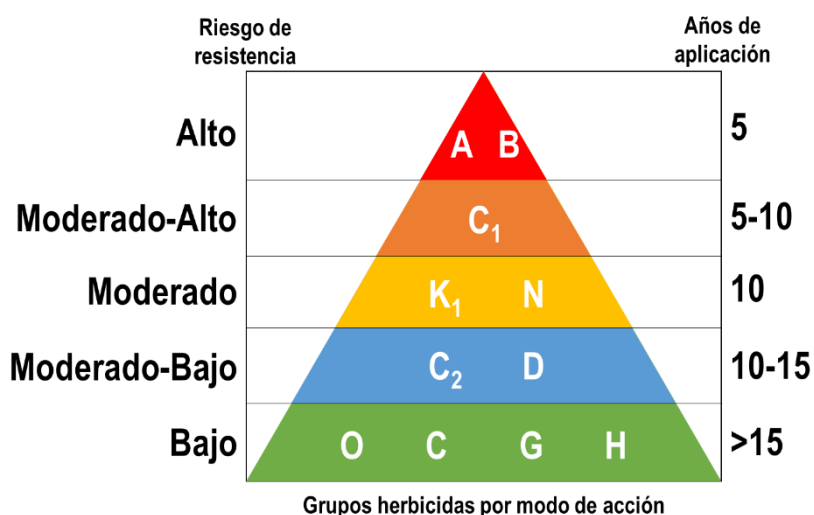


Figura 13. Clasificación de los herbicidas por modos de acción según el riesgo de desarrollar resistencia (Códigos HRAC)

Dependiendo del tipo de mecanismo de resistencia detectado, la mala hierba presentará un patrón específico en su resistencia a herbicidas, que podrá variar desde un alto grado de resistencia a determinados compuestos de una misma familia química, a una moderada resistencia a un amplio espectro de herbicidas

III.4.3. Mecanismos de resistencia

Hay dos grandes grupos de mecanismos de resistencia. Los primeros son dependientes del sitio de acción, (TSR por el inglés Target-Site Resistance), entendiéndose como sitio de acción la proteína de especial relevancia biológica (generalmente una enzima) inhibida por la unión de ésta con el herbicida. Los segundos no son dependientes del sitio de acción (NTSR por el inglés Non Target-Site Resistance) (Sammons and Gaines, 2014; Fernández-Moreno et al., 2017).

Dentro del primer grupo (Figura 14), la resistencia es el resultado de una modificación del sitio de acción, lo que impide que el herbicida se una de manera efectiva. Si el herbicida no puede unirse al enzima, la inhibición de ésta no se produce y la planta sobrevive. La resistencia del sitio de acción es el mecanismo de resistencia más común. La mayoría, de los casos de resistencia a inhibidores de la ALS, inhibidores ACCasa, dinitroanilina y herbicidas de triazina se deben a modificaciones del sitio de acción del herbicida (Heap, 2014). Este mecanismo se traduce en la aparición de una o más sustituciones de nucleótidos en la secuencia de ADN (González-Torralva et al., 2014; Fernandez et al., 2015).

Otro tipo de mecanismo TSR es la amplificación/sobreexpresión génica, que es el mecanismo de resistencia a herbicidas identificado más recientemente, y causa resistencia al aumentar la producción del enzima objetivo, diluyendo el herbicida en relación con el sitio de acción (Gaines et al., 2010b; Salas et al., 2012).

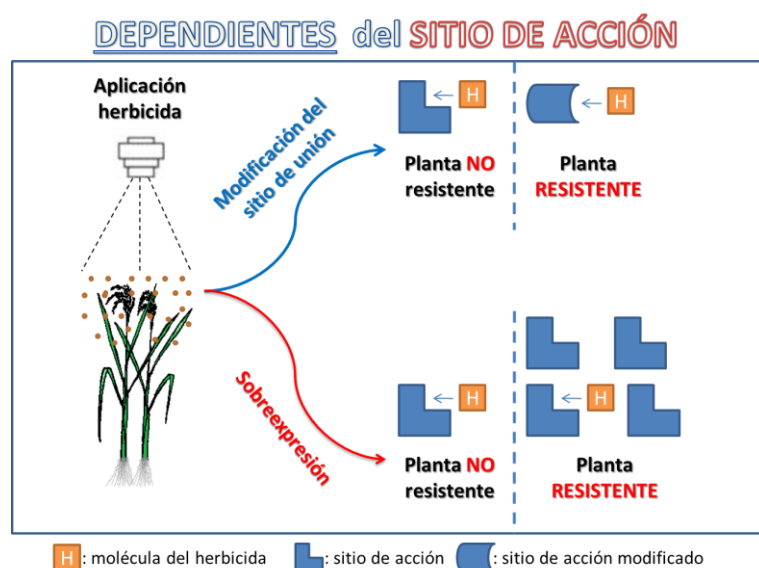


Figura 14. Mecanismos de resistencia dependientes del sitio de acción (mecanismos TSR)

Por otro lado, encontramos los mecanismos NTSR (Figura 15), que pueden incluir los siguientes subgrupos:

1. **Metabolismo:** la resistencia por metabolismo ocurre cuando la planta tiene la capacidad de degradar el herbicida antes de que pueda afectar seriamente a la planta (Rojano-Delgado et al., 2012)
2. **Reducción de la absorción/translocación:** la disminución de la absorción y/o translocación puede causar resistencia porque el movimiento del herbicida está restringido y el herbicida no alcanza su sitio de acción en una concentración suficiente como para causar la muerte (Délye et al., 2013)

- Secuestro: el secuestro de un herbicida en vacuolas o en paredes celulares puede mantener al herbicida fuera del sitio de acción, lo que resulta en resistencia (Ge et al., 2012).

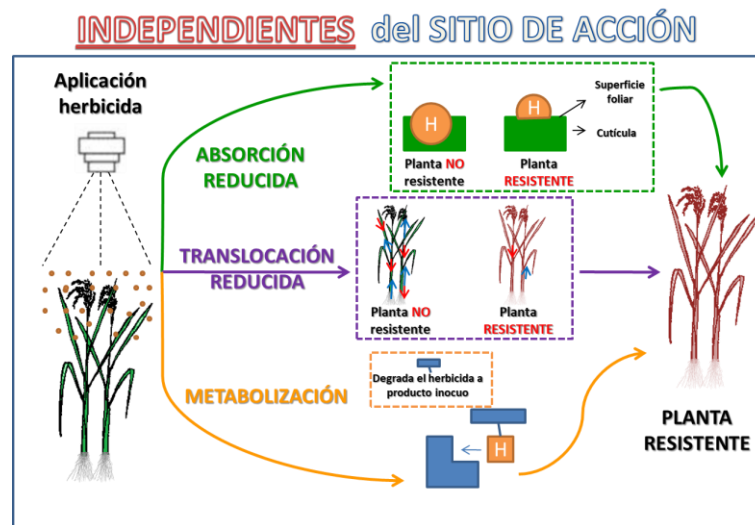


Figura 15. Mecanismos de resistencias independientes del sitio de acción (mecanismos NTSR)

III.5. Control integrado de malas hierbas (CIM)

Los herbicidas son una herramienta frecuentemente utilizada para el control de malas hierbas en la agricultura moderna; son altamente efectivos frente a la mayoría de las ellas, pero no son una solución completa al desafío complejo que presentan estas plantas. Teniendo en cuenta los problemas de malas hierbas resistentes a herbicidas y la constante presión social para reducir el uso general de ellos, se necesitan más que nunca herbicidas alternativos y estrategias de manejo integrado de malas hierbas.

El control integrado de malas hierbas (CIM) se puede definir como un enfoque holístico para el manejo de malas hierbas que integra diferentes métodos de control para proporcionar al cultivo una ventaja sobre las plantas no deseadas (Harker and O'Donovan, 2013).

Los sistemas CIM pueden combinar diferentes de métodos de control de malas hierbas. Aunque pocos de estos sistemas combinan todos los métodos de manejo de malezas, muchos sistemas actuales de CIM involucran métodos químicos y mecánicos (especialmente el laboreo) o químicos y culturales. Desafortunadamente, la "integración" únicamente con componentes de control químico es común en los sistemas de cultivo modernos. En este último ejemplo, el recomendar varias formas de aplicar herbicidas o aplicar con más de un modo de acción, aunque son técnicas importantes, no son CIM.

De todo lo anteriormente expuesto podría inferirse de manera incorrecta que la implementación del CIM significa que los herbicidas deben evitarse a favor de otros métodos de

manejo de malas hierbas. Sin embargo, el CIM no debería tratar de la exclusión de un método por otro, sino de la diversidad general de la técnica. Cualquier método de manejo de malas hierbas que se repita continuamente proporciona una fuerte presión de selección para la adaptación de ellas y la resistencia a ese método.

Como se ha mencionado en el apartado de resistencia, con el objetivo de prevenir la aparición de resistencias a herbicidas, la legislación (Real Decreto 1311/2012) recoge la Gestión Integrada de Plagas que en materia de Gestión Integrada de Malas Hierbas insiste en un control integrado de malas hierbas (CIM) que aúne diferentes estrategias incluyendo el control químico racional.

III.6. Referencias bibliográficas

- Aichele, T. M., & Penner, D. (2005). Adsorption, desorption, and degradation of imidazolinones in soil. *Weed Technology*, 19(1), 154–159.
- Amaro-Blanco, I., Fernández-Moreno, P. T., Osuna-Ruiz, M. D., Bastida, F., & De Prado, R. (2018). Mechanisms of glyphosate resistance and response to alternative herbicide-based management in populations of the three *Conyza* species introduced in Southern Spain. *Pest Management Science*, Accepted Author Manuscript. <https://doi.org/10.1002/ps.4896>
- Anderson, K. S., & Johnson, K. A. (1990). Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: lessons from EPSP synthase. *Chemical Reviews*, 90(7), 1131–1149.
- Atkinson, D. (1985). Toxicological properties of glyphosate--a summary. *Herbicide Glyphosate/Edited by E. Grossbard, D. Atkinson*.
- Baylis, A. D. (2000). Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*, 56(4), 299–308.
- Berner, D. K., Ikie, F. O., & Green, J. M. (1997). ALS-inhibiting herbicide seed treatments control *Striga hermonthica* in ALS-modified corn (*Zea mays*). *Weed Technology*, 704–707.
- Brady, T. M., Cross, B., Doehner, R. F., Finn, J., & Ladner, D. L. (1998). The discovery of imazamox, a new broad-spectrum imidazolinone herbicide. In *Synthesis and chemistry of agrochemicals* (pp. 30–37). American Chemical Society.
- Brown, A. C., Moss, S. R., Wilson, Z. A., & Field, L. M. (2002). An isoleucine to leucine substitution in the ACCase of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) is associated with resistance to the herbicide sethoxydim. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72(3), 160–168.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Coble, H. (1996). Weed management tools and their impact on the agro-ecosystem. In *Proceedings of the Second International Weed Control Congress (Copenhagen, Denmark, 1996)*. Department of Weed Control and Pesticide Ecology.
- Délye, C., Jasieniuk, M., & Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), 649–658.
- Evans, J. A., Tranel, P. J., Hager, A. G., Schutte, B., Wu, C., Chatham, L. A., & Davis, A. S. (2016). Managing the evolution of herbicide resistance. *Pest Management Science*, 72(1), 74–80.
- Feng, P. C. C., Tran, M., Chiu, T., Sammons, R. D., Heck, G. R., & CaJacob, C. A. (2004). Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science*, 52(4), 498–505.

- Fernández Moreno, P. T. (2017). Resistencia cruzada y múltiple de malas hierbas a herbicidas.
- Fernández, P., Alcántara, R., Osuna, M. D., Vila-Aiub, M. M., & Prado, R. De. (2017). Forward selection for multiple resistance across the non-selective glyphosate, glufosinate and oxyfluorfen herbicides in *Lolium* weed species. *Pest Management Science*, 73(5), 936–944.
- Fernández, P., Alcántara-de la Cruz, R., Cruz-Hipólito, H., Osuna, M. D., & De Prado, R. (2016). Underlying Resistance Mechanisms in the *Cynosurus echinatus* Biotype to Acetyl CoA Carboxylase-Inhibiting Herbicides. *Frontiers in Plant Science*, 7, 449.
- Fernandez, P., Gauvrit, C., Barro, F., Menendez, J., & De Prado, R. (2015). First case of glyphosate resistance in France. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(4), 1469–1476.
- Fernández-Moreno, P. T., Bastida, F., & De Prado, R. (2017). Evidence, mechanism and alternative chemical seedbank-level control of glyphosate resistance of a rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype from southern Spain. *Frontiers in Plant Science*, 8, 450.
- Franz, J. E., Mao, M. K., & Sikorski, J. A. (1997). Uptake, transport and metabolism of glyphosate in plants. *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. American Chemical Society, Washington, DC, 143–181.
- Gaines, T. A., Preston, C., Leach, J. E., Chisholm, S. T., & Shaner, D. L. (2010). Gene amplification is a mechanism for glyphosate resistance evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 1029–1034.
- Gaines, T. A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S. T., Shaner, D. L., ... Culpepper, A. S. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 1029–1034.
- Ge, X., D'Avignon, D. A., Ackerman, J. J. H., Collavo, A., Sattin, M., Ostrander, E. L., ... Preston, C. (2012). Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium spp.*) from Australia, South America, and Europe: a ³¹P NMR investigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1243–1250.
- Gill, G. S., & Holmes, J. E. (1997). Efficacy of cultural control methods for combating herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Pesticide Science*, 51(3), 352–358.
- González-Torralva, F., Gil-Humanes, J., Barro, F., Domínguez-Valenzuela, J. A., & De Prado, R. (2014). First evidence for a target site mutation in the EPSPS2 gene in glyphosate-resistant Sumatran fleabane from citrus orchards. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 553–560.
- Gressel, J., & LeBaron, H. M. (1982). *Herbicide resistance in plants*. Wiley.
- Gu, D. (2000). A novel selective herbicide cyhalofop-butyl. *World Pesticide*, 22, 55–57.
- Harker, K. N., & O'Donovan, J. T. (2013). Recent Weed Control, Weed Management, and Integrated Weed Management. *Weed Technology*, 27(01), 1–11.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1614/WT-D-12-00109.1>

- Harper, J. L. (1956). The evolution of weeds in relation to resistance to herbicides. In *Proceedings of the Third British Weed Control Conference*. The Council.
- Heap, I. (2019). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Retrieved May 29, 2019, from <http://www.weedscience.org>
- Heap, I., & Knight, R. (1986). The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofop-methyl. *Australian Journal of Agricultural Research*, 37(2), 149–156.
- Heap, I. (2014). Herbicide resistant weeds. In *Integrated pest management* (pp. 281–301). Springer.
- Heap, J., & Knight, R. (1982). A population of ryegrass tolerant to the herbicide diclofop-methyl [in South Australia]. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science (Australia)*.
- HRAC, H. R. A. C. (2018). General principles of herbicide resistance management. Retrieved August 10, 2018, from <http://www.hracglobal.com/>
- Kaundun, S. S., Zelaya, I. A., Dale, R. P., Lycett, A. J., Carter, P., Sharples, K. R., & McIndoe, E. (2008). Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Science*, 56(5), 637–646.
- Liebman, M., Mohler, C. L., & Staver, C. P. (2001). *Ecological management of agricultural weeds*. Cambridge University Press.
- Liu, C. L. (2002). *World Pesticide Volume: Herbicide*. Beijing.
- Loureiro, I., Rodríguez-García, E., Escorial, C., García-Baudín, J. M., González-Andújar, J. L., & Chueca, M. C. (2010). Distribution and frequency of resistance to four herbicide modes of action in *Lolium rigidum* Gaud. accessions randomly collected in winter cereal fields in Spain. *Crop Protection*, 29(11), 1248–1256.
- Mallory-Smith, C. A., Thill, D. C., & Dial, M. J. (1990). Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology*, 4(1), 163–168.
- Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31–43.
- Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., LaVallee, B. J., Tinius, C. N., ... Eichholtz, D. A. (1995). Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science*, 35(5), 1451–1461.
- Peterson, D. E., Thompson, C. R., Shoup, D., & Olson, B. (2010). *Herbicide mode of action*. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service.
- Powles, S. B. (2018). *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*. CRC Press.
- Powles, S. B., & Shaner, D. L. (2001). *Herbicide resistance and world grains*. Crc Press.

- Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). *Evolution in Action : Plants Resistant to Herbicides*.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Pujadas, A., & Hernández, J. E. (1988). Concepto de mala hierba. *Información Técnica Económica Agraria*, 75, 47–56.
- Ray, T. B. (1984). Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiology*, 75(3), 827–831.
- Roberts, D. W., Knuteson, J. A., & Jackson, R. (2003). The dissipation of penoxsulam in flooded rice fields. *Pesticides in Air, Plant, Soil & Water Systems*, 349–357.
- Rojano-Delgado, A. M., Cruz-Hipolito, H., De Prado, R., de Castro, M. D. L., & Franco, A. R. (2012). Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants. *Phytochemistry*, 73, 34–41.
- Ryan, G. F. (1970). Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science*, 18(5), 614–616.
- Salas, R. A., Dayan, F. E., Pan, Z., Watson, S. B., Dickson, J. W., Scott, R. C., & Burgos, N. R. (2012). EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest Management Science*, 68(9), 1223–1230.
- Sammons, R. D., & Gaines, T. A. (2014). Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science*, 70(9), 1367–1377.
- Shaner, D. L., Anderson, P. C., & Stidham, M. A. (1984). Imidazolinones potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology*, 76(2), 545–546.
- Shaner, D. L., & O'Connor, S. L. (2017). *The Imidazolinone Herbicides (1991)*. CRC Press.
- Sorribas, M., Romero, M., Bernes, R., & Larelle, D. (2006). Penoxsulam, the new herbicide for rice cultivation. *Phytoma España (España)*.
- Tharayil-Santhakumar, N. (2003). Mechanism of herbicide resistance in weeds. *Plant and Soil Science University of Massachusetts Amherst, MA*, 20. Retrieved from <http://www.weedresearch.com/paper/Mechanism>
- Walsh, M. J., & Powles, S. B. (2007). Management strategies for herbicide-resistant weed populations in Australian dryland crop production systems. *Weed Technology*, 21(2), 332–338.
- Woodburn, A. T. (2000). Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 56(4), 309–312.
- WSSA, W. S. S. of A. (n.d.). Herbicide resistance and tolerance defined. Retrieved August 10, 2018, from www.wssa.es



IV. OBJETIVOS



IV. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo, como ya se mencionó anteriormente en el apartado de contextualización, es la identificación de malas hierbas problemáticas en cultivos de interés agrícolas para la región de Extremadura, así como la identificación de posibles casos de resistencia. Las malas hierbas objeto de estudio en esta tesis son *Conyza* spp. en cultivos leñosos y *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp. en arrozales.

Para lograr el objetivo principal, se marcaron los siguientes objetivos específicos:

1. Llevar a cabo prospecciones de *Conyza* spp., *Echinochloa* spp., y *Leptochloa* spp. en campos de cultivo leñosos y arrozales extremeños, y en el caso de *Conyza* spp., también zonas urbanas.
2. Caracterizar la eficacia de los herbicidas en los géneros de malas hierbas mencionados en condiciones de invernadero.
3. Identificar especies de *Conyza* spp., *Echinochloa* spp., y *Leptochloa* spp. mediante el uso de técnicas moleculares.
4. Identificar los posibles mecanismos de resistencia, tanto los dependientes, como los independientes del sitio de acción.
5. En el caso de *Conyza* spp., estudiar la dispersión de sus semillas y la problemática en un posible flujo de resistencia de un lugar a otro.
6. Colaborar con empresas extremeñas del sector para determinar el estado de sus campos y publicar los resultados en revistas de divulgación con el objetivo de transferir la información al sector.



V. METODOLOGÍA GENERAL



V. Metodología General

En este apartado se abordará, de manera gráfica, la metodología general utilizada para todos los trabajos elaborados para la tesis.

V.1. Prospecciones

La primera de las fases son las prospecciones. Se llevaron a cabo muestreos de poblaciones de malas hierbas en cultivos leñosos y en malas hierbas del arroz en regiones de Extremadura. Las fases para llevar a cabo las prospecciones son las siguientes:

1. Elegir la zona. La elección de la zona depende del objetivo del trabajo que se esté llevando a cabo.
 - a) Prospecciones al azar: para ver la distribución de las especies, se elaboraron previamente mapas con las zonas urbanas o campos de cultivo donde podían estar las poblaciones. Debido a la gran cantidad de parcelas que se podían muestrear, se escogieron las más representativas filtrando por usos oleícolas y frutícolas utilizando la herramienta online SIGPAC.
 - b) Prospecciones dirigidas. Durante estas prospecciones se mantuvieron reuniones con técnicos del servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura donde informaron de parcelas donde existían fallos en el control con herbicidas y se sospechaba casos de resistencia. Posteriormente, también se elaboraron mapas con las coordenadas de las parcelas a muestrear.



Figura 16. Prospecciones realizadas en Extremadura. A, prospección dirigida de *Conyza* spp. en campos de frutales; B, prospección dirigida de malas hierbas del arroz

2. Recolección de semillas: Una vez elaborados los mapas, se recogieron las semillas atendiendo a varios factores: madurez fisiológica adecuada (desde junio a

septiembre), muestreo desde el centro a los bordes de la parcela, y cantidad de muestra. Las semillas recolectadas se almacenaron en sobres de papel para que el material pudiera respirar, se anotaron las coordenadas del punto del que procedían y la fecha de recogida. Por último, las semillas se dejaron secar a temperatura ambiente durante un mes y luego se conservaron a -4°C hasta su utilización en posteriores ensayos. Así mismo, se recogieron semillas de áreas aledañas en donde nunca se aplicaron herbicidas, para que sirviera de control sensible o testigo.

V.2. Identificación de especies con marcadores moleculares

V.2.1. Extracción del ADN

Para la identificación de especies mediante marcadores moleculares se trituraron aproximadamente 100 mg de tejido vegetal hasta que se consiguió un polvo fino. El ADN se extrajo usando el kit de extracción de ADN para plantas Speedtools (BIOTOOLS, Madrid, Spain). En todos los casos, el ADN se cuantificó usando un NANODROP-1000 (Thermo-Scientific), diluyendo a una concentración final de $10\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ para ser utilizada en la PCR.

V.2.2. Amplificación del ADN

Para la amplificación del ADN se empleó la técnica de PCR con cebadores de repetición de secuencia inter-simple (ISSR) para *Conyza* spp., cebadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) para *Echinochloa* spp. y marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) para *Leptochloa* spp..

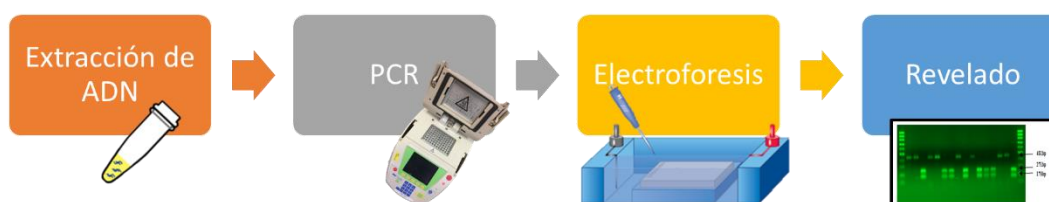


Figura 17. Esquema resumen para la identificación de especies con marcadores moleculares

A partir de las fotos de los geles se creó una matriz de presencia/ausencia de bandas moleculares y se elaboró un árbol de separación de especies a partir de dicha matriz utilizando el programa NTSYSpc que permitió agrupar las poblaciones recolectadas por grupos de especies.

V.3. Screening y ensayos dosis-respuesta

Las semillas de las poblaciones recolectadas se pusieron a germinar.

En el caso de *Conyza* spp. cuando las plántulas alcanzaron un tamaño de 2-4 hojas verdaderas se trasladaron a macetas individuales de 7x8cm. La mezcla de turba-vermiculita utilizada fue 3 partes de turba por cada parte de vermiculita. Para *Echinochloa* spp., las semillas se pusieron a germinar en placas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada y selladas con parafilm. Las semillas de *Leptochloa* spp., se pusieron a germinar en macetas de 7x7x9 cm. utilizándose un sustrato de turba-vermiculita en la misma proporción de 3:1.

Las plantas se conservaron en un invernadero equipado con un sistema de climatización programado para no superar temperaturas de 30°C ni descender de 15°C, e iluminación artificial para mantener 16/14 h de luz y 8/10 h de oscuridad. Todas las plantas fueron regadas hasta la capacidad de campo y no se utilizó ningún fertilizante.

V.3.1. Screening

Para ver si las poblaciones recolectadas eran resistentes a los herbicidas ensayados se realizó un screening previo. Este consistió en tratar poblaciones de las malas hierbas recolectadas a la dosis de campo o recomendada por el fabricante comparándolas con un control no tratado 21 días desde la fecha de tratamiento. Para la aplicación, se utilizó un pulverizador presurizado con una presión constante equipado con 4 boquillas espaciadas 0,5 m unas de otras y situadas a 0,5 metros de la superficie de las plantas. El volumen de caldo empleado fue de 200-250 l/ha, a presión, altura de barra y velocidad de avance constantes. Para el experimento se utilizaron 5 repeticiones (1 planta por maceta).

V.3.2. Ensayos dosis-respuesta

A las poblaciones que resistían la dosis de campo del herbicida, se les sometió a un ensayo dosis-respuesta: se utilizaron dosis crecientes de herbicidas hasta superar varias veces las dosis de campo de los herbicidas utilizados. Las condiciones de tratamientos fueron las mismas que las utilizadas durante el screening. Se utilizaron 8 repeticiones (1 planta por maceta) por herbicida y dosis ensayada. Todas las plantas del ensayo dentro del mismo estadio tenían un estado fenológico y un tamaño similar con el objetivo de descartar cualquier duda debido al mayor desarrollo de la planta. Pasados 21 días desde la fecha de tratamiento, se midió el peso fresco de la parte aérea de las plantas y se expresó como porcentaje respecto al control no tratado.

Los datos de dosis-respuesta se sometieron a un análisis de regresión no lineal utilizando un modelo log-logístico de cuatro parámetros para determinar la dosis de herbicida que resulta en una reducción del 50% en el crecimiento (GR_{50})

$$f(x) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b (\log(x) - \log(e)))}$$

donde $f(x)$ es la reducción del peso sobre el suelo expresado como porcentaje del control no tratado; c y d son la asíntota inferior y la superior, respectivamente; b es la pendiente de la línea alrededor del punto de inflexión; g es el GR_{50} ; y x (variable independiente) es la tasa de herbicida. El análisis de regresión se realizó utilizando el paquete *drc* (Ritz et al., 2015) para el entorno estadístico R (Team, 2017a). Los intervalos de confianza del 95% para cada GR_{50} se calcularon con el mismo software para comparar valores dentro de cada sección.

V.4. Estudio de mecanismos de resistencia involucrados

V.4.1. Absorción y translocación del ^{14}C -glifosato

Se preparó una solución de ^{14}C -glifosato (American Radiolabeled Chemicals, Inc., Saint Louis, MO, EE. UU.) agregando glifosato radiomarcado a glifosato formulado comercialmente, con la actividad específica final de $0,834 \text{ kBq } \mu\text{L}^{-1}$. Esta concentración correspondió a 360 g ae ha^{-1} y un volumen de aplicación de 200 L ha^{-1} .

Cuando las plantas de las poblaciones resistente ® y sensible (S) alcanzaron un estadio de tres a cuatro hojas, se aplicó $1 \mu\text{L}$ ($0,834 \text{ KBq planta}^{-1}$) de solución sobre la superficie adaxial de la segunda hoja más vieja con una micropipeta (LabMate Soft, HTL Lab Solutions, Varsovia, Polonia).

A las 12, 24, 48, 72 o 96 h después del tratamiento, la hoja tratada se lavó con 3 ml de solución de agua/acetona (1:1 v/v) para eliminar el glifosato no absorbido. El enjuague se mezcló con 2 ml de cóctel de centelleo y se analizó la radiactividad por espectrometría líquida (LSS) utilizando un contador de centelleo (Beckman LS 6500, Fullerton, CA, EE. UU.). El resto de la planta se retiró cuidadosamente de la maceta y las raíces se lavaron cuidadosamente con agua destilada. El tejido de la planta se seccionó en la hoja tratada, el tejido restante del brote y las raíces. El tejido de la planta se secó a 60°C durante 96 h y se quemó en un oxidante de muestras biológicas Packard Tri Carb 307 (Packard Instruments, Meriden, CT, EE. UU.). El $^{14}\text{CO}_2$ evolucionado fue atrapado y contado por LSS en una mezcla de 18 ml de Carbo-Sorb E y Permafluor E+ (1:1 v/v) (Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV). La cantidad de glifosato radiomarcado depositado en cada hoja de la planta se evaluó lavando la hoja de una planta seleccionada al azar de cada población inmediatamente después del tratamiento.

El experimento se llevó a cabo dos veces mediante un diseño completamente al azar con siete repeticiones por población. El porcentaje de herbicida absorbido se expresó como se muestra en la ecuación:

$$[\text{kBq en tejido quemado} / (\text{kBq en tejido quemado} + \text{kBq en lavados de hojas})] \times 100$$

V.4.2. Visualización del ¹⁴C-Glifosato

La distribución de ¹⁴C-glifosato en todas las plantas R y S se visualizó utilizando un generador de imágenes de fósforo (Cyclone, Perkin-Elmer, Waltham, MA, EE. UU.). Las plantas se cultivaron, se trataron y el tejido se recogió de la misma manera que se describe para los experimentos de captación y translocación. A las 96 horas después del tratamiento, las raíces de las plantas intactas se enjuagaron para eliminar el suelo y las hojas tratadas se enjuagaron para eliminar el glifosato no absorbido. Las plantas se dejaron secar a temperatura ambiente. El tejido seco se colocó adyacente a una película de almacenamiento de fósforo de 25 × 12,5 cm durante 13 h y se exploró para determinar la distribución de los marcadores radioactivos utilizando un generador de imágenes de fósforo. El procedimiento se realizó utilizando tres plantas por población.

V.4.3. Estudio del metabolismo

Las plantas de las poblaciones R y S se dejaron crecer hasta un estadio de tres o cuatro hojas y luego se trataron con glifosato a 360 g ha⁻¹. A las 96 horas después del tratamiento, se siguió la metodología de Rojano-Delgado et al. (2010) para determinar el glifosato y sus metabolitos primarios, es decir, ácido aminometilfosfónico, glioxilato y sarcosina. La cuantificación del glifosato y los metabolitos se llevó a cabo mediante electroforesis capilar de polaridad invertida utilizando un equipo Agilent G1600A de electroforesis capilar 3D equipado con un detector de red de diodos a una longitud de onda de 190–600 nm. Para la calibración del instrumento, se utilizaron los estándares adquiridos de glifosato, ácido aminometilfosfónico, sarcosina, formaldehído y glioxilato. La preparación del tejido de la hoja tratada para el análisis fue la siguiente: el tejido de la hoja se lavó con agua destilada, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -40°C hasta el momento de uso.

El electrolito de fondo acuoso consistió en ftalato de potasio 10 mM, bromuro de hexadeciltrimetilamonio 0,5 mM y acetonitrilo al 10% a pH 7,5. Las ecuaciones de calibración se establecieron a partir de plantas no tratadas y concentraciones conocidas de glifosato y metabolitos asociados, que se determinaron a partir de sus áreas de pico en el electroferograma. El contenido promedio de glioxilato, que se produce naturalmente en las plantas, se basó en el contenido del medio de cada población. El experimento se realizó dos veces y mediante un diseño completamente al azar con siete repeticiones por población.

V.4.4. Secuenciación del gen EPSPS

Se recolectaron muestras de hojas jóvenes (100 mg) de las poblaciones R y S de cada especie cuando tenían un estadio de entre tres y cuatro hojas. El ARN total se aisló de las hojas utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del

fabricante. El ARN se purificó con TURBO DNasa (sin ARNasa; Ambion, Warrington, Reino Unido) y se almacenó a -80°C. La síntesis de ADNc utilizó 2 µg de ARN total después de una M-MLV (virus de la leucemia murina de Moloney), la transcriptasa inversa (Invitrogen) en combinación con oligo (dT) y nonamers aleatorios (Amersham Biosciences, Amersham, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para amplificar el gen EPSPS, los cebadores se diseñaron según la secuencia del gen EPSPS2. Usamos F1-EPSPS2 (5'-TGATGTTTCATTACATGCTTGGAG-3') y R1-EPSPS2 (5'-TGAGGTGAGAGAAATGGGTACA-3') para *C. bonariensis*; (5'-AGGGCAACCACAGCAA-3') para *C. canadensis*; y F3-EPSPS2 (5'-TCTAAAGCTCCAGAAGAAATTGTG-3') y R3-EPSPS2 (5'-GAAACCCCAAACCGTYCC-3') para *C. sumatrensis*. Después de la PCR (ver González-Torralva et al. (2014)), los productos de la PCR fueron secuenciados (STAB VIDA, Caparica, Portugal) buscando la mutación generalmente descrita en la posición 106, pero también se buscó en la posición 102.

V.4.5. Secuenciación del gen ALS y ACCasa en *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp.

En primer lugar, se extrajo ADN siguiendo el protocolo descrito en el apartado V.2.1. Extracción del ADN.

En la secuencia de la ACCasa se estudiaron 8 codones: Ile1781, trp1999, trp2027, Ile2041, asp2078, lys2080, ser2088 y gly2096. Para ello, se utilizaron dos parejas de cebadores diseñadas a partir de la secuencia de ACCasa de número de accesoión HQ395759.1 del Genbank (*Echinochloa crus-galli*). La pareja CRUSS-F (5'-GATTGGCATAGCCGATGAAG-3')/CRUSSR(5'-TGGACAACACCATTGGTAGC-3') amplifica la región Ile1781 dando un fragmento de 474bp. La pareja AC6F (5'-AGCTTGGAGGAATCCCTGTT-3') /AC6R (5'-GGGTCAAGCCTACCCATACA-3') amplifica el resto de las regiones estudiadas dando un fragmento de 496bp.

En la secuencia de la ALS se estudiaron 2 zonas: la CAD (incluye los codones ala122, pro197, ala205), y la BE (incluye los codones trp574 y ser653). Para la zona CAD se utilizó la pareja de cebadores Pali-1F (5'-CGACGTCTTCGCCTACCC-3') / Pali-2R (5'-ATCTGCTGCTGGATGTCCTT -3') en el caso de *Echinochloa* spp. y PAUL-1F (5'-AACCAAGAAAAGGGGCTGAT-3') / PAUL-1R (5'-TCGGCCTGATGTAGCTAGAAA-3') para *Leptochloa* spp. diseñados a partir de la secuencia número de accesoión AJ577316 del Genbank (*Papaver rhoeas*) con un tamaño de banda de 447 y 455 bp respectivamente. En ciertas ocasiones la pareja de cebadores de *Leptochloa* spp. no amplificó bien con lo que se utilizó la misma pareja que en *Echinochloa* spp. diseñada a partir de la secuencia de la ALS de número de accesoión

JQ319776 del Genbank (*E. cruss galli*). En el caso de la zona BE se utilizó la pareja BE-1(5'-GTCTTGGGGCTATGGGATTT-3') /BE-2(5'-CGACAGAACAAGGGAGAACA-3'), diseñada a partir de la secuencia de ALS de número de acceso AB636580.1 del Genbank (*Echinochloa phyllopogon*) y AY885675.1 (*Oryza sativa*). Al igual que antes, con algunas muestras esta pareja no amplificó bien y se utilizó la formada por AHAS21F (5'-CCGCCGCAATATGCTATCCAG-3') / AHAS26R (5'-GTCCTGCCATCACCTCCATG-3') (Pozniak, C et al.2004). Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa PRIMER 3 PLUS.

Para las PCR, la mezcla de los reactivos utilizada fue de 1,125µl de cada primer (10pmol/µl), 2,4 µl de la mezcla de dNTP (2.5mM), 3 µl de Buffer 10X, 0.3µl de Taq polimerasa (5U/ µl) y se completó con agua de PCR hasta un volumen final de 30 µl. El ciclo de PCR llevado a cabo para todas las parejas de cebadores fue el mismo variando únicamente la temperatura de unión de los cebadores: 95°C 5min (x1); 95°C 30seg, X°C 30seg, 72°C 1min (x35) y 72°C 5min (x1), manteniéndose a 4°C al final del ciclo. Así, para las parejas CRUSS-F/ R, AC-6F/R, PAUL-1F/1R y PALI-1F/1R la temperatura de unión de los cebadores fue de 57°C; para la pareja BE-1/2 esta temperatura fue de 61°C y para la pareja AHAS21F/26R fue de 52°C.

Los productos de ADN amplificados mediante la técnica de PCR explicada en el apartado anterior, fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.3% y visualizados mediante el transiluminador Alpha Innotech. El gel de agarosa fue teñido con Red Safe (20.000X; INTRON). Las bandas esperadas, se cortaron y purificaron utilizando el Kit de Purificación de ADN de BIOTOOLS (según las indicaciones del fabricante).

Tras purificar las bandas, éstas fueron enviadas para su secuenciación al STAB (Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia) de la Universidad de Extremadura. Las secuencias, fueron visualizadas utilizando el programa CHROMAS y fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL OMEGA. Asimismo, se estudió con sumo cuidado los cromatogramas de las secuencias obtenidas debido a que, en ocasiones, se apreció la existencia de un solapamiento de los picos de algunas bases en los codones de interés.



V. BLOQUE I: CULTIVOS LEÑOSOS



VI. Bloque I: Cultivos leñosos

VI.1. Introducción

La producción de frutas, aceite de oliva, vino y mosto en su conjunto equivale al 21,7% de la Producción de la Rama Agraria (PRA) en el año 2012 en España (MAPAMA, 2012). Esto nos da una idea de la importancia de los cultivos leñosos en la agricultura del país.

Por lo tanto, la seguridad alimentaria a nivel mundial está desafiada por múltiples factores bióticos y abióticos en los últimos tiempos. En este sentido, las malas hierbas se encuentran entre las mayores restricciones bióticas para la producción de cultivos, entre los que podemos incluir los leñosos, y la seguridad alimentaria en todo el mundo (Chauhan and Johnson, 2010; Trezzi et al., 2015). Las pérdidas en los cultivos debido a la interferencia de las malas hierbas tiene un efecto económico significativo en la rentabilidad neta de los productores (Soltani et al., 2016). Algunas malas hierbas se consideran más problemáticas y nocivas que otras debido a su presencia generalizada, interferencia pronunciada y manejo difícil.

Por tanto, las malas hierbas son la amenaza más grave para la producción de cultivos leñosos, causando pérdidas económicas de miles de millones de euros como resultado de un menor rendimiento debido a la competencia de recursos (nutrientes, humedad y luz), el control de malas hierbas y la eficiencia de las operaciones de cosecha (Chandler et al., 1984). Los herbicidas son el método principal para el manejo de malas hierbas, pero un mal uso de éstos puede provocar la aparición de resistencias y agravar la situación aún más. Estas malas hierbas resistentes representan un importante problema para el agricultor que observa cómo en sus campos crecen incontroladamente y producen una reducción en el rendimiento de sus cosechas, aun cuando éstas habían sido controladas anteriormente de forma satisfactoria. Una aplicación incorrecta de los herbicidas, y la tendencia a usar monocultivos, está agravando este problema, porque está emergiendo tanto en España como en otras regiones del mundo plantas que muestran resistencia múltiple a varios herbicidas al mismo tiempo. Esto deja al agricultor sin alternativa para ejercer un control químico de las malas hierbas.

VI.2. Malas hierbas en cultivos leñosos

Dentro de los cultivos leñosos, como por ejemplo los frutales, el olivar, la vid, etc., aparecen una gran variedad de malas hierbas que pertenecen a muchos géneros y familias. Según un estudio realizado por Ortiz et al. (2015), las malas hierbas que más preocupación causan dentro de los cultivos leñosos son fundamentalmente cuatro géneros: *Conyza*, *Cynodon*, *Cyperus* y

Lolium. Entre todas ellas, *Conyza* es la más difícil de controlar por los técnicos de explotaciones de especies leñosas.

A continuación, se destaca las características de las especies de *Conyza* por su importancia como mala hierba y por ser objeto de este bloque de la tesis.

VI.2.1. *Conyza*

Conyza spp. se encuentran entre las especies de malas hierbas más problemáticas en todo el mundo (Eubank et al., 2008; Shrestha, 2008; Shrestha et al., 2010; Baliousis, 2014; Heap, 2018). Este género de malas hierbas pertenece a la familia de las Asteráceas, es nativo de América y ha invadido una gran cantidad de países en África, Asia-Pacífico y Europa (Sansom et al., 2013^a; Trezzi et al., 2013). Hay muchas especies del género *Conyza* reconocidas como malas hierbas, pero las únicas introducidas en España como tales son *C. canadensis*, *C. bonariensis* y *C. sumatrensis* (González-Torralva et al., 2010) (Figura 18). Entre ellas, *C. canadensis* y *C. bonariensis* son las más importantes, teniendo en cuenta el impacto y los daños causados por ellas (Weaver, 2001; Wu et al., 2007; Shrestha, 2008; Khan et al., 2011). Ambas especies están estrechamente relacionadas y tienen muchas similitudes morfológicas. Sin embargo, también existen ciertas diferencias que vale la pena conocer para un manejo efectivo (Weaver, 2001; Tozzi et al., 2014^a).

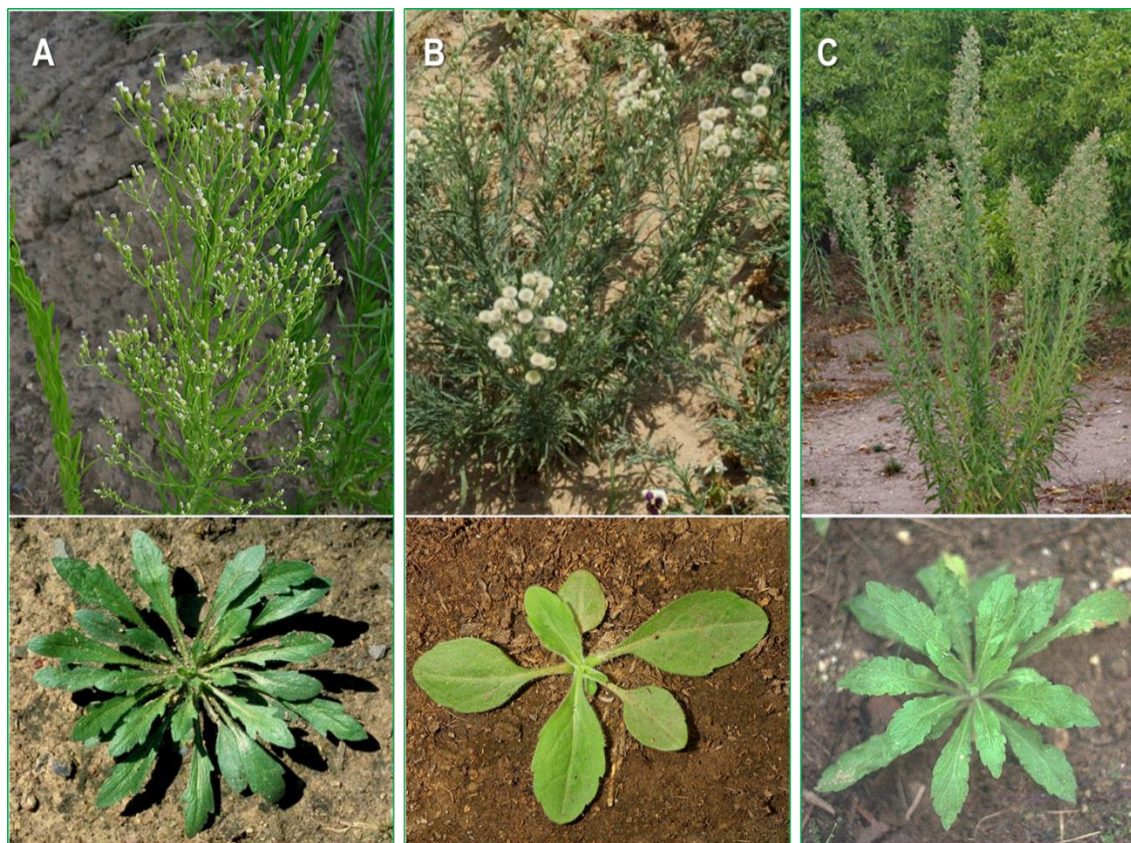


Figura 18. Especies de *Conyza* catalogadas como malas hierbas en España. Parte superior de la figura estado adulto y parte inferior estado roseta: (A) *C. canadensis*, (B) *C. bonariensis*, (C) *C. sumatrensis*.

C. bonariensis y *C. canadensis* tienen un conjunto único de características biológicas que incluyen alta producción de semillas, dispersión eficiente de semillas, capacidad de germinación bajo una amplia gama de condiciones ambientales, hábito de crecimiento vigoroso, ciclo de vida flexible y tolerancia a condiciones climáticas adversas, que las hacen malas hierbas problemáticas e invasoras (Weaver, 2001; Shrestha, 2008; Davis et al., 2009; Wu et al., 2010; Khan et al., 2013; Tozzi et al., 2014). La ecología dinámica de las semillas es una de las características clave de estas especies, que les permite reproducirse y proliferar en una amplia gama de temperatura, humedad y suelos en diferentes sistemas de cultivo (Steinmaus et al., 2000; Nandula et al., 2006; Waggoner et al., 2011; Widderick et al., 2011).

C. bonariensis es una especie presente como mala hierba importante en muchos cultivos de campo (Malatji, 2013). Su tallo es erecto y se origina en racimos desde la roseta basal. La planta entera es de color gris en las primeras etapas de crecimiento. Las hojas de *C. bonariensis* son de lineales a oblanceoladas, pelosas enteras y de aproximadamente 5 mm de ancho (Malatji, 2013). La inflorescencia de esta hierba recibe el nombre de aquenio. Las flores son de color verde grisáceo desde la parte superior y consisten únicamente en flósculos de disco de color crema (sin flores liguladas). La longitud de la semilla es de alrededor de 1 mm (Parker, 1992; Khalid, 1995; Holm et al., 1997). Por otro lado, *C. canadensis* es también una especie de planta anual con tallo similar procedente de roseta como en *C. bonariensis*. Tiene un sistema de raíz de derivación con raíces extendidas largas (Eubank et al., 2008). La altura de la planta de *C. canadensis* a veces puede alcanzar hasta 1 m. Tiene hojas dentadas de 10 cm de longitud y 1 cm de ancho, pero no grisáceas, en contraste con *C. bonariensis* (Holm et al., 1997). La superficie de la hoja es glabra y pelosa a veces con márgenes de hoja con pelo ciliado. Las flores tienen pedicelos cortos. Las flores frescas tienen flores estrechas y preservadas tienen un diámetro amplio (Baliouis, 2014). Las semillas de *C. canadensis* tienen una longitud de 1,0-1,3 mm (Holm et al., 1997; Baliouis, 2014).

Las semillas de *Conyza* spp. germinan mejor a principios de otoño o primavera; Sin embargo la germinación puede ocurrir durante todo el año (Nandula et al., 2006). Aunque se pueden encontrar flores de *Conyza* spp. a lo largo del año, la floración se ve favorecida por fotoperiodos largos (primavera-verano) (Wu et al., 2007).

La citotaxonomía de las especies de *Conyza* revela la presencia de $2n = 18$ y $2n = 54$ cromosomas en *C. canadensis* y *C. bonariensis*, respectivamente (Green, 2010). La floración en ambas especies comienza en julio y noviembre en los hemisferios sur y norte, respectivamente. *C. canadensis* produce alrededor de 200.000 semillas por planta, mientras que *C. bonariensis* produce más de 85.000 semillas por planta en inviernos (Green, 2010).

C. bonariensis y *C. canadensis* son autofecundadas y polinizadas por insectos (Tozzi et al., 2014). La producción promedio de semillas en *C. bonariensis* es de 400 semillas por cabeza (Wu et al., 2010). El número promedio de semillas producidas en una cabeza de flor de *C. canadensis* es 60-70 (Weaver, 2001). Después de 3 semanas de fertilización, las semillas de *C. canadensis* maduran.

VI.3. Herbicidas autorizados en cultivos leñosos

Como se ha explicado en el capítulo de Introducción General, hay varias formas de eliminar las malas hierbas. Los métodos más costosos y a los que se les tiene que dedicar más tiempo son los mecánicos. No en todos los cultivos se puede llevar a cabo control cultural como la rotación de cultivo, variar la fecha de siembra, etc. Por lo tanto, el método más popular y usado es el control químico.

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación establece las materias activas autorizadas para cada cultivo y cada plaga, así como la dosis máxima a utilizar por cultivo o árbol. En la Tabla 7 se recogen las materias activas herbicidas autorizadas para olivar y frutales (de hueso y de pepita) frente a todo tipo de malas hierbas.

Tabla 7. Materias activas herbicidas autorizadas en cultivos leñosos (2018) y modo de acción

Materia activa	Malas hierbas			Modo de acción
	Olivar	Frutales de hueso	Frutales de pepita	
2,4-D ácido + triclopir	X	X	X	Auxina sintética
Ácido pelargónico	-	X	X	Desconocido
Carfentrazona-etil	X	-	-	Inhibidor PPO
Clortoluron	X	-	-	Inhibidor PSII
Diflufenican	X	X	X	Inhibidor síntesis carotenoides
Flazasulfuron	X	-	-	Inhibidor ALS
Florasulam + Penoxsulam	X	-	-	Inhibidor ALS
Flumioxazina	X	-	-	Inhibidor PPO
Glifosato	X	X	X	Inhibidor EPSPS
Napropamida	-	X	X	Inhibidor división celular
Oxifluorfen	X	X	X	Inhibidor PPO
Pendimetalina	-	X	X	Inhibidor microtúbulos

Tabla elaborada a partir del Registro de Productos Fitosanitarios del MAPAMA

En el caso del olivar hay 10 materias activas autorizadas pertenecientes a 6 modos de acción diferentes. El número de materias activas que se pueden utilizar frente a malas hierbas que aparecen en frutales son 7, todas ellas con diferente modo de acción.

Es conveniente alternar con herbicidas de diferentes modos de acción para evitar la aparición de malas hierbas resistentes a herbicidas. Otra recomendación es utilizar los herbicidas con menor riesgos de desarrollar resistencias como se explica en la Figura 13.

VI.4. Casos de resistencia

Los casos de resistencias a herbicidas son una seria amenaza para el agricultor y cada vez se registran más a nivel mundial. Según Heap (2018), el número de casos de resistencia en cultivos leñosos es de 143 y abarca 47 especies de malas hierbas, 32 países y 13 sitios de acción.

Según un estudio realizado por Ortiz et al. (2015), las malas hierbas que más preocupación causan dentro de los cultivos leñosos en España pertenecen fundamentalmente cuatro géneros: *Conyza*, *Cynodon*, *Cyperus* y *Lolium*. Debido a la dispersión de las semillas de *Conyza* spp., la dispersión de la resistencia puede ser un gran problema.

La Tabla 8 recoge los casos de resistencia descritos para las malas hierbas más importantes de cada uno de los cuatro géneros que más preocupan a los técnicos de España. Se puede ver que *Conyza* spp. y *Lolium* spp. son los géneros con más casos de resistencia reportados superando los 100 cada uno. El número de casos de resistencia descritos abarcan 13 modos de acción.

Tabla 8. Casos de resistencia descritos en Heap (2018) para malas hierbas en cultivos leñosos

Mala hierba	Casos descritos	Primer caso	Modos de acción
<i>Conyza</i> spp.	100		
<i>C. bonariensis</i>	20	1987 (España)	Inhibidor ALS Inhibidor EPSPS
<i>C. canadensis</i>	64	1980 (Japón)	Inhibidor PSI Inhibidor PSII
<i>C. sumatrensis</i>	16	1980 (Taiwan)	Inhibidor ALS Inhibidor EPSPS Inhibidor PSI Inhibidor PSII Inhibidor PPO Inhibidor auxina sintética
<i>Cynodon</i> spp.	1		
<i>C. hisutus</i>	1	2008 (Argentina)	Inhibidor EPSPS
<i>Cyperus</i> spp.	18		
<i>C. esculentus</i>	1	2013 (EEUU)	Inhibidor ALS
<i>Lolium</i> spp.	122		
<i>L. multiflorum</i>	62	1987 (EEUU)	Inhibidor ACCasa Inhibidor ALS Inhibidor EPSPS Inhibidor PSI Inhibidor PSII Inhibidor glutamina Inhibidor división celular
<i>L. perenne</i>	9	1989 (EEUU)	Inhibidor ACCasa Inhibidor ALS Inhibidor EPSPS Inhibidor síntesis carotenoides Inhibidor glutamina
<i>L. rigidum</i>	48	1979 (Israel)	Inhibidor ACCasa Inhibidor ALS Inhibidor PSI Inhibidor PSII Inhibidor PPO Inhibidor síntesis lípidos Inhibidor mitosis Inhibidor división celular Inhibidor síntesis carotenoides Inhibidor microtúbulos Inhibidor DOXP

VI.5. Estructura de la investigación realizada sobre *Conyza* spp

La investigación realizada, en esta tesis, sobre especies de *Conyza* abarca varios trabajos de diferentes características. Los primeros se han desarrollado en la región de Extremadura y otros en colaboración con la Universidad de Córdoba. A continuación, se enumeran cada uno de ellos, para posteriormente desarrollarlos en sus capítulos correspondientes:

Capítulo 1. Estudio sobre poblaciones de *Conyza* spp. en Extremadura

El trabajo de investigación sobre *Conyza* spp. aquí realizado queda englobado dentro del proyecto AGROS. Sostenibilidad de las producciones hortofrutícolas en los regadíos de Extremadura (CCESAGROS) del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura. La entidad financiadora de este proyecto es el FEDER. Los estudios realizados bajo este proyecto, intentarán hacer una primera aproximación a la problemática real planteada por el sector agrícola en Extremadura.

Estos trabajos se han desarrollado en el ámbito de la Comunidad de Extremadura tanto para tener una visión de la distribución de *Conyza* spp. en campos de cultivo y zonas urbanas de Extremadura, como para ver la eficacia de los herbicidas frente a las poblaciones recolectadas.

El primer trabajo versa sobre las prospecciones realizadas en cultivos leñosos y el estudio de la eficacia de herbicidas alternativos frente a determinadas poblaciones de *Conyza* spp.. El segundo trabajo es una publicación en una revista de divulgación que trata sobre la distribución de *Conyza* por especies en zonas urbanas de la ciudad de Badajoz y se detallan datos de respuesta de esas poblaciones a la dosis recomendada de glifosato.

1.1. Distribución de *Conyza* spp. en cultivos leñosos en Extremadura y la evaluación de la eficacia de varios herbicidas frente a *Conyza* con diferentes estadios

1.2. Distribución de especies de “*Conyza*” spp. en zonas urbanas de la provincia de Badajoz.

Capítulo 2. Publicaciones de *Conyza* con factor de impacto indexadas en JCR

Los dos trabajos de este capítulo se han enviado a revistas de impacto indexadas en JCR.

El primero de ellos estudia los mecanismos de resistencia desarrollados por poblaciones de *Conyza* spp. tratadas con glifosato en el sur de España. El segundo estudia la resistencia a glifosato en poblaciones de *Conyza* spp. recogidas en las vías del tren y en los campos de cultivo colindantes.

- 1. Mechanisms of glyphosate resistance and response to alternative herbicide-based management in populations of the three *Conyza* species introduced in southern Spain**
- 2. Selection for glyphosate resistance in *Conyza* spp occurring in the railway network from the Southern Spain**

Capítulo 1. Estudio sobre poblaciones de *Conyza* spp. en Extremadura

- 1.1. Distribución de *Conyza* spp. en cultivos leñosos en Extremadura y evaluación de la eficacia de varios herbicidas frente a *Conyza* con diferentes estadios
- 1.2. Distribución de especies de “*Conyza*” spp. en zonas urbanas de la provincia de Badajoz.

Capítulo 1.1. Distribución de *Conyza* spp. en cultivos leñosos en Extremadura y evaluación de la eficacia de varios herbicidas en *Conyza* spp. a diferentes estadios de desarrollo

Este trabajo forma parte del estudio de *Conyza* spp. en Extremadura con motivo de la beca predoctoral INIA que me ha sido concedida. Es un ensayo parcial que todavía está en fase de desarrollo.

El estudio de la distribución de *Conyza* spp. en Extremadura se realizó mediante prospecciones al azar y prospecciones dirigidas en campos de cultivo leñosos situados en zonas de la región durante la época de floración de *Conyza* spp. (junio-octubre) en 2016 y 2017.

a) Prospecciones al azar

Las prospecciones al azar, durante los años 2016 y 2017, se llevaron a cabo para ver la distribución de las especies por zonas de producción olivarera en Extremadura. Debido a la gran cantidad de parcelas que se podían muestrear, se escogieron las más representativas filtrando por usos oleícolas utilizando la herramienta online SIGPAC.



Figura 19. Prospección al azar realizada en el Término Municipal de Corte de Peleas perteneciente a la comarca de Tierra de Barros

Se escogieron dos zonas de tradición olivarera en Extremadura, la comarca de Tierra de Barros y la comarca de La Serena, situadas en la provincia de Badajoz. En la Figura 20 se observan las poblaciones de *Conyza* spp. recolectadas en las dos zonas durante 2016 y 2017. En 2016, el número de poblaciones recogidas en Tierra de Barros fue 56 (TB-01-2016 a TB-56-2016), mientras que en La Serena las poblaciones ascendieron a 28 (MR-01-2016 a MR-28-2016). En

2018, se recogieron 25 poblaciones en Tierra de Barros (TB-01-2017 a TB-25-2017) y 15 en La Serena (MR-01-2017 a MR-14-2017).

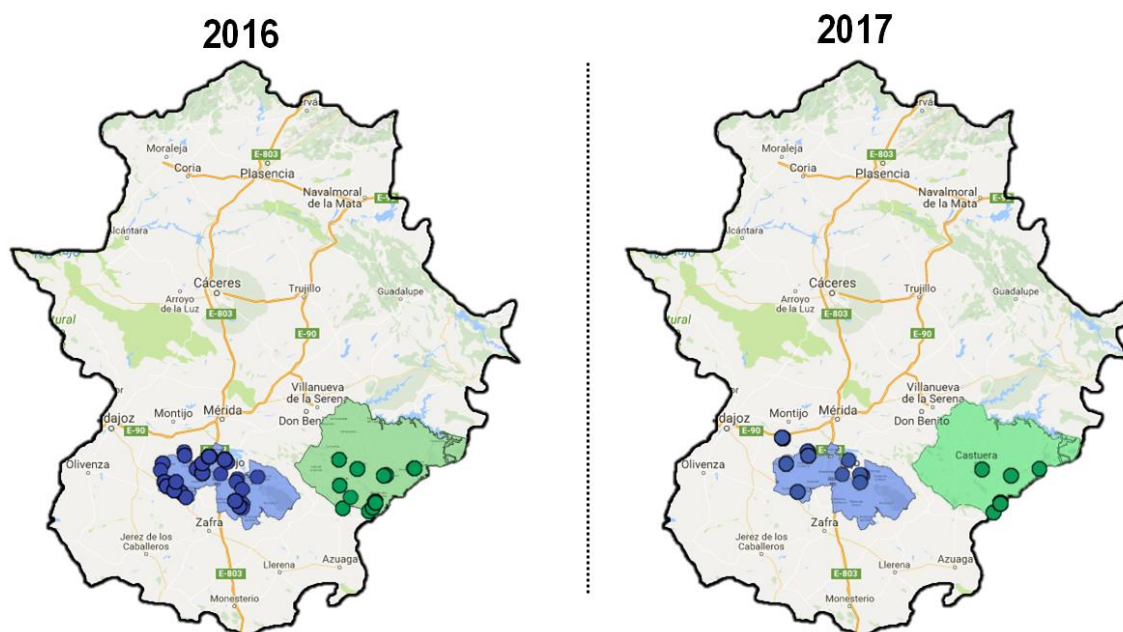


Figura 20. Prospecciones al azar realizadas en campos de olivar tradicional durante los años 2016 y 2017. El color azul corresponde a la comarca de Tierra de Barros y la verde a la comarca de La Serena, ambas en la provincia de Badajoz.

Screening

Después de realizar las prospecciones al azar, se realizó un screening de algunas de las muestras que se habían recogido para ver la posible resistencia de cada una de ellas a glifosato. La dosis de glifosato fue la recomendada por el fabricante (1080 g ia ha⁻¹) Este trabajo está sin finalizar y se completará en ensayos futuros como parte del proyecto AGROS antes mencionado.

Tabla 9. Reducción del peso fresco de la biomasa de la parte aérea en biotipos de *Conyza* spp. 21 después del tratamiento con glifosato a una dosis de 1080 g ia ha⁻¹. Datos de 2016-2017 de prospección al azar.

Población	Reducción	Población	Reducción
	parte aérea		parte aérea
	%		%
TB-3-2016	98	TB-01-2017	100
TB-5-2016	98	TB-02-2017	100
TB-6-2016	38	TB-03-2017	100
TB-7-2016	100	TB-04-2017	100
TB-8-2016	100	TB-05-2017	100
TB-9-2016	100	TB-06-2017	100
TB-10-2016	95	TB-07-2017	100
TB-52-2016	98	TB-08-2017	100
MR-07-2016	97	TB-09-2017	100
		TB-10-2017	100
		TB-11-2017	100
		TB-12-2017	100
		TB-13-2017	100

TB-14-2017 100

Como se puede ver en la Tabla 9, la mayoría de los biotipos de *Conyza* spp. ensayados fueron controlados por el glifosato a la dosis de campo. Únicamente la población TB-06-2016 redujo su peso fresco respecto al control un 38%.

b) Prospecciones dirigidas

Estas prospecciones se realizaron con el asesoramiento de técnicos del servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura y técnicos de empresas del sector. En las reuniones mantenidas con los mismos, informaron sobre campos de cultivos leñosos (frutales principalmente) en los que existían fallos en el control con herbicidas y se sospechaba casos de resistencia. El objetivo era la prospección en estos puntos y comprobar que las poblaciones recolectadas eran realmente resistentes y no se debía a un mal uso del herbicida o tratamiento a un estadio no recomendado. Al igual que en las prospecciones al azar, la recolección se llevó a cabo durante la época de floración de las semillas de *Conyza* spp. en los años 2016 y 2017.

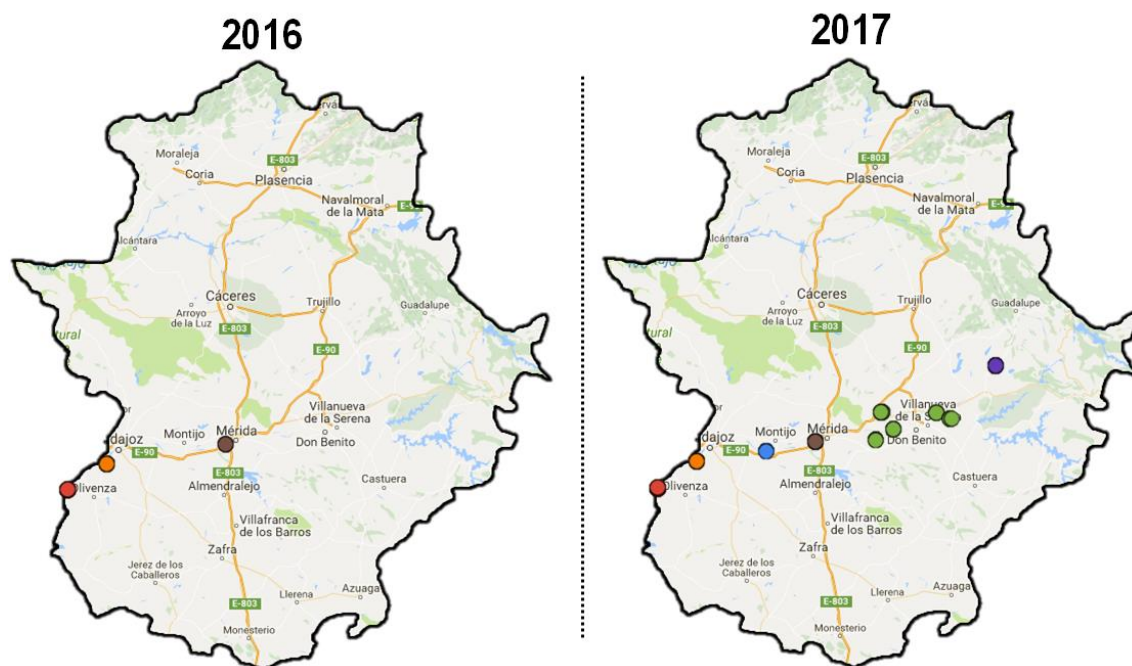


Figura 21. Prospecciones dirigidas realizadas en campos de cultivos leñosos durante los años 2016 y 2017. ● corresponde a la finca “El Freixal” en Villareal de Olivenza; ● corresponde a la finca la “La Adelantada” en Badajoz; ● corresponde a la finca la Orden en Guadajira; ● corresponde a la Cooperativa “San José” en Calamonte; ● corresponde a diferentes fincas de “Frugalia” en Medellín, Valdeterros, Santa Amalia y Valdivia; ● corresponde a la finca de “Alimentos y Confituras” en Obando.

En 2016 se realizó una prospección dirigida en tres zonas recogiendo un total de 14 muestras: 5 en Villareal de Olivenza (CNYR-07-2016 a CNYR-11-2016), 6 en Badajoz (CNYR-01-2016 a CNYR-06-2016) y 3 en Calamonte (CNYR-02-2016 a CNYR-14-2016). En el año 2017, se volvieron recolectar en las mismas zonas y se amplió el espectro añadiendo 3 zonas más. Las muestras recogidas en este año ascendieron a 43: 5 en Villareal de Olivenza (CNYR-09-2017 a

CNYR-13-2017), 8 en Badajoz (CNYR-01-2017 a CNYR-8-2017), 2 en Guadajira (LO-01-2017 a LO-02-2017), 6 en Calamonte (CNYR-14-2017 a CNYR-19-2017), 16 en fincas de “Frugalia” (TANY-01-2017 a TANY-16-2017) y 5 en Obando (OBANDO-01-2017 a OBANDO-05-2017).

Después de realizar las prospecciones dirigidas, se realizó un screening de algunas de las muestras que se habían recogido para ver la posible resistencia de cada una de ellas a glifosato. La dosis de glifosato fue la recomendada por el fabricante (1080 g ia ha⁻¹). Asimismo, se utilizaron otras muestras de estas prospecciones para realizar una evaluación de la eficacia de herbicidas alternativos frente a *Conyza* spp. con diferentes estadios.

Al igual que en el caso anterior, este trabajo está sin finalizar y se completará en ensayos futuros como parte del proyecto AGROS sobre control de *Conyza* spp. en Extremadura.

Screening

Los datos obtenidos del screening con glifosato a la dosis de campo (1080 g ia ha⁻¹) están reflejados en la Tabla 10.

Todas las poblaciones que se estudiaron fueron controladas por glifosato en la dosis ensayada, ya que, la reducción del peso fresco de la parte aérea de la planta fue muy próxima al 100%.

Tabla 10. Reducción del peso fresco de la biomasa de la parte aérea en biotipos de *Conyza* spp. 21 después del tratamiento con glifosato a una dosis de 1080 g ia ha⁻¹. Datos de 2016-2017 de prospección dirigida.

Población	Reducción parte aérea %	Población	Reducción parte aérea %
CNYR-1-2016	100	CNYR-1-2017	98
CNYR-4-2016	98	CNYR-2-2017	99
CNYR-5-2016	100	CNYR-3-2017	100
CNYR-6-2016	99	CNYR-4-2017	100
CNYR-8-2016	100	CNYR-5-2017	100
		CNYR-6-2017	98
		CNYR-7-2017	100
		CNYR-8-2017	100
		CNYR-9-2017	100
		CNYR-10-2017	100
		CNYR-11-2017	100
		CNYR-12-2017	100
		CNYR-13-2017	100
		CNYR-14-2017	98
		CNYR-15-2017	100
		CNYR-18-2017	100
		CNYR-19-2017	100

Evaluación de la eficacia de herbicidas alternativos frente a *Conyza* spp. con diferentes estadios

Este trabajo queda encuadrado dentro del proyecto AGROS financiado por Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). El objetivo de este ensayo consistió en el estudio de control alternativo de *Conyza* spp. en diferentes estadios mediante el uso de diferentes herbicidas de postemergencia.

Podemos diferenciar en este trabajo dos ensayos relacionados. En el primero se testaron los siguientes herbicidas carfentrazona-etil, carfentrazona-etil + glifosato, glifosato, flazasulfuron, flazasulfuron + glifosato, y ácido pelargónico.

En el segundo se probaron glifosato, glufosinato, pendimetalina, flazasulfuron, fluroxipir, carfentrazona-etil y carfentrazona-etil + glifosato. Los de los resultados obtenidos en la segunda parte de este ensayo se han publicado en la revista de divulgación PHYTOMA para su difusión en el sector agrario a nivel nacional y se expondrán más adelante.

En ambos ensayos, las plantas se trataron en 4 estadios diferentes: diámetro de roseta 0-5 cm, 10-15 cm y 20 cm y roseta desarrollada (con alargamiento del tallo).

Primer ensayo

Las poblaciones que se utilizaron en este ensayo se reflejan en la Tabla 11. En la Tabla 12 se observan las materias activas probadas y las dosis de las mismas.

Tabla 11. Coordenadas de las poblaciones utilizadas en el primer ensayo

Población	Coordenadas
Tany-01-2017	39.025906, -6.045408
Tany-04-2017	39.025906, -6.045408
Tany-05-2017	39.025811, -6.045211
Tany-08-2017	38.955360, -5.980128
Tany-11-2017	38.910163, -6.076672
TB-11-2017	38.841644, -6.698638

Tabla 12. Materias activas, nombres comerciales y dosis empleadas durante el tratamiento

Materia Activa	Nombre comercial	Dosis empleada
carfentrazona-etil	Spotlight PLUS (6% p/v)	0,3 l/ha
carfentrazona-etil	Spotlight PLUS (6% p/v)	0,9 l/ha
carfentrazona-etil + glifosato	Spotlight PLUS (6% p/v) + Glifae (36% p/v)	0,3l/ha + 3 l/ha
glifosato	Glifae (36% p/v)	3 l/ha
flazasulfuron	Terafit (25% p/p)	0,2 kg/ha
flazasulfuron 0,67% +glifosato	Chikara Duo	3 kg/ ha
ácido pelargónico	Belouka	10-15l/ha

Para la aplicación de las materias activas, se utilizó un pulverizador presurizado con una presión constante equipado con 4 boquillas espaciadas 0,5 m unas de otras y situadas a 0,5 metros de la superficie de las plantas. El volumen de caldo empleado fue de 200 l/ha, a presión, altura de barra y velocidad de avance constantes. Pasados 21 días desde la fecha de tratamiento (DDT), se midió el peso fresco de la parte aérea de las plantas y se expresó como porcentaje respecto al control no tratado.

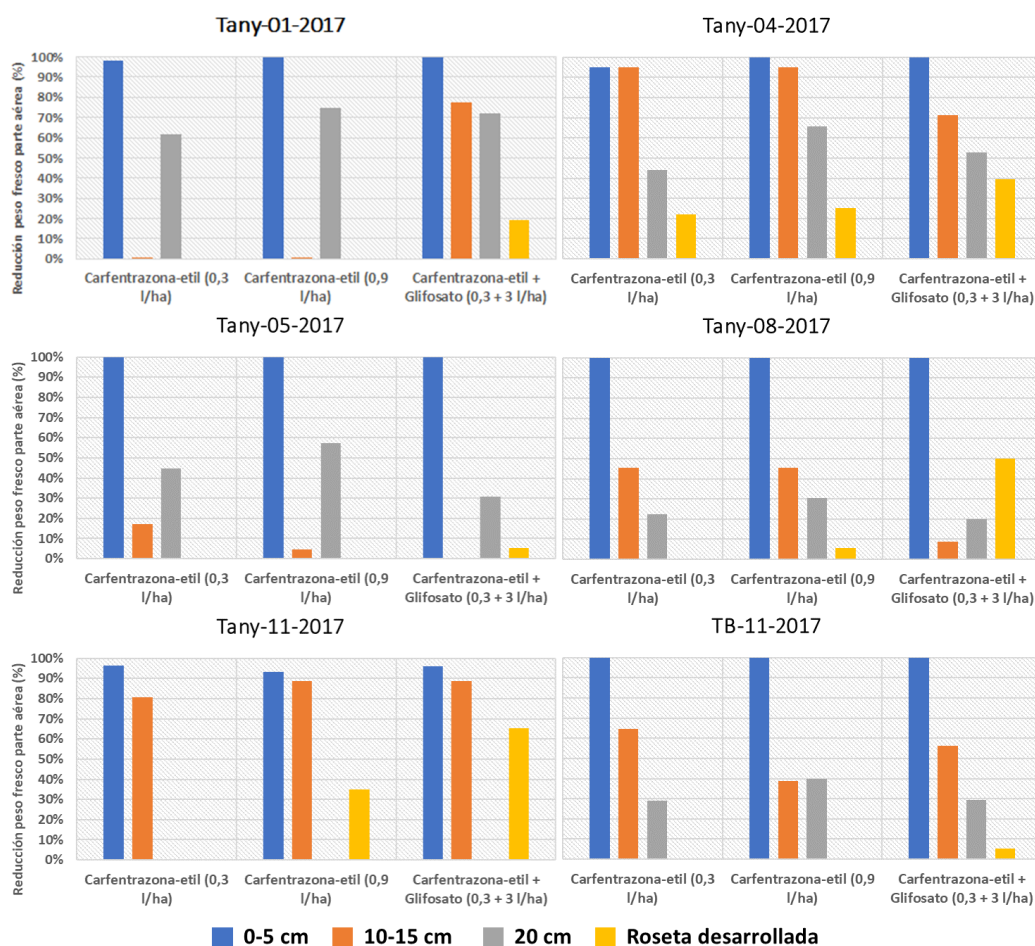


Figura 22. Reducción del peso fresco de cada población tratada con carfentrazona-etil (0,3 y 0,9 l/ha) y carfentrazona-etil+glifosato en los 4 estadios a los 21 días después del tratamiento (DDT).

Los resultados de peso fresco (% respecto al control) de cada población tratada con carfentrazona-etil (0,3 y 0,9 l/ha) y carfentrazona-etil+glifosato en los 4 estadios a los 21 días después del tratamiento (DDT) están reflejados en la Figura 22.

Cuando se utilizó carfentrazona-etil en las dos dosis utilizadas (0,3 y 0,9 l/ha), controló bien todas las poblaciones estudiadas en el estadio más pequeño (0-5 cm). También se observó que, a pesar de que esta materia activa controló algunas poblaciones con tamaño de 10-15 cm (Tany-04-2017, Tany-11-2017 y TB-11-2017), tuvo menor eficacia en el resto de las poblaciones, siendo Tany-01-2017 y Tany-05-2017 las que menos reducción de peso fresco presentaron. En el caso de Tany-08-2017 el control con ambas dosis tampoco fue bueno, aunque algo mejor que en Tany-

01-2017 y Tany-05-2017. En el caso del tercer estadio (20cm), la materia activa fue efectiva para controlar Tany-01-2017 con las dos dosis empleadas. Con Tany-04-2017 se obtuvieron peores resultados, mejorando la efectividad de carfentrazona-etil a dosis más elevadas. La reducción del peso fresco, independientemente de la dosis usada, fue bastante malo en este estadio en las poblaciones Tany-05-2017, Tany-08-2017 y TB-11-2017, destacando la población Tany-11-2017 la cual no redujo su peso fresco a ninguna de las dosis utilizadas. Para el estado de roseta desarrollada, destaca que Tany-11-2017 fuese controlada por carfentrazona-etil a su dosis más alta. Para el resto de las poblaciones para este mismo estadio la materia activa apenas controló el crecimiento. Por otro lado, cuando se utilizó carfentrazona-etil + glifosato, mejoró algo su efectividad en los dos primeros estadios de desarrollo en la mayoría de las poblaciones estudiadas, a excepción de Tany-05-2017 y Tany-08-2017. Cuando la mezcla se aplicó a un estadio de 20 cm la tónica general fue un peor control que el anterior, siendo Tany-01, 04 y 05-2017 las mejor controladas por esta mezcla. Tany-08-2017 y TB 11-2017, fueron controlaron peor que las anteriores llamando la atención de nuevo en este estadio la población Tany-11-2017, donde la mezcla tampoco controló absolutamente nada el desarrollo de la planta. Sin embargo, en esta misma población, el estadio de roseta desarrollada fue bastante controlada con la mezcla. En el resto de las poblaciones, en este estadio mayor, la eficacia del herbicida no fue bueno.

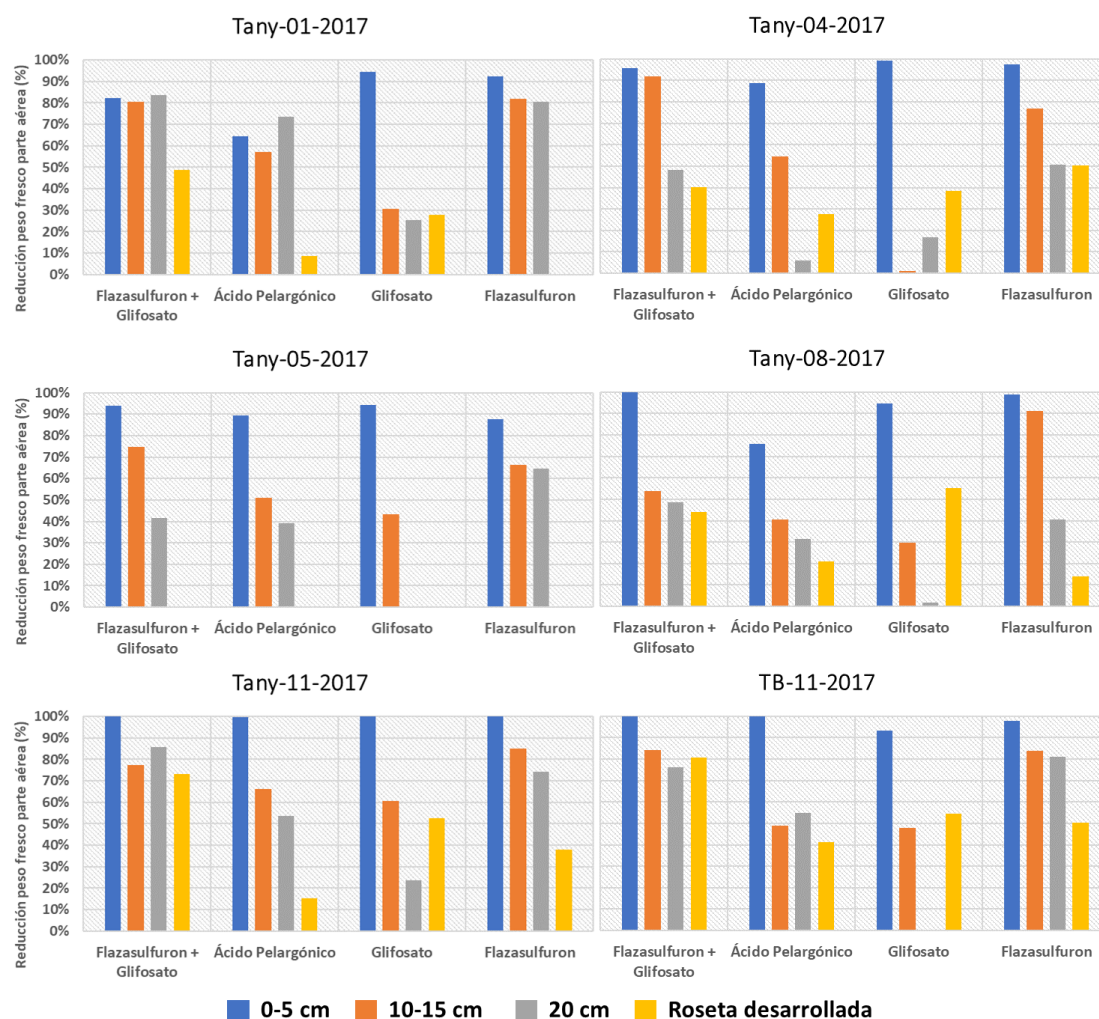


Figura 23. Reducción del peso fresco de cada población tratada con flazasulfuron+glifosato, ácido pelargónico, glifosato y flazasulfuron en los 4 estadios a los 21 días después del tratamiento (DDT).

Los resultados de la evaluación de *Conyza* spp. con diferentes estadios y tratada con glifosato, flazasulfuron, flazasulfuron + glifosato, y ácido pelargónico, se muestran en la Figura 23. En la mayoría de las poblaciones estudiadas, la mezcla de flazasulfuron + glifosato fue más efectiva que cuando sólo se utilizó flazasulfuron, siendo los dos estadios más pequeños donde los dos tratamientos fueron más efectivos. En el estadio de 20 cm el control fue bastante bueno sobre Tany-01, Tany-11-2017 y TB-11-2017. En las otras tres poblaciones su efectividad fue media, siendo peor en el estadio mayor, destacando que la mezcla fue más efectiva sobre Tany-11-2017 y TB-11-2017. Tany-05-2017 apenas presentó sensibilidad a esta materia activa ni cuando fue utilizada en mezcla con glifosato. El glifosato fue efectivo en el estadio más joven de las plantas en todas las poblaciones. En el resto de los estadios su eficacia se vio disminuida, siendo en el estadio de roseta desarrollada cuando tuvo un control medio sobre Tany-08-2017, Tany-11-2017 y TB-11-2017. Por último, el ácido pelargónico, al igual que la mayoría de las materias activas ensayadas, controló las poblaciones de *Conyza* spp. en el estadio de 0-5cm. Como ocurrió con

otras materias activas, su efectividad disminuyó a medida que el estadio de la planta tratada era mayor.

Segundo ensayo

Los de los resultados obtenidos en la segunda parte se han publicado en la revista de divulgación PHYTOMA, como puede verse a continuación

Artículo divulgación publicado

Evaluación de la eficacia de varios herbicidas en *Conyza* spp. a diferentes estadios de desarrollo

Ignacio Amaro-Blanco¹, Leonard I. Torcea², Prado Márquez¹, María Sarmiento-Giraldo¹, Meryem Khribech-Rachid¹, Yolanda Romano¹, María D. Osuna¹

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Guadajira (Badajoz)

² Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara a Banatului, "Regele Mihai I Al Romaniei" din Timisoara (Rumanía)

Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal

Evaluación de la eficacia de varios herbicidas en *Conyza* spp. a diferentes estadios de desarrollo.

Ignacio Amaro-Blanco¹, Yolanda Romano¹, Leonard I. Torcea², Prado Marquez¹, María Sarmiento-Giraldo¹, Meryem Khribech-Rachid¹, María D. Osuna¹

¹ Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Guadajira (Badajoz)

² Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara a Banatului "Regele Mihai I Al Romaniei" din Timisoara (Rumanía)

Resumen

Conyza spp. es una mala hierba que aparece en gran cantidad de cultivos, especialmente en cultivos leñosos. Este género representa un serio problema debido a la gran capacidad de dispersión de sus semillas principalmente por el viento.

Uno de los métodos más utilizados para el control de esta mala hierba es el uso de herbicidas. Un uso adecuado de los herbicidas disponibles en el mercado es primordial para evitar la aparición de resistencias. En este trabajo se muestra la efectividad de varios herbicidas utilizados en diferentes estadios de crecimientos en poblaciones de *Conyza* spp. procedentes de cultivos leñosos de la zona de Extremadura.

Los resultados obtenidos confirman que la mayoría de los herbicidas utilizados presentan mayor eficacia cuanto menor es el estadio de la planta. En general, de todos ellos, la pendimentalina no mostró gran efectividad y el glufosinato fue el que más redujo el peso fresco de las plantas de *Conyza* spp. respecto al control. Asimismo, la tónica general fue que cuanto menor es el estadio de desarrollo en que se trata la planta mayor es la eficiencia del herbicida sobre la misma.

Introducción

Conyza spp. es una mala hierba herbácea anual de verano o invierno. Puede crecer en cultivos leñosos como olivos, frutales o viñas, pero también es frecuente su presencia en campos abandonados, cunetas de carretera o las vías por donde pasa el tren (Weaver, 2001). Cada planta de *Conyza* spp. produce una gran cantidad de semillas, los aquenios, (con más de 200.000 semillas por planta) que son fácilmente desplazados por el viento (Dauer et al., 2006).

Debido a la rápida dispersión de sus semillas y a su biología reproductiva, *Conyza* spp. puede llegar a ser un gran problema pudiendo reducir el rendimiento del cultivo en 28-68% (Bajwa et al., 2016).

Este género ha desarrollado resistencia a herbicidas con diferentes modos de acción que según la clasificación dada por el comité de acción de resistencia a herbicidas (HRAC) son: inhibidores de la fotosíntesis en el fotosistema I (Fuerst et al., 1985), inhibidores de la fotosíntesis en el fotosistema II (Lehoczki et al., 1984), inhibidores de la EPSP sintetasa (VanGessel, 2001) e inhibidores de la ALS (Trainer et al., 2005).

Con respecto a los herbicidas empleados contra *Conyza* spp., el glifosato (inhibidor de la EPSPs) es uno de los más utilizados desde hace años en multitud de cultivos. Es un herbicida de amplio espectro en postemergencia utilizándose contra malas hierbas anuales o perennes de hoja ancha en cultivos leñosos (tanto en frutales como en olivar). Por otro lado, este herbicida también se emplea en los sistemas de producción de cultivos en hileras frecuentemente para controlar la vegetación antes de sembrar. Además, el glifosato se utiliza para controlar las malas hierbas en zonas no agrícolas como carreteras, vías férreas y áreas recreativas (González-Torralva et al. 2012, Urbano et al. 2007, Powles 2008).

Malas prácticas agrícolas como el uso repetido de glifosato, el tratamiento con herbicidas en un estadio de la planta inadecuado o el uso de una dosis no recomendada, puede fomentar la aparición de resistencias. En este sentido, *Conyza* spp. está entre las malas hierbas con más casos de resistencia a glifosato descritos (Heap, 2019).

Extremadura es una de las comunidades autónomas con mayor tradición agrícola dentro de España. Los cultivos leñosos son parte importante de la producción dentro de la comunidad. Así, el olivar extremeño ocupó 272 mil hectáreas y produjo una recolección de más de 300 mil toneladas en 2015, siendo la tercera comunidad de España con más extensión de este cultivo (MAPAMA, 2016). Dentro del sector frutícola, la producción alcanzada en 2017 superó los 270 mil toneladas, teniendo como máximo exponente la producción de ciruela que representa el 63% a nivel nacional (ieex, 2017).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en ensayos realizados en invernadero. Se utilizaron dos especies de *Conyza* presentes en Extremadura (*C. bonariensis* y *C. sumatrensis*), tratadas con herbicidas autorizados para esta mala hierba en cultivos leñosos, a diferentes estadios de su desarrollo.

Material y Métodos

Prospección, material vegetal y condiciones de crecimiento

La prospección se realizó en septiembre de 2017 en fincas situadas en el sur de Extremadura. De este modo se llevó a cabo un muestreo de poblaciones de *Conyza* spp. en explotaciones de cultivos leñosos, especialmente en campos de cultivo frutícolas (ciruelos, melocotoneros y nectarinas principalmente) y olivar.

Una vez recogidas las semillas, se almacenaron en sobres de papel y se etiquetaron con datos referentes a la fecha de recogida, coordenadas geográficas y el cultivo donde se encontraban. Cuando las muestras estuvieron libres de humedad, se conservaron en refrigeración hasta su utilización para posteriores ensayos.

Las semillas de las poblaciones recolectadas se pusieron a germinar en macetas con una mezcla de turba/vermiculita en proporción 3:1 en invernadero. Cuando las plántulas alcanzaron un tamaño de 2-4 hojas verdaderas se trasplantaron a macetas individuales de 7x8cm. El invernadero se programó con un sistema de climatización para no superar temperaturas de 30 °C ni descender de 15 °C y mantener una iluminación artificial de 16/14 h de luz y 8/10 h de oscuridad. Las plantas fueron regadas hasta la capacidad de campo y no se utilizó ningún fertilizante.

Tratamientos realizados

Para los ensayos llevados a cabo se utilizaron 5 poblaciones de las prospectadas. La aplicación de los herbicidas se realizó sobre plantas con cuatro estadios de desarrollo diferentes en base a su diámetro: a) 2-4 cm, b) 6-8 cm, c) 8-10 cm, y d) roseta desarrollada (con alargamiento del tallo).

Los tratamientos se realizaron utilizando varios herbicidas a la dosis recomendada por el fabricante para ver la efectividad de cada uno de ellos en los estadios seleccionados. Los herbicidas utilizados y la dosis empleada para cada uno de ellos se especifican en la **Tabla 13**. El experimento se realizó con 5 repeticiones (1 planta por maceta) aplicando las materias activas mediante una máquina de tratamiento diseñada específicamente para este fin. La pulverización se hizo a presión y velocidad de avance constante por medio de 4 boquillas espaciadas 0,5 m unas de otras y situadas a 0,5 metros de la superficie de las plantas. El volumen de caldo empleado fue de 200 l/ha.

Tabla 13. Herbicidas y dosis empleadas durante el tratamiento

Materia Activa	Nombre comercial	Dosis empleada
Glifosato	Glifae (36% p/v)	3 l/ha
Glufosinato	Finale (15% p/v)	2,4 l/ha
Pendimentalina	Stomp Aqua (45,5% p/v)	3 l/ha
Flazasulfuron	Terafit (25% p/p)	0,2 kg/ha
Fluroxipir	Starane-20 (20% p/v)	1,5 l/ha
Carfentrazona-etil	Spotlight PLUS (6% p/v)	0,3 l/ha
Carfentrazona-etil + glifosato	Spotlight PLUS (6% p/v) + Glifae (36% p/v)	3 l/ha

Pasados 21 días desde la fecha de tratamiento (DDT), se midió el peso fresco de la parte aérea de las plantas tratadas expresándose como porcentaje respecto al control no tratado.

Resultados y discusión

La reducción de peso fresco de cada población en cada estadio y para cada herbicida se muestra en la Figura 24.

La efectividad del glifosato fue, en general, alta cuando el tamaño de la planta no era demasiado grande (roseta de 2-4 cm de diámetro). Con un tamaño de planta mayor, la eficacia del herbicida se redujo, siendo muy acusada en determinadas poblaciones (Tany-13). Saavedra et al. (2013) consiguió efectos similares en el control de *Conyza* spp. y dicotiledóneas en olivar aplicando el tratamiento con un diámetro de roseta de 2-5 cm. Si bien, utilizó el glifosato mezclado con amitrol para obtener un buen control.

El tratamiento de las plantas con glufosinato pareció controlar el crecimiento de las mismas a todos los estadios estudiados. Únicamente en el tratamiento de la población Tany-13 en el estadio de roseta desarrollada no fue efectivo. Saavedra et al. (2012b) realizó un ensayo control de *Conyza* spp. en postemergencia tardía con glufosinato evaluando la eficacia a los 7, 14 y 28 días después del tratamiento. Los resultados obtenidos por este autor fueron más deficientes que los obtenidos en este trabajo. Esto podría ser debido al mayor tamaño de *Conyza* spp. utilizado en su ensayo.

Todas las poblaciones de *Conyza* spp. estudiadas mostraron un comportamiento similar cuando se trataron con pendimetalina, viéndose una alta sensibilidad a ella sin importar el tamaño de la planta.

Por normal general, con flazasulfuron y fluroxipir el peso fresco de las plantas respecto al control fue alto cuando el tamaño de las mismas no fue demasiado grande (hasta un tamaño de roseta de 6-8 cm). Con diámetro de la planta superior, la efectividad del herbicida fue disminuyendo alcanzándose valores relativamente altos de peso fresco. Estos datos fueron similares a los obtenidos por Saavedra et al. (2012a) el cual realizó un experimento en campo para ver control de *Conyza* spp. con herbicidas aplicados en las líneas de goteo en el olivar a dos estadios diferentes (2-3 cm y 8-10 cm de diámetro). Este autor utilizó la mezcla de Flazasulfurón+MCPA, no consiguiendo resultados notablemente mejores cuando el tratamiento se realizó con un diámetro de roseta de 8-10 cm.

Por último, decir que la mezcla de carfentrazona-etil + glifosato consiguió reducir el peso fresco de todas las poblaciones de *Conyza* spp. en casi todos los estadios ensayados. La acción del carfentrazona-etil consiguió efectos similares a los de la mezcla para las mismas poblaciones.

Conclusiones

El herbicida que mejor resultado mostró fue el glufosinato, controlando todas las poblaciones a todos los tamaños ensayados. Sin embargo, el glufosinato actualmente no está

autorizado por el registro de productos fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (MAPAMA, 2018).

El segundo tratamiento más efectivo para la lucha contra *Conyza* spp. fue la mezcla de carfentrazona-etil + glifosato con valores muy similares a los del carfentrazona-etil. Al encontrar en ambos resultados similares, se recomendaría el uso de este herbicida sin mezcla, ya que sería menos nocivo.

De forma general para todos los herbicidas ensayados, a mayor tamaño de la planta, menos efectividad del herbicida. De este modo, si tras la aplicación no se consigue reducir el peso fresco de la mala hierba de manera sustancial, ésta podría rebrotar, llegando incluso a producir semillas y dispersarse. Si esto tiene lugar en poblaciones resistentes, se podría favorecer la propagación de la resistencia hacia lugares alejados de donde se originó.

Por lo tanto, se puede concluir que el tamaño en el que se trata *Conyza* spp. es tan importante como el herbicida y la dosis utilizada en el control químico frente a ella.

En cualquier caso, se recomienda, cuando sea posible, el uso de técnicas alternativas para evitar el incremento de biotipos resistentes en la región.

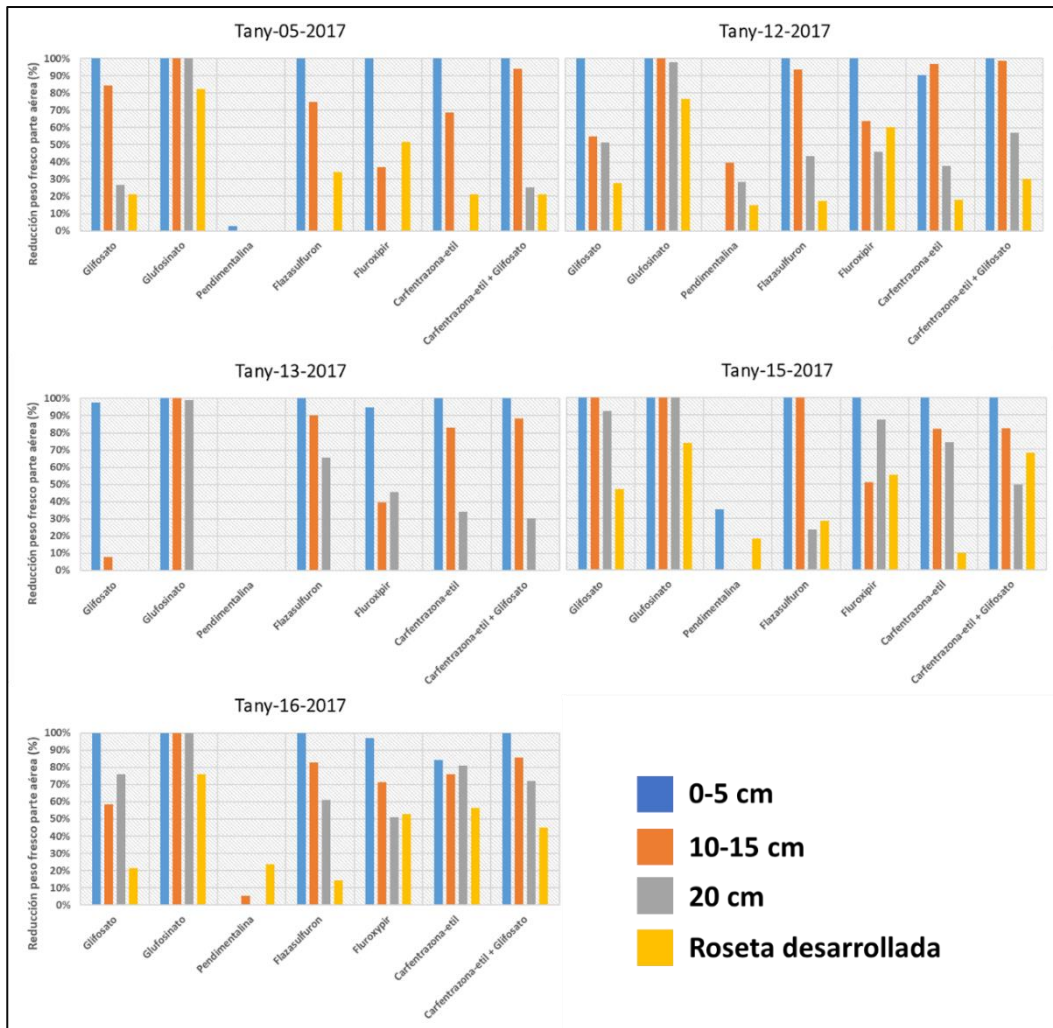


Figura 24. Reducción del peso fresco de cada población para cada uno de los herbicidas ensayados en cada uno de los estadios a los 21 días después del tratamiento (DDT)

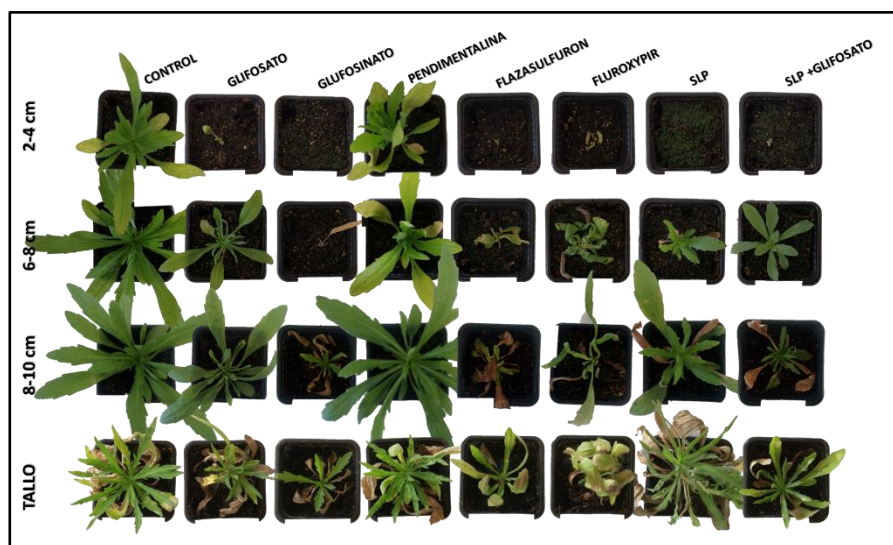


Figura 25. Efecto visual de los herbicidas en cada estadio para la población Tany-13 a los 21 días después del tratamiento (DDT)

Agradecimientos

Este trabajo ha sido apoyado por la ayuda a grupos de investigación de la Junta de Extremadura GR15112 y por el proyecto AGROS (CCESAGROS01), fondos FEDER. Ignacio Amaro Blanco ha sido financiado por la beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI-INIA) (Resolución de 18 de marzo de 2015, BOE N° 95, martes 21 de abril de 2015, 4318) del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Leonard I. Torcea fue financiado con una estancia Erasmus+.

Referencias bibliográficas

Bajwa, A.A., S. Sadia, H.H. Ali, and K. Jabran. 2016. Biology and management of two important *Conyza* weeds : a global review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(24): 24694–24710. doi: 10.1007/s11356-016-7794-7.

Dauer, J.T., D.A. Mortensen, and R. Humston. 2006. Controlled experiments to predict horseweed (*Conyza canadensis*) dispersal distances. *Weed Sci.* 54(3): 484–489.

Fuerst, E.P., H.Y. Nakatani, A.D. Dodge, D. Penner, and C.J. Arntzen. 1985. Paraquat resistance in *Conyza*. *Plant Physiol.* 77(4): 984–989.

González-Torralva, F., A.M. Rojano-Delgado, M.D. Luque de Castro, N. Mülleder, and R. De Prado. 2012. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *J. Plant Physiol.* 169(17): 1673–1679. doi: 10.1016/j.jplph.2012.06.014.

Heap, I. 2019. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Tuesday, January 30, 2018. Available www.weedscience.org. www.weedscience.org (accessed 15 January 2018).

ieex. 2017. ieex. <https://ciudadano.gobex.es/web/ieex/>.

Lehoczki, E., G. Laskay, E. Pölös, and J. Mikulás. 1984. Resistance to triazine herbicides in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci.* 32(5): 669–674.

MAPAMA. 2016. Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente (Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries, Food and Environment).

MAPAMA. 2018. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Powles, S. 2008. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Manag. Sci.* 64: 360–365. doi: 10.1002/ps.

Saavedra, M.S., J.D.P. Melgares, D.P. Mohedano, J.C.H. Moya, and J.J.H. Moya. 2012a. Control de “*Conyza*” spp. con herbicidas aplicados en las líneas de goteo en el olivar. *Vida Rural* (351): 32–36.

Saavedra, M., J.D. Pérez-Melgares, J. Hidalgo, J.C. Hidalgo, D. Pérez-Mohedano,

and V.J. Vega. 2012b. Control de *Conyza* spp. en postemergencia tardía. Córdoba.

Saavedra, M., V. Vega, D. Pérez-Mohedano, J.C. Hidalgo, C. Alcántara, and J. Hidalgo. 2013. Evaluación de herbicidas para el control de *Conyza* spp. y dicotiledóneas en olivar: Cambio de estrategia. Córdoba.

Trainer, G.D., M.M. Loux, S.K. Harrison, and E. Regnier. 2005. Response of horseweed biotypes to foliar applications of cloransulam-methyl and glyphosate. *Weed Technol.* 19(2): 231–236.

Urbano, J.M., A. Borrego, V. Torres, J.M. Leon, C. Jimenez, G. Dinelli, and J. Barnes. 2007. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technol.* 21: 396–401. doi: 10.1614/WT-06-096.1.

VanGessel, M.J. 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Sci.* 49(6): 703–705. doi: 10.1614/0043-1745(2001)049[0703:rprhfd]2.0.co;2.

Weaver, S.E. 2001. The biology of Canadian weeds . 115 . *Conyza canadensis*. *Can. J. Plant Sci.* 0: 867–875.

Artículo de divulgación publicado

Capítulo 1.2. Distribución de especies de “*Conyza*” spp. en zonas urbanas de la provincia de Badajoz

I. Amaro-Blanco¹, Y. Romano¹, L. Torcea², M.D. Osuna¹

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Guadajira (Badajoz)

² Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara a Banatului, “Regele Mihai I Al Romaniei” din Timisoara (Rumanía)

Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura, ISSN 0211-2728, N°. 406, 2017, págs. 373-375

Distribución de especies de “*Conyza*” spp. en zonas urbanas de la provincia de Badajoz

Ignacio Amaro-Blanco¹, Yolanda Romano¹, Leonard I. Torcea², María D. Osuna¹

¹ Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX).
Guadajira (Badajoz)

² Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara a Banatului “Regele Mihai I Al Romaniei” din Timisoara
(Rumanía)

Resumen

Conyza spp. es una mala hierba de hoja ancha que puede aparecer tanto en los cultivos como en las zonas urbanas: jardines, medianas de calzadas, parques, etc. Debido a la gran dispersión de sus semillas, la colonización de esta planta por la ciudad puede ser muy rápida. El uso del glifosato en el pasado fue habitual, por lo que la resistencia de *Conyza* spp. a este herbicida puede aparecer también en zonas de tránsito público.

En este trabajo se muestran los primeros resultados de la prospección por zonas urbanas de la provincia de Badajoz. Después de la prospección se realizó un ensayo para ver la respuesta de estas poblaciones a la dosis de campo de glifosato. Por último, se llevó a cabo su caracterización usando marcadores moleculares para ver la distribución por especies en la ciudad. Los resultados mostraron que la dosis comercial de glifosato controlaba un alto porcentaje las poblaciones recogidas y que la especie predominante en las zonas urbanas es *Conyza bonariensis* frente a *Conyza canadensis* y *Conyza sumatrensis*.

Introducción

El género *Conyza* pertenece a la familia de las asteráceas que compete con cultivos tales como el olivo y los frutales. *Conyza* spp. abarca un conjunto de especies arvenses (*Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* y *Conyza sumatrensis*) que son cada vez más problemáticas en lugares donde no se puede recurrir al laboreo, por lo que, la práctica del control químico es habitual y recurrente. Es por ello que es un problema a nivel mundial (Davis and Johnson 2008).

Además de la invasión de los cultivos y ser un gran problema para los agricultores, dentro de los parques y áreas urbanas también suelen crecer este tipo de malas hierbas y se tiene menos alternativas de lucha contra ellas, ya que, el uso de herbicidas en estas zonas está restringido debido a que son usualmente frecuentadas por el público en general. La normativa referente al uso de herbicidas dentro de uso urbano suele ser más restrictiva.

En este sentido, el glifosato solía ser el herbicida que más se empleaba porque es una materia activa con poca tendencia a generar resistencia (Heap 2017). Esta materia activa ha sido para controlar malas hierbas incluso fuera de zonas de agricultura como por ejemplo cunetas, jardines, medianas, etc. (Urbano et al. 2007; González-Torralva et al. 2012).

El glifosato es un herbicida de amplio espectro y no selectivo con la ventaja de baja persistencia en el suelo y baja toxicidad a los mamíferos (Atkinson 1985; Malik, 1989; Powles, 2008). Este herbicida mata las plantas interfiriendo con la síntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano. Lo hace inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS).

Por todo ello, el objetivo del trabajo fue realizar una prospección por zonas urbanas para ver las especies de *Coryza* que pueden encontrarse, si éstas tenían resistencia a la dosis comercial de glifosato cuando se tratan a un estadio adecuado y detectar molecularmente a qué especie pertenecían los ejemplares recolectados.

Material y métodos

Prospección, material vegetal y condiciones de crecimiento

En primer lugar, se realizó una prospección de poblaciones de *Coryza* spp. por zonas urbanas de la ciudad Badajoz incluyendo parques, jardines, solares, medianas de calzadas, etc. durante los meses de septiembre y octubre de 2016. Las zonas muestreadas correspondieron a zonas representativas de la ciudad espaciadas unas de otras.

Las semillas de todas estas poblaciones se pusieron a germinar para posteriormente trasplantar las plántulas cuando tenían un estadio de 2-4 hojas verdaderas a macetas de 7x8 cm. Para dicho trasplante se utilizó una mezcla de turba-vermiculita (proporción 3:1).

Tratamiento

La aplicación del herbicida se realizó cuando las plantas tuvieron entre 6-8 hojas verdaderas. La dosis utilizada fue 1080 g i.a./ha que correspondiente a 3 l/ha de producto comercial (Glifae, glifosato 36% p/v) en un experimento con 5 repeticiones. Todas las plantas del ensayo tenían un estado fenológico y un tamaño similar con el objetivo de descartar cualquier duda debido al mayor desarrollo de la planta. Para la aplicación, se utilizó un pulverizador presurizado con una presión constante equipado con 4 boquillas espaciadas 0,5 m unas de otras y situadas a 0,5 metros de la superficie de las plantas. El volumen de caldo empleado fue de 200 l/ha, a presión, altura de barra y velocidad de avance constantes.

Las plantas se conservaron en un invernadero de CICYTEX-La Orden equipado con un sistema de climatización programado para no superar temperaturas de 30 °C ni descender de 15 °C, e iluminación artificial para mantener 16/14 h de luz y 8/10 h de oscuridad.

Los parámetros evaluados fueron de supervivencia y peso fresco al final del ensayo a los 21 días después del tratamiento (21DDT).

DetECCIÓN MOLECULAR DE ESPECIES

Se trituraron aproximadamente 100 mg de tejido vegetal hasta que se consiguió un polvo fino. El ADN se extrajo usando el kit de extracción de ADN para plantas Speedtools (BIOTOOLS, Madrid, Spain). En todos los casos, el ADN se cuantificó usando un NANODROP-1000 (Thermo-Scientific), diluyendo a una concentración final de $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ para ser utilizada en la PCR. Un total de 8 cebadores ISSR del set #9 del Laboratorio Biotecnológico de la Universidad de British Columbia (Vancouver, Canadá) fueron escogidos para la amplificación del ADN. La amplificación del ADN se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía $1 \mu\text{l}$ ($10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) de ADN; $2,5 \mu\text{l}$ de buffer 10X (con 15 mM MgCl_2); $2 \mu\text{l}$ ($2,5 \text{ mM}$) de una mezcla de deoxynucleotide triphosphate; $1 \mu\text{l}$ ($1 \mu\text{M}$) del cebador y $0,2 \mu\text{l}$ ($5 \text{ U}/\mu\text{l}$) de Taq ADN polymerase (BIOTOOLS) por $25 \mu\text{l}$ de la mezcla de reacción. Para la PCR se utilizó un termociclador Bio-Rad programado para 38 ciclos tal que: 1 ciclo de 7 minutos a 94°C , 38 ciclos de 30 segundos a 94°C , 30 segundos a 52°C y 1 minuto a 72°C y finalmente 1 ciclo de 5 minutos a 72°C . El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 1,3% añadiéndole previamente intrón. Una vez realizado el gel, se realizó una fotografía bajo luz ultravioleta (transiluminador ALPHA-INNOTECH). El tamaño molecular de los fragmentos se estimó a partir de un marcador de 100 a 2000 pares de bases (Fisher; rango de 100 a 2000).

A partir de las fotos de los geles se creó una matriz de presencia/ausencia de bandas moleculares y se elaboró un árbol de separación de especies a partir de dicha matriz utilizando el programa NTSYSpc 2.2.

Resultados y discusión

Prospección.

La recolección de *Conyza* spp. se realizó por zonas la ciudad de Badajoz que incluyeron parques, medianas de calzadas, paseos, vallas que delimitaban recintos, etc. Tanto en la **¡Error!** **La autoreferencia al marcador no es válida.**, como en la

Tabla 14 se muestran los distintos lugares por las que realizó la prospección.

Tabla 14. Zona y lugar de las muestras de *Conyza spp.*

Zona	Lugar	Muestras
Zona 1	Universidad	ZU-4 a ZU-7
Zona 2	Urb. Guadiana	ZU-8 a ZU-11, ZU-33 a ZU-34, ZU-42 a ZU-46
Zona 3	Valdepasillas	ZU-12 a ZU-15
Zona 4	Urb. Ciudad Jardín	ZU-35 a ZU-39
Zona 5	Parque Castelar	ZU-27 a ZU-30
Zona 6	Parque Alcazaba	ZU-31 a ZU-32
Zona 7	Parques Centro Ciudad	ZU-16 a ZU-26
Zona 8	Urb. Las Vaguadas	ZU-40 a ZU-41



Figura 26. Mapa de recolección de las muestras de *Conyza spp.*

De la prospección que se llevó a cabo, se recolectaron 46 muestras de *Conyza spp.* por la provincia de Badajoz. 3 de ellas (ZU-1, ZU2 y ZU-3) en el TM de Guadajira. Todas las demás se recogieron en zonas urbanas de la ciudad de Badajoz. La recogida de muestras dentro de Badajoz se desarrolló de la siguiente manera: cuatro de ellas en la zona 1 correspondiente a la zona universitaria y el hospital universitario Infanta Cristina de Badajoz, once en la zona residencial Urbanización Guadiana situada en el margen izquierdo de la ciudad, cuatro en el barrio de valdepasillas situado ya en el margen derecho, cinco en la urbanización ciudad jardín, cuatro en el parque de Castelar, 3 en la Alcazaba, once en los parques del centro histórico de la ciudad y dos en una urbanización a las afueras de la ciudad (Las Vaguadas).

Se puede observar que la mayor cantidad de poblaciones recogidas son en las zonas cercanas al río como indica Weaver (2001), que observó que aproximadamente el 80% de las semillas que tienen viabilidad germinativa se encuentran en ríos o canales.



Figura 27. Zonas Urbanas de Badajoz donde se realizó la prospección de *Conyza* spp.

Tratamiento

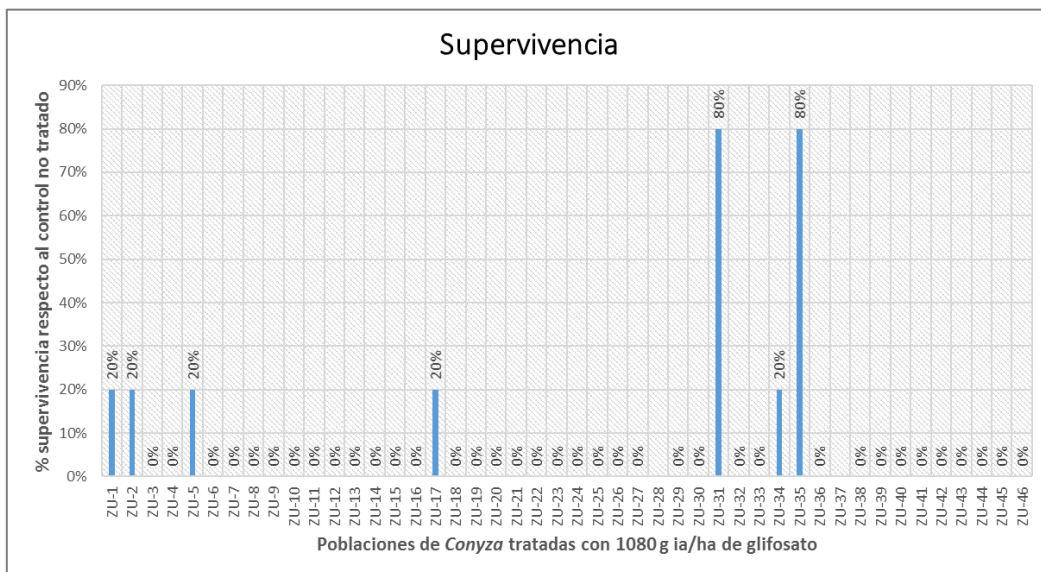


Figura 28. Supervivencia a los 21 DDT respecto al control no tratado de poblaciones de *Conyza* spp. recolectadas en zonas urbanas y tratadas con 1080 g i.a./ha de glifosato.

De las muestras recolectadas, todas presentaron una baja supervivencia respecto al control salvo ZU-31 y ZU-35 cuyo porcentaje de supervivencia fue del 80% (Figura 28). Éstas poblaciones sobrevivieron al tratamiento, pero su crecimiento era mucho más lento respecto al control sin tratar, por lo que no podrían sobrevivir en condiciones reales, ya que al parar su crecimiento durante el

periodo en el que deberían hacerlo, no tendrían las condiciones de temperatura y luz suficientes como para alcanzar la floración y dispersar sus semillas siendo éste fenómeno la forma exclusiva de propagación de la especie (Khan et al. 2013). Por lo tanto, no supondría un problema si se tratara en estadios similares al estudiado en este ensayo.

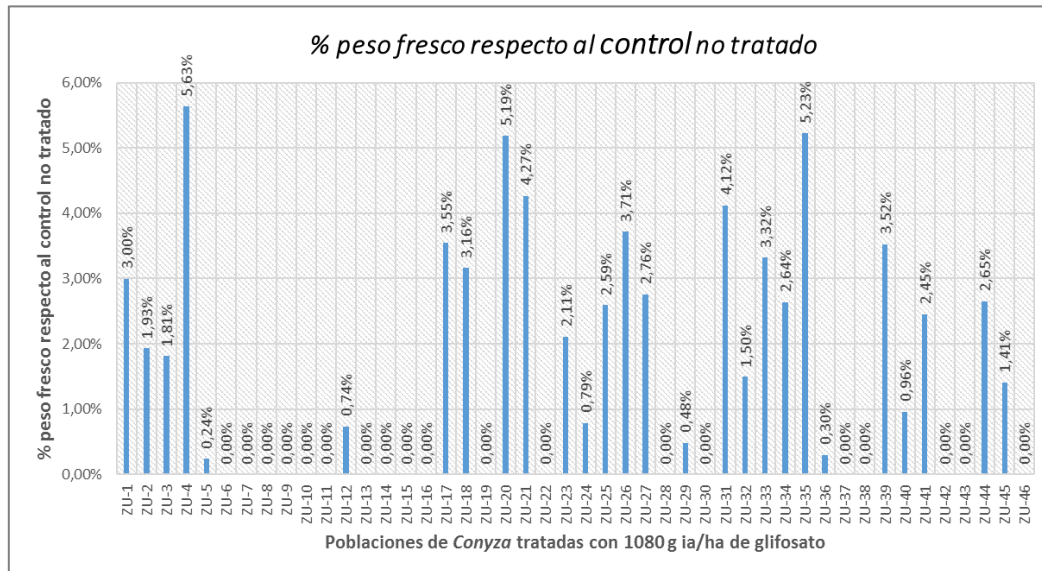


Figura 29. % peso fresco a los 21 DDT respecto al control no tratado de poblaciones de *Conyza* spp. recolectadas en zonas urbanas y tratadas con 1080 g i.a./ha de glifosato.

En la Figura 29 se observa el % de peso fresco respecto al control no tratado de las poblaciones de recogidas tratadas con glifosato a la dosis de campo (1080 g i.a./ha). Se puede observar una mayor variabilidad respecto al parámetro anteriormente estudiado.

Se vio, en general, que este parámetro fue bajo. Se observó que la dosis de glifosato recomendada por el fabricante controló el crecimiento de las poblaciones de *Conyza* de manera efectiva. El tamaño en el que se trata esta mala hierba es vital para su control y no siempre este es el idóneo cuando se realizan los tratamientos por parte de los responsables para realizar el tratamiento dentro de la ciudad.

Respecto a la caracterización molecular de las 46 muestras de *Conyza* spp.) recolectadas en áreas urbanas de la provincia de Badajoz (datos no mostrados), cabe resaltar que la especie más abundante es *Conyza bonariensis* con 34 biotipos identificados, la segunda es *Conyza sumatrensis* con 7 biotipos encontrados y, por último, *Conyza canadensis* con 5.

Se puede decir que es un método rápido para identificar la especie de *Conyza* cuando está el tamaño de la plántula todavía no está muy avanzado. Esto es diferencial a la hora de actuar, ya que, si la mala hierba alcanza el estado de roseta, la eficacia del herbicida se reduce drásticamente. Por lo tanto, hay que destacar, una vez más, la importancia del momento en que

se trata la mala hierba, siendo primordial hacerlo cuando la plántula tenga entre 6-8 hojas verdaderas máximo como se ha estudiado en este ensayo.

Se puede observar que no hay diferencias moleculares a partir del dendograma elaborado entre las poblaciones sensibles y resistentes, ya que no se separan dentro de él.

Otros trabajos

Además del trabajo aquí expuesto, en el grupo de malas hierbas del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), se están desarrollando otros proyectos que versan sobre esta mala hierba de hoja ancha.

Uno de los ensayos que se está realizando es una prospección de *Conyza* spp. por las principales zonas olivareras de Extremadura. La recolección se está focalizando en zonas de Olivar tradicional.

Asimismo, se está estudiando la posible resistencia de *Conyza* presente en cultivos leñosos tales como frutales de hueso (melocotón, nectarinos, ciruelos). El motivo del muestreo en esta zona es debido al fallo en el control de esta mala hierba al que hacían referencia los técnicos encargados de las fincas visitadas.

Referencias

- Atkinson, D. 1985. "Toxicological Properties of Glyphosate--a Summary. Herbicide Glyphosate/edited by E. Grossbard, D. Atkinson." *Butterworths*, 127–33.
- Davis, Vince M, and William G Johnson. 2008. "Glyphosate-Resistant Horseweed (*Conyza Canadensis*) Emergence , Survival , and Fecundity in No-till Soybean Glyphosate-Resistant Horseweed (*Conyza Canadensis*) Emergence , Survival , and Fecundity in No-Till Soybean." *Weed Science Society of America* 56 (2): 231–36. doi:10.1614/WS-07-093.1.
- González-Torralva, Fidel, Antonia M. Rojano-Delgado, María D. Luque de Castro, Norbert Mülleder, and Rafael De Prado. 2012. "Two Non-Target Mechanisms Are Involved in Glyphosate-Resistant Horseweed (*Conyza Canadensis* L. Cronq.) Biotypes." *Journal of Plant Physiology* 169 (17). Elsevier GmbH.: 1673–79. doi:10.1016/j.jplph.2012.06.014.
- Heap, I. 2017. "The International Survey of Herbicide Resistant Weeds." *Internet*. www.weedscience.org.
- Khan, Rehman Ullah, Sultan Mehmood, Saad Ullah, and M Subhan. 2013. "Journal of Medicinal Plants Studies Ethnobotanical Study of Common Weed Flora of Sugarcane in District Bannu , Khyber Pakhtunkhawa , Pakistan." *Journal of Medicinal Plant Studies* 1 (4): 49–78.
- Malik, J., G. Barry, and G. Kishore. 1989. "The Herbicide Glyphosate." *BioFactors* 2 (1): 17–25.
- Powles, S. 2008. "Review Evolved Glyphosate-Resistant Weeds around the World: Lessons to Be

Learnt." *Pest Management Science* 64: 360–65. doi:10.1002/ps.

Urbano, Jose M, Ana Borrego, Vanessa Torres, Juan M Leon, Cristobal Jimenez, Giovanni Dinelli, and Jasper Barnes. 2007. "Glyphosate-Resistant Hairy Fleabane (*Conyza Bonariensis*) in Spain." *Weed Technology* 21: 396–401. doi:10.1614/WT-06-096.1.

Capítulo 2. Publicaciones de *Conyza* con factor de impacto indexadas en JCR

Capítulo 2. Publicaciones de *Conyza* con factor de impacto indexadas en JCR

Mientras que se desarrollaban las prospecciones en busca de poblaciones resistentes en Extremadura, como parte de mi formación sobre *Conyza* spp., se realizaron estudios de mecanismos de resistencia con poblaciones previamente identificada en Andalucía por el grupo de Dr. Rafael de Prado del Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba. Este trabajo queda reflejado en las distintas estancias que he realizado durante los años 2015 y 2016. Esto ha permitido la publicación de un artículo y otro en revisión en revistas de impacto indexadas en JCR.

El primero está relacionado con los mecanismos de resistencia desarrollados por poblaciones de *Conyza* spp. tratadas con glifosato en el sur de España. El segundo estudia la resistencia a glifosato en poblaciones de *Conyza* spp. recogidas en las vías del tren.

Artículo de impacto publicado en 2018

Capítulo 2.1. Mechanisms of glyphosate resistance and response to alternative herbicide-based management in populations of the three *Conyza* species introduced in southern Spain

Ignacio Amaro-Blanco,^a Pablo Tomás Fernández-Moreno,^b María Dolores Osuna Ruiz,^a Fernando Bastida,^c and Rafael De Prado^b

^a Agrarian Research Center 'Finca La Orden' Valdesequera, Badajoz, Spain

^b Department of Agricultural Chemistry and Edaphology, University of Cordoba, Cordoba, Spain

^c Department of Agroforestry Sciences, University of Huelva, Huelva, Spain

Pest Manag Sci 2018; 74: 1925–1937, DOI 10.1002/ps.4896

Mechanisms of glyphosate resistance and response to alternative herbicide-based management in populations of the three *Conyza* species introduced in Southern Spain.

Ignacio Amaro-Blanco¹, Pablo Tomás Fernández-Moreno^{2†}, María Dolores Osuna-Ruiz¹,
Fernando Bastida³, Rafael De Prado²

¹Agrarian Research Center “Finca La Orden” Valdesequera, Badajoz, Spain.

²Department of Agricultural Chemistry and Edaphology, University of Cordoba, 14071 Cordoba, Spain.

³Department of Agroforestry Sciences, University of Huelva, 21819 Huelva, Spain.

†Corresponding Author: Pablo Tomás Fernández-Moreno (pablotomas91@hotmail.es)

Abstract

BACKGROUND

In perennial crops, the most common method of weed control is to spray herbicides, and glyphosate has long been the first choice of farmers. Three species of the genus *Conyza* are among the most problematic weeds for farmers, exhibiting resistance to glyphosate. The objectives of this work were to evaluate resistance levels and mechanisms, and to test chemical control alternatives in putative resistant (R) populations of *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* and *Conyza sumatrensis*.

RESULTS

Plants of the three R-populations of *Conyza* spp. survived high doses of glyphosate compared to plants of susceptible (S) populations. The rate of movement of ¹⁴C glyphosate out of treated leaves in plants of S-populations was higher than in plants of R-populations. Only in plants of the R-population of *C. sumatrensis* contained the known target-site 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutation Pro-106-Thr. Field responses to the different alternative herbicide treatments tested indicated injury and high effectiveness in most cases.

CONCLUSIONS

The results indicate that non-target-site resistant (NTSR) mechanisms explain resistance in *C. bonariensis* and *C. canadensis*, whereas both NTSR and target-site resistant (TSR) mechanisms

contribute to resistance in *C. sumatrensis*. The results obtained in the field trials suggest that the resistance problem can be solved through Integrated Weed Management.

Keywords: Resistance; Molecular markers; Non-Target-Site Resistance; Target-Site Resistance; Seedbank; Integrated Weed Management.

1. Introduction

Herbicide resistance is the evolutionary response of weeds to the sustained selection pressure imposed by recurrent application of a herbicidal ingredient, and is an important concern in agriculture¹. Glyphosate is one of the most widely used herbicides and the number of glyphosate-resistant weeds has grown to 37 species worldwide². Glyphosate inhibits the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), which catalyzes the reaction of shikimate-3-phosphate (S3P) and phosphoenolpyruvate to form 5-enolpyruvil-shikimate-3-phosphate (ESP). Inhibition of EPSPS prevents the biosynthesis of aromatic amino acids and thus is highly lethal to sensitive plants³.

The application of glyphosate, for over four decades as a non-selective herbicide in crop and non-crop situations, has resulted in resistance to this herbicide in populations of three widespread species of the genus *Conyza* (Asteraceae), *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* and *Conyza sumatrensis*^{4,5}. These three major species of *Conyza* are native to America, and are considered highly invasive species. Very high fecundity and the capacity for long-distance wind seed dispersal are contributing traits explaining invasive behavior⁶. In new territories where these species have become established, including the Mediterranean basin, *Conyza* species behave mainly as ruderal plants, inhabiting field and road margins and human settlements. However, they can also be conspicuous elements of weed communities of fields showing low or intermittent soil cover of the crop plants, such as fruit tree crops and olive groves, frequently arousing the concern of farmers⁷.

In these perennial crops in Spain, the most common method of weed control is to spray herbicides, and glyphosate has long been the first choice of farmers⁸. In addition, very few farmers follow a herbicide-rotation regime where herbicides with different modes of action are used to reduce selection pressure⁹. As a consequence, species of *Conyza*, in addition to *Lolium* spp., are among the most problematic weeds for farmers, exhibiting resistance to glyphosate and to different herbicides of contrasting modes of action¹⁰. *C. canadensis* was the first broadleaf weed to evolve glyphosate resistance in 2000. Since then, there have been many cases of resistance in *Conyza* spp. recorded around the world².

Weed survival to herbicide applications results from two different mechanisms, known as target-site (TSR) and non-target-site resistance (NTSR)¹⁰. Most herbicides are designed to target specific enzymes or proteins and, thus, target-site resistance is mostly monogenic and involves a point-mutated target enzyme¹¹. NTSR, described as a collection of mechanisms that are, by definition not TSR, results from reduced uptake and/or translocation, increased vacuolar sequestration, or metabolism to non-toxic compounds, with consequent decreased levels of glyphosate interacting with EPSPS¹². TSR mechanisms involve one or more mutations in the DNA encoding the target protein of the herbicide, which leads to changes in amino acids or conformational changes in protein folding¹³. Amplified basal expression of EPSPS for instance, also a TSR mechanism, provides additional active sites for PEP and S3P to bind normally and continue to move carbon flux through the shikimate pathway¹⁴.

Each mechanism can show different levels of resistance. For example, in TSR, a single mutation in the EPSPS gene, Pro-106 as the most common, confers low levels of resistance, in the order of 2- to 4-fold. A double mutation found recently in some weeds, Pro-106-Ser and Thr-102-Ile, greatly increases resistance levels¹⁵. However, NTSR can confer unpredictable resistance levels. Also, the existence of both TSR and NTSR mechanisms in the same resistant population results in this population being more resistant than if it had only one of the two mechanisms. In fact, this situation is becoming more common because of selection pressure. However, there are no reports about which mechanism develops first, or how each mechanism individually contributes to the resistance levels exhibited^{16,17}.

The main objectives of this study were to: a) elucidate the taxonomical identity of putative resistant populations of *Conyza* spp. based on molecular analysis; b) evaluate their resistance levels and the mechanisms involved; and c) test chemical alternatives for control of the resistant populations.

2. Material and Methods

2.1. Plant material

Mature seeds of putative glyphosate-resistant (R) *Conyza* spp. populations were collected from citrus orchards and olive groves located in different areas of southern Spain (Figure 30 and Table 15). The existing weeds in the crops had been treated with 1440 g ae ha⁻¹ of glyphosate (4 L ha⁻¹) or higher for at least 16 consecutive years (Roundup®, 360 g ae L⁻¹ as isopropylamine salt). Also, seeds of five different glyphosate-susceptible (S) populations, which had never been treated and were chosen for having a location close to the resistant populations, were collected per species (Figure 1 and 2).

Table 15. Coordinates of putative glyphosate-resistant (R) and glyphosate-susceptible (S) *Conyza* spp. populations collected

Population	Coordinates
<i>C. canadensis</i> putative resistant (R)	38.1143782, -4.4183175
<i>C. canadensis</i> susceptible 1 (S)	37.9970432, -4.4659401
<i>C. canadensis</i> susceptible 2 (S)	38.2728156, -4.812013
<i>C. canadensis</i> susceptible 3 (S)	37.6580289, -5.2404336
<i>C. canadensis</i> susceptible 4 (S)	37.7012074, -4.7570801
<i>C. canadensis</i> susceptible 5 (S)	37.5184402, -4.6472168
<i>C. bonariensis</i> putative resistant (R)	37.9528609, -4.888916
<i>C. bonariensis</i> susceptible 1 (S)	38.0567422, -5.4492187
<i>C. bonariensis</i> susceptible 2 (S)	38.5997004, -4.9328613
<i>C. bonariensis</i> susceptible 3 (S)	38.3416562, -4.9987793
<i>C. bonariensis</i> susceptible 4 (S)	38.1000071, -4.6801524
<i>C. bonariensis</i> susceptible 5 (S)	37.7359631, -4.5483398
<i>C. sumatrensis</i> putative resistant (R)	37.347439, -6.696507
<i>C. sumatrensis</i> susceptible 1 (S)	37.2478212, -7.1685791
<i>C. sumatrensis</i> susceptible 2 (S)	37.3395919, -7.2344971
<i>C. sumatrensis</i> susceptible 3 (S)	37.714245, -6.7126465
<i>C. sumatrensis</i> susceptible 4 (S)	37.2784239, -6.630249
<i>C. sumatrensis</i> susceptible 5 (S)	37.4312505, -7.2839355



Figure 30. Spanish map with the different *Conyza* spp. populations collected. Symbols in white represent susceptible populations of *Conyza* spp. Symbols in black represent the three putative resistant populations of *Conyza* spp. and the field studies.

Seeds were germinated in Petri dishes with moistened filter paper (distilled water). Germinating seedlings were transplanted into pots (7 x 7 x 6 cm) containing sand and peat (1:2 v/v) and placed in a growth chamber at 28/18 C (day/night) under a photoperiod of 16 h, 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux, and 80% relative humidity.

2.2. Dose-response assays

Glyphosate was applied to plants of *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis* at the 3-4 leaf stage using a laboratory chamber sprayer (SBS-060 De Vries Manufacturing, Hollandale, MN) equipped with 8002 flat fan nozzles delivering 200 L ha⁻¹ at 250 kPa at a height of 50 cm.

The following glyphosate (Roundup®, 360 g ae L⁻¹ as isopropylamine salt; Monsanto, Spain) rates were used: 0, 62.50, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, and 8000 g ae ha⁻¹. The experiment was arranged using eight replicates per rate and was repeated. Plant mortality (LD₅₀) and dry mass (GR₅₀) were evaluated 21 days after treatment (DAT). Plant dry mass was measured for above ground tissue after drying at 60° C for 72 h.

The five S populations of each species were compared for their LD₅₀ values, and no significant differences ($P > 0.05$) were found for any species (Figure 31). Then, we randomly selected one S population per species for subsequent analyses and experiments.

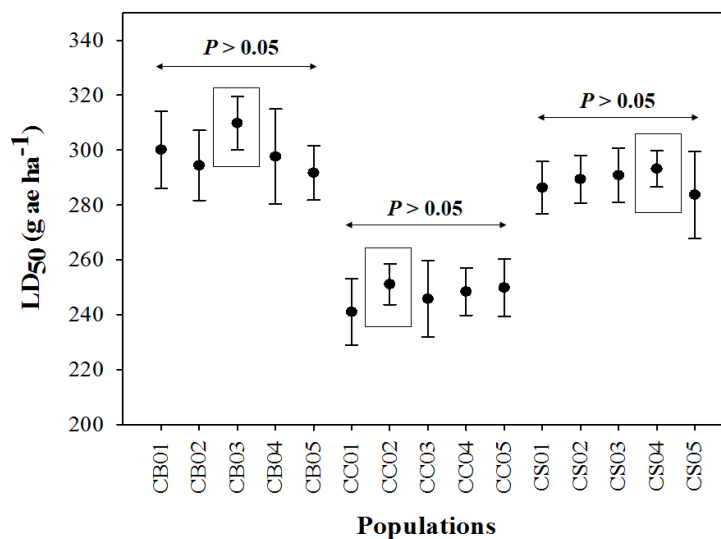


Figure 31. Plant survival 50% (LD₅₀) in five populations of each species of *Conyza* spp. Vertical bars correspond to standard errors. CB01 to 05: *C. bonariensis* populations. CC01 to 05: *C. canadensis* populations. CS01 to 05: *C. sumatrensis* populations.

2.3. Identification of *Conyza* species using molecular markers

Approximately 100 mg of plant tissue was ground until a fine powder was obtained. DNA was extracted using the Speedtools plant DNA extraction kit (BIOTOOLS, Madrid, Spain). In all cases, DNA was quantified using a NANODROP-1000 spectrophotometer (Thermo-Scientific), diluted in a final concentration of 10 ng μL⁻¹ to be used in the PCR. A total of 8 ISSR primers were chosen for DNA amplification (Table 16). Amplification of the DNA was carried out in a reaction mixture containing 1 μl (10 ng μL⁻¹) DNA, 2.5 10X buffer (with 15 mM MgCl₂), 2 μl (2.5 mM) of a mixture of deoxynucleotide triphosphate, 1 μl (1 μM) of the primer and 0.2 μl (5 U μL⁻¹) of Taq DNA

polymerase (BIOTOOLS) per 25 µL of the reaction mixture. For the PCR, a Bio-Rad thermocycler programmed for 38 cycles was used: 1 cycle of 7 minutes at 94°C, 38 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 52°C and 1 minute at 72°C and finally 1 cycle of 5 minutes at 72°C. The amplified product was visualized on a 1.3% agarose gel adding intron previously. Once the gel was made, a photograph was taken under ultraviolet light (ALPHA-INNOTECH transilluminator). The molecular size of the fragments was estimated from a marker of 100 to 2000 base pairs (Fisher, range from 100 to 2000).

Using the photos of the gels, a matrix of presence / absence of molecular bands was created and a tree of separation of species was elaborated from the previous matrix with the NTSYSpc program.

Table 16. Inter-simple sequence repeat (ISSR) primers used in *Conyza* populations

Primers	Primer sequence
ISSR 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
ISSR 889	DBDACACACACACACAC
ISSR 890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT
ISSR 857	ACACACACACACACACYG
ISSR 864	ATGATGATGATGATGATG
ISSR 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
ISSR 827	ACACACACACACACACG
ISSR 880	GGAGAGGAGAGGAGA
ISSR 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT

2.4. Shikimic acid accumulation assays

Fifty 4-mm leaf disks were harvested from the youngest fully expanded leaf at the 3-4 tiller stage from 15 plants per population¹⁸. The disks were transferred to 2 mL Eppendorf tubes containing 1 mL of 1 mM NH₄H₂PO₄ (pH 4.4), placing 5 disks per tube. At this point, 1 µL of glyphosate was added to each tube, resulting in the following concentrations: 0, 0.5, 1, 10, 50, 100, 200, 400, 600, and 1000 µM. Tubes were incubated in a growth chamber for 24 h under the above conditions. After 24 h, tubes were stored at -20°C until further analysis. For analysis, tubes were thawed at 60°C for 30 min. Thereafter, 250 µL of 1.25 N HCL was added to each Eppendorf. Tubes were incubated at 60°C for 15 min. A 125 µL aliquot from each Eppendorf was pipetted into a new 2 mL Eppendorf, and 500 µL of periodic acid and sodium metaperiodate (0.25% [wt/v] each) was added. After incubation at room temperature for 90 min, 500 µL of 0.6 N sodium hydroxide and 0.22 M sodium sulfite were added. Finally, liquid in the tubes was transferred to glass vials. Within 30 min, light absorption at 380 nm was measured in a spectrophotometer. For each glyphosate concentration and population, six replicates were used and the experiment was repeated.

2.5. ¹⁴C-glyphosate uptake and translocation

Experiments were carried out following Fernandez-Moreno et al¹². A solution of ¹⁴C-glyphosate (American Radiolabeled Chemicals, Inc., Saint Louis, MO, USA) was prepared by adding radiolabeled glyphosate to commercially formulated glyphosate, with the final specific activity of 0.834 kBq μL^{-1} . This concentration corresponded to 360 g ae ha⁻¹ and an application volume of 200 L ha⁻¹. When plants of R and S populations reached the 3-4 leaf growth stage, 1 μL (0.834 kBq plant⁻¹) of solution was applied onto the adaxial surface of the second most mature leaf with a micropipette (LabMate Soft, HTL Lab Solutions, Warsaw, Poland).

At 12, 24, 48, 72, or 96 h after treatment (HAT), the treated leaf was washed with 3 mL of water: acetone (1:1 v/v) solution to remove unabsorbed glyphosate. The rinsate was mixed with 2 mL of scintillation cocktail and radioactivity analyzed by liquid scintillation spectrometry (LSS) using a scintillation counter (Beckman LS 6500, Fullerton, CA, USA.). The remainder of the plant was carefully removed from the pot and the roots gently washed with distilled water. Plant tissue was sectioned into treated leaf (TL), remaining shoot tissue (RST), and roots (R). Plant tissue was dried at 60°C for 96 h and combusted in a Packard Tri Carb 307 biological sample oxidizer (Packard Instruments, Meriden, US). Evolved ¹⁴CO₂ was trapped and counted by LSS in an 18-mL mixture of Carbo-Sorb E and Permafluor E+ (1:1v/v) (Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV). The amount of radiolabeled glyphosate deposited on each plant leaf was assessed by washing a leaf from a randomly selected plant of each population immediately after treatment. The experiment was arranged in a completely randomized design with seven replicates per population and repeated. The percentage of absorbed herbicide was expressed as shown in Equation 1.

$$[\text{kBq in combusted tissue} / (\text{kBq in combusted tissue} + \text{kBq in leaf washes})] \times 100. \quad [1]$$

2.6. ¹⁴C-glyphosate visualization

Distribution of ¹⁴C-glyphosate throughout the R- and S-plants was visualized using a phosphor imager (Cyclone, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Plants were grown, treated and the tissue was collected in the same way as described for the uptake and translocation experiments. Following 96 HAT, roots of intact plants were rinsed to remove soil and treated leaves were rinsed to remove unabsorbed glyphosate. Following gentle blotting on absorbent tissue to remove water, plants were gently pressed and dried at room temperature. Dry tissue was placed adjacent to 25 × 12.5 cm phosphor storage film for 13 h and scanned for radiolabel distribution using a phosphor imager. The procedure was conducted using three plants per population.

2.7. Metabolism study

Plants of R and S populations were grown to the 3-4 leaf growth stage, and then treated with glyphosate at 360 g ha⁻¹ as described in the dose response section. At 96 HAT, the methodology

of Rojano-Delgado et al¹⁹ was followed to determine glyphosate and its primary metabolites, i.e. aminomethylphosphonic acid (AMPA), glyoxylate, and sarcosine. Quantification of glyphosate and metabolites was carried out by reversed polarity capillary electrophoresis using a 3D Capillary Electrophoresis Agilent G1600A instrument equipped with a diode array detector (DAD) at a wavelength of 190–600 nm. For calibration of instrumentation, purchased standards of glyphosate, AMPA, sarcosine, formaldehyde and glyoxylate were used. Preparation of treated leaf tissue for analysis was as follows. Leaf tissue was washed with distilled water, frozen in liquid nitrogen, and stored at -40°C until use. The aqueous background electrolyte consisted of 10 mM potassium phthalate, 0.5 mM hexadecyltrimethylammonium bromide, and 10% acetonitrile at pH 7.5. Calibration equations were established from non-treated plants and known concentrations of glyphosate and associated metabolites, which were determined from their peak areas in the electropherogram. The average value for the content of glyoxylate, which is naturally produced by plants, was subtracted from the mean content of each population. The experiment was arranged in a completely randomized design with seven replications per population and repeated.

2.8. EPSPS enzyme activity assays

Samples of 5 g of leaf tissue (3-4 leaf growth stage) from each population were ground to fine powder using a pestle and mortar. The methodology described by Dayan et al²⁰ was used for EPSPS extraction. Total protein content in the extract was measured according to the method of Bradford²¹ using a Kit for Protein Determination (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

Specific EPSPS activity in plants from each population was estimated in the presence and absence (basal activity) of glyphosate. The EPSPS activity was determined using an EnzChek Phosphate Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The glyphosate concentrations used were: 0, 0.1, 1, 10, 50, 100, 200, 500 and 1000 μM . Five replications at each glyphosate concentration were used, and the experiment was repeated. EPSPS enzyme activity was expressed as percentage of enzyme activity in presence of glyphosate with respect to the control (without glyphosate). The EPSPS activity was calculated to determine the amount of phosphate (μmol) released per μg of total soluble protein (TSP)⁻¹ min⁻¹.

2.9. EPSPS gene sequence

Young leaf samples (100 mg) of the R and S populations of each species were collected at the 3-4 leaf growth stage. Total RNA was isolated from leaves using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was purified with TURBO DNase (RNase-Free; Ambion, Warrington, UK) and stored at -80°C . Synthesis of cDNA utilized 2 μg of total RNA following an M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in combination with oligo (dT)₁₂₋₁₈ and random nonamers

(Amersham Biosciences, Amersham, UK) according to the manufacturer's instructions. To amplify the EPSPS gene, the primers were designed based on the EPSPS2 gene sequence. We used F1-EPSPS2 (5'-TGATGTTTCATTACATGCTTGGAG-3') and R1-EPSPS2 (5'-TGAGGTGAGAGAAATGGGTACA-3') for *C. bonariensis*⁵; F2-EPSPS2 (5'-GTTGCGGGACAAGCA-3') and R2-EPSPS (5'-AGGGCAACCACAGCAA-3') for *C. canadensis*²²; and F3-EPSPS2 (5' -TCTAAAGCTCCAGAAGAAATTGTG-3') and R3-EPSPS2 (5'-GAAACCCCAAACCGTYCC-3') for *C. sumatrensis*⁷. After PCR (see Gonzalez-Torralva et al⁷), PCR products were sequenced (STAB VIDA, Caparica, Portugal) searching for the commonly reported mutation at 106 position, and also for the recently reported mutation at 102 position^{23,24}.

2.10. Herbicide-based control alternatives

Experiments were conducted during three consecutive seasons (2014 to 2016) in springtime (March-April) in the fields of origin of each R population. These were olive groves for *C. bonariensis* and *C. canadensis*, and a citrus orchard for *C. sumatrensis*. In each case, nine herbicide treatments (glyphosate: Roundup Energy®, 45 % p/v. SL, Monsanto, Spain; glufosinate: Finale®, 15% p/v. SL, Bayer CropScience, Spain; fluroxypyr: Praxis®, 20% p/v. EC, Nufarm, Spain; iodosulfuron+diflufenican: Musketeer®, 15 % p/v. diflufenican + 1 % p/v. iodosulfuron-metthyl, Bayer CropScience, Spain; 2,4-D: U 46 D Complet®, 60% p/v. SL, Nufarm, Spain; flazasulfuron: Terafit®, 25% WG, Syngenta, Spain; MCPA: U 46 SP Fluid ®, 40% p/v SL, Nufarm, Spain; pyraflufen-ethyl: Gozai®, 2.65% p/v. EC, Belchin, Spain) were tested for control effectiveness following a randomized complete block design with four replications. The experimental unit was a plot of 2 m x 15 m (Table 17).

Table 17. Herbicide treatments tested *in situ* for control effectiveness of glyphosate-resistant *Coryza* spp. populations over three seasons (2014-2016).

Active ingredient	Commercial product	HRAC group	Dose (g ai ha ⁻¹)
control	-	-	-
glyphosate	Roundup Energy®	G	1800 ^a
glufosinate	Finale®	H	750
fluroxypir + glyphosate	Praxis® + Roundup Energy®	O + G	300 + 1800
iodosulfuron + diflufenican + glyphosate	Musketeer® + Roundup Energy®	B + F1 + G	10 + 150 + 1080
2,4-D + glyphosate	U 46 D Complet® + Roundup Energy®	O + G	960 + 1800
flazasulfuron + glyphosate	Terafit® + Roundup Energy®	B + G	80 + 1800
MCPA + glyphosate	U 46 SP Fluid ® + Roundup Energy®	O + G	1200 + 1800
pyraflufen-ethyl	Gozai®	E	22

g ai ha⁻¹ = grams of active ingredient per hectare.

^a g ae ha⁻¹ = grams of acid equivalent per hectare.

HRAC: Herbicide-Resistance Action Committee; G: EPSPS inhibitors; B: ALS inhibitors; O: Synthetic auxins; E: PPO inhibitors; F1: PDS inhibitors; H: Glutamine synthase inhibitors.

glyphosate: Roundup Energy®, 45 % p/v. SL, Monsanto, Spain; glufosinate: Finale®, 15% p/v. SL, Bayer CropScience, Spain; fluroxypyr: Praxis®, 20% p/v. EC, Nufarm, Spain; iodosulfuron+diflufenican: Musketeer®, 15 % p/v. diflufenican + 1 % p/v. iodosulfuron-metthyl, Bayer CropScience, Spain; 2,4-D: U 46 D Complet®, 60% p/v. SL, Nufarm, Spain; flazasulfuron: Terafit®, 25% WG, Syngenta, Spain; MCPA: U 46 SP Fluid ®, 40% p/v SL, Nufarm, Spain; pyraflufen-ethyl: Gozai®, 2.65% p/v. EC, Belchin, Spain.

Herbicides were applied at early post-emergence (2- to 8-leaf stage or early rosette stage) using a Pulverex backpack sprayer with a T coupling for the wand equipped with four flat fan nozzles, at a spraying pressure of 200 kPa, and calibrated to deliver a volume of 200 L ha⁻¹. A strip of 1 m was established between plots within a block to prevent treatment overlap. Application effects on plants were evaluated 60 days after treatment (DAT) in terms of percentage of effectiveness in reducing soil cover of *Coryza* spp.

In addition to effectiveness in reducing the standing populations, each treatment was also evaluated according to its ability to reduce the contribution of surviving plants to future infestations through seed production, following the methodology described by Fernandez-Moreno et al¹². Plants of R populations surviving the different herbicide treatments in the field trials were left to flower and fruit. Fruiting heads (i.e. capitula) were bulk collected for each treatment within each block and stored in the laboratory for three-four months. Percentage seed germination was recorded after 14 days under conditions described in the plant material section. Relative effectiveness in reducing seed production was estimated as the product of percentage cover at 60 DAT, an estimate of the relative production of capitula, by percentage germination, relative to untreated plots, and finally

expressed as the complementary percentages¹². In doing so, we assumed that the number of flowers per capitulum, i.e. potential seeds, is unaffected by treatment. Viable seeds of *Conyza* spp. germinate readily under favorable conditions, so percentage germination estimates the fraction of flowers which transforms to viable seeds within a capitulum.

In relation to these treatments, it should be noted that glufosinate and pyraflufen-ethyl applications were not mixed with other modes of action as they are contact herbicides. Contact herbicides in mixture with systemic herbicides produce antagonism, thus lowering control effectiveness.

2.11. Data analysis

Dose response and EPSPS enzyme activity data were subjected to non-linear regression analysis using a three-parameter log-logistic model (Equation 2) to determine the glyphosate dose resulting in a 50% reduction in growth (GR₅₀), 50% reduction in mortality (LD₅₀), or the herbicide rate resulting in 50% inhibition of EPSPS activity (I₅₀).

$$y = d / [1 + (x/g)^b] \quad [2]$$

where y is reduction of above-ground weight, survival, or enzyme activity expressed as percentage of the non-treated control, d is the upper asymptote, b is the slope of the line around the inflection point, g is the GR₅₀, LD₅₀ or I₅₀, and x (independent variable) is the herbicide rate. Regression analyses were conducted using the *drc* package²⁵ for the statistical environment R²⁶. Resistance factors (R/S) were computed as R-to-S GR₅₀, LD₅₀ or I₅₀ ratios. To test for a common GR₅₀, LD₅₀, or I₅₀ for R and S populations within each *Conyza* species, i.e. resistance factor equal to 1, a lack-of-fit test was used to compare the model consisting of curves with population-specific g values with a reduced model with common g .

Analysis of variance (ANOVA) was conducted using Statistix 9.0 (Analytical Software, USA) to test for differences between R and S populations within each *Conyza* species in shikimate accumulation at 1000 μ M glyphosate in leaf segments (paragraph 2.4), in proportions of applied ¹⁴C-glyphosate taken up by leaves, in proportions of absorbed ¹⁴C-glyphosate remaining in the treated leaf, translocated to roots and to the rest of the plant at 96 HAT (2.5), in accumulation of the different glyphosate metabolites (2.7), in basal enzyme activity (2.8), and in the effects of herbicide treatment and year, and their interaction, on effectiveness in reducing soil cover of R populations in the field trials, and in reducing the contribution to future generations of plants surviving the treatments to fruiting (2.10). For the cases of replicated whole experiments, ANOVA was conducted according to a generalized randomized block design, with each run of the experiment representing a block. In neither case interaction terms including block were significant and thus they were not included in the final ANOVA models. Percentage data were previously

transformed (arcsine of the square root) to meet model assumptions of normality of error distribution and homogeneity of variance. Model assumptions were graphically inspected. When needed, differences between means were separated using the Tukey HSD test.

3. Results

3.1. Dose-Response assays

Analysis of the dose-response assays of the 5 S populations tested for each *Conyza* species indicated that they did not differ in any case in LD₅₀ values (Figure 32), as judged by non-significant lack-of-fit tests ($P>0.05$) comparing for each species a reduced model with a common g parameter and a full model with population-specific g values. Then, a S population was randomly selected for each *Conyza* species to be used in the laboratory experiments. Plants of the three R populations of *Conyza* spp. fully survived a high dose commonly used in fields (4 L ha^{-1} , 360 g ae L^{-1}) experiencing only a limited biomass loss compared to plants of the respective S populations which, in turn, showed high mortality at this dose (Figure 32, Table 18). R *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis* populations exhibited 6.82-, 10.36- and 8.10-fold resistance to glyphosate (resistant factors based on LD₅₀ values) relative to S populations (Table 18). The test for lack of fit comparing a reduced model with a common g parameter for R and S populations with a full model with population-specific parameter values was significant ($P<0.01$) for all the three *Conyza* species, both for LD₅₀ and GR₅₀, thus confirming resistance to glyphosate in the three R populations.

Table 18. Parameter estimates from the logistic analysis of plant survival (LD₅₀), growth reduction (GR₅₀) and EPSPS enzyme activity (I₅₀) of resistant (R) and susceptible (S) *Conyza bonariensis*, *C. canadensis*, and *C. sumatrensis* populations under increasing glyphosate rates.

Plant survival (LD ₅₀)							
Species	Population	d	b	R ²	LD ₅₀ (g ae ha ⁻¹)	RF	P-value
<i>C. bonariensis</i>	R	99.96	2.75	0.99	2112.96 ± 79.98	6.82	0.0001
	S	99.11	2.96	0.99	309.38 ± 9.66		
<i>C. canadensis</i>	R	100.21	3.08	0.98	2602.12 ± 71.18	10.36	0.0001
	S	101.66	3.17	0.97	251.07 ± 7.42		
<i>C. sumatrensis</i>	R	99.63	3.54	0.99	2377.32 ± 69.91	8.10	0.0001
	S	99.56	3.42	0.98	293.15 ± 6.62		
Growth reduction (GR ₅₀)							
Species	Population	d	b	R ²	GR ₅₀ (g ae ha ⁻¹)	RF	P-value
<i>C. bonariensis</i>	R	103.25	1.51	0.98	683.37 ± 52.31	6.95	0.0001
	S	100.13	3.31	0.99	98.23 ± 4.41		
<i>C. canadensis</i>	R	102.04	1.78	0.99	790.95 ± 32.97	7.22	0.0001
	S	101.35	3.26	0.99	109.48 ± 5.42		
<i>C. sumatrensis</i>	R	102.92	1.67	0.97	726.22 ± 65.37	7.00	0.0001
	S	101.95	4.60	0.98	103.71 ± 5.25		
EPSPS enzyme activity (I ₅₀)							
Species	Population	d	b	R ²	I ₅₀ (µM)	RF	P-value
<i>C. bonariensis</i>	R	99.73	1.44	0.99	11.03 ± 0.38	1.13	0.2613
	S	98.71	1.40	0.98	9.71 ± 1.84		
<i>C. canadensis</i>	R	100.67	1.28	0.99	18.13 ± 1.49	1.19	0.1764
	S	99.97	1.19	0.99	15.16 ± 2.98		
<i>C. sumatrensis</i>	R	100.18	3.61	0.98	106.11 ± 4.89	7.83	0.0001
	S	99.26	1.27	0.99	13.55 ± 1.26		

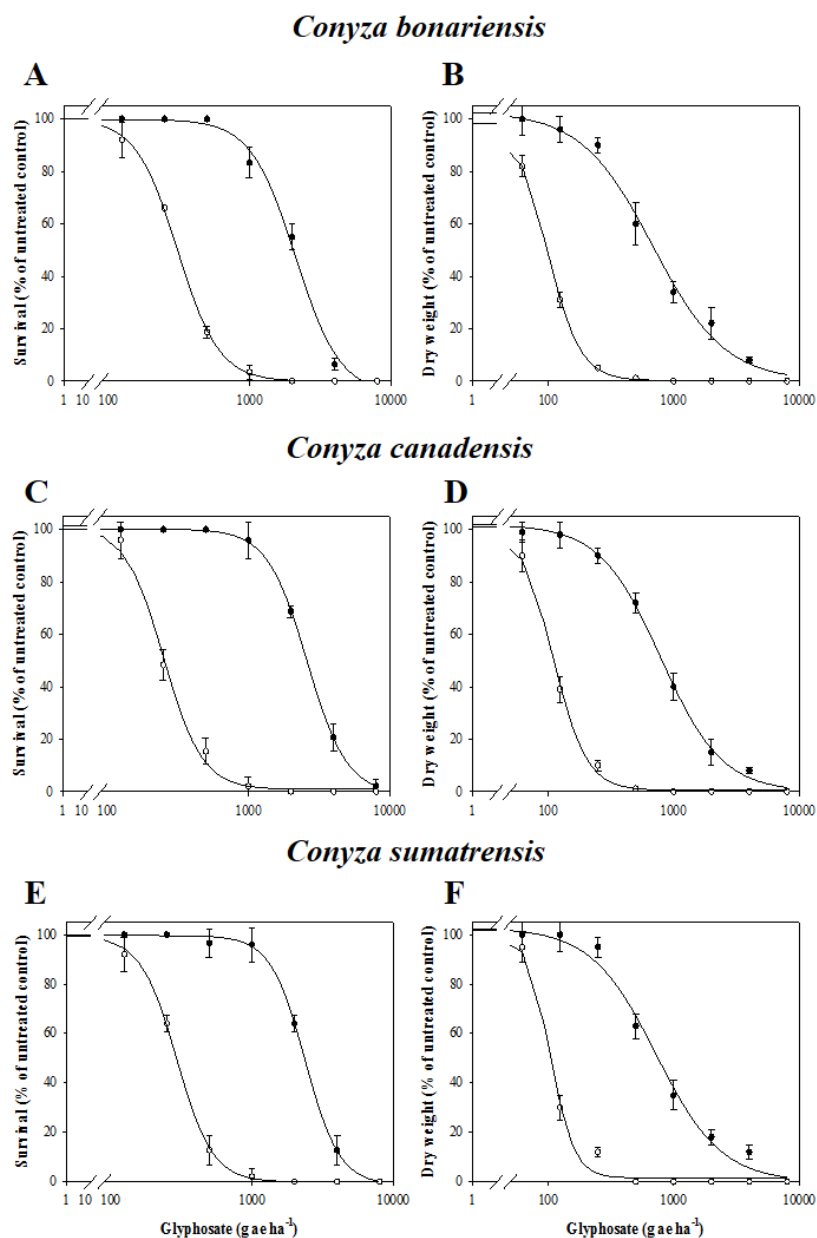


Figure 32. Glyphosate dose response on (A, C, E) survival and (B, D, F) fresh weight reduction expressed as percentage of the mean untreated control of the R (●) and S (○) populations of *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis*. Symbols denote mean ($n=8$) \pm standard errors of the mean.

3.2. Identification of *Conyza* species using molecular markers

Jaccard's similarity indices were calculated for all the populations examined, and the clustering was represented by a dendrogram. In the UPGMA dendrogram, two main clusters converged at a 45% similarity level. The first cluster comprised *C. bonariensis* and *C. sumatrensis* populations. This cluster separated at a 50% similarity level. The second cluster was formed by *C. canadensis* populations (Figure 33).

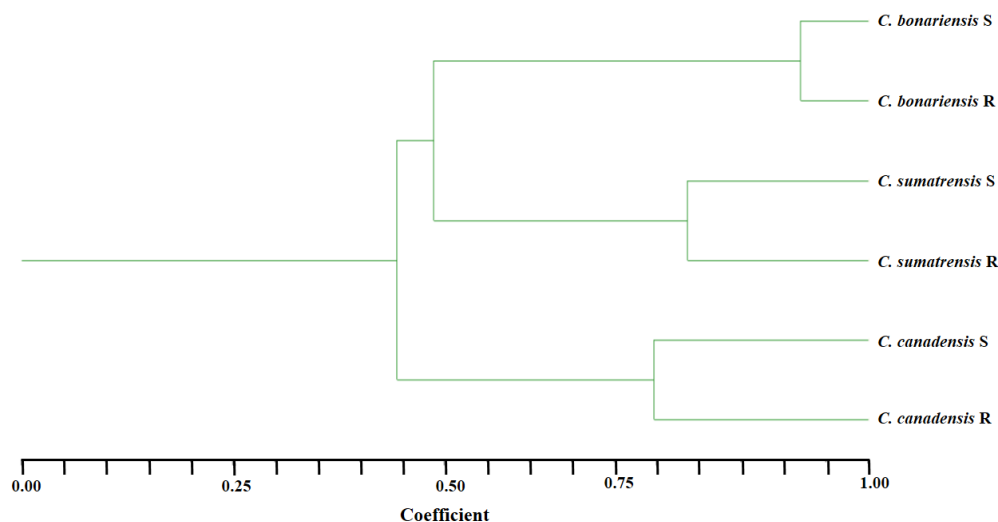


Figure 33. Dendrogram of the genetic similarities among *Conyza* species after UPGMA analysis performed with ISSR marker data.

3.3. Shikimic acid accumulation assays

Both the R and S populations of each *Conyza* species accumulated shikimic acid with maximum levels reached at 1000 μM (Figure 34). However, at this concentration, the S populations of *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis* accumulated, respectively, 4.01-, 6.75- and 4.05-fold more shikimic acid than the respective R populations, with values ranging between 228 and 264 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight (Figure 34).

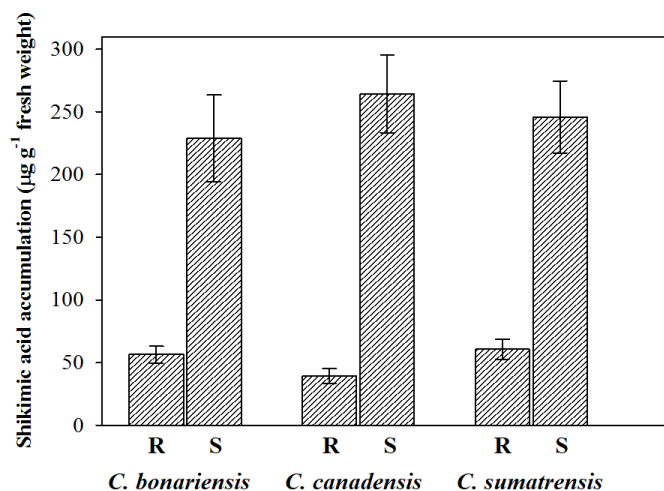


Figure 34. Shikimic acid accumulation expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight at 1000 μM of glyphosate in the R and S populations of the three species of *Conyza* spp. Vertical bars correspond to standard errors.

3.4. ¹⁴C-glyphosate uptake, translocation and visualization

Recovery of ¹⁴C-glyphosate from treated leaves was approximately 92-96%. The maximum glyphosate uptake was observed at 96 HAT, with the S population exhibiting 22, 33, and 24% more uptake than the R population in *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis*, respectively (Table 5). From 12 to 72 HAT, glyphosate uptake was rapid, and started slow from 72 to 96 HAT. There were no major differences between R and S populations in both *C. bonariensis* and *C. sumatrensis* in glyphosate uptake from 12 to 24 HAT. In *C. canadensis*, the S population started to show differences of uptake with respect to the R population at 12 HAT (data not shown). Differences between R and S populations within each species in ¹⁴C-glyphosate translocation were significant at 96 HAT (Table 16). The rate of movement out of the treated leaf in plants of S populations was greater compared to plants of R populations, 57.9%, 65.4% and 65.8% for *C. bonariensis*, *C. canadensis*, and *C. sumatrensis*, respectively (Table 16). The ¹⁴C-glyphosate visualization revealed important differences in the distribution of the herbicide in the plant between S and R populations of the three *Conyza* species (Figure 35), with plants of the R populations exhibiting very low glyphosate accumulation in the remaining shoot tissue and in roots. These results suggest that altered uptake and translocation of glyphosate are mechanisms that contribute to resistance in the R populations of *C. bonariensis*, *C. canadensis*, and *C. sumatrensis*.

Table 19. ¹⁴C glyphosate uptake and translocation in the resistant (R) and susceptible (S) *Conyza bonariensis*, *C. canadensis*, and *C. sumatrensis* populations at 96 h after treatment (HAT).

Species	Population	Uptake ^a	Translocation ^b		
			Treated leaf	Shoot tissue	Roots
<i>C. bonariensis</i>	R	66.1 ± 4.38	91.5 ± 5.40	7.3 ± 2.05	1.2 ± 0.41
	S	88.3 ± 7.69	33.6 ± 4.76	31.1 ± 6.91	35.3 ± 5.52
	<i>P</i> -value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
<i>C. canadensis</i>	R	57.6 ± 3.95	97.3 ± 2.03	1.1 ± 0.19	1.6 ± 0.38
	S	91.4 ± 3.07	31.9 ± 5.44	28.3 ± 2.63	39.8 ± 4.57
	<i>P</i> -value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
<i>C. sumatrensis</i>	R	62.9 ± 4.42	86.1 ± 3.72	11.6 ± 2.28	2.3 ± 0.18
	S	87.1 ± 6.33	20.3 ± 6.89	37.6 ± 5.14	42.1 ± 7.08
	<i>P</i> -value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

Mean value ($n=7$) ± standard error of the mean. Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at $\alpha = 0.05$.

^a % of applied label.

^b % of absorbed label.

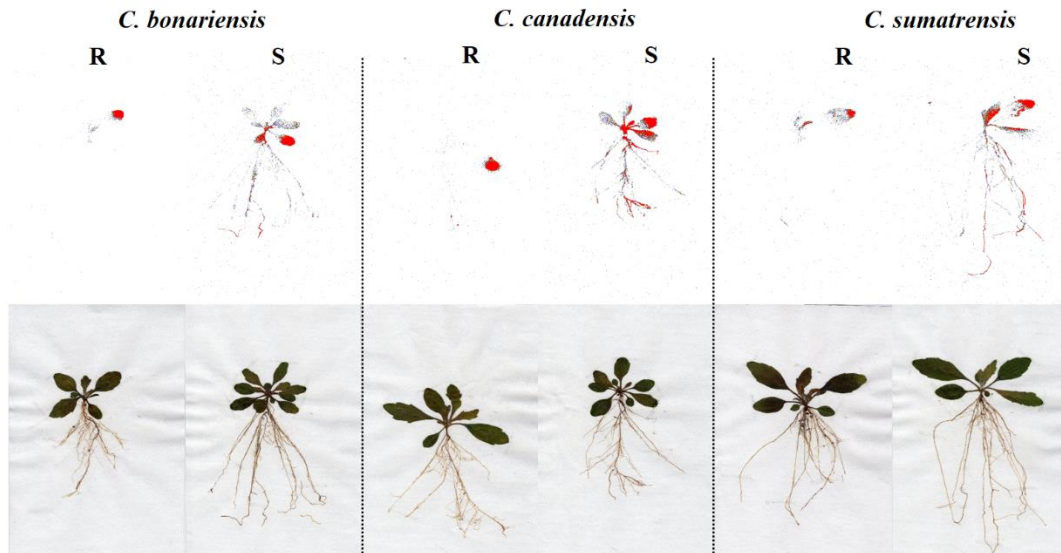


Figure 35. Visible movement of ^{14}C -glyphosate in the R and S populations of the three species of *Conyza* spp. 96 hours after an application to treated leaf.

3.5. Metabolism study

No significant differences between R and S populations were observed in any of the three *Conyza* species in the extent of glyphosate metabolism at 96 HAT (Table 20). At this time, the proportion of glyphosate remaining un-metabolized in plants of R and S populations was 86 and 89% ($P = 0.1833$) in *C. bonariensis*, 87 and 91% ($P = 0.1162$) in *C. canadensis* and 88 and 92% ($P = 0.1321$) in *C. sumatrensis* (Table 20). Some small differences were apparent between R and S populations in AMPA and glyoxylate, but these were probably due to the large amount of un-metabolized herbicide. These results indicate that metabolism is not a mechanism involved in glyphosate resistance in any R population of the studied *Conyza* species.

Table 20. Glyphosate metabolism expressed as a percentage of total glyphosate and their metabolites in the resistant (R) and susceptible (S) *Conyza bonariensis*, *C. canadensis*, and *C. sumatrensis* populations at 96 h after treatment (HAT).

Species	Populations	Glyphosate	Metabolites		
			AMPA	Glyoxylate	Sarcosine
<i>C. bonariensis</i>	R	86.76 ± 5.87	7.89 ± 3.85 A	5.35 ± 2.18	ND
	S	89.58 ± 3.43	4.29 ± 2.87 B	6.13 ± 2.67	ND
	<i>P</i> -value	0.1833	0.0248	0.1102	-
<i>C. canadensis</i>	R	91.16 ± 4.08	6.69 ± 2.76	2.15 ± 0.46 B	ND
	S	87.52 ± 6.44	8.31 ± 2.04	4.17 ± 1.13 A	ND
	<i>P</i> -value	0.1162	0.0605	0.0348	-
<i>C. sumatrensis</i>	R	88.06 ± 6.30	5.49 ± 2.51 A	5.37 ± 1.76	1.08 ± 0.27
	S	92.51 ± 3.18	3.88 ± 1.98 B	3.61 ± 2.82	ND
	<i>P</i> -value	0.1321	0.0343	0.1026	-

Mean value ($n=7$) ± standard error. Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at $\alpha = 0.05$.

ND= non-detected

AMPA=aminomethylphosphonic acid

3.6. EPSPS enzyme activity assays

Contrasting results were found in I_{50} values among the different *Conyza* species (Table 20, Figure 36). The R population of *C. sumatrensis* showed an I_{50} value 7.83-fold higher compared to the S population ($P=0.0001$). However, I_{50} values were only 1.13- and 1.19-fold higher in the R populations of *C. bonariensis* ($P=0.2613$) and *C. canadensis* ($P=0.1764$) compared to the respective S populations. The EPSPS activity in the absence of glyphosate (basal enzyme activity) revealed no significant differences between R and S populations of *C. bonariensis* ($P=0.1941$), *C. canadensis* ($P=0.2053$), and *C. sumatrensis* ($P=0.1426$) (Figure 36). These results suggest that a TSR mechanism is involved in the resistant behavior of the R population of *C. sumatrensis*. Contrastingly, no significant differences between the R and S populations of *C. bonariensis* and *C. canadensis* in both I_{50} and basal enzyme activity values indicate that TSR was not contributing to resistance in the studied R populations of these species.

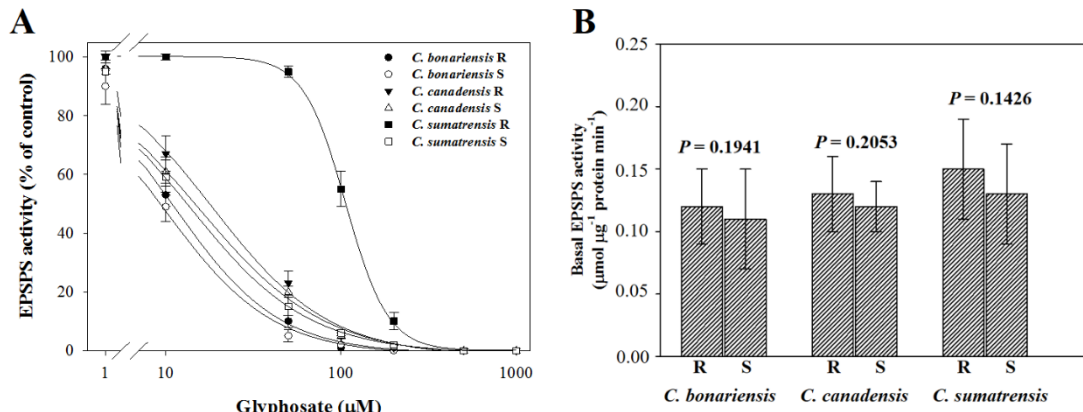


Figure 36. EPSPS enzyme activity expressed as a percentage of the untreated control in the R and S populations of the three species of *Conyza* spp. Values represent mean ($n=5$) and vertical bars represent \pm standard errors (A). EPSPS activity for R and S populations of the three species of *Conyza* spp. was estimated in the absence of glyphosate. Histograms represent treatment means \pm standard errors of the mean ($n=5$) (B).

3.7. EPSPS gene sequence

The sequence of the EPSPS2 gene revealed no amino acid substitution either at Pro-106 or at Thr-102 positions in R and S populations of *C. bonariensis* and *C. canadensis* (Figure 37). However, in plants of the R population of *C. sumatrensis*, the amino acid substitution Pro-106-Thr was observed (Figure 37). These results, in conjunction with the patterns of ¹⁴C-glyphosate uptake and translocation and EPSPS enzyme activity, indicate that NTSR mechanisms explain resistance in *C. bonariensis* and *C. canadensis*, whereas both NTSR and TSR mechanisms contribute to resistance in *C. sumatrensis*.

Amino acid location	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
Consensus sequence	Asn	Ala	Gly	Thr	Ala	Met	Arg	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	Val	Thr
	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Conyza sumatrensis</i> (AAY40474.1)	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Conyza sumatrensis</i> R	N	A	G	T	A	M	R	T	L	T	A	A	V	T
<i>Conyza sumatrensis</i> S	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Conyza canadensis</i> (CCB84815.1)	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Conyza canadensis</i> R	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Conyza canadensis</i> S	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Conyza bonariensis</i> (ABQ00962.1)	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Conyza bonariensis</i> R	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Conyza bonariensis</i> S	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Zea mays</i> (X63374.1)	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Bidens pilosa</i> (APA23035.1)	N	A	G	I	A	M	R	S	L	T	A	A	V	T
<i>Eleusine indica</i> (CAD01096.1)	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Eleusine indica</i> (CAD01095.1)	N	A	G	T	A	M	R	S	L	T	A	A	V	T
<i>Amaranthus palmeri</i> (FJ861243.1)	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T
<i>Amaranthus palmeri</i> (FJ861242.1)	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A	V	T

Figure 37. Partial sequence of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) DNA isolated from the R and S populations of the three species of *Conyza* spp.

3.8. Herbicide-based control alternatives

Field responses of R populations of *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis* to the different herbicide treatments tested indicate high injury and effectiveness in most cases (Table 21). Farmers consider a minimum 80-85% control necessary for satisfactory weed control. As we expected, glyphosate-only treatments did not result in high control effectiveness, with 42.5, 40.0 and 41.2% of relative cover reduction for R populations of *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis*, respectively, in the last study year (2016). These results confirm farmers' claims regarding their inability to control *Conyza* populations using glyphosate-only treatments. In all fields, the flazasulfuron+glyphosate and iodosulfuron+diflufenican+glyphosate treatments resulted in the best satisfactory control of the standing R populations (Table 21). In addition, the glufosinate, 2,4-D+glyphosate and fluroxypyr+glyphosate treatments revealed a satisfactory control, although in some cases they were not significantly as good as the two best treatments mentioned above. For *C. canadensis*, the effectiveness of pyraflufen was not significantly different compared to the best treatments. However, the effectiveness of this treatment was lower for the populations of the two other *Conyza* species (Table 21). Finally, the effectiveness of MCPA+glyphosate treatments was the lowest for all species.

As for control of standing populations, effectiveness in terms of reduction of seed production of surviving plants was highest for the flazasulfuron+glyphosate and iodosulfuron+diflufenican+glyphosate treatments, with the latter being the only treatment preventing seed production of surviving plants for the three *Conyza* species. These two treatments have in common the use of a herbicide with ALS mode of action. Also, herbicides with hormonal mode of action, i.e., 2,4-D, fluroxypyr and MCPA in combination with glyphosate, exhibited a satisfactory seed bank reduction (Table 21). For most tested treatments, effects on reduction of the standing populations paralleled effects on reduction of seed production. However, for glufosinate and pyraflufen-ethyl, both contact herbicides, effectiveness in reducing soil cover did not appear to be a good indicator of reduction of seed production. For the three R populations, surviving plants to these herbicides exhibited in general the lowest reductions in seed production among the tested treatments, apart from glyphosate (Table 21).

Table 21. Effectiveness in reducing standing R populations and seed production of surviving plants of the different herbicide treatments that were tested during three years for in situ control in the glyphosate-resistant *C. bonariensis*, *C. canadensis*, and *C. sumatrensis*.

Species	Active ingredient	Effectiveness in reducing the standing population (soil cover reduction relative to untreated plots, %) ^a			Effectiveness in reducing seed production (mean reduction relative to untreated plots, %) ^b
		2014	2015	2016	
<i>C. bonariensis</i>	glyphosate	27.5 C	32.5 C	42.5 D	32.0
	glufosinate	90.0 AB	95.0 A	90.0 AB	64.7
	fluroxipir + glyphosate	91.2 AB	88.7 AB	92.5 A	80.0
	iodosulfuron + diflufenican + glyphosate	93.7 A	97.5 A	92.5 A	100.0
	2,4-D + glyphosate	86.2 AB	92.5 A	87.5 AB	88.0
	flazasulfuron + glyphosate	97.5 A	92.5 A	90.0 AB	100.0
	MCPA + glyphosate	76.2 B	81.2 B	72.5 C	78.0
	pyraflufen-ethyl	81.2 AB	82.5 B	78.7 BC	66.7
<i>C. canadensis</i>	glyphosate	38.7 E	35.0 C	40.0 E	36.7
	glufosinate	96.2 AB	90.0 AB	91.2 ABC	70.0
	fluroxipir + glyphosate	83.7 BCD	92.5 AB	85.0 CD	78.0
	iodosulfuron + diflufenican + glyphosate	98.7 A	100.0 A	97.5 A	100.0
	2,4-D + glyphosate	81.2 CD	87.5 AB	88.7 BC	86.0
	flazasulfuron + glyphosate	100.0 A	95.0 AB	95.0 AB	100.0
	MCPA + glyphosate	72.5 D	81.2 B	82.5 D	80.0
	pyraflufen-ethyl	88.7 ABC	86.2 AB	90.0 ABC	72.6
<i>C. sumatrensis</i>	glyphosate	27.5 E	36.2 D	41.2 E	36.0
	glufosinate	90.0 ABC	92.5 AB	93.7 ABC	78.7
	fluroxipir + glyphosate	86.2 BCD	85.0 BC	87.5 BCD	84.7
	iodosulfuron + diflufenican + glyphosate	100.0 A	98.7 A	97.5 A	100
	2,4-D + glyphosate	82.5 CD	88.7 BC	90.0 ABC	89.6
	flazasulfuron + glyphosate	98.7 AB	100.0 A	98.5 A	98.0
	MCPA + glyphosate	76.2 D	80.0 C	78.7 D	78.0
	pyraflufen-ethyl	88.7 ABC	87.5 BC	85.0 CD	70.0

^a Effectiveness was measured 60 days after treatment as soil cover of *Coryza* spp. relative to untreated plots.

^b Effectiveness in reducing seed production was calculated as the product of mean cover reduction by mean seed set of plants surviving treatments. For each column and species, mean percentages of cover reduction followed by the same letter are not statistically different according to the Tukey HSD test following ANOVA.

4. Discussion

For more than two decades, both farmers and the scientific community have remarked on poor herbicide effectiveness because of glyphosate-resistant weeds in fields²⁷. The occurrence of

glyphosate resistance in *Conyza* spp. is not novel². In this study, we characterized the presence of the most frequent TSR and NTSR mechanisms in populations of the three *Conyza* species introduced in southern Spain. We also took the step of identifying the species by molecular markers and carrying out field assays during three seasons to test integrated weed management (IWM) with alternative herbicides.

Control levels attained for the several S populations tested for each *Conyza* species clearly showed that glyphosate is still an useful herbicide when used as part of an IWM scheme. Control failures are often due to applications at too advanced growth stages or to ignoring environmental factors during herbicide use¹⁶. Such situations could lead to possible resistance in a few years. The populations characterized as resistant could be due to these events, numerous applications over successive years, increases in the recommended field dose, and to not changing to another herbicide mode of action²⁸.

According to the Weed Science Society of America (WSSA) and Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), resistance is defined as taking place when LD₅₀ values for a weed population are higher than the recommended field dose, and are backed by the resistance mechanisms involved. Resistance Factors (RFs) can vary for different reasons such as species identity, the greater or lesser susceptibility of S populations used for comparison, the resistance mechanisms involved, and the existence of multiple- or cross-resistance.

GR₅₀ and LD₅₀ values found in this study were in line with previous research on *Conyza* spp.^{5,7,29}. The similar results between R populations could be because the three species are so close, as we found according to the molecular markers. However, at species level, this analysis indicates that the North-American native *C. canadensis* is a taxonomic entity separate from *C. bonariensis* and *C. sumatrensis*, of South American origin, which appear to be more closely related species. At population level, the ISSR markers separated both R and S populations within each *Conyza* species, suggesting that molecular markers can be an adequate and fast tool to detect resistance.

In spite of the similar RFs among species, the R population of *C. sumatrensis* revealed the existence of both NTSR and TSR mechanisms, whereas for *C. bonariensis* and *C. canadensis* only NTSR mechanisms were involved.

Shikimic acid accumulation in leaves increased with glyphosate dose for all the S populations tested, indicating interaction between the herbicide and target enzyme. However, the low accumulation levels in R populations revealed limited interaction of glyphosate with EPSPS, resulting in the observed reduced sensitivity to the herbicide. However, shikimic acid levels do not reveal *per se* the mechanism/s of resistance involved.

Reduced uptake and/or translocation (NTSR) have previously been reported in *Conyza* spp.^{5,7,22,30,31}. These common resistance mechanisms have also been reported in other weeds, including *Bidens pilosa*²⁴, *Sorghum halepense*³², *Lolium multiflorum*³³, *L. perenne*³⁴, and *L. rigidum*¹², among others. Our results show that NTSR mechanisms involving restricted uptake and translocation of glyphosate contribute to glyphosate resistance in the R populations of *C. bonariensis*, *C. canadensis* and *C. sumatrensis*.

Metabolism of glyphosate revealed no contribution to resistance. Although metabolism assays are carried out in many studies in determining resistance, this mechanism appears to be of low importance in glyphosate-resistant weeds. However, in innate glyphosate-tolerant weeds its importance as a responsible mechanism increases³⁵.

Another widely studied, common mechanism of resistance to glyphosate, an EPSPS point mutation at 106 position resulting in amino acid substitution, was only found in the R population of *C. sumatrensis*. To date, no amino acid substitutions have been reported at both 102 and 106 positions in *C. bonariensis* and *C. canadensis*. These results were suggested previously with the levels of EPSPS activity, in which the R population of *C. sumatrensis* was the only population showing significant differences relative to the S population. As a TSR mechanism, amino acid substitutions at position 106 have also been reported many times³⁶⁻⁴¹. Target-site mutation often endows herbicide resistance. There can be strong target-site mutations that confer high-level (>20–100-fold) herbicide resistance, such as various mutations endowing resistance to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting or acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase)-inhibiting herbicides, and weak mutations that provide a marginal level (2–5-fold, as compared with susceptible counterparts) of resistance, such as Pro-106 mutations in the EPSPS gene endowing resistance to glyphosate^{42,43}.

The resistance values observed (8.10-fold for *C. sumatrensis*) in dose response trials may be higher than those reported for Han et al⁴³ when there is this type of mutation due to the combined action of both TSR and NTSR mechanisms. Generally, each of these NTSR mechanisms endows moderate level (4-8 fold the recommended rates) glyphosate resistance⁴⁴. The resistance values obtained for *C. bonariensis* and *C. canadensis* (6.82-, 10.36-fold respectively) are within the range of resistance conferred by a NTSR mechanism, in this case translocation.

Continuous and excessive use of glyphosate for weed control in perennial crops has led to the appearance of R populations of *Conyza* spp., as we have shown in this work. The alternative herbicide treatments tested in the field trials offered high levels of efficacy both in terms of injury to the standing populations and of reduction of seed production. The herbicides tested, with the

exception of 2,4-D, are currently authorized for use in olive groves in Spain, and thus can be incorporated into IWM schemes for control of *Conyza* spp.

Glyphosate in combination with herbicides of different modes of action produced synergy in control effectiveness. Similar results were observed in *L. rigidum*, as reported by Fernandez-Moreno et al¹².

Applications of iodosulfuron or flazasulfuron, both in combination with glyphosate, were revealed as the most effective treatments in terms of control of the standing R populations and reducing seed production of surviving plants. It is important to learn from mistakes made in the past in terms of the exclusive reliance on - and excessive use of - glyphosate, and to not repeat this situation with alternative herbicides, which produce *a priori* excellent results. These herbicides belong to the acetolactate synthase (ALS) inhibiting group, which are prone to developing weed resistance in the short term. In fact, some farmers have begun to report low effectiveness control after continuous use of flazasulfuron during 5 years without any alternative herbicide mode of action. Results of field trials offer farmers different chemical alternatives for weed control at field scale. However, the high capacity of *Conyza* spp. for long distance wind seed dispersal should be taken into account in the design of control strategies of R populations of these species⁴⁵. This means that effectiveness of any control measure cannot be evaluated only in terms of injury effects to standing plants or reductions of seed production in within-field populations. In addition, coordinated actions of neighboring farmers are required to limit the arrival of resistant seeds from extra-field sources⁶, including populations established in adjacent fields and in field and road margins.

5. Conclusion

The results indicate that non-target-site resistant (NTSR) mechanisms explain resistance in *C. bonariensis* and *C. canadensis*, whereas both NTSR and target-site resistant (TSR) mechanisms contribute to resistance in *C. sumatrensis*. Results of *in situ* trials evaluating the effects of alternative herbicide treatments on standing populations and seed production show that promising solutions exist to combat resistance through an IWM. However, this goal can only be achieved through the combined effort of farmers and the scientific community. Unlike other species, the species of the genus *Conyza* spp. are easily dispersed by wind. This means that results in terms of seed production reduction only can be properly interpreted in the actual study fields. Furthermore, there is no total control over resistant phenotypes because new phenotypes, resistant not only to glyphosate but to the modes of action of other herbicides, can become established in these or other fields at any time.

Acknowledgements

We are grateful to Yolanda Romano, Rafael Roldan and Antonio Jesus Garcia-Romero for technical assistance in the completion of this research.

Funding

This work was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2016-78944-R).

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Shaner DL, Lessons learned from the history of herbicide resistance. *Weed Sci* **62**:427-431 DOI: 10.1614/WS-D-13-00109.1 (2014).
2. Heap I, The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org>. Accessed July 19, 2017 (2017).
3. Hammerschmidt R, How glyphosate affects plant disease development: It's more than enhanced susceptibility. *Pest Manag Sci* DOI:10.1002/ps.4521 (2017).
4. González-Torralva F, Brown AP, Chivasa S, Comparative proteomic analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) biotypes identifies candidate proteins for glyphosate resistance. *Sci Rep* **7**: 42565 DOI: 10.1038/srep42565 (2017).
5. Kleinman Z, Rubin B, Non-target-site glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* is based on modified subcellular distribution of the herbicide. *Pest Manag Sci* **73**:246-253 DOI: 10.1002/ps.4293 (2017).
6. Dauer JT, Mortensen DA, Vangessel MJ, Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. *J Appl Ecol* **44**:105-114 DOI: 10.1111/j.1365-2664.2006.01256.x (2007).
7. González-Torralva F, et al., First evidence for a target site mutation in the EPSPS2 gene in glyphosate-resistant Sumatran fleabane from citrus orchards. *Agron Sustain Dev* **34**:553 DOI:10.1007/s13593-013-0163-8 (2014).
8. Fernández P, Alcántara R, Osuna MD, Vila-Aiub MM, Prado R, Forward selection for multiple resistance across the non-selective glyphosate, glufosinate and oxyfluorfen herbicides in *Lolium* weed species. *Pest Manag Sci* **73**:936-944 DOI:10.1002/ps.4368 (2017).
9. Beckie HJ, Harker KN, Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. *Pest Manag Sci* **73**:1045-1052 DOI: 10.1002/ps.4543 (2017).

10. Sammons RD, Gaines TA, Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Manag Sci* **70**:1367–1377 DOI: 10.1002/ps.3743 (2014).
11. Yuan JS, Tranel PJ, Stewart CN, Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci* **12**:6-13 (2007).
12. Fernández-Moreno PT, Bastida F, De Prado R, Evidence, mechanism and alternative chemical seedbank-level control of glyphosate resistance of a rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype from southern Spain. *Front Plant Sci* **8**:450 DOI: 10.3389/fpls.2017.00450 (2017).
13. Gherekhloo J, Fernández-Moreno PT, Alcántara-de la Cruz R, Sánchez-González E, Cruz-Hipolito HE, Dominguez-Valenzuela JA, De Prado R, Pro-106-Ser mutation and EPSPS overexpression acting together simultaneously in glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*). *Sci Rep* DOI : 10.1038/s41598-017-06772-1 (2017).
14. Dominguez-Valenzuela JA, Gherekhloo J, Fernández-Moreno PT, Cruz-Hipolito HE, Alcántara-de la Cruz R, Sánchez-González E, De Prado R, First confirmation and characterization of target and non-target site resistance to glyphosate in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) from Mexico. *Plant Physiol Biochem* **115**:212-218 DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.03.022 (2017).
15. Yu Q, Jalaludin A, Han H, Chen M, Sammons RD, Powles SB, Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. *Plant Physiol* **167**:1440–1447 DOI: 10.1104/pp.15.00146 (2015).
16. Bracamonte E, Fernández-Moreno PT, Barro F, De Prado R, Glyphosate-resistant *Parthenium hysterophorus* in the Caribbean islands: Non target site resistance and target site resistance in relation to resistance levels. *Front Plant Sci* **7**:1845 DOI:10.3389/fpls.2016.01845 (2016).
17. Délye C, Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Manag Sci* **69**:176–187 DOI:10.1002/ps.3318 (2013).
18. Hanson BD, Shrestha A, Shaner DL, Distribution of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) and relationship to cropping systems in the central valley of California. *Weed Sci* **57**:48–53 DOI: 10.1614/WS-08-103.1 (2009).
19. Rojano-Delgado AM, Ruiz-Jiménez J, De Castro MDL, De Prado R, Determination of glyphosate and its metabolites in plant material by reversed-polarity CE with indirect absorptiometric detection. *Electrophoresis* **31**:1423–1430 DOI: 10.1002/elps.200900583 (2010).

20. Dayan FE, Owens DK, Corniani N, Lima-Silva FM, Watson SB, Howell JL, et al, Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. *Weed Sci* Special Issue 23–63 DOI: 10.1614/WS-D-13-00063.1 (2015).
21. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254 DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3 (1976).
22. Dinelli G, Marotti I, Bonetti A, Minelli M, Catizone P, Barnes J, Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pestic Biochem Physiol* **86**:30-41 DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.01.004 (2006).
23. Kaundun SS, Dale RP, Zelaya IA, Dinelli G, Marotti I, Mcindoe E, A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum*. *J Agric Food Chem* **59**:3227-3233 DOI: 10.1021/jf104934j (2011).
24. Alcántara-de la Cruz R, Fernández-Moreno PT, Ozuna CV, Rojano-Delgado AM, Cruz-Hipolito HE, Domínguez-Valenzuela JA, Barro F, De Prado R, Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant Hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. *Front Plant Sci* **7**:1492 DOI: 10.3389/fpls.2016.01492 (2016).
25. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D, Dose-response analysis using R. PLoS ONE 10:e0146021 DOI:10.1371/journal.pone.0146021 (2015).
26. R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available online at: [https:// www.R-project.org/](https://www.R-project.org/) (2017).
27. Norsworthy JK, Ward SM, Shaw DR, Llewellyn RS, Nichols RL, Webster TM, Bradley KW, Frisvold G, Powles SB, Burgos NR, Witt WW, Barrett M, Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. *Weed Sci* **60**:31-62 DOI: 10.1614/WS-D-11-00155.1 (2012).
28. Alcantara R, Fernandez P, Smeda RJ, Alves PL, De Prado R, Response of *Eleusine indica* and *Paspalum distichum* to glyphosate following repeated use in citrus groves. *Crop Prot* **79**:1-7 DOI: 10.1016/j.cropro.2015.09.027 (2016).
29. Moretti ML, Hanson BD, Reduced translocation is involved in resistance to glyphosate and paraquat in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* from California. *Weed Res* DOI: 10.1111/wre.12230 (2017).
30. Feng PC, Tran M, Chiu T, Sammons RD, Heck GR, CaJacob CA, Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Sci* **52**:498-505 DOI: 10.1614/WS-03-137R (2004).

31. Koger CH, Reddy KN, Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci* **53**:84-89 DOI: 10.1614/WS-04-102R (2005).
32. Vila-Aiub MM, Gundel PE, Yu Q, Powles SB, Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. *Pest Manag Sci* **69**:228–232 DOI:10.1002/ps.3464 (2013).
33. Michitte P, De Prado R, Espinoza N, Ruiz-Santaella JP, Gauvrit C, Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Sci* **55**:435–440 DOI: 10.1614/WS-06-167.1 (2007).
34. Ghanizadeh H, Harrington KC, James TK, Woolley DJ, Ellison NW, Mechanisms of glyphosate resistance in two perennial ryegrass (*Lolium perenne*) populations. *Pest Manag Sci* **71**:1617–1622 DOI: 10.1002/ps.3968 (2015).
35. Fernández-Moreno PT, Alcantara-de la Cruz R, Cruz-Hipólito HE, Rojano-Delgado AM, Travlos I, De Prado R, Non-target site tolerance mechanisms describe tolerance to glyphosate in *Avena sterilis*. *Front Plant Sci* **7**:1220 DOI: 10.3389/fpls.2016.01220 (2016).
36. Kaundun SS, Zelaya IA, Dale RP, Lycett AJ, Carter P, Sharples KR, McIndoe E, Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Sci* **56**:637-646 DOI: 10.1614/WS-07-148.1 (2008).
37. Gonzalez-Torralva F, Gil-Humanes J, Barro F, Brants I, De Prado R, Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. *Plant Physiol Biochem* **58**:16–22 DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.06.001 (2012).
38. de Carvalho LB, Alves PLDCA, González-Torralva F, Cruz-Hipolito HE, Rojano-Delgado AM, De Prado R, Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *J Agric Food Chem* **60**:615–622 DOI: 10.1021/jf204089d (2012).
39. Bell MS, Hager AG, Tranel PJ, Multiple resistance to herbicides from four site-of-action groups in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Sci* **61**:460-468 DOI: 10.1614/WS-D-12-00166.1 (2013).
40. Fernandez P, Gauvrit C, Barro F, Menendez J, De Prado R, First case of glyphosate resistance in France. *Agron Sustain Dev* **35**:1469-1476 DOI: 10.1007/s13593-015-0322-1 (2015).
41. Alarcón-Reverte R, García R, Watson SB, Abdallah I, Sabaté S, Hernández MJ, et al., Concerted action of target-site mutations and high EPSPS activity in glyphosate-resistant

- junglerice (*Echinochloa colona*) from California. *Pest Manag Sci* **71**:996-1007 DOI: 10.1002/ps.3878 (2015).
42. Powles SB, Yu Q, Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu Rev Plant Biol* **61**:317–347 (2010).
43. Han H, Yu Q, Widderick MJ, Powles SB, Target-site EPSPS Pro-106 mutations: sufficient to endow glyphosate resistance in polyploid *Echinochloa colona*?. *Pest Manag Sci* **72**: 264-271 (2016).
44. Yu Q, Jalaludin A, Han H, Chen M, Sammons RD, Powles SB. Evolution of a double amino acid substitution in the EPSP synthase in *Eleusine indica* conferring high level glyphosate resistance. *Plant Physiology*, doi: 10.1104/pp.15.00146 (2015).
45. Thébaud C, Abbott RJ, Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. *Am J Bot* **82**:360-368 (1995)

Artículo de impacto publicado en 2019

Capítulo 2.2. Selection for glyphosate resistance in *Conyza* spp occurring in the railway network of the Southern Spain

Ignacio Amaro-Blanco^{1,*}, María D. Osuna¹, Yolanda Romano¹, Rafael Roldan-Gomez², Candelario Palma-Bautista², João Portugal³, Rafael de Prado²

¹Department of Horticultural Sciences, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura, Ctra. A-V, Km 372, 06187 Guadajira, Badajoz, 06187, mdosuna@gmail.com

²Department of Agricultural Chemistry and Soil Science, University of Cordoba, Campus Rabanales, Edificio Marie Curie - Ctra. Nacional IV-Km 396, 14071, ge1pramr@uco.es

³IPB Escola Superior Agrária de Beja, 7800-295 Beja, Portugal, jportugal@ipbeja.pt.

*Correspondence: iamaroblanco@gmail.com, Tel: +34924014092

Can. J. Plant Sci. 2019, DOI 10.1139/CJPS-2018-0254

Selection for glyphosate resistance in *Conyza* spp occurring in the railway network of the Southern Spain

Ignacio Amaro-Blanco^{1,*}, María D. Osuna¹, Yolanda Romano¹, Rafael Roldan-Gomez²,
Candelario Palma-Bautista², João Portugal³, Rafael de Prado²

¹ Department of Horticultural Sciences, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura, Ctra. A-V, Km 372, 06187 Guadajira, Badajoz, 06187, mdosuna@gmail.com.

² Department of Agricultural Chemistry and Soil Science, University of Cordoba, Campus Rabanales, Edificio Marie Curie - Ctra. Nacional IV-Km 396, 14071, qe1pramr@uco.es.

³ IPB Escola Superior Agrária de Beja, 7800-295 Beja, Portugal, jportugal@ipbeja.pt.

* Correspondence: iamaroblanc@gmail.com, Tel: +34924014092

Abstract: *Conyza* are broadleaf weeds that occur in many crops but are also common non-crop systems such as roadsides and railways. *Conyza* have selected for glyphosate resistance along railway tracks from the Southern Spain, due to the misuse of this herbicide and the high seed dispersal rate of these species. Twenty-three samples of the genus *Conyza* (11 *C. canadensis* and 12 *C. bonariensis*) were collected from the margins of railways in different routes of Andalusia railway network running adjacent to nearby crop fields. Glyphosate resistance level of the *Conyza* populations was evaluated through GR₅₀ (rate causing 50% growth reduction) and resistance factor (RF) in every population collected. The highest GR₅₀ were 1851.2 g a.e. ha⁻¹ (RF=52.53) in *C. canadensis* (Malaga-Cordoba route) and 1972.4 g a.e. ha⁻¹ (RF=35.20) in *C. bonariensis* (Seville-Cordoba route) and the lowest were 46.9 g a.e. ha⁻¹ (RF=1.33) in *C. canadensis* (Seville-Cordoba route) and 23.2 g a.e. ha⁻¹ (RF=0.41) in *C. bonariensis* (Seville-Cordoba route). Results showed that, among all the *C. canadensis* populations collected, 18.2% were glyphosate-resistant (RF>10), 45.5% showed tendency to develop resistance (RF 2.5-5) and 36.4% were susceptible (RF<2.5). Of the 25% of *Conyza bonariensis* populations had resistance to glyphosate, 16.7% had a moderate resistance (RF 5-10), and 58.3% were susceptible. This study found that there are already glyphosate-resistant *Conyza* spp. along the railway network in Southern Spain. This could lead to a possible seed exchange between railway and adjacent places. Therefore, it is vital to consider the railway network when planning control measures against resistance.

Keywords: *Conyza*, glyphosate, resistance, neighboring crop, railway, growth rate 50.

Introduction

The *Conyza* genus includes broadleaf weeds belonging to the *Asteraceae* family. These weeds compete with crops in olive and fruit orchards and are important problems worldwide (Davis and Johnson 2008). There are at least 50 known species (Sansom et al. 2013), but only hairy fleabane (*Conyza bonariensis*), horseweed (*Conyza canadensis*) and Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*) have been described in Spain (González-Torralva et al. 2010). These problematic, noxious, invasive and widespread weed species can cause 28-68% yield loss in field crops (Bajwa et al. 2016). The increasing economic impact of *Conyza* spp. is caused by two main factors: 1) long distance seed dispersal and, 2) intensive use of herbicides for its control, encouraging the selection of resistant populations (Norsworthy et al. 2012). Reproduction of *Conyza* spp. is exclusively by seeds. *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* species are self-fertilized and insect pollinated (Tozzi et al. 2014) and produce large number of seeds that are easily dispersed by wind (Shields et al. 2006). These seeds rapidly colonize field borders, roadsides and industrial sites (Khan et al. 2013). Shields et al. (2006) reported that the seeds can reach heights over 141 m above ground level and travel distances of up to 500 km with the help of the wind. The height and distance of seed movement of this weed increase the potential for herbicide resistance movement.

One of the main herbicides used to control *Conyza* spp. is glyphosate, which has become the world's most widely used herbicide because it is effective, economical and environmentally benign (Dill et al. 2008; Duke and Powles 2008). Today, a major use of glyphosate is weed control in orchards and vineyards as well as in weeds on railway tracks that have to be removed to maintain track and to ensure safe passage of railway traffic (Torstensson et al. 2005). Since the first use of glyphosate in 1974, evolved resistance to glyphosate has been reported 302 times in 43 weed species worldwide (Heap 2018). Within the *Conyza* genus, 61 cases of glyphosate-resistance have been described for its three most common species (Heap 2018); 13 cases in hairy fleabane, 42 in horseweed and 6 in Sumatran fleabane. Glyphosate has also been used worldwide to control weeds in non-agricultural areas such as roadsides, railway lines and recreation areas (González-Torralva et al. 2012, Urbano et al. 2007, Powles 2008). To date, 23 glyphosate-resistant *Conyza* spp cases in non-crop areas have been described: 9 in *C. bonariensis*, 12 in *C. canadensis* and 2 *C. sumatrensis* (Heap 2018). As such, non-crop areas, such as railways, can be important sources for glyphosate resistant weeds, particularly if glyphosate is used for weed control in these areas (Yoshimura et al. 2006). Weed surveys in railroad beds are necessary to know the progress of the infestation process. They also help the development and implementation of weed management plans (Rankins et al. 2005; Korres et al. 2015).

The use of glyphosate or other herbicides on railway embankments or roads close to cropland could result in a lack of control of glyphosate-resistant weeds (Yoshimura et al. 2006).

The main goal of this work was to document the presence of glyphosate-resistant *Conyza* spp. along the railway network in Southern Spain by calculating the glyphosate rate providing a reduction in aboveground weed biomass by 50% (GR₅₀) and the resistance factor (RF) by species.

Materials and Methods

Plant material and growing conditions

A survey was conducted during June-July of 2015 and 2016 on Andalusian railways starting from Cordoba city to other places in the same region: Cordoba-Seville, Cordoba-Málaga and Cordoba-Jaén (Figure 38). Adjacent to these railways were fruit, almond orchards crop fields such as wheat and corn. *Conyza bonariensis* and *C. canadensis* seeds were collected from 23 different locations in the route described above, being 12 populations *C. bonariensis* and 11 populations *C. canadensis* (Table 22). Molecular identification, previously described by Amaro-Blanco et al. (2018), was used to confirm the visual classification carried out during sampling (as double confirmation) in order to sort the populations by species. Seeds from each population were collected from one single plant and used for the assays described below. The pattern for choosing every area was that the location had to have a crop land next to the railways. The locations are shown in Table 1.

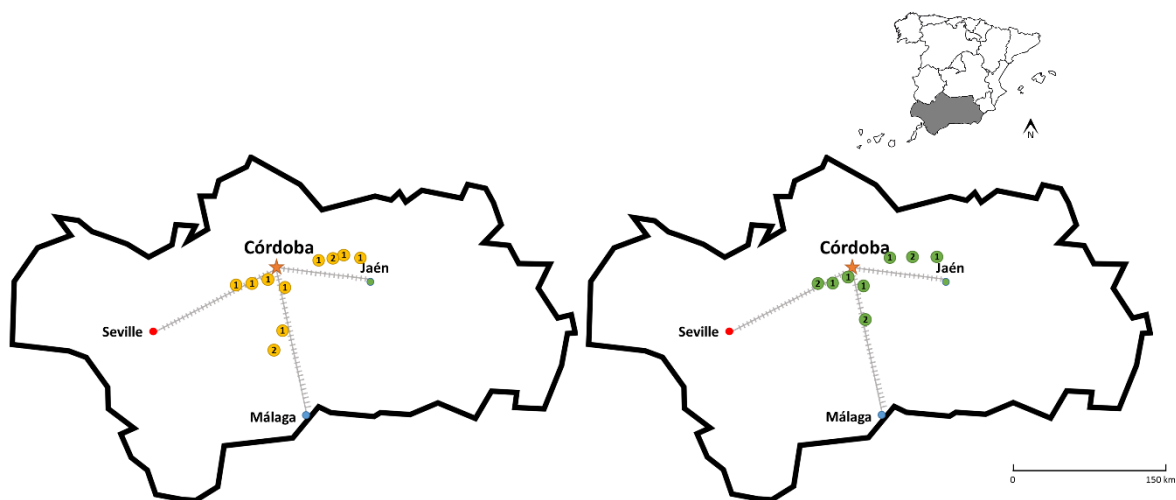


Figure 38. Representation of the *Conyza* spp. samples collected at each point in Andalusia. On the left *C. bonariensis* and on the right *C. canadensis*. Numbers refer to the number samples collected at every location.

Table 22. Species, location and coordinates of every collected population

Sample	Species	Location	Latitude (N)	Longitude (W)	Crop field Near
UCO_5	<i>C. canadensis</i>	Posadas	37°47'49.6"	5°09'02.9"	Olive
UCO_10	<i>C. canadensis</i>	Posadas	37°47'44.8"	5°09'17.2"	Olive
UCO_12	<i>C. canadensis</i>	Posadas	37°47'44.8"	5°09'18.2"	Olive
UCO_14	<i>C. canadensis</i>	Almodovar	37°47'43.4"	4°59'47.4"	Corn
UCO_16	<i>C. canadensis</i>	Almodovar	37°47'44.1"	4°59'46.8"	Corn
UCO_33	<i>C. canadensis</i>	S. Cruz	37°46'15.2"	4°40'44.7"	Olive
UCO_35	<i>C. canadensis</i>	S. Cruz	37°46'17.1"	4°40'46.9"	Olive
UCO_37	<i>C. canadensis</i>	Montoro	37°59'46.8"	4°24'27.9"	Olive
UCO_47	<i>C. canadensis</i>	S. Julian	38°00'02.7"	4°11'37.7"	Orchard
UCO_49	<i>C. canadensis</i>	S. Julian	38°00'18.9"	4°10'45.0"	Corn
UCO_51	<i>C. bonariensis</i>	S. Julian	38°00'20.0"	4°10'43.8"	Corn
UCO_57	<i>C. bonariensis</i>	Villa del Rio	37°59'22.3"	4°19'22.5"	Olive
UCO_63	<i>C. canadensis</i>	Fontanar de Quintos	37°50'22.8"	4°49'46.0"	Wheat
UCO_65	<i>C. bonariensis</i>	Fontanar de Quintos	37°50'21.8"	4°49'47.0"	Wheat
UCO_73	<i>C. bonariensis</i>	Pte. Genil	37°24'44.8"	4°41'39.3"	Olive
UCO_82	<i>C. bonariensis</i>	Riguelo	37°15'51.7"	4°46'19.8"	Olive
UCO_86	<i>C. bonariensis</i>	Casariche	37°16'31.2"	4°46'05.2"	Olive
UCO_92	<i>C. bonariensis</i>	Aguilar	37°31'38.1"	4°39'26.1"	Grape
UCO_98	<i>C. bonariensis</i>	Aguilar	37°31'21.6"	4°39'50.9"	Grape
UCO_108	<i>C. bonariensis</i>	Vva. de la Reina	38°00'07.9"	3°54'50.6"	Olive
UCO_110	<i>C. bonariensis</i>	Vva. de la Reina	38°00'08.1"	3°54'53.1"	Olive
UCO_114	<i>C. bonariensis</i>	Andujar	38°01'40.2"	4°04'41.1"	Cotton
UCO_116	<i>C. bonariensis</i>	Marmolejo	38°01'30.7"	4°09'35.2"	Olive

Seeds of each population were sown in 15 x 15 x 4.5 cm wide/long/high pots that were filled with peat and covered with transparent film until plant emergence. The seedlings (at dicotyledon stage) were then transplanted individually to 7 x 7 x 7 cm pots filled with 1:1 (v/v) peat–sand mix and placed in growth chambers at 28/18 °C (day/night) with a photoperiod of 16 h, 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux, and 80% relative humidity. The plants were then irrigated over the top up to field capacity on a daily basis and supplied with no fertilizer.

Dose-response assays with glyphosate

The collected populations of *C. canadensis* and *C. bonariensis* were treated with different rates of glyphosate at 4-6 leaf rosette stage (Hess et al. 1997) in a laboratory spray chamber (SBS-060 DeVries Manufacturing) equipped with 8002 flat fan nozzles delivering 200 L ha⁻¹ at 200 kPa at a height of 50 cm. The evaluated rates of glyphosate (Roundup®, 360 g ae L⁻¹ as isopropylamine salt; Monsanto, Spain) were: 0, 31, 63, 125, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 g ae ha⁻¹. The experiment was arranged in a completely randomized design using five replicates per rate. The glyphosate dose required to reduce the fresh weight of plants by 50% (GR₅₀) was determined 28 days after treatment (DAT). Data were expressed as a percentage of fresh weight compared to untreated control plants following Cruz-Hipolito et al. (2011).

To characterize glyphosate resistance/susceptibility, one susceptible (S) *Conyza* population for each species was chosen as representative for susceptibility to glyphosate. The Resistant Factor was determined by dividing the GR₅₀ of each biotype by the GR₅₀ of the chosen susceptible (S) biotype. We used a scale (Du et al. 2016) to assess the level of resistance: a RF below 2.5 indicated susceptibility, a RF between 2.5 and 5 a likelihood of resistance development, a RF between 5 and 10 moderate resistance, and an RF above 10 high resistance to glyphosate.

Data analysis

Dose response data were subjected to nonlinear regression analysis using a four-parameter log-logistic model to determine the herbicide dose resulting in a 50% reduction in growth (GR₅₀)

$$f(x) = c + \frac{d-c}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))} \quad (1)$$

where $f(x)$ is reduction of above-ground weight expressed as percentage of the non-treated control; c and d are the lower and the upper asymptote, respectively; b is the slope of the line around the inflection point; g is the GR₅₀; and x (independent variable) is the herbicide rate. Regression analysis was conducted by using the drc package (Ritz et al. 2015) for the statistical environment R (Team 2017). 95% confidence intervals for each GR₅₀ were calculated with the same software to compare values within each section.

Results and discussion

Dose-response assay with glyphosate

The collected samples were sorted by area (Seville-Cordoba, Malaga-Cordoba and Jaen-Cordoba) and species (*C. canadensis* and *C. bonariensis*). The estimated GR₅₀ values, and the corresponding RF values, for each population divided by route and species are shown in Table 23 (*C. canadensis*) and Table 24 (*C. bonariensis*).

Table 23. Parameters of the log-logistic equations ^a used to calculate the glyphosate rates (g ae ha⁻¹) required for reduction fresh weight by 50% (GR₅₀) and the distance in km of the populations for *C. canadensis*.

Section	samples	c	d	b	GR ₅₀ (95% CI) ^b	P	RF ^c
Seville-Cordoba	UCO_10	1.98	99.96	1.03	46.9 (9.56)	<0.0001	1.33
	UCO_5	5.28	95.12	5.24	1340.0 (13.64)	<0.0001	30.28
	UCO_16	1.71	93.23	2.39	144.2 (10.88)	<0.0001	4.09
	UCO_63	0.11	102.15	1.97	118.0 (4.58)	<0.0001	3.34
Malaga-Cordoba	UCO_98	-5.30	100.19	1.77	1851.2 (6.88)	<0.0001	52.53
	UCO_92	1.83	98.88	2.28	66.1 (8.31)	<0.0001	1.87
	UCO_33	1.96	96.98	2.35	115.4 (12.19)	<0.0001	3.27
Jaen-Cordoba	UCO_110	0.92	101.20	2.39	75.7 (7.70)	<0.0001	2.20
	UCO_116	0.89	96.62	2.89	125.2 (6.21)	<0.0001	3.55
	UCO_49	4.41	100.04	3.43	63.9 (8.82)	<0.0001	1.82
	UCO_37	0.94	99.09	1.82	163.6 (6.85)	<0.0001	4.63
<i>C. canadensis</i> (S)		1.33	100.25	1.23	35.2	-	-

^a $f(x) = c + \frac{d-c}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))}$ where f(x): is reduction of above-ground weight expressed as percentage of the non-treated control; c and d are the lower and the upper asymptote, respectively; b is the slope of the line around the inflection point; g is the GR₅₀; and x (independent variable) is the herbicide rate.

^b CI values are the 95% limits of confidence intervals (n = 16).

^c RF calculated with the formula: GR₅₀ UCO_ /GR₅₀ susceptible

Table 24. Parameters of the log-logistic equations ^a used to calculate the glyphosate rates (g ae ha⁻¹) required for reduction fresh weight by 50% (GR₅₀) and the distance in km of the populations for *C. bonariensis*

Section	samples	c	d	b	GR ₅₀ (95% CI) ^b	P	RF ^c
Seville-Cordoba	UCO_12	-3.52	95.49	2.12	1972.4 (10.84)	<0.0001	35.20
	UCO_14	0.79	99.98	1.09	452.6 (14.23)	<0.0001	8.07
	UCO_65	1.10	99.98	0.68	23.2 (7.12)	<0.0001	0.41
Malaga-Cordoba	UCO_82	0.70	99.98	0.99	23.9 (5.94)	<0.0001	0.44
	UCO_86	1.70	103.32	1.51	87.0 (4.72)	<0.0001	1.55
	UCO_73	-3.24	102.04	1.21	410.3 (14.27)	<0.0001	7.32
	UCO_35	-2.63	102.09	1.13	340.4 (10.85)	<0.0001	6.07
Jaen-Cordoba	UCO_108	5.34	100.15	1.49	25.3 (5.94)	<0.0001	0.45
	UCO_114	5.89	94.05	2.23	890.2 (13.15)	<0.0001	15.45
	UCO_51	4.97	100.13	1.51	57.6 (10.25)	<0.0001	1.02
	UCO_47	0.45	100.03	1.79	44.7 (6.77)	<0.0001	0.79
	UCO_57	1.16	100.00	1.03	25.0 (6.48)	<0.0001	0.44
<i>C. bonariensis</i> (S)		-3.25	99.59	0.09	56.0 (8.99)	-	-

^a $f(x) = c + \frac{d-c}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))}$ where f(x): is reduction of above-ground weight expressed as percentage of the non-treated control; c and d are the lower and the upper asymptote, respectively; b is the slope of the line around the inflection point; g is the GR₅₀; and x (independent variable) is the herbicide rate.

^b CI values are the 95% limits of confidence intervals (n = 16).

^c RF calculated with the formula: GR₅₀ UCO_ /GR₅₀ susceptible

All *C. canadensis* populations collected had a higher GR₅₀ than the susceptible population (Table 2). The population with the highest GR₅₀ was found in the Malaga-Cordoba route reaching

a rate of 1851.2 g a.e. ha⁻¹ (UCO_98) and the population UCO_10 was the one with the lowest resistance (46.9 g a.e. ha⁻¹) and was found at Seville-Cordoba route. Amaro-Blanco et al. (2018) described lower GR₅₀ values for glyphosate-resistant *C. canadensis* located in orchards in the same region (Southern Spain), whilst a study in soybean fields in Mississippi by Koger et al. (2004) reported similar GR₅₀ than our most resistant *C. canadensis* population (UCO_98). With regard to *C. bonariensis*, there were several populations with a higher GR₅₀ than the susceptible one. The highest GR₅₀ was found in UCO_12 (1972.4 g a.e. ha⁻¹) in the Seville-Cordoba route and the lowest was found in the same route for UCO_65 (23.2 g a.e. ha⁻¹). Moretti et al. (2016) described much higher GR₅₀ values (>10,000 g a.e. ha⁻¹) for *C. bonariensis* from orchards in California than ours. The GR₅₀ could be higher because they surveyed in places where they expected to find glyphosate-resistant *C. bonariensis* and our survey was done along the railways with no information about which dose of herbicide was used and for how long.

High glyphosate-resistant *Conyza* (RF > 10) was observed in 21.7% of *Conyza* populations collected (18.2% in *C. canadensis* and 25.0% in *C. bonariensis*). Cases of glyphosate-resistant *Conyza* have been reported in systems ranging from non-crop areas such as railways (Chodova et al. 2009; Hamouzová et al. 2012), perennial crops such as vineyards (Hanson et al. 2009), and annual crops such as corn and cotton (Steckel et al. 2006; Steckel and Gwathmey 2009). The GR₅₀ of the populations collected for our study were higher than the herbicide doses used by the farmers to control *Conyza* spp. in the neighboring crop fields (data not shown). Repeated low-rate applications, applications outside of the label recommendations, and lack of tillage have been identified as possible factors contributing to higher resistance values (Dubois and Plancke 2010).

A RF between 5 and 10 indicated a moderate resistance following the method by Du et al. (2016). The 8.7% of the populations collected showed this level of resistance (0% in *C. canadensis* and 16.7% in *C. bonariensis*). The likelihood of developing resistance (RF between 2.5 and 5) was 21.7% (45.5% in *C. canadensis* and 0% in *C. bonariensis*). 47.8% of the populations collected (36.4% in *C. canadensis* and 58.3% in *C. bonariensis*) were susceptible (RF < 2.5). Therefore, these results indicate that there are already *Conyza* spp. populations with high and moderate resistance to glyphosate occurring along railway networks in southern Spain.

Both *Conyza* species have a high tendency to disperse, but it is particularly important to be cautious with *C. bonariensis* seed production because it is much higher than in *C. canadensis* (Bajwa et al. 2016). This study supports this fact in the way that there are more glyphosate-resistant *C. bonariensis* (high and moderate resistance) than in the case of *C. canadensis*. This high dispersion increases the chance to have more glyphosate-resistant *Conyza* spp. along the railway network and it will be damaging to neighboring crop fields because of the easy transport of *Conyza*

spp. seeds by wind (Dauer et al. 2005; Shields et al. 2006). Because of this, we have to take care about the possibility of a seed exchange between railway and neighboring areas (both crop and non-crop areas) as it is indicated by Schoenenberger y D'Andrea (2012), and we observed with similar GR₅₀ values in areas close to the collected populations (data not shown).

A general absence of weed removal or other means of weed control along the railways, coupled with the misuse of glyphosate (Bain et al. 2017) when the *Conyza* have left the rosette state, allows the weeds to complete their life cycle and annually replenish the seed bank. The same as in crop fields, an appropriate and rational use of herbicides with multiple effective modes of action combined with non-chemical tools along railways is required to avoid creating resistant populations that spread easily.

In conclusion, along the railway network in Southern Spain were identified *Conyza* species distinguishing between *C. canadensis* and *C. bonariensis*. As we reported in this study, even in railways glyphosate-resistant *Conyza* can be found as GR₅₀ values confirmed this resistance. This resistance was classified according to the RF values showing that there are *Conyza* spp. with high and moderate resistance and other populations that may become resistant in the near future. The occurrence of resistance in other terrestrial ways of communication, is ignored most of the time as a source of resistance. As a result, it is very important to consider the railway network when planning control measures to avoid resistance level increases along railway networks and their neighboring areas (both crop and non-crop areas).

Acknowledgments: This work was funded by the project CCESAGROS, the research group PRI AGA001 (GR15112) of Extremadura System of Science, Technology and Innovation (Spanish initials: SECTI) and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2016-78944-R). Ignacio Amaro-Blanco was supported by the National Institute of Agricultural and Food Research and Technology (Spanish initials: INIA) in Spain with a PhD grant (FPI2014-0030).

References

- Amaro-Blanco, I., Fernández-Moreno, P.T., Osuna-Ruiz, M.D., Bastida, F., and De Prado, R. 2018. Mechanisms of glyphosate resistance and response to alternative herbicide-based management in populations of the three *Conyza* species introduced in Southern Spain. *Pest Manag. Sci.*: Accepted Author Manuscript. doi:10.1002/ps.4896.
- Bain, C., Selfa, T., Dandachi, T., and Velardi, S. 2017. 'Superweeds' or 'survivors'? Framing the problem of glyphosate resistant weeds and genetically engineered crops. *J. Rural Stud.* **51**: 211–221.

- Bajwa, A.A., Sadia, S., Ali, H.H., and Jabran, K. 2016. Biology and management of two important *Coryza* weeds: a global review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 24694–24710. doi:10.1007/s11356-016-7794-7.
- Chodova, D., Salava, J., Martincová, O., and Cvikrova, M. 2009. Horseweed with reduced susceptibility to glyphosate found in the Czech Republic. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 6957–6961. doi:10.1021/jf901292x.
- Cruz-Hipolito, H., Rojano-delgado, A., and Domínguez-Valenzuela, J.A. 2011. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. *Plant Soil* **347**: 221–230. doi:10.1007/s11104-011-0840-9.
- Dauer, J.T., Mortensen, D.A., and Bàrberi, P. 2005. Long-distance wind dispersal of *Coryza canadensis* and management implications. *In Proc. 13th European Weed Research Society Symposium, Bari, Italy.*
- Davis, V.M., and Johnson, W.G. 2008. Glyphosate-resistant horseweed (*Coryza Canadensis*) emergence, survival, and fecundity in no-till soybean. *Weed Sci.* **56**: 231–236. doi:10.1614/WS-07-093.1.
- Dill, G., CaJacob, C., and Padgett, S. 2008. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Manag. Sci.* **64**: 326–331. doi:10.1002/ps.1501.
- Du, L., Liu, W., Yuan, G., Guo, W., Li, Q., and Wang, J. 2016. Cross-resistance patterns to ACCase-inhibitors in American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne* Steud.) homozygous for specific ACCase mutations. *Pestic. Biochem. Physiol.* **126**: 42–48.
- Duke, S., and Powles, S. 2008. Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* **64**: 319–325. doi:10.1002/ps.1518.
- González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H., Bastida, F., Mülleder, N., Smeda, R.J., and De Prado, R. 2010. Differential susceptibility to glyphosate among the *Coryza* weed species in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 4361–4366. doi:10.1021/jf904227p.
- González-Torralva, F., Rojano-Delgado, A.M., Luque de Castro, M.D., Mülleder, N., and De Prado, R. 2012. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Coryza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *J. Plant Physiol.* **169**: 1673–1679. doi:10.1016/j.jplph.2012.06.014.

- Hamouzová, K., Holec, J., Tůmová, P., and Soukup, J. 2012. Glyphosate-Tolerant horseweed found on the railway tracks in Czech Republic. Pages 99–100 in *Glyphosate Weed Resistance: European Status and Solutions*.
- Hanson, B.D., Shrestha, A., and Shaner, D.L. 2009. Distribution of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) and relationship to cropping systems in the Central Valley of California. *Weed Sci.* **57**: 48–53.
- Heap, I. 2018. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [Online] Available: www.weedscience.org [2018 Jan. 15].
- Hess, M., Blefholder, H., Buhrg, L., Weg, D., and Kiel, D.- 1997. Use of the extended BBCH scale - general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Res.* **37**: 433–441.
- Khan, R.U., Mehmood, S., Ullah, S., and Subhan, M. 2013. Ethnobotanical study of common weed flora of sugarcane in District Bannu , Khyber Pakhtunkhawa , Pakistan. *J. Med. Plant Stud.* **1**: 49–78.
- Koger, C.H., Poston, D.H., Hayes, R.M., Robert, F., Koger, C.H., Poston, D.H., Hayes, R.M., and Montgomery, R.F. 2004. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. *Weed Technol.* **18**: 820–825.
- Korres, N.E., Norsworthy, J.K., Bagavathiannan, M. V, and Mauromoustakos, A. 2015. Distribution of arable weed populations along Eastern Arkansas – Mississippi Delta roadsides : factors affecting weed occurrence. *Weed Technol.* **29**: 596–604. doi:10.1614/WT-D-14-00152.1.
- Moretti, M.L., Sosnoskie, L.M., Shrestha, A., Wright, S.D., Hembree, K.J., Jasieniuk, M., and Hanson, B.D. 2016. Distribution of *Conyza* sp. in Orchards of California and Response to Glyphosate and Paraquat. *Weed Sci.* **64**: 339–347.
- Norsworthy, J.K., Ward, S.M., Shaw, D.R., Llewellyn, R.S., Nichols, R.L., Webster, T.M., Bradley, K.W., Frisvold, G., Powles, S.B., and Burgos, N.R. 2012. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. *Weed Sci.* **60**: 31–62.
- Powles, S. 2008. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Manag. Sci.* **64**: 360–365. doi:10.1002/ps.

- Rankins, A., Byrd, J.D., Mask, D.B., Barnett, J.W., and Gerard, P.D. 2005. Survey of soybean weeds in Mississippi. *Weed Technol.* **19**: 492–498.
- Sansom, M., Saborido, A.A., and Dubois, M. 2013. Control of *Conyza* spp. with glyphosate - A review of the situation in Europe. *Plant Prot. Sci.* **49**: 44–53.
- Schoenenberger, N., and D'Andrea, L. 2012. Surveying the occurrence of spontaneous glyphosate-tolerant genetically engineered *Brassica napus* L.(Brassicaceae) along Swiss railways. *Environ. Sci. Eur.* **24**: 23.
- Shields, E.J., Dauer, J.T., Vangessel, M.J., Neumann, G., Dauer, J.T., and Vangessel, M.J. 2006. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed collected in the planetary boundary layer. *Weed Sci.* **54**: 1063–1067.
- Steckel, L.E., Craig, C.C., and Hayes, R.M. 2006. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) control with glufosinate prior to planting no-till cotton (*Gossypium hirsutum*). *Weed Technol.* **20**: 1047–1051.
- Steckel, L.E., and Gwathmey, C.O. 2009. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) growth, seed production, and interference in cotton. *Weed Sci.* **57**: 346–350.
- Torstensson, L., Börjesson, E., and Stenström, J. 2005. Efficacy and fate of glyphosate on Swedish railway embankments. *Pest Manag. Sci.* **61**: 881–886. doi:10.1002/ps.1106.
- Tozzi, E., Beckie, H., Weiss, R., Gonzalez-Andujar, J.L., Storkey, J., Cici, S.Z.H., and van Acker, R.C. 2014. Seed germination response to temperature for a range of international populations of *Conyza canadensis*. *Weed Res.* **54**: 178–185. doi:10.1111/wre.12065.
- Urbano, J.M., Borrego, A., Torres, V., Leon, J.M., Jimenez, C., Dinelli, G., and Barnes, J. 2007. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technol.* **21**: 396–401. doi:10.1614/WT-06-096.1.
- Yoshimura, Y., Beckie, H.J., and Matsuo, K. 2006. Transgenic oilseed rape along transportation routes and port of Vancouver in western Canada. *Environ. Biosafety Res.* **5**: 67–75.

VI.6. Referencias Bibliográficas

- Amaro Blanco, I., Romano, Y., Torcea, L., & Osuna, M. D. (2017). Distribución de especies de «*Conyza*» spp. en zonas urbanas de la provincia de Badajoz. *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, (406), 373-375.
- Aramendía, L. A. I. (2005). El género *Lotium*: Claves dicotómicas. *Revista de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza*, (60), 143-155.
- Baliouis, E. (2014). Recent data from the flora of the island of Limnos (NE Aegean, Greece): new alien invasive species affecting the agricultural economy of the island. *Edinburgh Journal of Botany*, 71(2), 275-285.
- Baloch, A. H., ur Rehman, H., Ibrahim, Z., Buzdar, M. A., & Ahmad, S. (2015). The Biology of Balochistani Weed: *Cyperus rotundus* Linnaeus. A Review. *Pure and Applied Biology*, 4(2), 171.
- Beadle, N. C. W., Evans, O. D., Carolin, R. C., & Tindale, M. D. (1982). *Flora of the Sydney region*. Wellington, Reed.
- Brosnan, J. T., & DeFrank, J. (2008). Purple nutsedge control in Turf and ornamentals.
- Bulinska-Radomska, Z., & Lester, R. N. (1985). Relationships between five species of *Lolium* (Poaceae). *Plant systematics and evolution*, 148(3-4), 169-175.
- Caro, J. A., Sánchez, E., & Elisetch, M. (1978). Las especies de *Lolium* (Gramineae) de la flora Argentina. *Dominguezia*, 1(1), 1-23.
- Chandler, J. M., Hamill, A. S., & Thomas, A. G. (1984). *Crop losses due to weeds in Canada and the United States: Special report of the Losses Due to Weeds Committee*. Weed Science Society of America.
- Chauhan, B. S., & Johnson, D. E. (2010). The role of seed ecology in improving weed management strategies in the tropics. En *Advances in Agronomy* (Vol. 105, pp. 221-262). Elsevier.
- Cousens, R., & Mortimer, M. (1995). *Dynamics of weed populations*. Cambridge University Press.
- Dallwitz, M. J. (1992). The grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. <http://delta-intkey.com/>.
- Davis, V. M., Gibson, K. D., Bauman, T. T., Weller, S. C., & Johnson, W. G. (2009). Influence of weed management practices and crop rotation on glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) population dynamics and crop yield-years III and IV. *Weed Science*, 57(4), 417-426.

- Dill, G., CaJacob, C., & Padgett, S. (2008). Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Management Science*, 64, 326-331. <https://doi.org/10.1002/ps.1501>
- Duke, S., & Powles, S. (2008). Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64, 319-325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>
- Eubank, T. W., Poston, D. H., Nandula, V. K., Koger, C. H., Shaw, D. R., & Reynolds, D. B. (2008). Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) control using glyphosate-, paraquat-, and glufosinate-based herbicide programs. *Weed Technology*, 22(1), 16-21.
- Fernandez, O. N. (2003). Establishment of *Cynodon dactylon* from stolon and rhizome fragments. *Weed Research*, 43(2), 130-138.
- Filibeck, G., Cornelini, P., & Petrella, P. (2012). Floristic analysis of a high-speed railway embankment in a Mediterranean landscape. *Acta Botanica Croatica*, 71(2), 229-248.
- Gigón, R., Vigna, M., Yannicari, M., & Privado, A. (2017). *Manejo de malezas problema. Raigrás (Lolium spp.) Bases para su manejo y control en sistemas de producción*. Recuperado de <http://www.aapresid.org.ar/wp-content/uploads/sites/3/2018/03/Manejo-de-malezas-problema.-Raigras.-Lolium-spp.pdf>
- González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H., Bastida, F., Mülleder, N., Smeda, R. J., & De Prado, R. (2010). Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(7), 4361-4366.
- González-Torralva, F., Gil-Humanes, J., Barro, F., Domínguez-Valenzuela, J. A., & De Prado, R. (2014). First evidence for a target site mutation in the EPSPS2 gene in glyphosate-resistant Sumatran fleabane from citrus orchards. *Agronomy for sustainable development*, 34(2), 553-560.
- Green, T. D. (2010). The ecology of fleabane (*Conyza* spp). Tesis doctoral). University of New England, Armidale.
- Heap, I. (2018). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Recuperado 24 de agosto de 2018, de <http://www.weedscience.org>
- Holm, L. G., Holm, L., Holm, E., Pancho, J. V., & Herberger, J. P. (1997). *World weeds: natural histories and distribution*. John Wiley & Sons.
- Horowitz, M. (1996). Bermudagrass (*Cynodon dactylon*): A history of the weed and its control in Israel. *Phytoparasitica*, 24(4), 305-320.
- Horowitz, M. (1972). Development of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. *Weed Research*, 12(3), 207-220.
- Karaca, M., Saha, S., Zipf, A., Jenkins, J. N., & Lang, D. J. (2002). Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon* spp.). *Crop science*, 42(6), 2118-2127.

- Kenworthy, K. E., Taliaferro, C. M., Carver, B. F., Martin, D. L., Anderson, J. A., & Bell, G. E. (2006). Genetic variation in *Cynodon transvaalensis* Burtt-Davy. *Crop science*, 46(6), 2376-2381.
- Khalid, S. (1995). Weeds of Pakistan, Compositae.
- Khan, I., Marwat, K. B., Khan, I. A., Ali, H., Dawar, K., & Khan, H. (2011). Invasive weeds of southern districts of Khyber Pakhtunkhwa-Pakistan. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, 17(2).
- Khan, R. U., Mehmood, S., Khan, S. U., & Subhan, M. (2013). Ethnobotanical study of common weed flora of sugarcane in district Bannu, Khyber Pakhtunkhawa. *Pakistan. J Med Plants Res*, 1, 49-78.
- Lati, R. N., Filin, S., & Eizenberg, H. (2011). Temperature-and radiation-based models for predicting spatial growth of purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Weed science*, 59(4), 476-482.
- Malatji, M. W. (2013). Allelopathic potential of *Conyza bonariensis*. University of Pretoria.
- MAPAMA. (2012). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Recuperado de https://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/Leñosos2012_tcm30-88508.pdf
- Monaghan, N. M. (1980). The biology and control of *Lolium rigidum* as a weed of wheat. *Weed Research*, 20(2), 117-121.
- Nandula, V. K., Eubank, T. W., Poston, D. H., Koger, C. H., & Reddy, K. N. (2006). Factors affecting germination of horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*, 54(5), 898-902.
- Ortiz, R., Contreras, J. M., Ruiz, A., Sanz, M. A., Romero, M., Gordillo, M., ... Urbano Fuentes-Guerra, J. M. (2015). Malas hierbas preocupantes en España. En *XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología: La Malherbología y la transferencia tecnológica: Sevilla, 19-22 octubre 2015*, 497-503. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- Owen, M. J., Owen, R. K., & Powles, S. B. (2009). A survey in the southern grain belt of Western Australia did not find *Conyza* spp. resistant to glyphosate. *Weed Technology*, 23(3), 492-494.
- Parker, C. (1992). Weeds of Bhutan. *Weeds of Bhutan*.
- Penã-Castro, J. M., Barrera-Figueroa, B. E., Fernández-Linares, L., Ruiz-Medrano, R., & Xoconostle-Cázares, B. (2006). Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. *Plant Science*, 170(4), 724-731.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. *PLoS one*, 10(12), e0146021.

- Rojano-Delgado, A. M., Ruiz-Jiménez, J., de Castro, M. D. L., & De Prado, R. (2010). Determination of glyphosate and its metabolites in plant material by reversed-polarity CE with indirect absorptometric detection. *Electrophoresis*, 31(8), 1423-1430.
- Sansom, M., Saborido, A. A., & Dubois, M. (2013). Control of *Conyza* spp. with Glyphosate-A Review of the Situation in Europe. *Plant Protection Science*, 49(1).
- Shields, E. J., Dauer, J. T., VanGessel, M. J., & Neumann, G. (2006). Horseweed (*Conyza canadensis*) seed collected in the planetary boundary layer. *Weed Science*, 54(6), 1063-1067.
- Shrestha, A. (2008). *Biology and management of horseweed and hairy fleabane in California*. UCANR Publications.
- Shrestha, A., Hanson, B. D., Fidelibus, M. W., & Alcorta, M. (2010). Growth, phenology, and intraspecific competition between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweeds (*Conyza canadensis*) in the San Joaquin Valley of California. *Weed Science*, 58(2), 147-153.
- Sivapalan, S. R., & Jeyadevan, P. (2012). Physico-chemical and phytochemical study of rhizome of *Cyperus rotundus* Linn. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology*, 1(2), 42-46.
- Soltani, N., Dille, J. A., Burke, I. C., Everman, W. J., VanGessel, M. J., Davis, V. M., & Sikkema, P. H. (2016). Potential corn yield losses from weeds in North America. *Weed Technology*, 30(4), 979-984.
- Steinmaus, S. J., Prather, T. S., & Holt, J. S. (2000). Estimation of base temperatures for nine weed species. *Journal of Experimental Botany*, 51(343), 275-286.
- Team, R. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.
- Tozzi, E., Beckie, H., Weiss, R., Gonzalez-Andujar, J. L., Storkey, J., Cici, S. Z. H., & Van Acker, R. C. (2014). Seed germination response to temperature for a range of international populations of *Conyza canadensis*. *Weed research*, 54(2), 178-185.
- Trezzi, M. M., Balbinot Jr, A. A., Benin, G., Debastiani, F., Patel, F., & Miotto Jr, E. (2013). Competitive ability of soybean cultivars with horseweed (*Conyza bonariensis*). *Planta Daninha*, 31(3), 543-550.
- Trezzi, M. M., Vidal, R. A., Patel, F., Miotto Jr, E., Debastiani, F., Balbinot Jr, A. A., & Mosquen, R. (2015). Impact of *Conyza bonariensis* density and establishment period on soybean grain yield, yield components and economic threshold. *Weed research*, 55(1), 34-41.
- Waggoner, B. S., Mueller, T. C., Bond, J. A., & Steckel, L. E. (2011). Control of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) with saflufenacil tank mixtures in no-till cotton. *Weed Technology*, 25(3), 310-315.

- Weaver, S. E. (2001). The biology of Canadian weeds .115 . *Conyza canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science*, 0, 867-875.
- Widderick, M., Walker, S., & Cook, T. (2011). Flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis*)—strategic solutions using best management practice. En *23 rd Asian-Pacific Weed Science Society Conference* (p. 585).
- Wu, H., Walker, S., Robinson, G., & Coombes, N. (2010). Control of Flaxleaf Fleabane (*Conyza bonariensis*) in Wheat and Sorghum. *Weed Technology*, 24(02), 102-107.
<https://doi.org/10.1614/WT-09-043.1>
- Wu, H., Walker, S., Rollin, M. J., Tan, D. K. Y., Robinson, G., & Werth, J. (2007). Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* [L.] Cronquist). *Weed Biology and Management*, 7(3), 192-199.



VI. BLOQUE II: ARROZ



VII. Bloque II: Arroz

VII.1. Introducción

El arroz es un cultivo que tiene una gran importancia a nivel mundial. Atendiendo al arroz cultivado en España, Extremadura es la segunda Comunidad Autónoma con mayor producción, solo por detrás de Andalucía (Figura 39). La región de Extremadura cuenta con una superficie cultivada de 24.700 ha y una producción de 175.000 toneladas (MAPAMA, 2017).

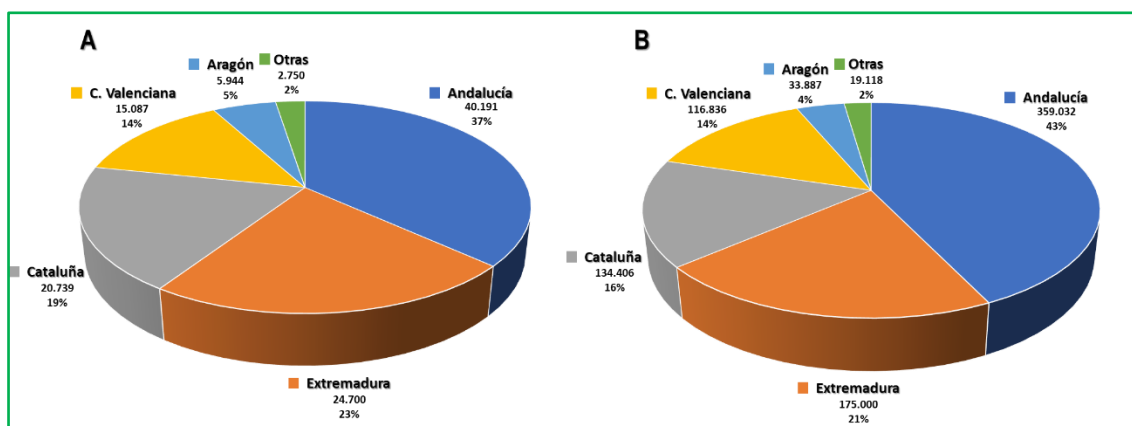


Figura 39. (A) Distribución de la superficie de arroz por CCAA 2016/17 (ha), (B) Distribución de la producción de arroz por CCAA 2016/17(t). Fuente MAPAMA (2017)

Debido a la trascendencia de este cultivo inundado en el territorio extremeño, el control de malas hierbas es un tema que preocupa cada vez más a los agricultores, pues supone una reducción considerable en el rendimiento de la cosecha (Osuna et al., 2012). En este sentido, el uso del control químico juega un papel importante, pues es rápido y menos costoso que otros métodos de control no químico.

El principal factor limitante del control químico frente a malas hierbas en el cultivo del arroz estriba en que los herbicidas pertenecen sólo a dos modos de acción: los inhibidores de la ALS y los inhibidores de la ACCasa. El uso repetido de herbicidas y no cambiar frecuentemente modo de acción fomenta la aparición de resistencias en las malas hierbas (Romano García et al., 2017).

En los últimos años se está fomentando el uso de métodos alternativos al control químico. De acuerdo con ello, se puede destacar el uso de la siembra en seco, que supuso el 30-35% de la superficie total sembrada (Romano García et al., 2017).

VII.2. Malas hierbas en el cultivo del arroz

En el cultivo de arroz, como en la mayoría de los cultivos, el control de las malas hierbas es fundamental, ya que compiten por el espacio, la luz y los nutrientes, especialmente durante las etapas de plántula y ahijamiento del arroz. Las malas hierbas no solo disminuyen la cosecha y la calidad del grano, sino que incrementan los costes de producción, recolección, secado y

procesamiento industrial. Además, hospedan y son focos de infección de numerosas plagas y enfermedades (Aguilar, 2001)

Las condiciones climatológicas, edáficas, y la calidad de las aguas utilizadas son condicionantes que favorecen la proliferación de las malas hierbas en el cultivo del arroz. Además, la extensión del cultivo por zonas no tradicionales, con la creación humedales donde no existe una flora autóctona, facilita la colonización de estos espacios por las adventicias asociadas al cultivo del arroz (Osuna et al., 2012).

De acuerdo con el estudio de Ortiz et al. (2015), las malas hierbas que más preocupan en el sector arrocero de España son *Echinochloa* spp. y *Cyperus diformis*. Por su parte, Osuna et al. (2012) destaca *Echinochloa* spp., *Leptochloa* spp., *Oryza sativa* var., *Cyperus* spp. como las principales malas hierbas en la producción de arroz a nivel nacional. Dentro de la Comunidad Autónoma de Extremadura, Romano García et al. (2017) resalta a *Leptochloa* spp. y *Echinochloa* spp. como los géneros que más problemas generan a los agricultores de la región y que pueden desarrollar resistencias a herbicidas.

VII.2.1. *Echinochloa*

Echinochloa es una gramínea anual que puede alcanzar en algunos casos un metro de altura. Florece en otoño con espiguillas densas, frecuentemente ramificadas con tonalidades rojizas, y destacan por la tenencia de largos pelos rígidos entre las espiguillas. Está muy extendida en zonas tropicales y templadas del mundo en diferentes cultivos incluyendo el arroz. Su emergencia es escalonada, precisando de tratamientos repetidos para su control (Fuentes, 1991). Altas infestaciones de esta gramínea pueden llegar a reducir la cosecha en más del 80% (de Prado and de Prado, 2005).

En el género *Echinochloa* se incluyen las especies de malas hierbas más importantes en arroz en todo el mundo (Danquah et al., 2002b). Estudios morfológicos y genéticos revelan la complejidad taxonómica de este género debido a la gran similitud entre sus especies (Lopez-martinez et al., 1999; Ruiz-Santaella et al., 2006a). El problema estriba en que las diferentes especies de *Echinochloa* muestran una sensibilidad diferente a los herbicidas utilizados para controlarlas (Tabacchi et al., 2006).

Hay algunas discrepancias en cuanto al número de especies que constituyen el género *Echinochloa* comprendiendo entre 20 y 60 especies. Las especies de *Echinochloa* muestran diferente sensibilidad a varios herbicidas utilizados para su control (Vidotto et al., 2007), incluso dentro de la misma especie (Osuna et al., 2011). Además, se ha descrito el desarrollo de

resistencias a herbicidas comúnmente aplicados para el control de *Echinochloa* en arroz (Fisher et al., 2000)

En la Península Ibérica la clasificación taxonómica fue establecida por Carretero (1981), que propuso 5 taxones: *E. crus-galli* (L) Beauv.; *E. colonum* (L) Link.; *E. hispidula* (Retz) Nees ex Royle; *E. oryzoides* (Ard) Fritsch.; y *E. oryzicola* (Vasing.) Vasing.

Todas las especies de *Echinochloa* tienen una morfología parecida cuando se encuentran en estado de plántula. Una de las más frecuente en Extremadura es la de *E. crus-galli*. Las panículas de *E. crus-galli* (Figura 40) pueden tener una longitud de 2 a 20 cm y mostrar una forma piramidal abierta o cerrada y columnar; además, las panículas pueden tener rodamientos erectos o postrados (Norris, 1996). Las espiguillas pueden ser sin aristas o con aristas rojas o verdes (Mitich, 1990). Las plantas pueden producir hasta 40,000 semillas por planta dependiendo de las condiciones ambientales y las relaciones de competencia (Holm et al., 1977).

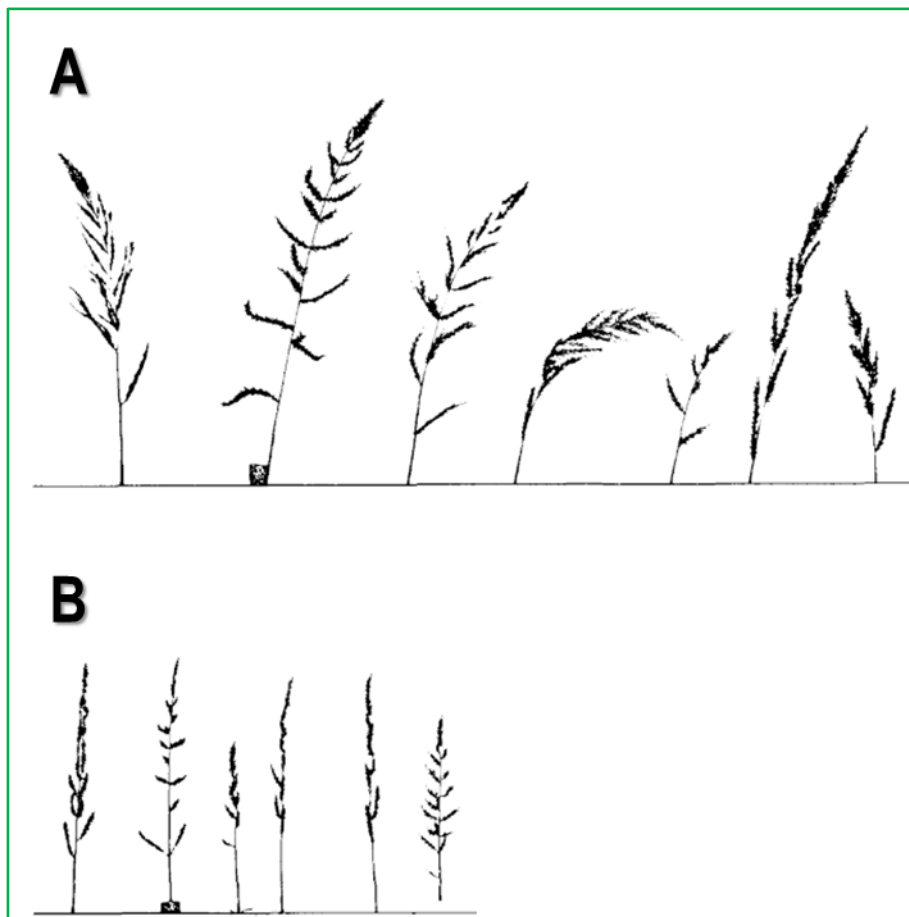


Figura 40. Panículas de: (A) *E. crus-galli*, (B) *E. colona*. Fuente: Michael (1983)

VII.2.2. *Leptochloa*

Leptochloa spp. (Figura 41) es una gramínea anual de primavera considerada una mala hierba del cultivo del arroz. Está muy extendida en América y Asia, pero hasta la década de los 80 no se

detecta por primera vez en España dentro de Extremadura. Posteriormente aparece en otras zonas del cultivo del arroz en España como Valencia, Cataluña, Navarra y posteriormente a Andalucía. Por lo tanto, se convierte en una mala hierba común en el territorio nacional a partir de 2006.



Figura 41. Inflorescencia *Leptochloa* spp.

Como se ha indicado, en Extremadura se conoce desde los 80 la presencia de la especie *Leptochloa fascicularis*, la cual es una especie de difícil eliminación y control en dicho cultivo ocasionando pérdidas en el rendimiento de la producción (Saavedra et al., 1995).

Esta mala hierba aparece con más frecuencia en los bordes y zonas húmedas de los arrozales que en las zonas que se encuentran encharcadas. La manera que tiene este género de aparecer en nuevas zonas es en el momento de la siembra del arroz, cuando están mezcladas semillas de arroz y de esta gramínea.

Leptochloa spp. está constituido por unas 40 especies y suele aparecer en zonas subtropicales y cálidas del mundo (Del Monte and Cortés, 2000).

Respecto a la morfología y biología de este género, se puede decir que los tallos son erectos y pueden llegar a medir hasta 1,5 metros de altura y sobresalen por encima del arroz cuando está espigado. Tienen una lígula membranosa de 2-4 mm. Las hojas son alargadas, de 10-45 cm, de color verde claro y con un nervio central de color claro. Las inflorescencias aparecen primero en el tallo principal y luego en los secundarios, en forma de película laza de 20-50 cm. Las espiguillas están formadas por 9-12 flores que producen semillas alargadas de 1,5 mm de longitud (Fernández-Cavada et al., 2008).

Las dos subespecies más abundantes y frecuentes en Extremadura son *L. fusca subespecies fascicularis* y *uninervia* (Figura 42). La primera se distingue de la segunda por sus espiguillas más aristadas (Fernández-Cavada et al., 2008). Las semillas de ambas especies maduran de manera progresiva y muy rápido. Su dispersión se produce porque caen al terreno antes y durante la

recolección del arroz, perpetuando la infestación en años sucesivos ya que el desgrane de las malas hierbas suele ser más fácil que el de las especies domesticadas.

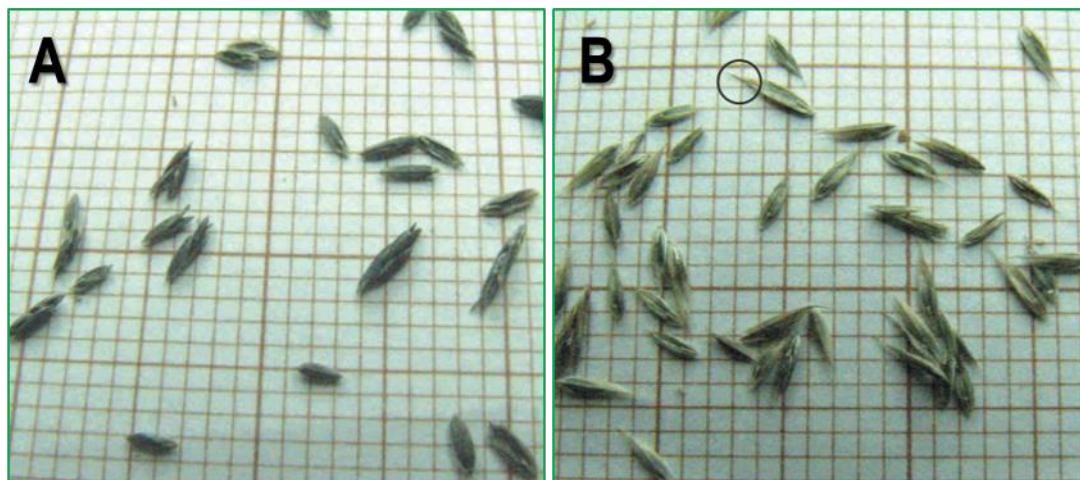


Figura 42. Semillas de *Leptochloa* spp.: sin arista (A) *L. fusca* subespecie *uninervia*, con arista (B) *L. fusca* subespecie *fascicularis*.

Este género presenta una germinación escalonada y tiene gran capacidad de ahijamiento. Tanto la germinación como su desarrollo coinciden con el del arroz y el de la *Echinochloa crus-galli*, con la que suele estar asociada.

Según Fernández-Cavada et al. (2008) algunas de las medidas para prevenir su aparición son el uso de semilla certificada (limpia) y vigilar los campos ya infestados. En el caso de que ya se encuentre en la parcela, para evitar su dispersión hay que vigilar su hábitat preferido (márgenes y zonas poco encharcadas), utilizando el control mecánico cuando las densidades no sean muy elevadas. Si las medidas preventivas no han sido eficaces, podemos hacer uso de herbicidas de forma racional para evitar la aparición de resistencias.

VII.2.3. *Cyperus*

Este género de malas hierbas, conocido comúnmente como juncia, tiene especies que afectan al rendimiento en muchos cultivos, pero la especie que interfiere con el arroz es *C. difformis* siendo una de las principales dentro de este cultivo (Swain et al., 1975).

Se trata de una juncia acuática emergente anual de tipo C3 (Barrett and Seaman, 1980; Merotto et al., 2010) altamente autofecundante (Merotto et al., 2009). Es una planta anual de 20 a 60 cm de altura (Figura 43). El tallo es trígono, hojas bien desarrolladas. Tiene una inflorescencia en umbela con las espiguillas en glomérulos. Presenta glumas obovadas a suborbiculares, de hasta 2 mm de ancho, pardas, con la quilla más clara. Su forma biológica es un terófito. Incluyen el gran número de semillas muy pequeñas (300 por 300 por 600 μm), lo que puede facilitar su dispersión por el viento, el agua o la maquinaria (Sanders, 1994).

Cyperus difformis está muy extendida en el sur de Europa, Asia, América Central, América del Norte, África y las islas de los océanos Índico y Pacífico (Holm et al., 1977).

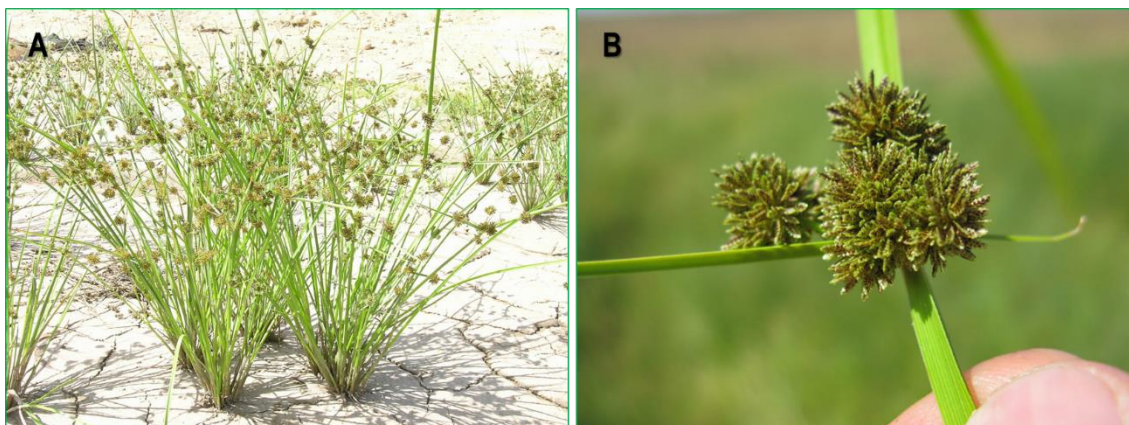


Figura 43. *Cyperus difformis*. (A) Plantas típicas, (B) Inflorescencia

Crece principalmente en áreas de tierras bajas. También es una mala hierba común en los campos de arroz de siembra directa (Rao et al., 2007). La juncia puede convertirse en mala hierba principal en el arroz, en particular, donde los herbicidas se usan para controlar las malas hierbas, pero no son efectivos frente a juncias como *C. difformis* (Chauhan and Johnson, 2009). La capacidad de la especie para completar un ciclo vegetativo y reproductivo dentro de un mes lo hace especialmente competitivo en un cultivo que requiere al menos 90 o más días para alcanzar la madurez (Holm et al., 1991).

VII.2.4. *Oryza sativa* var.

Oryza sativa var., llamada comúnmente arroz salvaje, son plantas espontáneas del arroz, con características morfológicas y atributos de calidad distintos a las variedades cultivadas. Muchas presentan las cariósides pigmentadas de color rojo, pero no todas, de ahí que se llame erróneamente a esta mala hierba “arroz rojo”.

Desde el punto de vista botánico, es una hierba anual de 0,5-1,7 m de altura o más. La inflorescencia, la panícula, la espiga son amarillentas. El arroz salvaje tiene una sola flor con seis estambres y normalmente las cáscaras son cortadas. Su cariósida se adhiere fuertemente a las cáscaras con pericarpio rojo y se rompe fácilmente. Normalmente, esta hierba es más alta que el arroz cultivado. Sus semillas contaminan las semillas de arroz y aumentan las semillas en el banco de semillas del suelo. El arroz salvaje puede provenir de arroz cultivado degradado o de cruzamiento entre arroz cultivado y arroz silvestre como *Oryza nivara* u *Oryza rufipogon* (Chin, 2001).

Los granos de estas malas hierbas son comestibles, pero se consideran malas hierbas porque, como se ha señalado, los parámetros de calidad son distintos a los de las variedades comerciales y, al mezclarse con éstas, disminuye la calidad del producto desde el punto de vista del

consumidor. Además, las plantas de esta mala hierba tiene un gran vigor, por lo que van a competir por espacio, luz y nutrientes durante las etapas de plántula y ahijamiento del arroz (Coria, 2017).

Estas plantas presentan una panícula que tiene la particularidad de que se desgranar con mucha facilidad, con lo cual, el grano cae al terreno y germinará el siguiente año.

VII.3. Herbicidas autorizados en el cultivo del arroz

Entre los métodos agronómicos para el control de malas hierbas en arroz destacan el laboreo (profundidad y época de realización), riego (control de la capa de agua de inundación según la fase de cultivo), rotaciones y siembra (época, tipo y densidad) (Osuna et al., 2012).

El control químico está indicado si las medidas preventivas o métodos agronómicos utilizados no han surtido efecto.

La Tabla 25 recoge las materias activas autorizadas por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para el cultivo del arroz en 2018. También se recoge a qué tipo de mala hierba hace frente cada materia activa recogida.

Tabla 25. Materias activas herbicidas autorizadas en el cultivo del arroz (2018) y modo de acción

Materia Activa	Malas hierbas	Modo de acción
Presiembra		
Cicloxidim	Arroz salvaje, echinocloa	Inhibidor ACCasa
Propaquizafop	Arroz salvaje, <i>echinocloa</i>	Inhibidor ACCasa
Postemergencia		
Azimsulfuron	Alismatáceas, ciperáceas, potamogetáceas, heterantera, lindernia, bergia, ammania, echinocloa, <i>Scirpus</i> , tifa	Inhibidor ALS
Bensulfuron-metil	Alismatáceas, ciperáceas, dicotiledóneas	Inhibidor ALS
Bentazona	Dicotiledóneas	Inhibidor PSII
Bispiribac-sodio	Ciperáceas, echinocloa	Inhibidor ALS
Cyhalofop-butil	Echinocloa, leptocloa, <i>Paspalum</i>	Inhibidor ACCasa
Clomazona	Echinocloa	Inhibidor síntesis de carotenoides
Halosulfuron-metil	Ciperáceas, echinocloa	Inhibidor ALS
Imazamox	Malas hierbas en general, utilizar solo en variedades Clearfield	Inhibidor ALS
MCPA	Dicotiledóneas	Auxina sintética
Pendimetalina	Malas hierbas en general. Sólo para siembra en seco	Inhibidor microtúbulos
Penoxsulam	Echinocloa, alismatáceas, ammania, ciperáceas	Inhibidor ALS
Profoxidim	Echinocloa, leptocloa	Inhibidor ACCasa

Tabla elaborada a partir del Registro de Productos Fitosanitarios del MAPAMA

El número de materias activas autorizadas para el cultivo del arroz son 14, pertenecientes a 6 modos de acción. No obstante, los modos de acción principales y que actúan frente a las malas hierbas más frecuentes y problemáticas son 2: inhibidor de la ALS e inhibidor de la ACCasa.

Los otros cuatro modos de acción son inhibidores del PSII, inhibidores de la síntesis de carotenoides, auxinas sintéticas e inhibidores de microtúbulos. Las materias activas con modos de acción inhibidores del PSII y auxinas sintéticas (bentazona y MCPA, respectivamente), actúan simplemente frente a dicotiledóneas. La materia activa clomazona, con modo de acción inhibidor de la síntesis de carotenoides, actúa únicamente frente a *Echinochloa* spp. Solo la pendimetalina (inhibidor de microtúbulos) tiene un rango de actuación más amplio, pero cuando se realiza la siembra en seco.

Se ha destacado en apartados anteriores que como método de control alternativo al químico, en los últimos años se está fomentando la siembra en seco, que supuso el 30-35% de la superficie total sembrada (Romano García et al., 2017). No obstante, para hacer más efectivo el método hay una materia activa autorizada para siembra en seco, la pendimetalina, que tiene un amplio espectro de actuación frente a malas hierbas en el cultivo del arroz.

VII.4. Casos de resistencia

En muchas ocasiones, el mal uso de herbicidas o el tratamiento con herbicidas cuando la planta tiene un tamaño mayor al recomendado, da lugar a casos de resistencias.

Como hemos visto, la oferta de herbicidas autorizados para el tratamiento de malas hierbas en arroz pertenece principalmente a dos modos de acción (ALS y ACCasa) y el resto de materias activas autorizadas con diferentes modos de acción actúan frente a dicotiledóneas. Por lo tanto, una de las premisas para prevenir casos de resistencias, como es alternar tratamientos con herbicidas de diferentes modos de acción, es muy difícil de llevar a cabo. Esta es la razón, sumada a que estos herbicidas pertenezcan a los grupos de herbicidas con mayor riesgo a desarrollar resistencia de forma más rápida, da lugar a que los casos de resistencias descritos para malas hierbas en este cultivo sean abundantes.

La Tabla 26 muestra que se han descrito 96 casos de resistencia en malas hierbas en el cultivo de arroz a nivel mundial. Entre los 9 modos de acción descritos para malas hierbas del arroz destacan los inhibidores de la ALS y la ACCasa como los más predominantes.

Destaca *Echinochloa* spp. como un serio problema en el arroz porque ha desarrollado una resistencia múltiple a la mayoría de los herbicidas de arroz disponibles. El número de casos de resistencia descritos asciende a 76. La especie *E. crus-galli* es la más problemática dentro de los campos de arroz por el número de casos descritos. El primer caso de *Echinochloa* spp. (*E. crus-*

galli) resistente apareció en 1978 en EEUU a herbicidas inhibidores del fotosistema II. Los primeros casos de *Echinochloa* spp. resistente (*E. colona*) a herbicidas inhibidores de la ACCasa y ALS aparecieron en Costa Rica en 1994 y 1998, respectivamente (Heap, 2018).

Tabla 26. Casos de resistencia descritos en Heap (2018) para malas hierbas en el cultivo del arroz

Mala hierba	Casos descritos	Primer caso	Modos de acción
<i>Echinochloa</i> spp.	76		
<i>E. colona</i>	25	1987 (Costa Rica)	Inhibidor EPSPS, Inhibidor PSII, Inhibidor ACCasa, Inhibidor ALS, auxinas sintéticas, Inhibidor pared celular
<i>E. crus-galli</i> var. <i>crus-galli</i>	45	1978 (EEUU)	Inhibidor PSII, Inhibidor ACCasa, Inhibidor ALS, auxinas sintéticas, Inhibidor pared celular, Inhibidor de microtúbulos, Inhibidor de la síntesis de lípidos, Inhibidor DOXP
<i>E. crus-galli</i> var. <i>formosensis</i>	2	2009 (Japón)	Inhibidor ACCasa, Inhibidor ALS
<i>E. crus-galli</i> var. <i>zelayensis</i>	1	2013 (China)	Auxinas sintéticas
<i>E. crus-pavonis</i>	1	1999 (Brasil)	Auxinas sintéticas
<i>E. erecta</i>	2	2004 (Italia)	Inhibidor PSII, Inhibidor pared celular
<i>E. oryzoides</i>	2	2000 (EEUU)	Inhibidor ACCasa, Inhibidor ALS, Inhibidor síntesis de lípidos
<i>E. oryzicola</i>	6	1998 (EEUU)	Inhibidor ACCasa, Inhibidor ALS, Inhibidor síntesis lípidos
<i>Leptochloa</i> spp.	7		
<i>L. chinesis</i>	4	2002 (Tailandia)	Inhibidor ACCasa, Inhibidor PSII
<i>L. panicoides</i>	1	2009 (EEUU)	ACCasa
<i>L. scabra</i>	1	2013 (Venezuela)	Inhibidor PSII
<i>L. virgata</i>	1	2010 (México)	Inhibidor EPSPS
<i>Cyperus</i> spp.			
<i>C. difformis</i>	7	2002(EEUU)	Inhibidor ALS, Inhibidor PSII
<i>Oryza sativa</i> var.	6		
<i>Oryza sativa</i> var. <i>sylvatica</i>	6	2002 (EEUU)	Inhibidor ALS

VI.5. Estructura de la investigación realizada sobre malas hierbas del arroz

En este bloque se han realizado estudios de dos malas hierbas del arroz con gran problemática en Extremadura. El trabajo desarrollado queda englobado por el proyecto INIA RTA-2014-00033-C03-01, por la ayuda a Grupos de Investigación de la Junta de Extremadura GR15112 y por el proyecto AGROS (CCESAGROS), fondos FEDER. Se ha dividido en 4 capítulos para dar una noción sobre la dificultad que plantean estas dos especies de malas hierbas en los campos de arroz de la Comunidad:

Capítulo 3. Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campaña 2017)

Este estudio ha sido publicado en una revista de divulgación (Agrícola Vergel) en el año 2017.

Se aborda el hándicap de que los herbicidas autorizados para las malas hierbas del arroz pertenecen, principalmente, a dos modos de acción: ALS y ACCasa. Esto da lugar a que el uso repetido y continuado de estos grupos de herbicidas provoque la aparición y propagación de malas hierbas resistentes.

Capítulo 4. Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura "*Echinochloa* spp." y "*Leptochloa* spp."

Este trabajo ha sido desarrollado como póster para el Congreso nacional de la Sociedad Española de Malherbología (SEMh) en el año 2017.

La idea principal de esta publicación es que la identificación temprana de malas hierbas pertenecientes a los géneros *Echinochloa* y *Leptochloa* es primordial ya que las diferentes especies de ambos géneros muestran diferentes respuestas frente a un mismo herbicida. En este sentido, los marcadores moleculares desempeñan un papel muy importante.

Capítulo 5. Distribution and characterisation of target-site resistance to ALS and ACCase-inhibiting herbicides in *Echinochloa* spp. from Spanish rice fields

Este artículo se encuentra en revisión por una revista de impacto JCR (Crop Protection).

Trata de forma concreta el problema que se destaca en el capítulo 1: la aparición de *Echinochloa* spp. resistente por el uso repetido de los inhibidores de la ALS y la ACCasa. Para ello, poblaciones de *Echinochloa* spp. fueron recogidas por las diferentes zonas arroceras de Extremadura y se estudió posibles mutaciones dependientes del sitio de acción, así como su respuesta a diferentes concentraciones de herbicidas pertenecientes a los inhibidores de la ALS y la ACCasa.

Capítulo 6. Caracterización de la resistencia a inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y a inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) en *Leptochloa* spp. de arrozales de Extremadura

En este capítulo se aborda el mismo problema que en el capítulo anterior, pero desde el punto de vista de *Leptochloa* spp. Se recogieron poblaciones de esta mala hierba que se sospechaban resistentes por provenir de campos de cultivo con historial de tratamiento con inhibidores de ALS y ACCase. Se realizó una identificación molecular y morfológica a nivel de especie, se realizaron ensayos dosis-respuesta para ver el grado de resistencia y por último se determinó la mutación causante de dicha resistencia. De forma complementaria, se realizó un estudio de distribución de mutaciones encontradas en otras poblaciones de *Leptochloa* recogidas en años anteriores.

Artículo de divulgación publicado

Capítulo 3. Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campaña 2017)

Y. Romano¹, I. Amaro-Blanco¹, J.M. Quiles², J.A. Palmerín³, L. Torcea⁴, M.D. Osuna¹

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Guadajira (Badajoz)

²Servicio de Producción Agraria (Junta de Extremadura)

³Servicio de Sanidad Vegetal (Junta de Extremadura)

⁴Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara a Banatului, "Regele Mihai I Al Romaniei" din Timisoara (Rumanía)

Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura, ISSN 0211-2728, N°. 406, 2017, págs. 378-381

Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campaña 2017)

Y. Romano¹, I. Amaro-Blanco¹, J.M. Quiles², J.A. Palmerin³, L. Torcea⁴, M.D. Osuna¹

¹ Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Guadajira (Badajoz)

² Servicio de Producción Agraria (Junta de Extremadura). Mérida (Badajoz)

³ Servicio de Sanidad Vegetal (Junta de Extremadura). Don Benito (Badajoz)

⁴ Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara a Banatului "Regele Mihai I Al Romaniei" din Timisoara (Rumania)

Resumen: El arroz es uno de los principales cultivos a nivel mundial. En España, Extremadura es la segunda comunidad autónoma con más producción de arroz después de Andalucía, aunque este año la superficie que se ha dedicado al cultivo ha disminuido. El control de las malas hierbas en el cultivo es un tema que preocupa a los agricultores, siendo para ello su principal y más eficaz herramienta los herbicidas. En la actualidad, los herbicidas autorizados en España para el cultivo del arroz pertenecen principalmente a dos modos de acción: inhibidores de la ALS y de la ACCasa, con lo que su uso repetido y continuado está dando lugar a la aparición y propagación de malas hierbas resistentes. Como método alternativo de control cabe destacar el aumento producido durante esta campaña de la práctica de la siembra en seco. Así, se puede estimar que, del total de la superficie del cultivo del arroz, entre un 30-35% del mismo ha sido utilizando esta técnica. Hay que resaltar que este año las condiciones climáticas de altas temperaturas, tanto diurnas como nocturnas, y prolongadas en el tiempo, han favorecido que el rendimiento del cultivo no haya sido el esperado.

PALABRAS CLAVE: arroz, malas hierbas, resistencia, herbicidas, siembra en seco.

SUPERFICIE CULTIVADA Y PRINCIPALES VARIEDADES

Durante la campaña de 2017 la superficie de arroz cultivada se ha visto disminuida sobre un 4% respecto a la campaña pasada, siendo el total del cultivo este año de 23.550 ha. Se barajan dos causas para explicar este descenso. Por un lado, debido a la baja rentabilidad del cultivo del arroz, muchos agricultores han optado por cambiar a otro tipo de producción. Por otro lado, el problema causado por las malas hierbas obliga a los agricultores a buscar alternativas como la rotación de cultivos (siempre que el terreno lo permita). En cuanto a la superficie cultivada con arroz a nivel nacional durante esta campaña sigue siendo Andalucía la comunidad que más superficie le dedica, seguida de Extremadura (Figura 1) (MAPAMA, 2017).

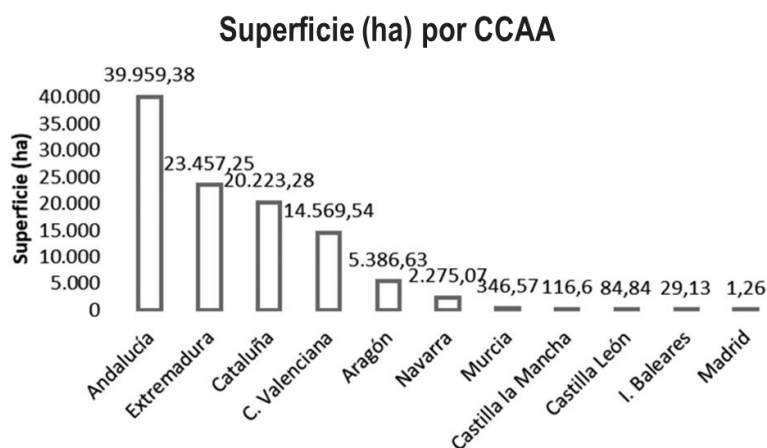


Figura 44. Distribución por CCAA de la superficie de arroz cultivada a nivel nacional en 2017.

Centrándonos en Extremadura, del total de las variedades de arroz utilizadas, el 70% fueron de tipo comercial largo, mientras que el 30% fueron de tipo redondo. Hay que destacar que las variedades Clearfield han representado el 51% de la superficie del cultivo (Figura 2).

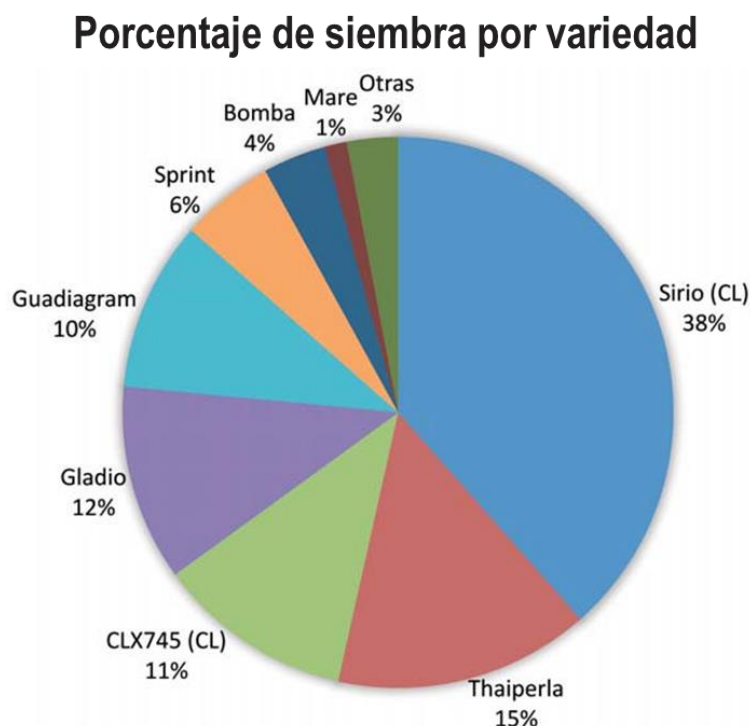


Figura 45. Variedades de arroz expresadas en porcentaje utilizadas en Extremadura en 2017 (datos de septiembre de 2017).

MALAS HIERBAS DEL CULTIVO DEL ARROZ DURANTE LA CAMPAÑA DE 2017

En el cultivo del arroz, como en la mayoría de los cultivos, el control de las malas hierbas es fundamental ya que compiten por el espacio, nutrientes y otros factores, especialmente durante

las etapas de plántula y ahijamiento del arroz. Las malas hierbas no sólo disminuyen la cosecha y la calidad del grano, sino que incrementan los costes de producción, recolección, secado y procesamiento industrial. Además, hospedan y son focos de infección de numerosas plagas y enfermedades.

Se puede decir que, en Extremadura, las malas hierbas son el principal problema de este cultivo, concentrando por ello la mayor parte del coste fitosanitario.

El género *Leptochloa* sigue siendo el principal problema en la región, sin embargo, se ha observado un incremento de las especies del género *Echinochloa*, especialmente de *E. oryzicola* y *E. oryzoides*.

Durante este año, los controles iniciales de la mayor parte de las malas hierbas fueron buenos debido a unas condiciones climatológicas adecuadas para ello. Sin embargo, la prolongación de las excesivas temperaturas favoreció la aparición de nascencias posteriores. Con todo ello, la superficie de cultivo afectado por ambos géneros ha sido muy importante, pero inferior al de años anteriores.

Respecto al resto de las malas hierbas que también han afectado negativamente al cultivo hay que citar a *Alisma plantago-acuática*, *Cyperus difformis* y al grupo de las

Heterantheras, las cuales, aunque han seguido la tónica general, han tenido una incidencia menor en cuanto a la capacidad de competir se refiere, ya que su presencia ha sido similar que en campañas anteriores. Todo ello se debe, como ya se comentó anteriormente, a las condiciones climáticas iniciales.

CONTROL DE LAS MALAS HIERBAS EN EL CULTIVO DEL ARROZ

Para hacer frente a las malas hierbas podemos utilizar lo que se denominan **medidas culturales**, tales como el uso de semillas certificadas, control manual (en parcelas con infestaciones bajas o con fallos puntuales de la aplicación del herbicida), manejo del agua (manteniendo unos niveles adecuados tras la aplicación del herbicida), limpieza de la maquinaria para evitar la propagación de semillas, uso del fangueo y rotación de cultivos (donde sea posible). Dentro de las **medidas químicas** destaca el uso de herbicidas. Para realizar un uso correcto de los mismos se recomienda evitar el uso del mismo modo de acción durante varias campañas, utilizar mezclas de herbicidas que sean igualmente efectivos contra la misma mala hierba, evitar utilizar repetidamente la misma mezcla, no utilizar inhibidores de ALS o de ACCasa como único método de control, y mantener registros de los herbicidas usados anualmente.

En la **Tabla 1** se muestran los herbicidas autorizados en la actualidad en el cultivo de arroz en España, así como las autorizaciones excepcionales (MAPAMA, 2017).

Tabla 27. Herbicidas autorizados y autorizaciones excepcionales en el cultivo de arroz en España en 2017.

Materia activa (modo acción)	Nombre/Casa comercial Dosis Especies (*)		
PRE			
Cicloxidim 10% (A)	Focus/BASF	2-3 l/ha	AS, ECH
Cletodim 12% (A)	Varios/Varias	1,5 l/ha	AS
Cletodim 24% (A)	Select/ARYSTA	0,75 l/ha	AS
Propaquizafop 10% (A)	Varios/Varias	1,25-1,5 l/ha	AS, ECH
POST			
Azimsulfuron 50% (B)	Gulliver/Dupont	40-50 g/ha	AL, AM, BE, CIP, ECH, HE, LIN, SC, TIF
Bensulfuron-metil 60% (B)	Varios/Varias	80-100 g/ha	AL, CIP, DIC
Bentazona 48% (C3)	Varios/Varias	2 l/ha	CIP/DIC
Bentazona 87% (C3)	Basagran SG/BASF	1-1,15 kg/ha	CIP/DIC
Bispiribac-sodio 40,8% (B)	Nominee/Bayer	50-75 cc/ha	CIP/ECH
Cihalofop-butil 20% (A)	Clincher/Dow	1,5 l/ha	ECH, LEP, PAS
Clomazona 36% (F3)	Command/FMC	1 l/ha	ECH
Halosulfuron-metil 75% (B)	Permit/Kenogard	30-50 g/ha	CIP/DIC
Imazamox 4% (B) (**)	Pulsar 40/BASF	0,875 l/ha	AS, HE, LEP, ECH
Imazosulfuron 10,7% (B)	Kocis/Sipcam	0,7-0,8 l/ha	AL, CIP, EL, LIT, PON, TIF
MCPA 40% (O)	Varios/Varias	1,25 l/ha	DIC
MCPA 50% (O)	Varios/Varias	1 l/ha	DIC
Pendimetalina 27,5%+ Clomazona 5,5%CS	Bismark/Sipcam	2-3l/ha	MONO/DI
Penoxsulam 2,04% (B)	Viper/Dow	2 l/ha	AL, AM, CIP, ECH
Penoxsulam 1,33% + Cihalofop 10%	Viper Max/ Dow	3 l/ha	ECH, LEP
Penoxsulam 1,6% + Triclopir 12%OD	Pindar/Dow	2,5kg/ha	AM,BI,ECH,CIP,HE,BOL,SCHO
Profoxdim 20% (A)	Aura/BASF	0,5-1 l/ha	ECH, LEP
AUTORIZACIONES EXCEPCIONALES			
Molinato 7% (N)	Varios/Varias	12,5kg/ha	ECH, TIF
Oxadiazon 38% (E)	Ronstar/Bayer Cropscience	0,65-1,3 l/ha	HE
Propanil 48% (C2)	Stam/UPL	1 l/ha	AL, AM, CIP,ECH, LEP

(*) AL: Alismataceas; AM: Ammania; AS: arroz salvaje; BE: Bergia; BI: Bideus; BOL: Bolboschoenus; CIP: Ciperaceas; DIC: Dicotiledóneas; ECH: Echinochloa; EL: Elatináceas; HE: Heteranthera; LIN: Lindernia; LIT: Litráceas; MONO: monocotiledóneas; PAS: Paspalum; PON: Pontederáceas; SC: Scirpus; SCHO: Schoenoplectus; TIF: Tifa

(**) Uso sistema Clearfield, 2 aplicaciones.

Tal y como se muestra, las materias activas autorizadas en arroz a nivel nacional son escasas. Además, mayoritariamente se concentran en dos grupos de acción, con lo que a causa del uso repetido de los mismos, se están encontrando cada vez con más frecuencia biotipos de malas hierbas resistentes (Boletín 14, Sanidad Vegetal. Junta de Extremadura).

Como método alternativo de control cabe destacar el aumento producido durante esta campaña de la práctica de la siembra en seco. Así, se puede estimar que, del total de la superficie del cultivo del arroz, entre un 30-35% del mismo ha sido utilizando esta técnica. Este tipo de práctica consiste en sembrar el arroz en terreno seco con cierto grado de humedad (tempero), pero no inundado de agua como es la práctica habitual. Se mantiene en esta situación el mayor tiempo posible, siempre y cuando las condiciones climáticas lo permitan. Posteriormente, se procede a inundar el terreno continuando con las prácticas tradicionales del cultivo. Con todo ello, se pretende llevar a cabo un mejor control de las malas hierbas ya que se consigue romper la

dinámica habitual a la que están sujetas. De este modo, como están sometidas a unas condiciones diferentes, compiten peor con el arroz.

CASOS CONFIRMADOS DE RESISTENCIAS A HERBICIDAS

Los estudios de resistencias de ambos géneros de malas hierbas en Extremadura se vienen desarrollando desde 2014 en CICYTEX en colaboración con el Servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura, dentro del Proyecto **INIA RTA2014- 00033-C03-01** denominado “**Manejo Integrado de Infestaciones de *Echinochloa* spp y *Leptochloa* spp en arroz cultivado en inundación**” cuya investigadora principal es M^a Dolores Osuna Ruiz. Como resultado de estos estudios, se han confirmado un aumento de los casos de resistencias causadas por mutación en el sitio de acción del herbicida en los géneros *Leptochloa* y *Echinochloa*, observándose incluso su extensión a parcelas cercanas de donde se encontraron por primera vez (Osuna *et al.*, 2017).

También como fruto de estos trabajos, en 2016 se realizó un folleto titulado “**Resistencia de malas hierbas a herbicidas: cultivo del arroz**” que como su título indica, abarca el tema de las resistencias a herbicidas en malas hierbas del cultivo del arroz,

los mecanismos posibles causantes de esta resistencia, y algunas recomendaciones que se pueden emplear para retrasar la evolución de la misma. Dicho folleto se puede descargar desde la web del CICYTEX: <http://cicytex.juntaex.es/es/descargas/general/63/monografias-libros-manuales-etc>.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el proyecto INIA RTA-2014-00033-C03-01, por la ayuda a Grupos de Investigación de la Junta de Extremadura GR15112 y por el proyecto AGROS (CCESAGROS), fondos FEDER. La participación de Leonard Torcea, está incluida dentro de una estancia financiada por el programa Erasmus +.

BIBLIOGRAFÍA

Boletín Fitosanitario Sanidad Vegetal (Junta de Extremadura). Número 14 (2017). <http://www.juntaex.es/con03/sanidad-vegetal>

Osuna MD *et al.* 2017. Distribución de poblaciones resistentes de *Echinochloa* spp. a herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa en Extremadura. XVI Congreso Nacional de Malherbología. Pamplona-Iruña 2017.

MAPAMA. 2017. <http://www.mapama.gob.es>

Comunicación en Congreso SEMh 2017

Capítulo 4. Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura "*Echinochloa* spp." y "*Leptochloa* spp."

Y. Romano¹, F. Mendoza¹, J.A. Palmerín², J.M. Quiles³, I. Amaro-Blanco¹, M.D. Osuna¹

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Guadajira (Badajoz)

²Servicio de Sanidad Vegetal (Junta de Extremadura)

³Servicio de Producción Agraria (Junta de Extremadura)

XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología: actas: Pamplona-Iruña, 25-27 octubre, 2017 (pp. 337-342). Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra.

Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura: *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp.

Yolanda Romano¹, Fátima Mendoza¹, José Antonio Palmerín², José María Quiles³, Ignacio Amaro¹,
María Dolores Osuna¹✉

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Guadajira (Badajoz) ²Servicio de Sanidad Vegetal (Junta de Extremadura), Don Benito (Badajoz) ³Servicio de Producción Agraria (Junta de Extremadura), Mérida (Badajoz)
[✉]maria.dolores.osuna@juntaex.es

Resumen: Los géneros *Echinochloa* y *Leptochloa* son las malas hierbas más problemáticas actualmente para el cultivo del arroz en Extremadura. Para controlarlas adecuadamente es imprescindible una identificación temprana, ya que las diferentes especies de ambos géneros muestran diferentes respuestas frente a un mismo herbicida. Una herramienta útil para discriminar las especies de dichas malas hierbas en estadios tempranos son los marcadores moleculares, que ayuda a planificar antes las estrategias de control adecuadas para el agricultor. En este trabajo se muestran las técnicas moleculares empleadas para diferenciar las especies del género *Echinochloa* más habituales en Extremadura: *E. oryzicola*, *E. oryzoides*, *E. crus galli*, *E. hispidula* y *E. colona* utilizando la técnica molecular PCR-RFLP. Por otro lado, para diferenciar las especies del género *Leptochloa* (*L. fascicularis* y *L. uninervia*) se han utilizado marcadores tipo AFLP.
Palabras clave: *Echinochloa*, *Leptochloa*, marcador molecular, PCR-RFLP, AFLP.

INTRODUCCIÓN

De las malas hierbas presentes en el cultivo del arroz encontramos los géneros *Echinochloa* y *Leptochloa*, ambos pertenecientes a la familia Poaceae, y considerados como las malas hierbas más importantes que reducen el rendimiento del cultivo causando así grandes pérdidas económicas. Respecto al género *Echinochloa* a día de hoy no existe un acuerdo completo sobre las especies que lo constituyen. Debido a la alta variabilidad morfológica existente, para el género *Echinochloa* han sido propuestas diferentes clasificaciones taxonómicas. En el área mediterránea, la clasificación de este género se lleva a cabo principalmente según las claves taxonómicas de Pignatti (1982) y Carretero (1981). En Extremadura, el género *Echinochloa* incluye principalmente 4 especies: *E. crus-galli*, *E. hispidula*, *E. oryzoides* y *E. oryzicola*. Por otro lado, el género *Leptochloa*, comprende aproximadamente 40 especies de origen tropical y subtropical (Snow et al., 2008). En España, las primeras referencias como mala hierba aparecieron en 1985 en Lérída, en cultivos como maíz y pradera (Mayoral, 1991, 1993; Recasens and Conesa, 1995), y su

presencia como mala hierba en el cultivo del arroz, ha pasado de ser algo puntual a estar ampliamente extendida en un espacio de tiempo relativamente corto. Diferenciar las especies en campo es muy complicada y la bibliografía existente las caracterizaba una vez emergida la panícula. En Extremadura, el género *Leptochloa* incluye dos especies: *L. fascicularis* y *L. uninervia*. Tal y como se ha mencionado anteriormente, las especies de ambos géneros son difíciles de identificar morfológicamente, y además, para ello, se requiere que se encuentren en un estadio avanzado de su desarrollo, con lo cual sería tarde para llevar a cabo la aplicación del herbicida. Para poder hacer tal diferenciación de manera temprana se recurre al empleo de técnicas moleculares. En este trabajo se han puesto a punto técnicas moleculares basadas en la PCR para poder diferenciar las especies de ambos géneros de campos de arroz de Extremadura en un estadio temprano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal.

Semillas de *Echinochloa* spp. recolectadas en los campos de arroz de Extremadura, se hicieron germinar en placas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada y selladas con parafilm. Una vez germinadas, se procedió a su extracción. En ocasiones, la semilla no germinó, con lo que la extracción se hizo de la propia semilla hidratada. Para el caso de las semillas de *Leptochloa* spp., se germinaron en macetas de 7x7x9 cm. utilizándose un sustrato de turba-vermiculita en una proporción 3:1 en invernadero con condiciones controladas.

Extracción del ADN y reacciones de PCR.

Para la extracción del ADN se utilizó el kit de extracción de ADN para plantas de BIOTOOLS siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído, se cuantificó utilizando el NANODROP 1000 (Thermo Scientific) para asegurarnos que estaba en las condiciones adecuadas de concentración y pureza. A continuación, se hicieron diluciones a 10 ng/μl para el caso de las muestras de *Echinochloa* spp., y a 20 ng/μl para el caso de las muestras de *Leptochloa* spp., que son las concentraciones utilizadas en las posteriores PCR. El ADN se conservó a -21 °C hasta su utilización en los análisis.

En el caso de *Echinochloa* spp., para la realización de la PCR se utilizaron dos parejas de cebadores. Por un lado, la pareja formada por trn-a (5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3') / trn-b1 (5'-AACGATCGAATGAAAATGCC-3'), y por otro lado la pareja formada por trn-c (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3') y trn-d (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3') (Yamaguchi et al., 2005). La mezcla de los reactivos utilizada para llevar a cabo la reacción de PCR en ambas parejas de cebadores fue de 0.75 μl de cada uno (10 pmol/ μl), 1.6 μl de la mezcla de dNTP

(2.5mM), 2 µl de buffer 10X, 0.2µl de Taq polimerasa (5U/ µl) y se completó con agua de PCR hasta un volumen final de 20 µl. El ciclo de PCR en ambos casos fue: 94°C 3min (x1); 94°C 30seg, 57°C 30seg, 72°C 1min (x30); 72°C 7min (x1) manteniéndose a 4°C final del ciclo. A continuación, se llevaban a cabo las respectivas digestiones utilizando las enzimas de restricción Ecor I (5'-G*AATTC-3'), Alu I (5'-AG*CT-3') y Dra I (5'-TTT*AAA-3'), de manera que la PCR realizada con la pareja trna/b1 era digerida con la enzima Ecor I, y la PCR realizada con la pareja trnc/d era digerida con las enzimas Alu I y Dra I por separado. De este modo, los 30µl de volumen final de la reacción contenían 2µl del Buffer 10X, 1µl de la enzima (Fast Digest Thermo Fisher), 10µl del producto de PCR y 17µl de agua. La mezcla se incubaba durante 15 minutos a 37°C. Los productos digeridos fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.3% en TBE1X, teñidos con Red Safe 20000X (INTRON), y visualizados mediante luz UV utilizando el transiluminador GEL DOC XR SYSTEM (BIO RAD).

En el caso de *Leptochloa* spp. se utilizaron marcadores AFLP (amplified fragment length polymorphism) los cuales presentan un alto nivel de polimorfismo ya que dan lugar a gran cantidad de bandas, además son muy reproducibles y no requieren información previa del genoma a analizar. Se utilizó para ello el Kit de LICOR «IRDye Fluorescent AFLP» que necesita cuatro etapas. En la primera etapa el ADN genómico se digirió con dos enzimas de restricción, Ecor I (de corte raro) y Mse I (de corte frecuente). Se emplearon 5µl de ADN genómico (20ng/µl) total para 12,5µl de reacción (2,5µl de 5x PCR buffer, 1µl de EcoRI/MseI enzyme mix y 4µl de agua). El ciclo de PCR utilizado fue: 37°C 2h; 70°C 15min. En la segunda etapa, unos fragmentos de ADN doble denominados adaptadores se ligaron específicamente a los fragmentos de ADN obtenidos de la digestión anterior, lo cual permitió generar moldes de ADN para la amplificación posterior. Para ello se empleó 12µl del adaptador mix y 0,5µl de T4 DNA ligasa. El ciclo utilizado fue: 20°C 2h. La tercera etapa consistió en una preamplificación de los moldes generados mediante PCR utilizando cebadores específicos complementarios a los adaptadores. Para ello se emplearon 2,5µl de la dilución 1:10 de la mezcla de ligación para 25,5µl de volumen final. Se utilizó 20µl de AFLP Preamp primer mix, 2,5µl de Buffer de PCR reacción (10X) y 0,5µl de taq polimerasa (5 units/µl). El ciclo fue: 20 ciclos de 94°C 30s, 56°C 1 min, 72°C 1min. La cuarta y última etapa consistió en la amplificación selectiva utilizando 6 parejas de cebadores: E36-M48, E36-M60, E37-M49, E38-M59, E40-M61 y E35-M49. Se emplearon en cada reacción 2µl de la dilución 1:20 de pre-amplificación para 10,5 µl de volumen final: 6µl de taq polimerasa working mix (1,2µl buffer10X, 0,06µl taq (5U /µl) y 4,74µl de agua), 2µl de MseI primer que contenía los dNTPs, 0,5µl de IRDye 700 Labeled EcoRI primer A o 0,5µl de IRDye 800 Labeled EcoRI primer A). El ciclo utilizado en este caso fue: 1 ciclo de 94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 1min; 12 ciclos de 94°C 30s, 65°C

-0.7°C por ciclo, 72°C 1min; 23 ciclos de 94°C 30s, 56°C 30s y 72°C 1min. Los productos obtenidos tras todo el proceso fueron separados mediante electroforesis en geles de acrilamida al 6% utilizando el secuenciador de ADN automático LICOR 4300.

Con los datos obtenidos tras los análisis con AFLP se realizó una matriz que fue analizada con el programa estadístico NTSYS 2.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del género *Echinochloa*.

Para la puesta a punto de la técnica PCR-RFLP para diferenciar las especies del género *Echinochloa*, en primer lugar, se compararon los datos obtenidos con aquellos obtenidos en una caracterización a nivel morfológico con poblaciones de este género representativas de la zona arroceras de Extremadura (datos no mostrados). Una vez correctamente identificadas, se empleó la técnica molecular y se comprobó que se separaban de igual manera las especies con ambas técnicas, de manera que nos permitió clasificar molecularmente las especies en 3 grupos:

- Grupo 1: *E. oryzicola*/*E. oryzoides*
- Grupo 2: *E. crus-galli*/*E. hispidula*
- Grupo 3: *E. colona*.

Como ya fue nombrado con anterioridad, en esta técnica se utilizan dos parejas de cebadores. Utilizando la pareja de cebadores trn-a/trn-b1 para los grupos 1 y 2 se obtiene un fragmento de 481bp, sin embargo, para el grupo 3 el tamaño del fragmento obtenido es de 449bp. Tras la digestión con Ecor I el grupo 1 sigue dando el tamaño de banda de 481bp (la enzima no corta), el grupo 2 da dos fragmentos, uno de 178bp y otro de 271bp (la enzima sí corta), y el grupo 3 sigue dando un fragmento de 449bp (la enzima no corta) Por otro lado, utilizando la pareja de cebadores trn-c/trn-d, para los 3 grupos se obtiene un fragmento de 620bp. Tras la digestión con Dra I, el grupo 1 sigue dando el tamaño de banda de 620bp (la enzima no corta), el grupo 2 y 3 dan dos fragmentos, uno de 120bp y otro de 500bp (la enzima sí corta) Por último, tras la digestión con Alu I, el grupo 1 da 2 fragmentos, uno de 178bp y otro de 447bp (la enzima sí corta), el grupo 2 da un tamaño de banda de 620bp (la enzima no corta), y el grupo 3 da 2 fragmentos, uno de 178bp y otro de 449bp (Fig. 1).

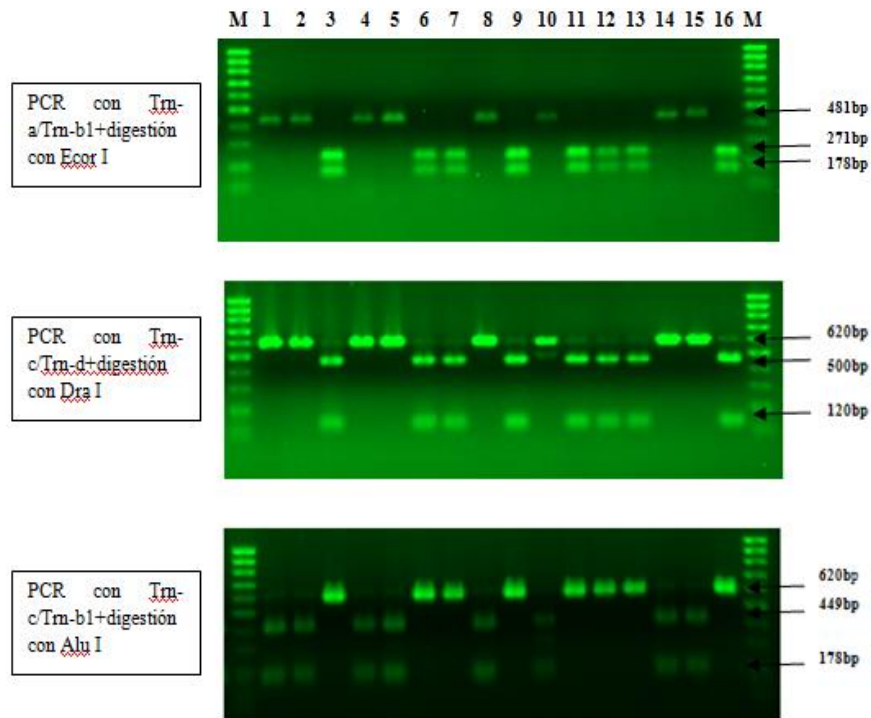


Figura 46. Productos obtenidos tras las digestiones con Ecor I, Dra I y Alu I una vez realizadas las PCR con las parejas de cebadores Trn-a/Trn-b1 y Trn-c/Trn-d. Se muestran poblaciones pertenecientes al GRU- PO 1 (calles 1, 2, 4, 5, 8, 10, 14, 15) y al GRUPO 2 (calles 3, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 16).

Del total de las muestras de *Echinochloa* spp. de Extremadura caracterizadas a nivel molecular mediante esta técnica, la mayoría de ellas (un 65%) pertenecen al Grupo 1, seguidas un 34% del Grupo 2. Del Grupo 3 tan solo se han encontrado dos poblaciones (menos de un 1%).

Del género *Leptochloa*.

En primer lugar, tal y como se hizo con las muestras del género *Echinochloa*, los datos moleculares obtenidos se compararon con una caracterización morfológica previa en individuos del género *Leptochloa* y se separaron por especies (datos no mostrados), comprobando la viabilidad de dichos marcadores. Por otro lado, analizando rigurosamente los fragmentos obtenidos en las electroforesis, se localizaron algunos específicos de cada especie con un 90-100% de seguridad. En la tabla 1 se muestran algunos de los tamaños de banda específicos con algunas de las parejas de cebadores utilizadas.

Podemos decir también, que, de todas las muestras caracterizadas molecularmente de este género, se ha encontrado que la mayoría de ellas pertenecen a *Leptochloa uninervia* (sobre un 70%), y en menor cantidad *Leptochloa fascicularis* (sobre un 30%).

Tabla 28. Algunos de los fragmentos diferenciadores de las dos especies del género *Leptochloa* spp. encontrados tras los análisis moleculares con marcadores AFLP

Primers	Fragmento	<i>L. fascicularis</i>	<i>L. uninervia</i>
E37_M49	409bp	Presente	Ausente
E37_M49	507bp	Presente	Ausente
E40_M61	236bp	Presente	Ausente
E35_M49	153bp	Presente	Ausente
E36_M48	256bp	Ausente	Presente

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el proyecto INIA RTA-2014-00033-C03-01, por la ayuda a Grupos de Investigación de la Junta de Extremadura GR15112 y por el proyecto AGROS (CCESAGROS), fondos FEDER.

REFERENCIAS

Carretero, JL (1981). El género *Echinochloa* Beauv. en el suroeste de Europa. Anales del Jardín Botánico de Madrid, 38: 91-108.

Mayoral A (1991). Notes Florístiques de la Plana d'Urgell, III. Ciències, 49, 79-81. Mayoral A (1993). Notes Florístiques de la Plana d'Urgell, IV. Ciències, 50, 9-11. Pignatti S (1982). Flora d'Italia. Vol. III. Bologna, Italy: Ed Agricole, p. 2324.

Recasens J y Conesa JA (1995). Nuevas malas hierbas alóctonas en los cultivos de regadío de Cataluña. Actas Congreso Sociedad Española de Malherbología, 59-65.

Snow N, Peterson PM and Giraldo-Cañas D (2008). *Leptochloa* (Poaceae, Chloridoideae) in Colombia.

Journal of the Botanical Research Institute of Texas 2(2): 861-874.

Yamaguchi HA, Utano K, Yasuda A, Yano and A Soejima (2005). A molecular phylogeny of wild and cultivated *Echinochloa* in East Asia inferred from non-coding region sequences of trn T-L-F. Weed Biology and Management, 5, 210-218.

Artículo de impacto en revisión

Capítulo 5. Distribution and characterisation of target-site resistance to ALS and ACCase-inhibiting herbicides in *Echinochloa* spp. from Spanish rice fields

Ignacio Amaro-Blanco^{1*}, Yolanda Romano¹, Candelario Palma-Bautista², Rafael de Prado², and Leonard I. Torcea³, María D. Osuna¹

¹Department of Horticultural Sciences, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura, Ctra. A-V, Km 372, 06187 Guadajira, Badajoz, 06187, mdosuna@gmail.com

²Department of Agricultural Chemistry and Soil Science, University of Cordoba, Campus Rabanales, Edificio Marie Curie - Ctra. Nacional IV-Km 396, 14071, ge1pramr@uco.es

³Banat University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Aradului 119, 300645 Timișoara, Romania, leonardtorcea@yahoo.com

*Correspondence: iamaroblanco@gmail.com, Tel: +34924014092

Crop Prot. 2019

Distribution and characterization of target-site resistance to ALS- and ACCase-inhibiting herbicides in *Echinochloa* spp. from Spanish rice fields

Ignacio Amaro-Blanco ^{1*}, Yolanda Romano ¹, Candelario Palma-Bautista ², Rafael de Prado ², Leonard I. Torcea ³, and María D. Osuna ¹

¹ Department of Horticultural Science, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura, Ctra. A-V, Km 372, 06187 Guadajira, Badajoz, 06187, mdosuna@gmail.com.

² Department of Agricultural Chemistry and Soil Science, University of Cordoba, Campus Rabanales, Edificio Marie Curie - Ctra. Nacional IV-Km 396, 14071, qe1pramr@uco.es.

³ Banat University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Aradului 119, 300645 Timișoara, Romania, leonardtorcea@yahoo.com.

* Correspondence: iamaroblanco@gmail.com, Tel: +34924014092

Abstract: *Echinochloa* spp. is one of the most invasive weeds in rice fields worldwide. Acetolactate synthase (ALS) and acetyl-CoA carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides are two of the most widely used herbicide groups to control these plants. Their excessive use can lead to herbicide-resistant *Echinochloa* due to target-site resistance (TSR) mechanisms. In this work, different *Echinochloa* spp. populations were collected in different rice fields in Extremadura (western Spain) where resistance to ALS and/or ACCase herbicides was suspected. Target-site and dose-response studies were carried out in those populations. It was found that Pro197Ser was the most common amino acid substitution in ALS gene sequencing and conferred resistance to triazolopyrimidine, imidazolinone, sulfonylurea, and pyrimidinyl benzoate families. In the ALS sequence study, evidence of heterozygosity was also observed from the sequencing results. In the ACCase gene sequencing, Ile1781Leu substitution was found, conferring resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione families. Of the authorized herbicides, 87.5% belong to these families. It is therefore important that farmers carry out an integrated control system that combines both chemical and non-chemical tools.

Keywords: *Echinochloa* spp.; Acetolactate synthase; Acetyl-CoA carboxylase; Amino acid substitutions; Herbicide resistance

1. Introduction

Rice (*Oryza sativa* and *Oryza glaberrima*) is a very important staple cereal grain which is consumed worldwide. In Spain, which is one of the main rice producers in Europe, an estimated

107,604 ha were dedicated to rice cultivation in the 2017 season, with around 55% and 45% corresponding to the Japonica and Indica varieties, respectively (MAPAMA, 2017). Cultivation of this crop requires agronomic practices that place high emphasis on weed control (Chauhan and Johnson, 2011). *Echinochloa* spp. is one of the most intractable weeds in rice fields globally (Danquah et al., 2002a; Duy et al., 2018). The genus *Echinochloa* spp. includes between 40-50 species. It is the most important weed genus worldwide, particularly in rice cultivation, growing principally in tropical and temperate regions (Holm et al., 1977; Michael, 1983). Barnyard grass [*E. crus-galli* (L.) Beauv.] is the most common weed species and is found in a wide range of summer crops such as rice. Late watergrass (*E. oryzicola* Vasing.) and early watergrass [*E. oryzoides* (Ard.) Fritsch.] are also considered to be serious weeds of water-seeded rice in many rice production areas (Carretero, 1981; Tabacchi et al., 2006).

Chemical control is very common in rice. Acetolactate synthase (ALS) and acetyl-CoA carboxylase (ACCCase) inhibiting herbicides are two of the most commonly used families in Spain to control weed species in this crop (MAPAMA, 2018b). In addition to ALS- and ACCCase-inhibiting herbicides, others used in Spain as alternative herbicides with a different mode of action include clomazone (DOXP inhibitor), bentazon (PSII inhibitor) and propanil (PSII inhibitor). The repeated use of herbicides to control *Echinochloa* spp. has led to increasingly important selection and resistance risks, producing large losses in rice crop yields.

Acetolactate synthase (ALS) is the enzyme that catalyzes the first reaction in the biosynthesis pathway of the branched amino acids, valine, leucine and isoleucine (Shaner, 1991). These amino acids are essential for plant growth and development, and the inhibition of their synthesis is lethal for the plant. ALS is the site of action for 5 families of herbicides: sulfonyleureas (SU) (Ray, 1984), imidazolinones (IMI) (Shaner et al., 1984), triazolopyrimidines (TP) (Gerwick et al., 1993), pyrimidinyl-thiobenzoates (PTB) (Takahashi et al., 1991) and sulfonyl-aminocarbonyl triazolinones (SCT) (Santel et al., 1999). Herbicides that inhibit this enzyme have been commonly used in agriculture throughout the world since the 1980s. They can control a large number of weed species, have low toxicity due to human or environmental action and are selective in the main crops (Mazur and Falco, 1989). Acetyl-coenzyme A carboxylase (ACCCase) is a key enzyme in the biosynthesis of fatty acids, catalyzing the production of malonyl-CoA from acetyl-CoA and CO₂. There are two isoforms of the enzyme, one

homomeric and the other heteromeric. In all eukaryotes, ACCase is found in the cytosol, which is a homomer composed of two identical subunits, and includes three catalytic domains in a single polypeptide (Iwakami et al., 2012). Plastidic ACCase is found in most plants. It is a heteromer composed of four different subunits where three domains are located. The inhibitory herbicides of this enzyme act on the homomeric form of ACCase and are structurally grouped into 3 classes of compounds: aryloxyphenoxypropionates (APPs) also known as "fops"; cyclohexanodiones (CHDs) also known as "dims"; and phenylpyrazolinones (PPZs) also known as "dens" (Délye, 2005; Muehlebach et al., 2009).

Currently, 67 cases of resistance to a unique site of action have been described in 8 *Echinochloa* species: *E. colona*, *E. crus-galli* var. *crus-galli*, *E. crus-galli* var. *formosensis*, *E. crus-galli* var. *zelayensis*, *E. crus-pavonis*, *E. erecta*, *E. oryzoides*, and *E. oryzicola*. By site of action, there are 20 cases described for ALS inhibitors, 20 for PSII inhibitors, 10 for synthetic auxins, 9 for ACCase inhibitors, 3 for microtubule inhibitors, 2 for long chain fatty acid inhibitors, 2 for lipid inhibitors, and 1 for DOXP inhibitors. Moreover, there are 17 cases of multiple resistance in these *Echinochloa* species (Heap, 2019b).

The mechanisms of herbicide resistance are divided into two groups: target-site-based resistance (TSR) and non-target-site-based resistance (NTSR). The majority of resistances to listed herbicides are due to TSR (Panozzo et al., 2013). In *Echinochloa*, Goh et al. (2018) reported that newly evolved resistance to glyphosate in populations of *E. colona* were not due to TSR mutations but to NTSR mechanisms that they had as yet been unable to decipher.

The main mechanism found in ALS-inhibitor resistant biotypes is a point mutation in the sequence of the ALS gene which results in conformational changes in the site of action of the enzyme that reduce the efficacy of the herbicide. Mutations that confer resistance to these herbicides mainly occur in eight conserved domains: Ala122 (Singh et al., 2019), Pro197 (Deng et al., 2019), Ala205 (Brosnan et al., 2016), Asp376 (Deng et al., 2019), Arg377, Trp574 (Deng et al., 2019), Ser653 (Kumar and Jha, 2017), and Gly654 (Laplante et al., 2009). Substitutions at Ala122, Ala205, and Ser653 mostly result in resistance to IMI herbicides.

The first case of ALS inhibitor resistant *Echinochloa* spp. was detected in *E. colona* in 1998 in Costa Rica. Since then, 26 cases of resistance to this group (including multiple site of action cases) of

herbicides have been reported for 5 species of *Echinochloa* spp. (*E. colona*, *E. crus-galli* var. *crus-galli*, *E. crus-galli* var. *formosensis*, *E. oryzoides*, *E. oryzicola*). The latest ALS-resistant *Echinochloa* was reported in Ukraine with a cross-resistant *E. crus-galli* var. *crus-galli* (Heap, 2019b).

TSR is possibly the primary underlying resistance mechanism to ACCase-inhibiting herbicides (Powles and Yu, 2010b). Thirteen amino acid substitutions in the ACCase domain have been recognized as conferring resistance to herbicides. They take place fundamentally in the following domains: Ile1781 to Leucine or Val or Thr (Zagnitko et al., 2001; Délye et al., 2002a; b; Collavo et al., 2011; Mohamed et al., 2012; Li et al., 2013), Trp1999 to Cys or Leu or Ser (Liu et al., 2007; Kaundun et al., 2013), Trp2027 to Cys (Xu et al., 2013), Ile2041 to Asn or Val (Tang et al., 2012), Asn2078 to Gly (Kaundun, 2010), Cys2088 to Arg (Kaundun et al., 2012), and Gly2096 to Ala or Ser (Cruz-Hipolito et al., 2012).

There are 21 reports of ACCase-inhibitor resistance (including multiple site of action cases) for 5 *Echinochloa* species: *E. colona*, *E. crus-galli* var. *crus-galli*, *E. crus-galli* var. *formosensis*, *E. oryzoides*, *E. oryzicola* (Heap, 2019b).

Although most of the cases described until now have been of the TSR type, numerous NTSR cases have also been described in ALS and ACCase. Fang et al. (2018) and Yan et al. (2019) have reported cytochrome P450 genes involved in ALS-inhibitor resistance in *E. crus-galli* and *E. glabrescens* respectively. Similarly, Iwakami et al. (2019) reported that cytochrome P450 is involved in cross-resistance to ALS- and ACCase-inhibiting herbicides in *E. phyllopogon* (*E. oryzicola*).

Different mutations can lead to different resistance patterns. For example, an Ala-122-Asn amino acid change endows resistance to both triazolopyrimidines and imidazolinones (Panozzo et al., 2017), while Ala122Val substitution can only endow resistance to triazolopyrimidines (Riar et al., 2013). The problem of mutations leading to multiple resistance is a serious one. In the case of *Echinochloa* spp., 17 cases have been confirmed with multiple resistance (all of them in rice cultivation), with 7 of them resistant to ALS and ACCase inhibitors at the same time.

In Spain, to date, two cases of resistance in *Echinochloa* spp. have been described, one of them in a rice crop to ALS-inhibiting herbicides (2015) and the other in a corn crop to PSII-inhibiting herbicides (1992).

The objectives of this work were: (1) To sample *Echinochloa* spp. populations in the rice-growing areas of Extremadura (southwestern Spain) where resistance was suspected; (2) To characterize the species by using molecular markers for every sampled population; (3) To study mutations in the ALS and ACCase gene sequences; and (4) To study cross- and multiple-resistance to ALS and ACCase-inhibiting herbicides at greenhouse level.

2. Materials and Methods

2.1. Surveys

Seeds of *Echinochloa* spp. of rice fields were collected from different rice areas in Extremadura (southwestern Spain), where there were reports of a lack of control. This region was divided into 4 parts to carry out surveys by area: 1. "Vegas Bajas"; 2. "Middle Area"; 3. "Classical Area"; and 4. "East Area". The management of each field in previous years was recorded.

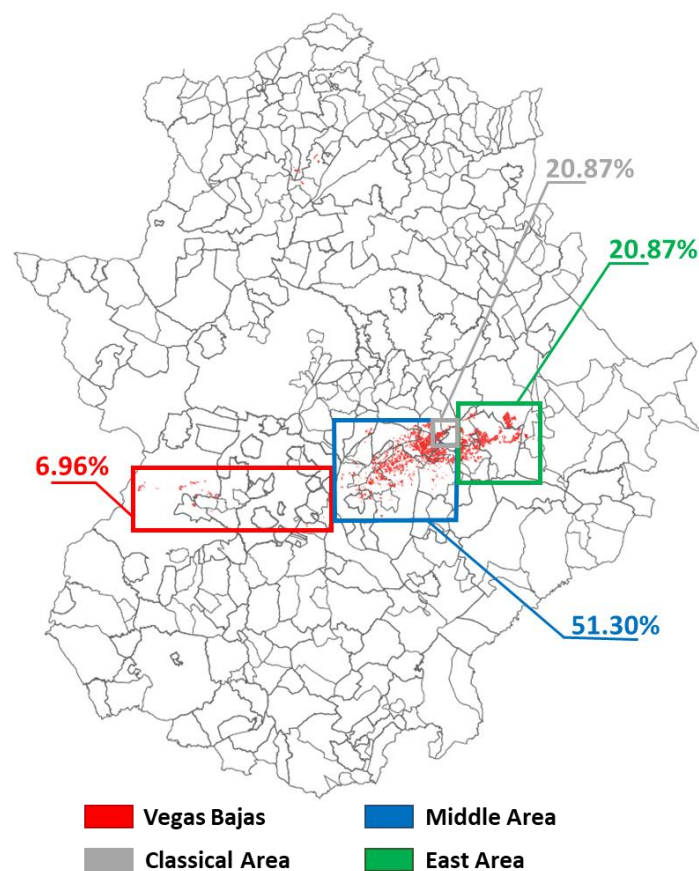


Figura 47. Distribution (%) of *Echinochloa* spp. populations sampled in the different areas of Extremadura.

2.2. DNA extraction and polymerase chain reaction

In order to extract the DNA, the seeds of *Echinochloa* spp. collected in the rice fields of Extremadura were germinated in Petri dishes with filter paper moistened with 0.01% gibberellic acid (8-10 ml) and sealed with parafilm. They were placed in a germination chamber with a day-night temperature of 25°C for a photoperiod of 16 hours (350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 80% relative humidity. DNA was extracted from live material. However, as sometimes seeds did not germinate, extraction was made directly from the hydrated seed.

For DNA extraction, a plant DNA extraction kit was used following the manufacturer's protocol (BIOTOOLS, B&M Labs S.A). Once extracted, the DNA was quantified using the NanoDrop-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) to ensure that it was in the right conditions of concentration and purity. Then, dilutions were made at 10 ng μl^{-1} , the concentration used in the subsequent polymerase chain reaction (PCR).

2.3. ALS and ACCase gene sequencing and polymerase chain reaction (PCR)

For the ALS sequence study, two pairs of primers were used. One pair, BE1 (5'-GTCTTGGGGCTATGGGATTT-3') / BE2 (5'-CGACAGAACAAGGGAGAACA-3'), was designed using ALS GenBank sequence accession numbers AB636580.1 (*E. phyllopogon*) and AY885675.1 (*Oryza sativa*) with the PRIMER 3 PLUS program to amplify the BE region of the ALS, giving a band size of 594 bp. The CAD region of the ALS was amplified using the pair of primers Pali-1F (5'-CGACGTCTTCGCCTACCC-3') / Pali-2R (5'-ATCTGCTGCTGGATGTCCTT-3'), also designed using the PRIMER 3 PLUS program from GenBank sequence accession number JQ319776 (*E. cruss galli*), giving a band size of 447 bp.

For the molecular study of ACCase, two pairs of primers were also used. Both were designed using ACCase GenBank sequence accession number HQ395759.1 (*E. cruss-galli*) with the PRIMER 3 PLUS program. The first pair of primers was CRUSS-F (5'-GATTGGCATAGCCGATGAAG-3') / CRUSS-R (5'-TGGACAACACCATTGGTAGC-3'), which amplifies the region Ile1781 giving a fragment of 474bp. The second pair was AC-6F (5'-AGCTTGGAGGAATCCCTGTT-3') / AC-6R (5'-GGGTCAAGCCTACCCATACA-3'), which amplifies the rest of the regions (Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Cys2088 and Gly2096), giving a 496bp fragment.

The mixture of reagents used to carry out the PCR was 0.75 µl of each primer (10 pmol µl⁻¹), 1.6 µl of the dNTP mixture (2.5 mM), 2 µl of 10X buffer, 0.2 µl of Taq polymerase (5U µl⁻¹) and PCR water to a final volume of 20 µl. The PCR cycle carried out for these four primer pairs CRUSS-F/CRUSS-R, AC-6F/AC-6R and Pali-1F/Pali-2R was the same: 95 °C 5 min (x1); 95 °C 30 sec, 57 °C 30 sec, 72 °C 1 min (x35) and 72 °C 5 min (x1), remaining at 4 °C at the end of the cycle. For the pair of primers BE1 / BE2 the PCR cycle was: 95 °C 5 min (x1); 95 °C 30 sec, 61 °C 30 sec, 72 °C 1 min (x35) and 72 °C 5 min (x1), and then held at 4 °C at the end of the cycle.

The DNA products amplified by the PCR technique described above were separated by electrophoresis in 1.3% agarose gel and visualized with the Alpha Innotech transilluminator. The agarose gel was stained with Gel Red 10000X (Biotium). The expected bands were cut and purified using the BIOTOOLS DNA Purification Kit (according to the manufacturer's instructions). After that, samples were sequenced using an external lab: STAB (Service of Applied Techniques to Bioscience) at the University of Extremadura (Spain). The sequencing results were visualized using CHROMAS software. Subsequently, these sequences were aligned using the CLUSTAL OMEGA software.

2.4. Molecular characterization of populations

Species identification was carried out following the methodology used by Romano et al. (2017) with PCR-RFLP markers. Using this technique, the populations were divided into 3 main groups of species: *E. crus-galli*/*E. hispidula*, *E. oryzicola*/*E. oryzoides*, and *E. colona*.

2.5. Herbicides and chemicals

The herbicides selected for the treatment are authorized in the region of the sampling plots. Two ACCase inhibitors and four ALS inhibitors were used: profoxydim (200 g/L EC [Emulsifiable Concentrate], BASF) mixed with an adjuvant methyl oleate (348 g/L EC, BASF) and cyhalofop-butyl (200 g/L EC, Dow Agrosiences) as inhibitors of ACCase; and penoxsulam (20.4 g/L OD [Oil Dispersion], Dow Agrosiences), imazamox (40 g/L SL [Soluble Concentrate], BASF), azimsulfuron (0.5 g/g WG [Water-dispersible Granule], DUPONT IBERICA) and byspiribac-sodium (408 g/L SL, BAYER) as inhibitors of ALS.

2.6. Dose-response assays

In the same way as for the extraction of DNA, seeds were germinated in Petri dishes with moistened filter paper (distilled water). Germinating seedlings were transplanted into pots (10x10x11

cm) containing peat and vermiculite (3:1 v/v) and placed in a greenhouse at 28/18° C (day/night) under a photoperiod of 16 h with 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux.

Herbicide treatments were applied to plants at the BBCH 13–14 scale. A flat fan nozzle (Tee Jet 8002 EVS) was used to spray the plants at 250 kPa from a height of 50 cm above the soil surface, using an output volume equivalent to 250 L ha⁻¹. Five doses of each herbicide were applied to the selected *Echinochloa* spp. Herbicide doses are shown in Table 29. A total of 36 plants per population were used, 6 for each dose used (0, x/2, x, 2x, 4x, and 8x). The plants were cut above ground and the fresh weight was recorded 21 days after treatment (DAT) to calculate the ED₅₀. The ech5-09 population was used as a susceptible biotype to calculate the resistance factor (RF) by dividing the ED₅₀ of each biotype by the ED₅₀ of the chosen susceptible (S) biotype.

Table 29. Herbicide treatments applied for the dose–response tests.

Herbicides	Chemical group ^a	Dose g a.i. ha ⁻¹
ACCCase-inhibiting herbicides		
Profoxydim ^b	CHD	0, 100, <u>200</u> ^c , 400, 800, 1600
Cyhalofop-butyl	APP	0, 150, <u>300</u> , 600, 1200, 2400
ALS-inhibiting herbicides		
Penoxsulam	TP	0, 20.4, <u>40.8</u> , 81.6, 163.2, 326.4
Imazamox	IMI	0, 17.5, <u>35</u> , 70, 140, 280
Azimsulfuron	SU	0, 11.25, <u>22.5</u> , 45, 90, 180
Byspiribac-sodium	PB	0, 12.75, <u>25.5</u> , 51, 102, 204

^a APP: aryloxyphenoxypropionates; CHD: cyclohexanediones; IMI: imidazolinones; PB: pyrimidinyl benzoate; SU: sulfonyleureas; TP: triazolopyrimidines

^b A dose of 0.2% of an adjuvant (methyl oleate, 348 g/L EC, BASF) was used to produce a more effective absorption of the herbicide.

^c The labeled rate for each herbicide is underlined.

Dose-response data were subjected to nonlinear regression analysis using a three-parameter log-logistic model (equation 1) to determine the herbicide dose resulting in a 50% reduction in growth (ED₅₀).

$$y = d/[1 + (x/g)^b] \quad (1)$$

where y (ED₅₀) is the dose producing a response halfway between the upper limit, d (fixed at 100).

The parameter b denotes the relative slope around ED₅₀.

Regression analysis was conducted using the drc package with fct= LL.3 (Ritz et al., 2015) for the statistical environment R (Team, 2017b). To test for a common ED_{50} within each herbicide and population studied, i.e. an RF of 1, a lack-of-fit test was used to compare the model consisting of curves with population-specific ED_{50} values with a reduced model with common ED_{50} .

3. Results

3.1. Surveys

Surveys were carried out from 2008 to 2017 in four areas (1. "Vegas Bajas", 2. "Middle Area", 3. "Classical Area", and 4. "East Area") of Extremadura in southwestern Spain. The total number of populations collected was 115: 1 sample in 2008, 7 in 2009, 13 in 2010, 11 in 2011, 13 in 2012, 20 in 2013, 7 in 2014, 4 in 2015, 11 in 2016, and 28 in 2017.

A molecular and morphological characterization of the *Echinochloa* species present in the survey was performed. Each population of *Echinochloa* spp. collected in rice fields belonging to the 4 areas of Extremadura was characterized following the methodology of Romano et al. (2017). The results gave the following proportions: 79.13% of *E. oryzicola*/*E. oryzoides*, 15.65% of *E. crus-galli*/*E. hispidula*, and 5.22% of *E. colona*.

3.2. ALS and ACCase gene sequencing

From these collected samples, the sequences of ALS and ACCase were analyzed to determine whether the mechanism responsible for putative resistance in these populations led to a mutation in the target site of the ALS/ACCase genes. Two ALS gene fragments, with lengths of 594 and 447 bp, where the BE and CAD regions are found respectively, were amplified to identify the potential mutations. No mutations in the BE region were found in any of the populations collected. The sequencing revealed two mutations at position 197: Pro197Ser and Pro197Thr. The amino acid substitution from proline to serine was the most predominant mutation in the ALS gene in the populations collected (6.96%). Another mutation was found at position 653 of the ALS gene which resulted in a substitution from serine to asparagine. An analysis indicated that the Ser653Asn and Pro197Thr amino acid substitutions were found in, respectively, 4.35% and 0.87% of the samples collected. A total of 24.35% of the samples were heterozygous and in another 63.48% no mutation was found.

In the ACCase gene sequencing, seven positions were studied to find possible mutations: 1781, 1999, 2027, 2041, 2078, 2088 and 2096. Among all the populations collected, only two showed an amino acid substitution of isoleucine for leucine at the same position (1781), representing 1.74% of the collected samples. Sequencing did not show any mutation in the other regions studied.

In the ALS gene sequencing, several populations with overlapped peaks in the chromatograms were detected (see example in Figure 48). These populations showed no coding for a different amino acid compared to the susceptible population. Overlapped peaks from another base were observed and these would encode another amino acid. These biotypes could show heterozygosity and represented 24.35% of the all samples collected.

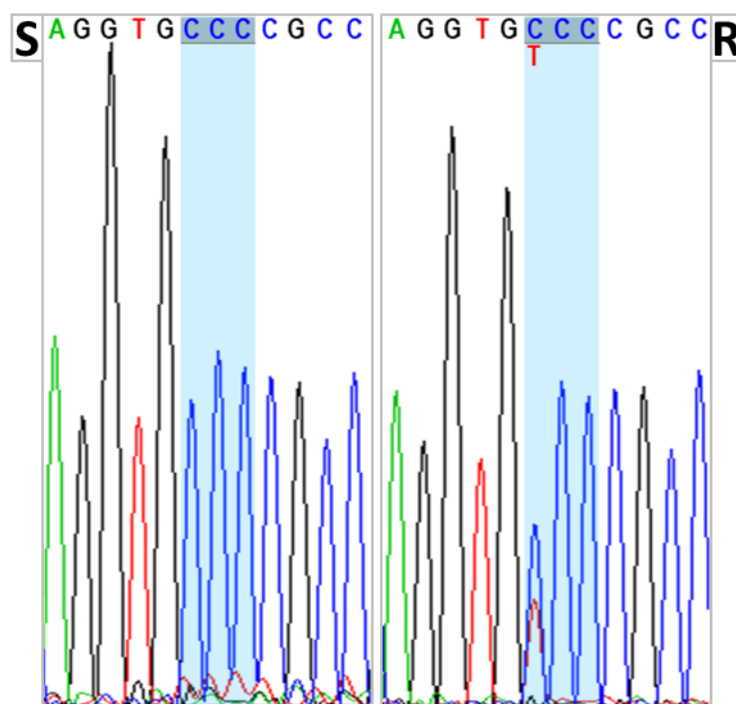


Figure 48. Partial sequencing chromatograms of ALS fragments of a susceptible (left) and a resistant (right) plant of *E. oryzicola*/*E. oryzoides* populations Ech5-09 and Ech114-10, respectively. The codon highlighted indicates position 197 of the ALS gene; the C to T change causes the substitution of Pro to Ser.

3.3. Dose-response assays with ACCase and ALS inhibitors

Based on the results of the ALS and ACCase gene sequencing, and due to the limitations of time and space, dose-response experiments were carried out to study cross and multiple resistance only with 3 populations. For ALS resistance, we chose a population (ech3-14) that showed the most repetitive mutation, Pro197Ser. The ech114-10 population was chosen as it showed mutations in the

genes of both enzymes (ACCase and ALS), and the ech5-09 was selected as susceptible biotype for comparison purposes.

Table 30. Amino-acid substitution identified in each collected population.

Population ID	Gene involved	Amino-acid substitution
ech114-10	ACCase/ALS	Ile1781Leu/Pro197Ser*
ech3-14	ALS	Pro197Ser
ech5-09	-	No mutation

* A Pro to Ser amino acid substitution at position 197 was detected with overlapped peaks (see **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

The dose-response studies were divided into two groups: those carried out with ACCase-inhibiting herbicides (profoxydim and cyhalofop-butyl) and those carried out with ALS-inhibiting herbicides (penoxsulam, imazamox, azimsulfuron and byspiribac-sodium) (Table 31 and Figura 49).

The population ech114-10 showed a high level of resistance to ACCase inhibitors. However, similar results for biotype ech3-14 were not observed. The ED₅₀ values for ech114-10 were 392.29 and 817.22 g ae ha⁻¹ for profoxydim and cyhalofop-butyl, respectively, while those for ech3-14 were 0.57 and 0.20 g ae ha⁻¹, respectively. Comparing these populations with the susceptible biotype (S), R/S values for ech114-10 were 643.09 and 1921.21 for profoxydim and cyhalofop-butyl, respectively, and 0.93 and 0.48 for ech3-14 for the same herbicides.

In relation to the ALS-inhibiting herbicides, ech3-14 exhibited 84.22-, 46.22-, 254.33- and 11.38-fold resistance to penoxsulam, imazamox, azimsulfuron and byspiribac-sodium, respectively, relative to the S population. Ech114-10 displayed a much lower RF: 2.24 for penoxsulam, 1.10 for imazamox, 0.69 for azimsulfuron and 0.66 for byspiribac-sodium.

Table 31. Parameter estimates from the logistic analysis of growth reduction (ED₅₀) of selected resistant (R) (ALS and ACCase-inhibiting herbicides) and susceptible (S) biotypes under increasing ALS and ACCase-inhibiting herbicide rates.

Herbicide	Population	d	b	ED ₅₀ (g ai ha ⁻¹)	RF	P-value
Profoxydim	ech114-10 (ACCase) (R)	99.49	2.11	392.29 ± 13.20	643.09	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	100.05	0.57	0.57 ± 0.10	0.93	0.0001
	ech5-09 (S)	100.05	0.65	0.61 ± 0.10	-	-
Cyhalofop-butyl	ech114-10 (ACCase) (R)	97.28	2.79	817.22 ± 28.85	1993.21	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	100.11	0.76	0.20 ± 0.04	0.48	0.0001
	ech5-09 (S)	100.23	1.07	0.41 ± 0.04	-	-
Penoxsulam	ech114-10 (ACCase) (R)	100.17	1.78	19.00 ± 1.19	2.24	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	98.79	1.99	713.42 ± 37.99	84.22	0.0001
	ech5-09 (S)	102.06	3.24	8.47 ± 0.34	-	-
Imazamox [†]	ech114-10 (ACCase) (R)	100.97	1.71	25.32 ± 1.11	1.10	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	98.25	1.73	1059.40 ± 42.95	46.22	0.0001

	ech5-09 (S)	101.43	1.42	22.92 ± 1.18	-	-
Azimsulfuron	ech114-10 (ACCCase) (R)	100.02	1.68	20.24 ± 1.02	0.69	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	97.46	2.75	7370.71 ± 209.04	254.33	0.0001
	ech5-09 (S)	101.60	1.53	28.98 ± 4	-	-
Bysipirbac-sodium	ech114-10 (ACCCase) (R)	98.85	3.51	3.22 ± 0.10	0.66	0.0001
	ech3-14 (ALS) (R)	99.80	2.13	59.98 ± 2.46	11.38	0.0001
	ech5-09 (S)	101.74	1.59	5.27 ± 0.27	-	-

The parameter ED₅₀ is the dose producing a response halfway between the upper limit, d (fixed at 100), and the lower limit (fixed at 0). The parameter b denotes the relative slope around ED₅₀; RF (Resistance Factor) is calculated as (ED₅₀ resistant/ED₅₀ sensitive); and P-value is the probability level of significance of the resistance factor.

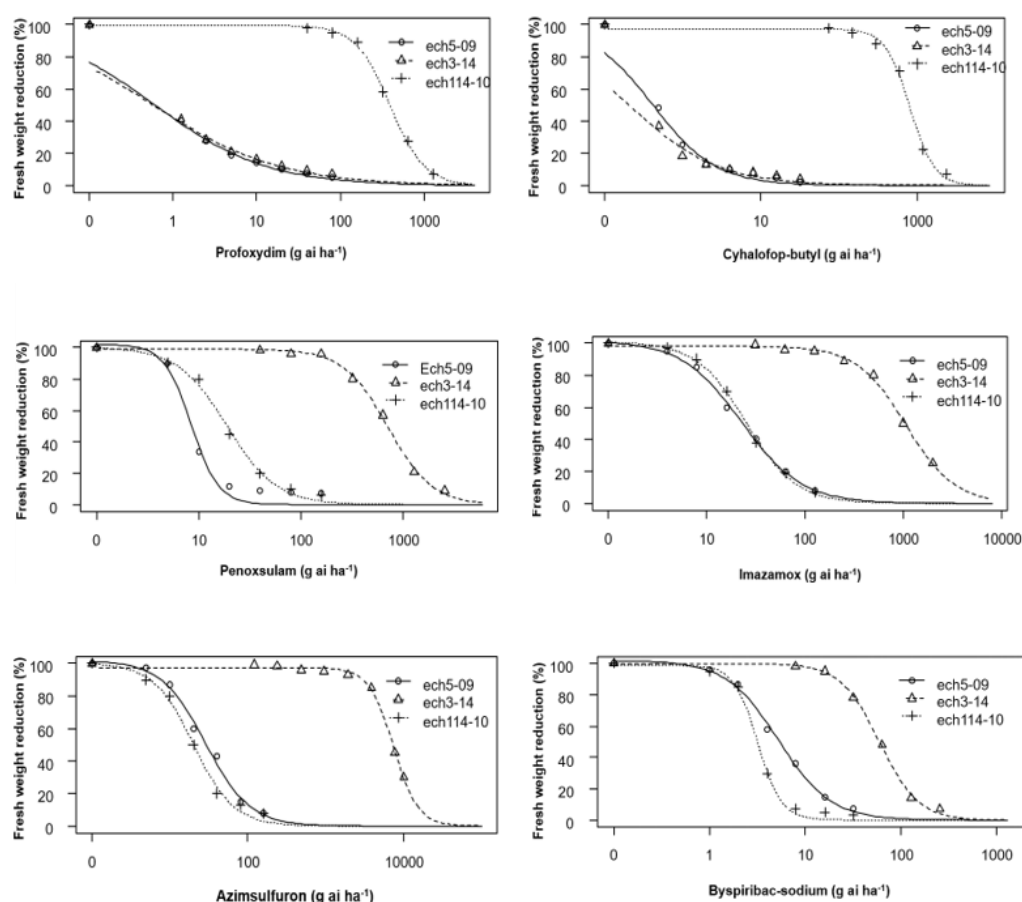


Figura 49. Profoxydim, cyhalofop-butyl, penoxsulam, imazamox, azimsulfuron and bysipirbac-sodium dose–response on fresh weight reduction expressed as percentage of the mean untreated control of the R (ech114-10 and ech3-14) and S (ech5-09) populations. Symbols denote mean (n=6) ± SEM.

4. Discussion

Echinochloa spp. has become a serious problem in rice fields worldwide (Kaloumenos et al., 2013; Romano-Garcia et al., 2017). The most commonly used herbicides to combat this monocotyledonous weed in rice crops have two sites of action: ALS and ACCase.

Weeds in general can develop resistance through two major mechanisms: target-site resistance mechanisms (TSR) and non-target site resistance mechanisms (NTSR) (Yuan et al., 2007; Panozzo et

al., 2013). There are cases where the metabolism is responsible for the resistance in *Echinochloa* spp. (Yasuor et al., 2009; Iwakami et al., 2014b; a), but in the cases described, it is mostly caused by TSR mechanisms.

ALS-inhibiting herbicides can cause amino-acid changes at 8 different positions (Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Arg377, Trp574, Ser653, and Gly654) leading to different patterns of cross-resistance to ALS inhibitors: triazolopyrimidines (TP), sulfonyleureas (SU), pyrimidinyl (thio) benzoates (PTB), imidazolinones (IMI) and sulfonilamino-carbonyl-triazolinones (SCT) (Heap 2018). In our study, three types of substitution were found: Pro197-Ser, Pro197-Thr and Ser653-Asn. Substitutions of Pro to Ser (Ntoanidou et al., 2016) and Thr (Sada et al., 2013) at position 197 and Ser to Asn (Kumar and Jha, 2017) at position 653 have previously been described. Mutations at Pro197 may confer resistance to SU and TP families (Yu et al., 2008). Our results show that the ALS-inhibiting herbicide resistant population (ech3-14) due to Pro197 substitution for Ser is related to cross-resistance to penoxsulam, imazamox, azimsulfuron and byspiribac-sodium (based on fresh weight reduction measurements), as seen in the dose-response assays (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** and **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Similarly, an *Echinochloa* spp. population was found to be cross-resistant to penoxsulam, imazamox, bispyribac-sodium and sulfonyleurea herbicides by Kaloumenos et al. (2013). This could be attributed to herbicide selection pressure imposed by the rice monoculture applied as the main practice in the sampling area, along with repeated use of these two herbicides for a long period of time (Kaloumenos et al., 2013).

The other mutations described in this study (Pro197Thr and Ser653Asn) have never previously been reported in the genus *Echinochloa*, though they have been reported in other species. Xia et al. (2015) found that the Pro197Thr mutation in *Alopecurus aequalis* led to cross-resistance to imidazolinone, sulfonyleurea, and triazolopyrimidine families. Kumar and Jha (2017) studied the response of the Ser653Asn mutation in *Bromus tectorum* to ALS inhibitors finding high resistance to imazamox (imidazolinones) and moderate cross-resistance to pyroxsulam (triazolopyrimidines) and propoxycarbazone (sulfonilaminocarbonyltriazolinone).

Evidence of heterozygosity was observed from the sequencing results (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Due to the fact that the *Echinochloa* species are largely self-pollinated, we could assume that they have multiple copies of ALS indicating the polyploidy of these species. This

has been previously investigated in another *Echinochloa* species (Iwakami et al., 2012; Panozzo et al., 2013). Since the chromatograms did not show a complete overlap of the peak in population ech114-110, this could be related with ED₅₀ values not as high as those of population ech3-14.

The ACCase gene sequencing results revealed one type of amino-acid substitution at position 1781: from Ile to Leu. Other studies have described changes from Ile to Leu, Val and Thr at this same position. Li et al. (2013) reported that Ile1781-Leu substitution conferred resistance to APP herbicides, while (Zagnitko et al., 2001; Mohamed et al., 2012) showed that it also conferred resistance to CHD and PPZ herbicides, respectively. In the case of this study, the Ile1781-Leu mutation is shown to endow resistance to two ACCase-inhibiting herbicide families, APP (chhalofop-butyl) and CHD (profoxydim). This is demonstrated through the dose-response assays which show high RFs for biotype ech114-10, ranging from 753.48 to 1850.44. Other authors have obtained similar results with profoxydim (Kaloumenos et al., 2013) and cyhalofop-butyl (Ruiz-Santaella et al., 2006b).

Although other putative resistant populations analyzed did not show mutations, they did show resistance in the screening experiments (data not shown). Further metabolism studies will be performed to see if there are cases of NTSR mechanisms, mainly metabolic, as described by Iwakami et al. (2015). The dose-response tests will also be completed with all the populations in which different mutations were found.

In this work, populations of *Echinochloa* spp. in fields where farmers had reported failures in weed control with herbicides were collected. By studying the involvement of TSR as a mechanism in these populations, mutations in ALS and ACCase genes were found. The areas where these populations were collected pertain to rice fields of Extremadura with a repetitive herbicide-use history.

Dispersion of *Echinochloa* spp. seeds through their transportation by birds, the flow of irrigation water from interconnected paddy fields, and agricultural machinery with seed leftovers may cause a serious resistance propagation problem (Osuna et al., 2011).

The permitted active ingredients to combat *Echinochloa* spp. in Spain are presently limited to two main families, ALS and ACCase: 37.5% contain active ingredients with ALS mode of action and 50% active ingredients with ACCase mode of action (MAPAMA, 2018b). This means that 87.5% of the herbicides which can be used belong to these groups.

In the context of the lack of permitted herbicides, alternative management strategies are required with herbicides belonging to other families such as clomazone (MAPAMA, 2018b), which can be combined with non-chemical control systems as an essential condition is not to use herbicides as the sole means of control. Key strategies can be used in a combined way to delay the evolution of resistance to greater effect. Using weed-free certified crop seed, controlling all weeds that escape to prevent seed return to the field by cutting, roguing or spraying weed patches, and avoiding spreading resistant weeds by frequent cleaning of equipment are important cultural practices. With respect to herbicide use, among other practices that can be adopted, it is important to avoid the same modes of action sequentially within the same or consecutive seasons, tank mixtures should be used of two herbicides that are equally effective on the same weed, and the same tank mixture should not be used repeatedly.

In conclusion, it can be said that there are more and more herbicide-resistant populations in the area surveyed but few chemical tools to deal with the problem. It is therefore important that farmers carry out an integrated control system that combines both chemical and non-chemical tools.

Acknowledgments: The authors wish to sincerely thank the editor and the anonymous reviewers for their constructive comments and suggestions, allowing us to improve the final version of the paper.

Funding: This work was funded by the project CCESAGROS, the national project “Integrated management of infestations of *Echinochloa* spp and *Leptochloa* spp in rice grown under flood-irrigation conditions” (RTA2014-00033-C03-01) funded by the National Institute of Agriculture and Food Research and Technology (Spanish initials: INIA), and the research group PRI AGA001 (GR18196) of Extremadura System of Science, Technology and Innovation (Spanish initials: SECTI). Ignacio Amaro-Blanco was supported by INIA in Spain with a PhD grant (FPI2014-0030).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Aguilar, M. 2001. Cultivo del arroz en el sur de España. Caja de Ahorros El Monte.
- Aichele, T.M., and D. Penner. 2005. Adsorption, desorption, and degradation of imidazolinones in soil. *Weed Technol.* 19(1): 154–159.
- Amaro-Blanco, I., P.T. Fernández-Moreno, M.D. Osuna-Ruiz, F. Bastida, and R. De Prado. 2018.

- Mechanisms of glyphosate resistance and response to alternative herbicide-based management in populations of the three *Conyza* species introduced in Southern Spain. *Pest Manag. Sci.*: Accepted Author Manuscript. doi: 10.1002/ps.4896.
- Amaro-Blanco, I., M.D. Osuna, Y. Romano, R. Roldán-Gómez, C. Palma-Bautista, J. Portugal, and R. De Prado. 2019. Selection for glyphosate resistance in *Conyza* spp occurring in the railway network of the Southern Spain. *Can. J. Plant Sci.* (ja).
- Amaro Blanco, I., Y. Romano, L. Torcea, and M.D. Osuna. 2017. Distribución de especies de “*Conyza*” spp. en zonas urbanas de la provincia de Badajoz. *Agrícola vergel Frutic. Hortic. Floric.* (406): 373–375.
- Anderson, K.S., and K.A. Johnson. 1990. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: lessons from EPSP synthase. *Chem. Rev.* 90(7): 1131–1149.
- Atkinson, D. 1985a. Toxicological properties of glyphosate--a summary. *Herbic. glyphosate*/edited by E. Grossbard, D. Atkinson.
- Atkinson, D. 1985b. Toxicological properties of glyphosate--a summary. *Herbicide glyphosate*/edited by E. Grossbard, D. Atkinson. Butterworths: 127–133.
- Bajwa, A.A., S. Sadia, H.H. Ali, and K. Jabran. 2016. Biology and management of two important *Conyza* weeds : a global review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(24): 24694–24710. doi: 10.1007/s11356-016-7794-7.
- Baliouis, E. 2014. Recent data from the flora of the island of Limnos (NE Aegean, Greece): new alien invasive species affecting the agricultural economy of the island. *Edinburgh J. Bot.* 71(2): 275–285.
- Barrett, S.C.H., and D.E. Seaman. 1980. The weed flora of Californian rice fields. *Aquat. Bot.* 9: 351–376.
- Baylis, A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag. Sci.* 56(4): 299–308.
- Berner, D.K., F.O. Ikie, and J.M. Green. 1997. ALS-inhibiting herbicide seed treatments control *Striga hermonthica* in ALS-modified corn (*Zea mays*). *Weed Technol.*: 704–707.
- Bernet, M.Á.G.-C. 2006. La fruticultura extremeña. *Boletín económico ICE, Inf. Comer. Española* (2889): 75–84.
- Brady, T.M., B. Cross, R.F. Doehner, J. Finn, and D.L. Ladner. 1998. The discovery of imazamox, a new broad-spectrum imidazolinone herbicide. p. 30–37. *In* Synthesis and chemistry of agrochemicals. American Chemical Society.
- Brosnan, J.T., J.J. Vargas, G.K. Breeden, L. Grier, R.A. Aponte, S. Tresch, and M. Laforest. 2016. A new amino acid substitution (Ala-205-Phe) in acetolactate synthase (ALS) confers broad

- spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Planta* 243(1): 149–159.
- Brown, A.C., S.R. Moss, Z.A. Wilson, and L.M. Field. 2002. An isoleucine to leucine substitution in the ACCase of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) is associated with resistance to the herbicide sethoxydim. *Pestic. Biochem. Physiol.* 72(3): 160–168.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem, and R.L. Jones. 2015. *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Carretero, J. 1981. El género *Echinochloa* Beauv. en el suroeste de Europa. *An. Jard. Bot. Madrid* 38: 91–108. <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2987498.pdf>.
- Chandler, J.M., A.S. Hamill, and A.G. Thomas. 1984. Crop losses due to weeds in Canada and the United States: Special report of the Losses Due to Weeds Committee. Weed Science Society of America.
- Chauhan, B.S., and D.E. Johnson. 2009. Ecological studies on *Cyperus difformis*, *Cyperus iria* and *Fimbristylis miliacea*: three troublesome annual sedge weeds of rice. *Ann. Appl. Biol.* 155(1): 103–112.
- Chauhan, B.S., and D.E. Johnson. 2010. The role of seed ecology in improving weed management strategies in the tropics. p. 221–262. *In Advances in Agronomy*. Elsevier.
- Chauhan, B.S., and D.E. Johnson. 2011. Row spacing and weed control timing affect yield of aerobic rice. *F. Crop. Res.* 121(2): 226–231.
- Chin, D. Van. 2001. Biology and management of barnyardgrass, red sprangletop and weedy rice. *Weed Biol. Manag.* 1(1): 37–41.
- Chodova, D., J. Salava, O. Martincová, and M. Cvikrova. 2009. Horseweed with reduced susceptibility to glyphosate found in the Czech Republic. *J. Agric. Food Chem.* 57(15): 6957–6961. doi: 10.1021/jf901292x.
- Coble, H. 1996. Weed management tools and their impact on the agro-ecosystem. *In Proceedings of the Second International Weed Control Congress (Copenhagen, Denmark, 1996)*. Department of Weed Control and Pesticide Ecology.
- Collavo, A., S. Panozzo, G. Lucchesi, L. Scarabel, and M. Sattin. 2011. Characterisation and management of *Phalaris paradoxa* resistant to ACCase-inhibitors. *Crop Prot.* 30(3): 293–299.
- Coria, S. 2017. Respuesta de diferentes biotipos de *Echinochloa* spp. a los herbicidas clomazona, pendimetalina y penoxsulam.
- Cruz-Hipolito, H., J.A. Domínguez-Valenzuela, M.D. Osuna, and R. De Prado. 2012. Resistance mechanism to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Phalaris paradoxa* collected in Mexican wheat fields. *Plant Soil* 355(1–2): 121–130.

- Cruz-Hipolito, H., A. Rojano-delgado, and J.A. Domínguez-Valenzuela. 2011. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. *Plant Soil* 347: 221–230. doi: 10.1007/s11104-011-0840-9.
- Danquah, E.Y., S.J. Hanley, R.C. Brookes, C. Aldam, and A. Karp. 2002a. Isolation and characterization of microsatellites in *Echinochloa* (L.) Beauv. spp. *Mol. Ecol. Notes*. 2: 54–56. doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00144.x.
- Danquah, E.Y., D.E. Johnson, C. Riches, G.M. Arnold, and A. Karp. 2002b. Genetic diversity in *Echinochloa* spp. collected from different geographic origins and within rice fields in Cote d'Ivoire. *Weed Res.* 42(5): 394–405. doi: 10.1046/j.1365-3180.2002.00300.x.
- Dauer, J.T., D.A. Mortensen, and P. Bàrberi. 2005. Long-distance wind dispersal of *Conyza canadensis* and management implications. *In Proc. 13th European Weed Research Society Symposium, Bari, Italy.*
- Dauer, J.T., D.A. Mortensen, and R. Humston. 2006. Controlled experiments to predict horseweed (*Conyza canadensis*) dispersal distances. *Weed Sci.* 54(3): 484–489.
- Dauer, J.T., D.A. Mortensen, E.C. Luschei, S.A. Isard, E. Shields, and M.J. Van-gessel. 2009. *Conyza canadensis* seed ascent in the lower atmosphere. *Agric. For. Meteorol.* 149: 526–534. doi: 10.1016/j.agrformet.2008.10.005.
- Dauer, J.T., D.A. Mortensen, and M.J. Vangessel. 2007. Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. *J. Appl. Ecol.* 44(1): 105–114.
- Davis, V.M., K.D. Gibson, T.T. Bauman, S.C. Weller, and W.G. Johnson. 2009a. Influence of weed management practices and crop rotation on glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) population dynamics and crop yield-years III and IV. *Weed Sci.* 57(4): 417–426.
- Davis, V.M., and W.G. Johnson. 2008. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza Canadensis*) emergence, survival, and fecundity in no-till soybean. *Weed Sci.* 56(2): 231–236. doi: 10.1614/WS-07-093.1.
- Davis, V.M., G.R. Kruger, J.M. Stachler, M.M. Loux, and W.G. Johnson. 2009b. Growth and seed production of Horseweed (*Conyza canadensis*) populations resistant to Glyphosate, ALS-inhibiting, and multiple (Glyphosate + ALS-inhibiting) herbicides. *Weed Sci.* 57(05): 494–504. doi: 10.1614/WS-09-024.1.
- Délye, C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Sci.* 53(5): 728–746.
- Délye, C., E. Calmes, and A. Matějček. 2002a. SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA-carboxylase inhibiting herbicides. *TAG Theor. Appl. Genet.* 104(6): 1114–1120.

- Délye, C., M. Jasieniuk, and V. Le Corre. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends Genet.* 29(11): 649–658. doi: 10.1016/j.tig.2013.06.001.
- Délye, C., T. Wang, and H. Darmency. 2002b. An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. *Planta* 214(3): 421–427.
- Deng, W., Y. Di, J. Cai, Y. Chen, and S. Yuan. 2019. Target-Site Resistance Mechanisms to Tribenuron-methyl and Cross-resistance Patterns to ALS-inhibiting Herbicides of Catchweed Bedstraw (*Galium aparine*) with Different ALS Mutations. *Weed Sci.* 67(2): 183–188.
- Dill, G., C. CaJacob, and S. Padgett. 2008. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Manag. Sci.* 64: 326–331. doi: 10.1002/ps.1501.
- Dinelli, G., I. Marotti, A. Bonetti, M. Minelli, P. Catizone, and J. Barnes. 2006. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 86(1): 30–41.
- Dubois, M., and M.P. Plancke. 2010. Développement d'adventices résistantes au glyphosate: situation et perspectives en France. *In* XXIème conférence du Columa.
- Duke, S., and S. Powles. 2008. Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 64: 319–325. doi: 10.1002/ps.1518.
- Duy, L., N.M. Chon, R.K. Mann, B.V.N. Kumar, and M.A. Morell. 2018. Efficacy of Rinskor TM (florpyrauxifen-benzyl ester) on Herbicide Resistant Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Rice Fields of Mekong Delta, Vietnam. 21(1): 75–81.
- Eubank, T.W., D.H. Poston, V.K. Nandula, C.H. Koger, D.R. Shaw, and D.B. Reynolds. 2008. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) control using glyphosate-, paraquat-, and glufosinate-based herbicide programs. *Weed Technol.* 22(1): 16–21.
- Evans, J.A., P.J. Tranel, A.G. Hager, B. Schutte, C. Wu, L.A. Chatham, and A.S. Davis. 2016. Managing the evolution of herbicide resistance. *Pest Manag. Sci.* 72(1): 74–80.
- Fang, J., L. Zhang, R. Li, G. Chen, and L. Dong. 2018. P450-mediated metabolism, related to the penoxsulam resistance in barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*). *J. Nanjing Agric. Univ.* 41(5): 854–859.
- FaoStat, F.A.O. 2013. Agriculture data. Agric. Prod.
- FaoStat, F.A.O. 2017. Agriculture data. Agric. Prod.
- Feng, P.C.C., M. Tran, T. Chiu, R.D. Sammons, G.R. Heck, and C.A. CaJacob. 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Sci.* 52(4): 498–505.

- Fernández-Cavada, S., A. Cirujeda, M. Carmelo, I. Salas, J. Aibar, and C. Zaragoza. 2008. *Leptocloa*. *Leptochloa uninervia* (C. Presl) Hitch. & Chase. http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Sanidad_Vegetal/Proteccion_Vegetal/Publicaciones/Informaciones_Tecnicas/HOJAS_INFORMATIVAS_MALAS_HIERBAS_LEPTOCLOA_2008.pdf (accessed 29 August 2018).
- Fernández-Moreno, P.T., F. Bastida, and R. De Prado. 2017. Evidence, mechanism and alternative chemical seedbank-level control of glyphosate resistance of a rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype from southern Spain. *Front. Plant Sci.* 8: 450.
- Fernández, P., R. Alcántara-de la Cruz, H. Cruz-Hipólito, M.D. Osuna, and R. De Prado. 2016. Underlying Resistance Mechanisms in the *Cynosurus echinatus* Biotype to Acetyl CoA Carboxylase-Inhibiting Herbicides. *Front. Plant Sci.* 7: 449.
- Fernández, P., R. Alcántara, M.D. Osuna, M.M. Vila-Aiub, and R. De Prado. 2017. Forward selection for multiple resistance across the non-selective glyphosate, glufosinate and oxyfluorfen herbicides in *Lolium* weed species. *Pest Manag. Sci.* 73(5): 936–944.
- Fernandez, P., C. Gauvrit, F. Barro, J. Menendez, and R. De Prado. 2015. First case of glyphosate resistance in France. *Agron. Sustain. Dev.* 35(4): 1469–1476.
- Fernández Moreno, P.T. 2017. Resistencia cruzada y múltiple de malas hierbas a herbicidas.
- Filibeck, G., P. Cornelini, and P. Petrella. 2012. Floristic analysis of a high-speed railway embankment in a Mediterranean landscape. *Acta Bot. Croat.* 71(2): 229–248.
- Fisher, A.J., C.M. Ateh, D.E. Bayer, and J.E. Hill. 2000. Herbicide-resistant *Echinochloa oryzoides* and *E. phyllopogon* in California *Oryza sativa* fields. *Weed Sci.* 48(2): 225–230.
- Franz, J.E., M.K. Mao, and J.A. Sikorski. 1997. Uptake, transport and metabolism of glyphosate in plants. *Glyphosate a unique Glob. Herbic. Am. Chem. Soc. Washington, DC*: 143–181.
- Fuentes, C.L. 1991. Notas sobre aspectos taxonómicos y biológicos de *Echinochloa* Beavois. *Comalfi* (18): 38–46.
- Gaines, T.A., C. Preston, J.E. Leach, S.T. Chisholm, and D.L. Shaner. 2010a. Gene amplification is a mechanism for glyphosate resistance evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 1029–1034.
- Gaines, T.A., W. Zhang, D. Wang, B. Bukun, S.T. Chisholm, D.L. Shaner, S.J. Nissen, W.L. Patzoldt, P.J. Tranel, and A.S. Culpepper. 2010b. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(3): 1029–1034.
- Ge, X., D.A. D'Avignon, J.J.H. Ackerman, A. Collavo, M. Sattin, E.L. Ostrander, E.L. Hall, R.D. Sammons, and C. Preston. 2012. Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium spp.*) from Australia, South America, and Europe: a ³¹P NMR investigation. *J. Agric. Food Chem.* 60(5): 1243–1250.

- Gerwick, B.C., L.C. Mireles, and R.J. Eilers. 1993. Rapid diagnosis of ALS/AHAS-resistant weeds. *Weed Technol.*: 519–524.
- Gill, G.S., and J.E. Holmes. 1997. Efficacy of cultural control methods for combating herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Pestic. Sci.* 51(3): 352–358.
- Goh, S.S., Q. Yu, H. Han, M.M. Vila-Aiub, R. Busi, and S.B. Powles. 2018. Non-target-site glyphosate resistance in *Echinochloa colona* from Western Australia. *Crop Prot.* 112: 257–263.
- González-Torralva, F., H. Cruz-Hipolito, F. Bastida, N. Müllerder, R.J. Smeda, and R. De Prado. 2010. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *J. Agric. Food Chem.* 58(7): 4361–4366.
- González-Torralva, F., H. Cruz-Hipolito, F. Bastida, N. Müllerder, R.J. Smeda, and R. De Prado. 2010. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *J. Agric. Food Chem.* 58(7): 4361–4366. doi: 10.1021/jf904227p.
- González-Torralva, F., J. Gil-Humanes, F. Barro, J.A. Domínguez-Valenzuela, and R. De Prado. 2014. First evidence for a target site mutation in the EPSPS2 gene in glyphosate-resistant Sumatran fleabane from citrus orchards. *Agron. Sustain. Dev.* 34(2): 553–560.
- González-Torralva, F., A.M. Rojano-Delgado, M.D. Luque de Castro, N. Müllerder, and R. De Prado. 2012. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *J. Plant Physiol.* 169(17): 1673–1679. doi: 10.1016/j.jplph.2012.06.014.
- Green, T.D. 2010. The ecology of fleabane (*Conyza* spp).
- Gressel, J., and H.M. LeBaron. 1982. *Herbicide resistance in plants*. Wiley.
- Gu, D. 2000. A novel selective herbicide cyhalofop-butyl. *World Pestic.* 22: 55–57.
- Hamouzová, K., J. Holec, P. Tůmová, and J. Soukup. 2012. Glyphosate-Tolerant horseweed found on the railway tracks in Czech Republic. p. 99–100. *In* *Glyphosate Weed Resistance: European Status and Solutions*.
- Hanson, B.D., A. Shrestha, and D.L. Shaner. 2009. Distribution of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) and relationship to cropping systems in the Central Valley of California. *Weed Sci.* 57(1): 48–53.
- Harker, K.N., and J.T. O'Donovan. 2013. Recent Weed Control, Weed Management, and Integrated Weed Management. *Weed Technol.* 27(01): 1–11. doi: <https://doi.org/10.1614/WT-D-12-00109.1>.
- Harper, J.L. 1956. The evolution of weeds in relation to resistance to herbicides. *In* *Proceedings of the Third British Weed Control Conference*. The Council.
- Heap, I. 2014. Herbicide resistant weeds. p. 281–301. *In* *Integrated pest management*. Springer.

- Heap, I. 2018a. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org> (accessed 11 September 2018).
- Heap, I. 2018b. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org> (accessed 24 August 2018).
- Heap, I. 2018c. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org> (accessed 30 October 2018).
- Heap, I. 2018d. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds.
- Heap, I. 2019a. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org> (accessed 14 February 2019).
- Heap, I. 2019b. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Tuesday, January 30, 2018. Available www.weedscience.org. www.weedscience.org (accessed 15 January 2018).
- Heap, I. 2019c. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org> (accessed 29 May 2019).
- Heap, J., and R. Knight. 1982. A population of ryegrass tolerant to the herbicide diclofop-methyl [in South Australia]. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.*
- Heap, I., and R. Knight. 1986. The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofop-methyl. *Aust. J. Agric. Res.* 37(2): 149–156.
- Hess, M., H. Blefholderj, L. Buhrg, D. Weg, and D.- Kiel. 1997. Use of the extended BBCH scale - general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Res.* 37: 433–441.
- Holm, L.G., L. Holm, E. Holm, J. V Pancho, and J.P. Herberger. 1997. *World weeds: natural histories and distribution*. John Wiley & Sons.
- Holm, L., D. Plucknett, J. Pancho, and J. Herberger. 1977. *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. Univ. Hawaii Press: 609.
- HRAC, H.R.A.C. 2018. General principles of herbicide resistance management. <http://www.hracglobal.com/> (accessed 10 August 2018).
- ieex. 2017. ieex. <https://ciudadano.gobex.es/web/ieex/>.
- INE. 2016. INE. http://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/categoria.htm?c=Estadistica_P&cid=1254735727106 (accessed 8 August 2018).
- Iwakami, S., M. Endo, H. Saika, J. Okuno, N. Nakamura, and M. Yokoyama. 2014a. Cytochrome P450

- CYP81A12 and CYP81A21 Are Associated with Resistance to Two Acetolactate Synthase Inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. 165(June): 618–629. doi: 10.1104/pp.113.232843.
- Iwakami, S., M. Hashimoto, K. Matsushima, H. Watanabe, K. Hamamura, and A. Uchino. 2015. Multiple-herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis*, an allohexaploid weed species, in dry-seeded rice. *Pestic. Biochem. Physiol.* 119: 1–8.
- Iwakami, S., Y. Kamidate, T. Yamaguchi, M. Ishizaka, M. Endo, H. Suda, K. Nagai, Y. Sunohara, S. Toki, and A. Uchino. 2019. CYP 81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. *New Phytol.* 221(4): 2112–2122.
- Iwakami, S., A. Uchino, Y. Kataoka, H. Shibaie, H. Watanabe, and T. Inamura. 2014b. Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Manag. Sci.* 70(4): 549–558.
- Iwakami, S., A. Uchino, H. Watanabe, Y. Yamasue, and T. Inamura. 2012. Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. *Pest Manag. Sci.* 68(7): 1098–1106.
- Kaloumenos, N.S., S.L. Chatzilazaridou, P. V Mylona, A.N. Polidoros, and I.G. Eleftherohorinos. 2013. Target-site mutation associated with cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides in late watergrass (*Echinochloa oryzicola* Vasing.). *Pest Manag. Sci.* 69(7): 865–873.
- Karlsson, L.M., and P. Milberg. 2007. Comparing after-ripening response and germination requirements of *Conyza canadensis* and *C. bonariensis* (Asteraceae) through logistic functions. *Weed Res.* 47(5): 433–441. doi: 10.1111/j.1365-3180.2007.00576.x.
- Kaundun, S.S. 2010. An aspartate to glycine change in the carboxyl transferase domain of acetyl CoA carboxylase and non-target-site mechanism (s) confer resistance to ACCase inhibitor herbicides in a *Lolium multiflorum* population. *Pest Manag. Sci.* 66(11): 1249–1256.
- Kaundun, S.S., G.C. Bailly, R.P. Dale, S.-J. Hutchings, and E. McIndoe. 2013. A novel W1999S mutation and non-target site resistance impact on acetyl-CoA carboxylase inhibiting herbicides to varying degrees in a UK *Lolium multiflorum* population. *PLoS One* 8(2): e58012.
- Kaundun, S.S., S.-J. Hutchings, R.P. Dale, and E. McIndoe. 2012. Broad resistance to ACCase inhibiting herbicides in a ryegrass population is due only to a cysteine to arginine mutation in the target enzyme. *PLoS One* 7(6): e39759.
- Kaundun, S.S., I.A. Zelaya, R.P. Dale, A.J. Lycett, P. Carter, K.R. Sharples, and E. McIndoe. 2008. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Sci.* 56(5): 637–646.
- Khalid, S. 1995. Weeds of Pakistan, Compositae.

- Khan, I., K.B. Marwat, I.A. Khan, H. Ali, K. Dawar, and H. Khan. 2011. Invasive weeds of southern districts of Khyber Pakhtunkhwa-Pakistan. *Pakistan J. Weed Sci. Res.* 17(2).
- Khan, R.U., S. Mehmood, S.U. Khan, and M. Subhan. 2013a. Ethnobotanical study of common weed flora of sugarcane in district Bannu, Khyber Pakhtunkhawa. *Pakistan. J Med Plants Res* 1: 49–78.
- Khan, R.U., S. Mehmood, S. Ullah, and M. Subhan. 2013b. Ethnobotanical study of common weed flora of sugarcane in District Bannu , Khyber Pakhtunkhawa , Pakistan. *J. Med. Plant Stud.* 1(4): 49–78.
- Koger, C.H., D.H. Poston, R.M. Hayes, F. Robert, C.H. Koger, D.H. Poston, R.M. Hayes, and R.F. Montgomery. 2004. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. *Weed Technol.* 18(3): 820–825.
- Korres, N.E., J.K. Norsworthy, M. V Bagavathiannan, and A. Mauromoustakos. 2015. Distribution of arable weed populations along Eastern Arkansas – Mississippi Delta roadsides : factors affecting weed occurrence. *Weed Technol.* 29(3): 596–604. doi: 10.1614/WT-D-14-00152.1.
- Kumar, V., and P. Jha. 2017. First report of Ser653Asn mutation endowing high-level resistance to imazamox in downy brome (*Bromus tectorum* L.). *Pest Manag. Sci.* 73(12): 2585–2591.
- Laplante, J., I. Rajcan, and F.J. Tardif. 2009. Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in *Setaria viridis*. *Theor. Appl. Genet.* 119(4): 577–585.
- Lee, L.J., and J. Ngim. 2000. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. *Pest Manag. Sci.* 339(February 1999): 336–339.
- Li, L., Y. Bi, W. Liu, G. Yuan, and J. Wang. 2013. Molecular basis for resistance to fenoxaprop-p-ethyl in American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne* Steud.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 105(2): 118–121.
- Liebman, M., C.L. Mohler, and C.P. Staver. 2001. *Ecological management of agricultural weeds.* Cambridge University Press.
- Liu, C.L. 2002. *World Pesticide Volume: Herbicide.*
- Liu, W., D.K. Harrison, D. Chalupska, P. Gornicki, C.C. O'Donnell, S.W. Adkins, R. Haselkorn, and R.R. Williams. 2007. Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(9): 3627–3632.
- Lopez-martinez, N., A. Pujadas- Salva, R.P. Finch, G. Marshall, and R. De Prado. 1999. Molecular Markers Indicate Intraspecific Variation in the Control of *Echinochloa* spp. with Quinclorac. 47(3): 310–315.
- Loureiro, I., E. Rodríguez-García, C. Escorial, J.M. García-Baudín, J.L. González-Andújar, and M.C.

- Chueca. 2010. Distribution and frequency of resistance to four herbicide modes of action in *Lolium rigidum* Gaud. accessions randomly collected in winter cereal fields in Spain. *Crop Prot.* 29(11): 1248–1256.
- Malatji, M.W. 2013. Allelopathic potential of *Conyza bonariensis*.
- Malik, J., G. Barry, and G. Kishore. 1989. The herbicide glyphosate. *BioFactors* 2(1): 17–25.
- Mallory-Smith, C.A., D.C. Thill, and M.J. Dial. 1990. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technol.* 4(1): 163–168.
- MAPAMA. 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. https://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/Leñosos_2012_tcm30-88508.pdf.
- MAPAMA. 2017. Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente (Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries, Food and Environment).
- MAPAMA. 2018a. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- MAPAMA. 2018b. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries, Food and Environment). <https://www.mapama.gob.es> (accessed 17 September 2018).
- Maxwell, B.D., M. Roush, and S. Radosevich. 1990. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations resistance in weed Populations. *Weed Technol.* 4(1): 2–13. doi: 10.2307/3986835.
- Mazur, B.J., and S.C. Falco. 1989. The development of herbicide resistant crops. *Annu. Rev. Plant Biol.* 40(1): 441–470.
- Merotto, A., M. Jasieniuk, and A.J. Fischer. 2009. Estimating the outcrossing rate of *Cyperus difformis* using resistance to ALS-inhibiting herbicides and molecular markers. *Weed Res.* 49(1): 29–36.
- Merotto, A., M. Jasieniuk, and A.J. Fischer. 2010. Distribution and cross-resistance patterns of ALS-inhibiting herbicide resistance in smallflower umbrella sedge (*Cyperus difformis*). *Weed Sci.* 58(1): 22–29.
- Michael, P.W. 1983. Taxonomy and distribution of *Echinochloa* species with special reference to their occurrence as weeds of rice. p. 291–306. *In* Proceeding of the Conference on Weed Control in Rice.
- Mitich, L.W. 1990. Barnyardgrass. *Weed Technol.* 4(4): 918–920.
- Mohamed, I.A., R. Li, Z. You, and Z. Li. 2012. Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) resistance to fenoxaprop and pinoxaden in China. *Weed Sci.* 60(2): 167–171.
- Del Monte, J.P., and J.A. Cortés. 2000. Acerca de las especies del género *Leptochloa*, como malas

- hierbas de los arrozales y su distribución en España. Bol. San. Veg. Plagas 26: 599–604.
- Muehlebach, M., M. Boeger, F. Cederbaum, D. Cornes, A.A. Friedmann, J. Glock, T. Niderman, A. Stoller, and T. Wagner. 2009. Aryldiones incorporating a [1, 4, 5] oxadiazepane ring. Part I: Discovery of the novel cereal herbicide pinoxaden. Bioorg. Med. Chem. 17(12): 4241–4256.
- Mylonas, P.N., C.N. Giannopolitis, P.G. Efthimiadis, G.C. Menexes, P.B. Madesis, and I.G. Eleftherohorinos. 2014. Glyphosate resistance of molecularly identified *Conyza albida* and *Conyza bonariensis* populations. Crop Prot. 65: 207–215. doi: 10.1016/j.cropro.2014.07.012.
- Nandula, V.K., T.W. Eubank, D.H. Poston, C.H. Koger, and K.N. Reddy. 2006. Factors affecting germination of horseweed (*Conyza canadensis*). Weed Sci. 54(5): 898–902.
- Nandula, V.K., N. Reddy, A.M. Rimando, S.O. Duke, and D.H. Poston. 2007. Glyphosate-resistant and -susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. J. Agric. Food Chem. 55: 3540–3545.
- Norris, R.F. 1996. Morphological and phenological variation in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in California. Weed Sci.: 804–814.
- Ntoanidou, S., N. Kaloumenos, G. Diamantidis, P. Madesis, and I. Eleftherohorinos. 2016. Molecular basis of *Cyperus difformis* cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides. Pestic. Biochem. Physiol. 127: 38–45.
- Oerke, E.-C. 2006. Crop losses to pests. J. Agric. Sci. 144(1): 31–43.
- Ortiz, R., J.M. Contreras, A. Ruiz, M.A. Sanz, M. Romero, M. Gordillo, A. Taberner Palou, and J.M. Urbano Fuentes-Guerra. 2015. Malas hierbas preocupantes en España. In XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología: La Malherbología y la transferencia tecnológica: Sevilla, 19-22 octubre 2015, 497-503. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- Osuna, M.D., M. Okada, R. Ahmad, A.J. Fischer, and M. Jasieniuk. 2011. Genetic diversity and spread of thiobencarb resistant early watergrass (*Echinochloa oryzoides*) in California. Weed Sci. 59(2): 195–201.
- Osuna, M.D., Y. Romano, and J.M. Quiles. 2012. Principales malas hierbas y métodos de control en el cultivo de arroz en España. Vida Rural 339: 74–77.
- Osuna Ruiz, M.D., J.A. Palmerín Romero, and J.M. Quiles Pecos. 2015. Principales problemas fitosanitarios del cultivo del arroz en España. Agric. Rev. Agropecu. (990): 862–865.
- Owen, M.J., R.K. Owen, and S.B. Powles. 2009. A survey in the southern grain belt of Western Australia did not find *Conyza* spp. resistant to glyphosate. Weed Technol. 23(3): 492–494.
- Padgett, S.R., K.H. Kolacz, X. Delannay, D.B. Re, B.J. LaVallee, C.N. Tinius, W.K. Rhodes, Y.I. Otero, G.F. Barry, and D.A. Eichholtz. 1995. Development, identification, and characterization of a

- glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35(5): 1451–1461.
- Palmerín Romero, J.A., and M.D. Osuna Ruiz. 2016. Control de malas hierbas en el cultivo del arroz. Resistencia a herbicidas. *Agrícola vergel Frutic. Hortic. Floric.* 35(392): 115–117.
- Panozzo, S., L. Scarabel, V. Rosan, and M. Sattin. 2017. A new Ala-122-Asn amino acid change confers decreased fitness to ALS-resistant *Echinochloa crus-galli*. *Front. Plant Sci.* 8: 2042.
- Panozzo, S., L. Scarabel, P.J. Tranel, and M. Sattin. 2013. Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 105(2): 93–101. doi: 10.1016/j.pestbp.2012.12.003.
- Parker, C. 1992. Weeds of Bhutan. Weeds of Bhutan.
- Perez, A., and M. Kogan. 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Res.* 43(1): 12–19. doi: 10.1046/j.1365-3180.2003.00311.x.
- Peterson, D.E., C.R. Thompson, D. Shoup, and B. Olson. 2010. Herbicide mode of action. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service.
- Powles, S. 2008. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Manag. Sci.* 64: 360–365. doi: 10.1002/ps.
- Powles, S.B. 2018. Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry. CRC Press.
- Powles, S.B., C. Preston, I. B. Bryan, and A.R. Jutsum. 1996. Herbicide resistance: impact and management. *Adv. Agron.* 58: 57–93.
- Powles, S.B., and D.L. Shaner. 2001. Herbicide resistance and world grains. Crc Press.
- Powles, S.B., and Q. Yu. 2010a. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 317–347.
- Powles, S.B., and Q. Yu. 2010b. Evolution in Action : Plants Resistant to Herbicides.
- de Prado, R., and J.L. de Prado. 2005. Caracterización y control de *Echinochloa* spp. resistente a herbicidas en arroz. *Phytoma España La Rev. Prof. Sanid. Veg.* (173): 108–114.
- Pujadas, A., and J.E. Hernández. 1988. Concepto de mala hierba. *Inf. Técnica Económica Agrar.* 75: 47–56.
- Rankins, A., J.D. Byrd, D.B. Mask, J.W. Barnett, and P.D. Gerard. 2005. Survey of soybean weeds in Mississippi. *Weed Technol.* 19(2): 492–498.
- Rao, A.N., D.E. Johnson, B. Sivaprasad, J.K. Ladha, and A.M. Mortimer. 2007. Weed management in direct-seeded rice. *Adv. Agron.* 93: 153–255.
- Ray, T.B. 1984. Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants.

- Plant Physiol. 75(3): 827–831.
- Renton, M., R. Busi, P. Neve, D. Thornby, and M. Vila-Aiub. 2014. Herbicide resistance modelling: past, present and future. *Pest Manag. Sci.* 70(9): 1394–1404.
- Riar, D.S., J.K. Norsworthy, V. Srivastava, V. Nandula, J.A. Bond, and R.C. Scott. 2013. Physiological and molecular basis of acetolactate synthase-inhibiting herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *J. Agric. Food Chem.* 61(2): 278–289.
- Ritz, C., F. Baty, J.C. Streibig, and D. Gerhard. 2015. Dose-response analysis using R. *PLoS One* 10(12): e0146021.
- Roberts, D.W., J.A. Knuteson, and R. Jackson. 2003. The dissipation of penoxsulam in flooded rice fields. *Pestic. Air, Plant, Soil Water Syst.*: 349–357.
- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Stud. Genet.* 7(7213): 145–153.
- Rojano-Delgado, A.M., H. Cruz-Hipolito, R. De Prado, M.D.L. de Castro, and A.R. Franco. 2012. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants. *Phytochemistry* 73: 34–41.
- Rojano-Delgado, A.M., J. Ruiz-Jiménez, M.D.L. de Castro, and R. De Prado. 2010. Determination of glyphosate and its metabolites in plant material by reversed-polarity CE with indirect absorptiometric detection. *Electrophoresis* 31(8): 1423–1430.
- Romano-Garcia, Y., I. Amaro-Blanco, J.M. Quiles-Pecos, J.A. Palmerín-Romero, L. Torcea, and M.D. Osuna Ruiz. 2017. Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campaña 2017). *Agrícola vergel Frutic. Hortic. Floric.* (406): 378–381.
- Romano García, Y., I. Amaro Blanco, J.M. Quiles Pecos, J.A. Palmerín Romero, L. Torcea, and M.D. Osuna Ruiz. 2017. Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campaña 2017). *Agrícola vergel Frutic. Hortic. Floric.* (406): 378–381.
- Romano, Y., F. Mendoza, J.A. Palmerín, J.M. Quiles, I. Amaro-Blanco, and M.D. Osuna. 2017. Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura: “*Echinochloa* spp.” y “*Leptochloa* spp.” p. 337–342. *In* XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología: actas: Pamplona-Iruña, 25-27 octubre, 2017. Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra.
- Ruiz-Santaella, J.P., F. Bastida, A.R. Franco, and R. De Prado. 2006a. Morphological and molecular characterization of different *Echinochloa* spp. and *Oryza sativa* populations. *J. Agric. Food Chem.* 54(4): 1166–1172. doi: 10.1021/jf0520746.
- Ruiz-Santaella, J.P., R. De Prado, J. Wagner, A. Fischer, and R. Gerhards. 2006b. Resistance mechanisms to cyhalofop-butyl in a biotype of *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss. from

- California. ZEITSCHRIFT FUR PFLANZENKRANKHEITEN UND PFLANZENSCHUTZ-SONDERHEFT- 20: 95.
- Ryan, G.F. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci.* 18(5): 614–616.
- Saavedra, M., J.A. Cortés, D.E.B.D. GÓMEZ, J.A. Rodríguez-Bernabé, A. TABENER, M. Castejón, A. Montserrat, and C. Zaragoza. 1995. *Malas hierbas de difícil control*. Minist. Agric. Pesca y Aliment. Madrid.
- Sada, Y., H. Ikeda, and S. Kizawa. 2013. Resistance levels of sulfonylurea-resistant *Schoenoplectus juncooides* (Roxb.) Palla with various Pro197 mutations in acetolactate synthase to imazosulfuron, bensulfuron-methyl, metsulfuron-methyl and imazaquin-ammonium. *Weed Biol. Manag.* 13(2): 53–61.
- Salas, R.A., F.E. Dayan, Z. Pan, S.B. Watson, J.W. Dickson, R.C. Scott, and N.R. Burgos. 2012. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest Manag. Sci.* 68(9): 1223–1230.
- Sammons, R.D., and T.A. Gaines. 2014. Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Manag. Sci.* 70(9): 1367–1377.
- Sanders, B.A. 1994. The life cycle and ecology of *Cyperus difformis* (rice weed) in temperate Australia: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 34(7): 1031–1038.
- Sansom, M., A.A. Saborido, and M. Dubois. 2013a. Control of *Coryza* spp. with Glyphosate-A Review of the Situation in Europe. *Plant Prot. Sci.* 49(1).
- Sansom, M., A.A. Saborido, and M. Dubois. 2013b. Control of *Coryza* spp. with glyphosate - A review of the situation in Europe. *Plant Prot. Sci.* 49(1): 44–53.
- Santel, H.J., B.A. Bowden, V.M. Sorensen, and K.H. Mueller. 1999. Flucarbazone-sodium-a new herbicide for the selective control of wild oat and green foxtail in wheat. p. 23–28. *In* 1999 Brighton crop protection conference: weeds. Proceedings of an international conference, Brighton, UK, 15-18 November 1999. British Crop Protection Council.
- Shaner, D.L. 1991. Mechanisms of resistance to acetolactate synthase/acetohydroxyacid synthase inhibitors. *In* Proceedings-Western Society of Weed Science (USA).
- Shaner, D.L., P.C. Anderson, and M.A. Stidham. 1984. Imidazolinones potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.* 76(2): 545–546.
- Shaner, D.L., and S.L. O'Connor. 2017. *The Imidazolinone Herbicides (1991)*. CRC Press.
- Shields, E.J., J.T. Dauer, M.J. Vangessel, G. Neumann, J.T. Dauer, and M.J. Vangessel. 2006. Horseweed (*Coryza canadensis*) seed collected in the planetary boundary layer. *Weed Sci.* 54(6): 1063–1067.

- Shrestha, A. 2008. Biology and management of horseweed and hairy fleabane in California. UCANR Publications.
- Shrestha, A., B.D. Hanson, M.W. Fidelibus, and M. Alcorta. 2010. Growth, phenology, and intraspecific competition between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweeds (*Conyza canadensis*) in the San Joaquin Valley of California. *Weed Sci.* 58(2): 147–153.
- Silva, D.R.O., D. Agostinetto, and L. Vargas. 2016. Molecular characterization of Hairy Fleabane using RAPD. *Planta Daninha* 34(3): 433–442.
- Singh, S., V. Singh, R.A. Salas-Perez, M. V Bagavathiannan, A. Lawton-Rauh, and N. Roma-Burgos. 2019. Target-site mutation accumulation among ALS inhibitor-resistant *Palmer amaranth*. *Pest Manag. Sci.* 75(4): 1131–1139.
- Soltani, N., J.A. Dille, I.C. Burke, W.J. Everman, M.J. VanGessel, V.M. Davis, and P.H. Sikkema. 2016. Potential corn yield losses from weeds in North America. *Weed Technol.* 30(4): 979–984.
- Sorribas, M., M. Romero, R. Bernes, and D. Larelle. 2006. Penoxsulam, the new herbicide for rice cultivation. *Phytoma España (España)*.
- Steckel, L.E., C.C. Craig, and R.M. Hayes. 2006. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) control with glufosinate prior to planting no-till cotton (*Gossypium hirsutum*). *Weed Technol.* 20(4): 1047–1051.
- Steckel, L.E., and C.O. Gwathmey. 2009. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) growth, seed production, and interference in cotton. *Weed Sci.* 57(3): 346–350.
- Steinmaus, S.J., T.S. Prather, and J.S. Holt. 2000. Estimation of base temperatures for nine weed species. *J. Exp. Bot.* 51(343): 275–286.
- Swain, D.J., M.J. Nott, and R.B. Trounce. 1975. Competition between *Cyperus difformis* and rice: the effect of time of weed removal. *Weed Res.* 15(3): 149–152.
- Tabacchi, M., R. Mantegazza, A. Spada, and A. Ferrero. 2006. Morphological traits and molecular markers for classification of *Echinochloa* species from Italian rice fields. *Weed Sci.* 54(6): 1086–1093. doi: 10.1614/WS-06-018R1.1.
- Takahashi, S., S. Shigematsu, A. Morita, M. Nezu, J.S. Claus, and C.S. Williams. 1991. KIH-2031, a new herbicide for cotton. *In* Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Weeds (United Kingdom). BCPC.
- Tang, H., J. Li, L. Dong, A. Dong, B. Lü, and X. Zhu. 2012. Molecular bases for resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitor in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*). *Pest Manag. Sci.* 68(9): 1241–1247.
- Team, R. 2017a. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.

- Team, R.C. 2017b. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.
- Tharayil-Santhakumar, N. 2003. Mechanism of herbicide resistance in weeds. Plant Soil Sci. Univ. Massachusetts Amherst, MA 20. <http://www.weedresearch.com/paper/Mechanism>.
- Torstensson, L., E. Börjesson, and J. Stenström. 2005. Efficacy and fate of glyphosate on Swedish railway embankments. Pest Manag. Sci. 61(9): 881–886. doi: 10.1002/ps.1106.
- Tozzi, E., H. Beckie, R. Weiss, J.L. Gonzalez-Andujar, J. Storkey, S.Z.H. Cici, and R.C. van Acker. 2014a. Seed germination response to temperature for a range of international populations of *Conyza canadensis*. Weed Res. 54(2): 178–185. doi: 10.1111/wre.12065.
- Tozzi, E., H. Beckie, R. Weiss, J.L. Gonzalez-Andujar, J. Storkey, S.Z.H. Cici, and R.C. Van Acker. 2014b. Seed germination response to temperature for a range of international populations of *Conyza canadensis*. Weed Res. 54(2): 178–185.
- Trezzi, M.M., A.A. Balbinot Jr, G. Benin, F. Debastiani, F. Patel, and E. Miotto Jr. 2013. Competitive ability of soybean cultivars with horseweed (*Conyza bonariensis*). Planta Daninha 31(3): 543–550.
- Trezzi, M.M., R.A. Vidal, F. Patel, E. Miotto Jr, F. Debastiani, A.A. Balbinot Jr, and R. Mosquen. 2015. Impact of *Conyza bonariensis* density and establishment period on soybean grain yield, yield components and economic threshold. Weed Res. 55(1): 34–41.
- Urbano, J.M., A. Borrego, V. Torres, J.M. Leon, C. Jimenez, G. Dinelli, and J. Barnes. 2007. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. Weed Technol. 21: 396–401. doi: 10.1614/WT-06-096.1.
- VanGessel, M.J. 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. Weed Sci. 49(6): 703–705. doi: 10.1614/0043-1745(2001)049[0703:rprhfd]2.0.co;2.
- Vidotto, F., F. Tesio, M. Tabacchi, and A. Ferrero. 2007. Herbicide sensitivity of *Echinochloa* spp. accessions in Italian rice fields. Crop Prot. 26(3): 285–293.
- Waggoner, B.S., T.C. Mueller, J.A. Bond, and L.E. Steckel. 2011. Control of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) with saflufenacil tank mixtures in no-till cotton. Weed Technol. 25(3): 310–315.
- Walsh, M.J., and S.B. Powles. 2007. Management strategies for herbicide-resistant weed populations in Australian dryland crop production systems. Weed Technol. 21(2): 332–338.
- Weaver, S.E. 2001. The biology of Canadian weeds . 115 . *Conyza canadensis*. Can. J. Plant Sci. 0: 867–875.
- Widderick, M., S. Walker, and T. Cook. 2011. Flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis*)—strategic solutions using best management practice. p. 585. In 23 rd Asian-Pacific Weed Science Society

Conference.

- Woodburn, A.T. 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Manag. Sci. Former. Pestic. Sci.* 56(4): 309–312.
- WSSA, W.S.S. of A. Herbicide resistance and tolerance defined. www.wssa.es (accessed 10 August 2018).
- Wu, H., S. Walker, G. Robinson, and N. Coombes. 2010. Control of Flaxleaf Fleabane (*Conyza bonariensis*) in Wheat and Sorghum. *Weed Technol.* 24(02): 102–107. doi: 10.1614/WT-09-043.1.
- Wu, H., S. Walker, M.J. Rollin, D.K.Y. Tan, G. Robinson, and J. Werth. 2007. Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* [L.] Cronquist). *Weed Biol. Manag.* 7(3): 192–199.
- Xia, W., L. Pan, J. Li, Q. Wang, Y. Feng, and L. Dong. 2015. Molecular basis of ALS-and/or ACCase-inhibitor resistance in shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 122: 76–80.
- Xu, H., X. Zhu, H. Wang, J. Li, and L. Dong. 2013. Mechanism of resistance to fenoxaprop in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) from China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107(1): 25–31.
- Yan, B., Y. Zhang, J. Li, J. Fang, T. Liu, and L. Dong. 2019. Transcriptome profiling to identify cytochrome P450 genes involved in penoxsulam resistance in *Echinochloa glabrescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.*
- Yasuor, H., M.D. Osuna, A. Ortiz, N.E. Saldain, J.W. Eckert, and A.J. Fischer. 2009. Mechanism of resistance to penoxsulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss.]. *J. Agric. Food Chem.* 57(9): 3653–3660.
- Yoshimura, Y., H.J. Beckie, and K. Matsuo. 2006. Transgenic oilseed rape along transportation routes and port of Vancouver in western Canada. *Environ. Biosafety Res.* 5(2): 67–75.
- Yu, Q., H. Han, and S.B. Powles. 2008. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. *Pest Manag. Sci. Former. Pestic. Sci.* 64(12): 1229–1236.
- Yuan, J.S., P.J. Tranel, and C.N. Stewart. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci.* 12(1): 6–13.
- Zagnitko, O., J. Jelenska, G. Tevzadze, R. Haselkorn, and P. Gornicki. 2001. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(12): 6617–6622.

**Capítulo 6. Caracterización de la resistencia a
inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y a
inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) en
Leptochloa spp. de arrozales de Extremadura**

Caracterización de la resistencia a inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y a inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) en *Leptochloa* spp. de arrozales de Extremadura

Resumen: *Leptochloa* spp. es una mala hierba presente en los campos de cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). En Extremadura, las dos especies que más abundan son *L. uninervia* y *L. fascicularis*. Los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) y de la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) se han utilizado extensivamente para controlar malas hierbas en el arroz. En el presente estudio, confirmamos la resistencia a los inhibidores de la ALS y la ACCasa utilizados comúnmente en el arroz y caracterizamos el mecanismo de resistencia en tres biotipos de Extremadura (Lp102-09, Lp5-14, Lp2-16). Asimismo, se realizó un estudio complementario ver la distribución de mutaciones de *Leptochloa* spp. por arrozales de Extremadura. Para ello, se realizó en primer lugar un experimento de dosis-respuesta en el invernadero usando profoxidim, cihalofop-butil, penoxsulam e imazamox para determinar el índice de resistencia (resistencia/susceptibilidad [R/S]) basado en las estimaciones de GR₅₀. Los genes ALS y ACCasa del sitio acción se amplificaron a partir de plantas R y S, y se analizaron las secuencias para detectar mutaciones que se sabe que confieren resistencia a los inhibidores de la ALS y la ACCasa. La secuenciación del gen ALS de las plantas R reveló una mutación previamente descrita en otras especies (Pro197Ser) en Lp102-09 y Lp5-14. La secuenciación del gen ACCasa mostró un intercambio de aminoácidos en Lp2-16 (Ile1781Leu). Se encontró que los biotipos Lp102-09 y Lp5-14 fueron resistentes al penoxsulam e imazamox. Por su parte, el biotipo Lp2-16 mostró resistencia frente a profoxidim y cihalofop-butil. Los resultados de distribución de mutaciones revelaron que, de las 42 muestras estudiadas, 5 de ellas mostraron mutación en el gen de la ALS (3 con Pro197Ser y 2 con Pro197Leu; 13 poblaciones con mutaciones en el gen de la ACCasa (12 con Ile1781Leu y 1 con Trp1999Cys) y 3 poblaciones que presentaron mutaciones al mismo tiempo en ambos genes (2 poblaciones con Pro197Ser en el gen ALS y Trp1999Cys en el gen ACCasa y 1 población con Pro197Ser en el gen ALS y

Trp2027Cys en el gen ACCasa). Por lo tanto, nuestra hipótesis de poblaciones resistentes de *Leptochloa* spp. distribuidas por toda la zona arrocera queda confirmada. Estos casos de resistencia son los primeros descritos a inhibidores de ALS y la ACCasa en *Leptochloa* spp. en España.

Introducción

Las especies de *Leptochloa* son gramíneas anuales de primavera consideradas como una mala hierba en los arrozales. Son muy comunes en América y Asia (Stauber et al., 1991; Tehranchian et al., 2016), pero hasta los años 80 no se detectó por primera vez en España dentro de Extremadura. La primera especie descrita en esta región fue el *Leptochloa fascicularis*, siendo una de las gramíneas de arroz más severas (Saavedra et al., 1995; Smith, 1988).

De las especies de *Leptochloa* que aparecen en el arroz en Extremadura, *L. fascicularis* y *L. uninervia* son las más comunes (Osuna et al., 2012). Están bien adaptadas a condiciones de inundación o suelo saturado. Las plantas utilizan la vía fotosintética C4 y producen una gran cantidad de semillas, por lo que ciertas especies de *Leptochloa* forman grandes poblaciones de malas hierbas en los campos de arroz de todo el mundo (Osca, 2013; Smith, 1983).

La aplicación generalizada de los herbicidas que inhiben la ALS y la ACCasa está dando paso a numerosos casos de malas hierbas resistentes. Hasta la fecha, 160 especies de malas hierbas han desarrollado resistencia a los herbicidas ALS, mientras que 48 han mostrado resistencia a ACCasa (I Heap, 2019). Hay que destacar que muchas de estas especies han desarrollado resistencia múltiple o cruzada (resistencia a varios herbicidas al mismo tiempo). El primer caso de resistencia a herbicidas inhibidores de ACCasa en *Leptochloa* spp. (*L. chinensis* L.) fue descrito por Maneechote et al. (2005). No hay casos documentados de *L. fascicularis* y *L. uninervia* resistentes a inhibidores de la ALS y de la ACCasa (I. Heap, 2019).

La mayoría de los herbicidas están diseñados para unirse a enzimas o proteínas fundamentales para ciclos biológicos y, por lo tanto, la resistencia del sitio de acción involucra una enzima objetivo mutada causada por la sustitución de aminoácidos dentro de los genes (Bi et al., 2016; Yuan et al., 2007). Por lo tanto, es relativamente fácil estudiar los mecanismos moleculares

de la resistencia del sitio de acción. Hasta la fecha, por un lado, se sabe que trece sustituciones de aminoácidos en siete sitios confieren resistencia a la inhibición de la ACCasa en varias especies de malas hierbas: Ile1781 a Leu o Val o Thr, Trp1999 a Cys o Leu o Ser, Trp2027 a Cys, Ile2041 a Asn o Val, Asp2078 a Gly, Cys2088 a Arg y Gly2096 a Ser o Ala (Bi et al., 2016; Délye et al., 2011; Powles y Yu, 2010; Zhang y Powles, 2006). Por otro lado, se han identificado 26 sustituciones de aminoácidos que implican resistencia a inhibidores de la ALS en ocho posiciones (Ala122 (3), Pro 197 (12), Ala 205 (1), Asp376 (1), Arg377 (1), Trp574 (3), Ser653 (3) y Gly654 (2) en los codones ALS de varias especies de malas hierbas (Bi et al., 2016; I Heap, 2019; Powles y Yu, 2010). Los NTSR, descrita como una colección de mecanismos que, por definición, no son TSR, se debe a una reducción en la absorción y/o translocación, incremento del metabolismo (Amaro-Blanco et al., 2018; Fernández-Moreno et al., 2017).

En base a casos anteriores y a la falta de información sobre *L. fascicularis* y *L. uninvervia*, el objetivo de este trabajo fue evaluar por primera vez la resistencia de poblaciones de *Leptochloa* spp., recogidas en los arrozales de Extremadura, a los herbicidas inhibidores de la ALS y de la ACCasa.

Material y métodos

Recolección y preparación material vegetal

Las plantas sospechosas de tener resistencia (R) de *Leptochloa* spp. se recolectaron en campos de arroz de Extremadura después de reuniones mantenidas con técnicos de campos y personal del servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura. Los mismos informaron sobre arrozales en los que existían fallos en el control con herbicidas inhibidores de la ALS y de la ACCasa y se sospechaba casos de resistencia.

Las semillas susceptibles (S), se recogieron de parcelas cuyo historial no indicaba tratamiento con herbicidas.

Las semillas de las poblaciones de *Leptochloa* spp. estudiadas fueron germinadas en macetas de 7x7x9 cm. utilizándose un sustrato de turba-vermiculita en una proporción 3:1 en invernadero con condiciones controladas de humedad y temperatura, 28/18 °C (día/noche) en un fotoperíodo

de 16 h, 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ flujo de fotón fotosintético en un invernadero en CICYTEX-La Orden (coordenadas: 38.852795, -6.671753). Cuando las plántulas crecieron, se trasplaron a macetas individuales para realizar ensayos. Las plantas se regaron en condiciones de inundación.

Caracterización molecular

Según Fernández-Cavada et al. (2008), *L. fascicularis* se distingue *L. uninervia* principalmente por sus espiguillas más aristadas. Se quiso llevar a cabo una caracterización molecular para comprobar que coincidía con la metodología de este autor.

Estas poblaciones de *Leptochloa* spp fueron caracterizadas a nivel de especie *L. fascicularis* o *L. uninervia* mediante el uso de marcadores moleculares AFLP usando la metodología de Romano et al. (2017) (Tabla 32).

Tabla 32. Bandas presentes/ausentes en *L. fascicularis* y *L. uninervia*

Pareja primers	Tamaño banda	<i>L. fascicularis</i>	<i>L. uninervia</i>
E37_M49	409bp	PRESENTE	AUSENTE
E37_M49	507bp	PRESENTE	AUSENTE
E40_M61	236bp	PRESENTE	AUSENTE
E35_M49	153bp	PRESENTE	AUSENTE
E36_M48	256bp	AUSENTE	PRESENTE

Ensayos dosis-respuesta

Las semillas se germinaron en macetas 10x10x11 cm. Las plántulas en germinación se trasplantaron a macetas individuales (10x10x11 cm) que contenían turba y vermiculita (3:1 v/v) y se colocaron en un invernadero a 28/8°C (día / noche) en un fotoperíodo de 16 h con 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ flujo de fotones fotosintéticos.

Los tratamientos se organizaron en un diseño de bloques completos al azar con seis repeticiones para cada herbicida y dosis ensayada, incluyendo el control no tratado. Dos herbicidas inhibidores de la ACCasa (cyhalofop-butyl y profoxydim) y cuatro herbicidas inhibidores de la ALS (azimsulfuron, byspiribac-sodium, imazamox y penoxsulam) fueron usados a 0, 1, 2, 4 y 8 veces la dosis de campo autorizada (Tabla 33).

Tabla 33. Herbicidas inhibidores de la ACCasa y la ALS usados en los ensayos dosis-respuesta

Herbicidas	Nombre comercial (fabricante)	Grupo químico	Dosis de campo g i.a. ha ⁻¹
ACCasa-inhibiting herbicides			
Proflorfenidim 20% ^b	Aura (BASF)	CHD	200
Ciflutol 20%	Clincher (Dow AgroSciences)	APP	300
ALS-inhibiting herbicides			
Penoxsulam 2,04%	Viper (Dow AgroSciences)	TP	40,8
Imazamox 4%	Pulsar 40 (BASF)	IMI	35
Azimsulfuron 50%	Gulliver (FMC)	SU	22,5
Bispiribac-sodio 40,8%	Nominee (Bayer)	PB	25,5

^aAPP: Ariloxifenoxi propiónicos; CHD: ciclohexanodionas; IMI: imidazolinonas; PB: pirimidiniltiobenzoatos; SU: sulfonilureas; TP: triazolopirimidinas

^b Una dosis de 0,2% de adyuvante (methyl oleate, 348 g/L EC, BASF) para producir una mayor efectividad en la absorción del herbicida

Las plantas de *Leptochloa* spp se trataron con estado de desarrollo de dos a cuatro hojas utilizando una boquilla de abanico plano (Tee Jet 8002 EVS) a 250 kPa desde una altura de 50 cm por encima de la superficie del suelo, usando un volumen de salida equivalente a 250 L ha⁻¹. Después de las aplicaciones de los herbicidas, las plantas se mantuvieron en invernadero en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Los datos de dosis-respuesta se sometieron a un análisis de regresión no lineal utilizando un modelo log-logístico de cuatro parámetros (ecuación 1) para determinar la dosis de herbicida que resulta en una reducción del 50% en el crecimiento (GR₅₀).

$$f(x) = c + \frac{d-c}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))} \quad (1)$$

donde f(x) es la reducción del peso de la parte aérea expresado como porcentaje del control no tratado; c y d son la asíntota inferior y la superior, respectivamente; b es la pendiente de la línea alrededor del punto de inflexión; g es el GR₅₀; y x (variable independiente) es la tasa de herbicida.

El análisis de regresión se realizó utilizando el paquete drc (Ritz et al., 2015) para el entorno estadístico R (Team, 2017).

Extracción del ADN y reacciones de PCR

El material vegetal (60-100mg) para este ensayo se tomó de plantas que habían crecido en las mismas condiciones que las del apartado anterior. Se procedió a la extracción del ADN utilizándose para ello el kit de extracción de ADN para plantas de BIOTOOLS siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído, se cuantificó utilizando el NANODROP 1000 (Thermo

Scientific) para asegurarnos que estaba en las condiciones adecuadas de concentración y pureza. A continuación, se hicieron diluciones a 10 ng/μl que son las concentraciones utilizadas en las posteriores PCR. El ADN se conservó a -21 °C hasta su utilización en los análisis.

En la secuencia de la **ACCasa** se estudiaron 8 codones: Ile1781, trp1999, trp2027, Ile2041, asp2078, lys2080, ser2088 y gly2096. Para ello, se utilizaron dos parejas de cebadores diseñadas a partir de la secuencia de ACCasa de número de accesoión HQ395759.1 del Genbank (*Echinochloa cruss-galli*). La pareja CRUSS-F (5'-GATTGGCATAGCCGATGAAG-3')/CRUSSR(5'-TGGACAACACCATTGGTAGC-3') amplifica la región Ile1781 dando un fragmento de 474bp. La pareja AC6F (5'-AGCTTGGAGGAATCCCTGTT-3') /AC6R (5'-GGGTCAAGCCTACCCATACA-3') amplifica el resto de las regiones estudiadas dando un fragmento de 496bp.

En la secuencia de la **ALS** se estudiaron 2 zonas: la CAD (incluye los codones ala122, pro197, ala205), y la BE (incluye los codones trp574 y ser653). Para la zona CAD se utilizó la pareja de cebadores la pareja PALI-1F (5'-CGACGTCTTCGCCTACCC-3')/PALI-2R (5'-ATCTGCTGCTGGATGTCCTT -3') diseñada a partir de la secuencia de la ALS de número de accesoión JQ319776 del Genbank (*E. cruss galli*). En el caso de la zona BE se utilizó la pareja BE-1(5'-GTCTTGGGGCTATGGGATTT-3') /BE-2(5'-CGACAGAACAAGGGAGAACA-3') con un tamaño de banda de 594bp, diseñada a partir de la secuencia de ALS de número de accesoión AB636580.1 del Genbank (*Echinochloa phyllopogon*) y AY885675.1 (*Oryza sativa*). Al igual que antes, con algunas muestras esta pareja no amplificó bien y se utilizó la formada por AHAS21F (5'-CCGCCGCAATATGCTATCCAG-3') / AHAS26R (5'-GTCCTGCCATCACCTCCATG-3') con un tamaño de banda de 534bp (Pozniak, C et al.2004). Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa PRIMER 3 PLUS.

Para las PCR, la mezcla de los reactivos utilizada fue de 1,125μl de cada primer (10pmol/ μl), 2,4 μl de la mezcla de dNTP (2.5mM), 3 μl de Buffer 10X, 0.3μl de Taq polimerasa (5U/ μl) y se completó con agua de PCR hasta un volumen final de 30 μl. El ciclo de PCR llevado a cabo para todas las parejas de cebadores fue el mismo variando únicamente la temperatura de unión de los cebadores: 95°C 5min (x1); 95°C 30seg, X°C 30seg, 72°C 1min (x35) y 72°C 5min (x1),

manteniéndose a 4°C al final del ciclo. Así, para las parejas CRUSS-F/ R, AC-6F/R, PAUL-1F/1R y PALI-1F/1R la temperatura de unión de los cebadores fue de 57°C; para la pareja BE-1/2 esta temperatura fue de 61°C y para la pareja AHAS21F/26R fue de 52°C.

Electroforesis en gel de agarosa y purificación de las bandas de interés

Los productos de ADN amplificados mediante la técnica de PCR explicada en el apartado anterior, fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.3% y visualizados mediante el transiluminador Alpha Innotech. El gel de agarosa fue teñido con Red Safe (20.000X; INTRON). Las bandas esperadas, se cortaron y purificaron utilizando el Kit de Purificación de ADN de BIOTOOLS (según las indicaciones del fabricante).

Secuenciación de los fragmentos amplificados

Tras purificar las bandas, éstas fueron enviadas para su secuenciación al STAB (Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia) de la Universidad de Extremadura. Las secuencias, fueron visualizadas utilizando el programa CHROMAS y fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL OMEGA.

Distribución de las mutaciones encontradas

Se analizaron muestras provenientes de prospecciones de años previos para estudiar la distribución de resistencias debidas a sitio de acción para la ALS y la ACCasa.

Resultados y discusión

Caracterización molecular y morfológica

Se llevó a cabo una caracterización molecular de las muestras y se comparó con otra caracterización morfológica en base a la aristas de las semillas según indica Fernández-Cavada et al. (2008).

Los resultados de caracterización molecular revelaron 3 poblaciones *L. fascicularis* (Lp102-9, Lp2-16 y Lp6-13) y 2 *L. uninervia* (Lp5-14 y Lp1-13) (Tabla 34). Los resultados coincidieron con

los morfológicos. Las poblaciones con semillas aristadas pertenecieron a la especie *L. fascicularis* y las no aristadas a la *L. uninervia*.

Tabla 34. Resultados de la caracterización de las poblaciones recolectadas

Población	Historial tratamiento	Especie
<i>Poblaciones Resistentes</i>		
Lp102-9	Inhibidores de la ALS	<i>L. fascicularis</i>
Lp5-14	Inhibidores de la ALS	<i>L. uninervia</i>
Lp2-16	Inhibidores de la ACCasa	<i>L. fascicularis</i>
<i>Poblaciones Sensibles</i>		
Lp1-13	No tratamiento	<i>L. uninervia</i>
Lp6-13	No tratamiento	<i>L. fascicularis</i>

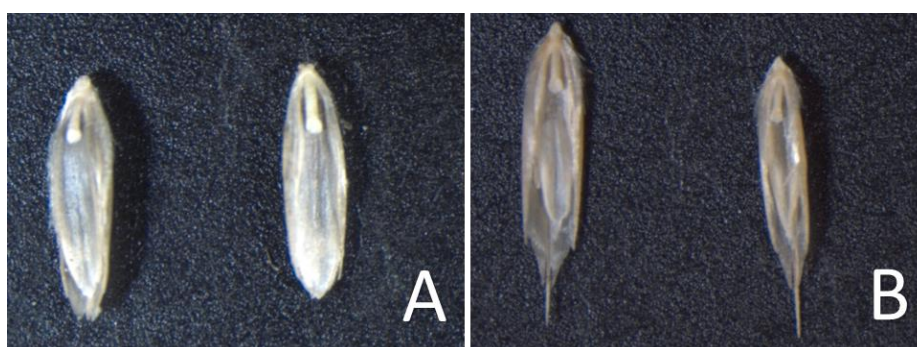


Figura 50. Semillas de las dos especies de *Leptochloa*. A, *L. uninervia*; B, *L. fascicularis*.

Los resultados moleculares coincidieron atendiendo a la metodología descrita por Fernández-Cavada et al. (2008). En las poblaciones con semillas más aristadas (Lp102-09, Lp6-13 y Lp2-16) se identificaron la presencia de fragmentos diferenciadores en 153, 236, 409 y 507 bp. En cambio, en las poblaciones cuyas semillas carecían de arista (Lp1-13 y Lp5-14), se encontró únicamente una banda en el fragmento 256 bp.

El método de caracterización molecular llevado a cabo aporta la ventaja de reconocer la especie en un estadio precoz y decidir el tratamiento que podría no ser el mismo en una especie que en otra. Además, este método no está influenciado por los factores medioambientales, lo cuál la hace más específica.

Ensayos dosis-respuesta

Los resultados de dosis-respuesta para las poblaciones recolectadas son los que se muestran en la Tabla 35. El índice de resistencia (R/S) fue muy elevado en el caso de las poblaciones que se recolectaron como resistentes. Lp102-09 y Lp5-14 registraron valores de GR₅₀ que superaban

varias veces la dosis de campo recomendada por el fabricante para herbicidas inhibidores de la ALS, siendo parecidos a los de la población sensible para inhibidores de la ACCasa.

De manera contraria, con el biotipo Lp2-16 se obtuvieron valores de GR₅₀ que superaban varias veces a las dosis máximas permitidas por el registro de productos fitosanitarios en España para herbicidas inhibidores de la ACCasa. Los índices R/S registrados para esta población cuando se utilizaron herbicidas inhibidores de la ALS, no fueron excesivamente altos.

Tabla 35. Dosis efectiva que causa 50% de inhibición del crecimiento (GR₅₀) en *Leptochloa* spp. frente a Profloroxim, Cihalofop-butil, Penoxsulam e Imazamox

Población	Valores de GR ₅₀ (g.i.a. ha ⁻¹) ^a			
	Profloroxim	Cihalofop-Butil	Penoxsulam	Imazamox
<i>L. fascicularis</i>				
Lp6-13 (S)	0,73 ± 0,18	0,25 ± 0,04	3,41 ± 0,17	2,13 ± 0,11
Lp102-09 (ALS) (R)	1,08 ± 0,06	0,37 ± 0,09	442,43 ± 7,15	140,54 ± 1,32
Lp2-16 (ACCasa) (R)	893,15 ± 9,17	1017,32 ± 22,98	4,28 ± 0,21	8,04 ± 0,20
R/S ^b (ALS)	1,48	1,48	129,74	65,98
R/S (ACCasa)	1223,49	4069,28	1,26	3,77
<i>L. uninervia</i>				
Lp1-13 (S)	0,87 ± 0,61	0,65 ± 0,11	1,03 ± 0,15	3,13 ± 0,28
Lp5-14 (ALS) (R)	1,92 ± 0,09	0,99 ± 0,12	816,25 ± 37,99	732,54 ± 2,71
R/S	2,21	1,52	792,48	234,04

^aLos números entre paréntesis de los valores GR₅₀ representan el error estándar
R/S es el índice de resistencia para cada herbicida calculado en base a los valores de GR₅₀

Estudio de las secuencias de los genes de la ALS y la ACCasa

Se amplificaron dos fragmentos del gen ALS, que tenían una longitud de 594 (o 634) y 455 bp donde se encuentran las regiones BE y CAD respectivamente, para identificar las posibles mutaciones. No se encontraron mutaciones en la región BE en ninguna de las poblaciones recolectadas. La secuenciación reveló un tipo de mutación en la posición 197: de Prolina (CCT) a Serina (TCT) (Lp102-09 y Lp5-14) (Tabla 36). El resultado parece lógico pues vienen de campos de arroz que tenían historial de tratamiento con inhibidores de la ALS. Por el contrario, la población Lp2-16, que provenía de una parcela en la que se utilizó inhibidores de la ACCasa, no mostró mutación al estudiar la secuencia de la ALS.

Las dos poblaciones que procedían de parcelas donde no hubo ningún tratamiento herbicida (Lp1-13 y Lp6-13), no tuvieron mutación en el fragmento de la secuencia de la ALS estudiada.

Tabla 36. Alineación de secuencias para el gen ALS. En negrita y resaltado, los nucleótidos que codifican Pro-197 en la población susceptible (S) y la mutación en los resistentes.

Población	La posición de aminoácidos, secuencia relativa de nucleótidos y aminoácidos derivados.										
	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
Lp1-13 (S)	ACT	GGT	CAA	GTA	CCT	AGG	AGG	ATG	ATT	GGT	ACT
	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr
Lp6-13 (S)	ACT	GGT	CAA	GTA	CCT	AGG	AGG	ATG	ATT	GGT	ACT
	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr
Lp102-09 (R)	ACT	GGT	CAA	GTA	TCT	AGG	AGG	ATG	ATT	GGT	ACT
	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr
Lp5-14 (R)	ACT	GGT	CAA	GTA	TCT	AGG	AGG	ATG	ATT	GGT	ACT
	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr
Lp2-16 (R)	ACT	GGT	CAA	GTA	CCT	AGG	AGG	ATG	ATT	GGT	ACT
	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr

Según Yu et al. (2008), mutaciones en la posición 197 del gen de la ALS puede dar lugar a resistencias a herbicidas inhibidores de la ALS pertenecientes a las familias sulfonilureas y triazolopirimidinas. Nuestros resultados en las poblaciones recolectadas con una mutación Pro197Ser (Lp102-09 y Lp5-14) mostraron resistencia todas las familias ensayadas pertenecientes a los inhibidores de la ALS: imidazolinonas, pirimidiniltiobenzoatos, sulfonilureas y triazolopirimidinas.

Se utilizaron dos pares de cebadores para identificar las sustituciones de aminoácidos a lo largo del gen ACCasa. Uno de ellos se usó para amplificar la región de 1781, lo que dio como resultado un fragmento de 474 pb. El otro cebador se usó para amplificar la otra región donde se podrían encontrar sustituciones de aminoácidos en las posiciones 1999, 2027, 2041, 2078, 2080, 2088 y 2096 dando como resultado un fragmento de 496 pb. Únicamente la población Lp2-16, proveniente de parcelas tratadas con herbicidas inhibidores de la ACCasa, mostró una sustitución de Ile por Leu en la posición 1781. El resto de poblaciones, resistentes y sensibles, no vieron alterada su fragmento de la secuencia del gen ACCasa estudiado (Tabla 37).

Tabla 37. Aminoácido intercambiado para las posiciones correspondientes a Ile1781, Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Ser2088 y Gly2096 en el gen ACCasa de las poblaciones *Leptochloa* spp. recolectadas

Población	ACCasa						
	Ile ₁₇₈₁	Trp ₁₉₉₉	Trp ₂₀₂₇	Ile ₂₀₄₁	Asp ₂₀₇₈	Ser ₂₀₈₈	Gly ₂₀₉₆
	Amino ácidos						
Lp1-13 (S)	ATA	TGG	TGG	ATT	GAT	TGT	GGC
	Ile	Trp	Trp	Ile	Asp	Ser	Gly
Lp6-13 (S)	ATA	TGG	TGG	ATT	GAT	TGT	GGC
	Ile	Trp	Trp	Ile	Asp	Ser	Gly
Lp102-09 (R)	ATA	TGG	TGG	ATT	GAT	TGT	GGC
	Ile	Trp	Trp	Ile	Asp	Ser	Gly
Lp5-14 (R)	ATA	TGG	TGG	ATT	GAT	TGT	GGC
	Ile	Trp	Trp	Ile	Asp	Ser	Gly
Lp2-16 (R)	TTA	TGG	TGG	ATT	GAT	TGT	GGC
	Leu	Trp	Trp	Ile	Asp	Ser	Gly

Li et al. (2013) afirmó que la sustitución Ile1781Leu confería resistencia a herbicidas de la familia APP perteneciente a los inhibidores de la ACCasa, mientras Zagnitko et al. (2001) and Mohamed et al. (2012) probaron que la misma mutación daba resistencia a las familias CHD y PPZ. En nuestro caso, la misma mutación, Ile1781Leu mostró dar lugar a resistencia frente a las dos familias inhibidoras de la ACCasa que se probaron: APP y CHD.

Distribución de las mutaciones encontradas

Las muestras que presentaron mutación se distribuyen en Extremadura como se detalla en la Figura 51. De las 42 muestras estudiadas, 5 de ellas mostraron mutación en el gen de la ALS (3 con Pro197Ser y 2 con Pro197Leu; 13 poblaciones con mutaciones en el gen de la ACCasa (12 con Ile1781Leu y 1 con Trp1999Cys) y 3 poblaciones que presentaron mutaciones al mismo tiempo en ambos genes (2 poblaciones con Pro197Ser en el gen ALS y Trp1999Cys en el gen ACCasa y 1 población con Pro197Ser en el gen ALS y Trp2027Cys en el gen ACCasa).

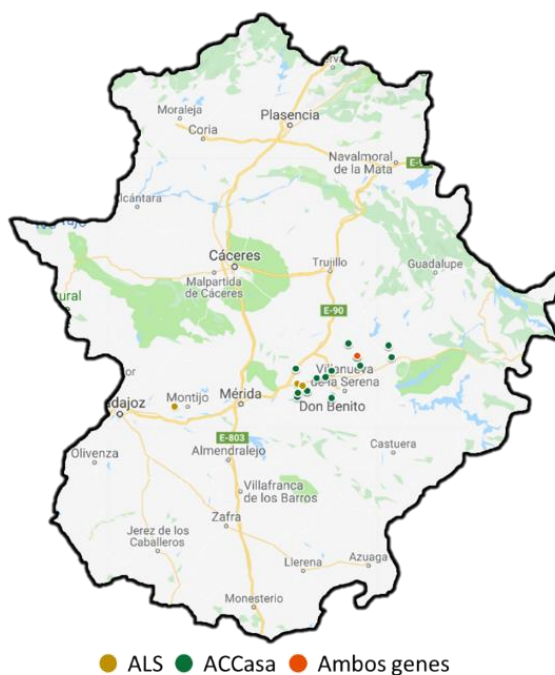


Figura 51. Distribución de poblaciones de *Leptochloa* spp. con mutación en gen de la ALS, ACCasa o en ambos en Extremadura

Conclusión

La dispersión de semillas de malas hierbas de arroz por su transporte por las aves, el flujo de agua de riego de los arrozales interconectados y la maquinaria agrícola con restos de semillas puede causar un grave problema de propagación de la resistencia. (Osuna et al., 2011).

Cada vez hay más y más poblaciones resistentes a los herbicidas en el área estudiada y aún menos herramientas químicas para tratar. El uso repetido de herbicidas del mismo modo de acción y el tratamiento en estados de desarrollo adulto puede agravar los casos de resistencia.

La identificación precoz a nivel de especie de poblaciones de *Leptochloa* puede ser un aspecto diferencial para combatir la resistencia.

Pero no solo esto es suficiente. Es importante que los agricultores lleven a cabo un sistema de control integrado que combine herramientas químicas y no químicas. Además, se deben utilizar prácticas que retrasen la evolución de la resistencia: usar semilla certificada libre de semillas de malas hierbas, limpiar equipos, cortar las malas hierbas para evitar la dispersión de sus semillas, evitar utilizar el mismo modo de acción de forma reiterada.

Referencias

- Amaro-Blanco, I., Fernández-Moreno, P.T., Osuna-Ruiz, M.D., Bastida, F., De Prado, R., 2018. Mechanisms of glyphosate resistance and response to alternative herbicide-based management in populations of the three *Conyza* species introduced in Southern Spain. *Pest Manag. Sci.* Accepted Author Manuscript. <https://doi.org/10.1002/ps.4896>
- Bi, Y., Liu, W., Guo, W., Li, L., Yuan, G., Du, L., Wang, J., 2016. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-and ALS-inhibiting herbicides in *Alopecurus japonicus* from China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 126, 22–27.
- Délye, C., Pernin, F., Michel, S., 2011. 'Universal'PCR assays detecting mutations in acetyl-coenzyme A carboxylase or acetolactate synthase that endow herbicide resistance in grass weeds. *Weed Res.* 51, 353–362.
- Fernández-Cavada, S., Cirujeda, A., Carmelo, M., Salas, I., Aibar, J., Zaragoza, C., 2008. *Leptocloa*. *Leptochloa uninervia* (C. Presl) Hitch. & Chase.
- Fernández-Moreno, P.T., Bastida, F., De Prado, R., 2017. Evidence, mechanism and alternative chemical seedbank-level control of glyphosate resistance of a rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype from southern Spain. *Front. Plant Sci.* 8, 450.
- Heap, I., 2019. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds [WWW Document]. Online. Internet. Tuesday, January 30, 2018. Available www.weedscience.org. URL www.weedscience.org (accessed 1.15.18).
- Heap, I., 2019. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds [WWW Document]. URL <http://www.weedscience.org> (accessed 2.14.19).
- Li, L., Bi, Y., Liu, W., Yuan, G., Wang, J., 2013. Molecular basis for resistance to fenoxaprop-p-ethyl in American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne* Steud.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 105, 118–121.
- Maneechote, C., Samanwong, S., Zhang, X.-Q., Powles, S.B., 2005. Resistance to ACCase-inhibiting herbicides in sprangletop (*Leptochloa chinensis*). *Weed Sci.* 53, 290–295.
- Mohamed, I.A., Li, R., You, Z., Li, Z., 2012. Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) resistance to fenoxaprop and pinoxaden in China. *Weed Sci.* 60, 167–171.

- Osca, J.M., 2013. Expansion of *Leptochloa fusca* ssp. *uninervia* and *Leptochloa fusca* ssp. *fascicularis* in rice fields in Valencia, eastern Spain. *Weed Res.* 53, 479–488.
- Osuna, M.D., Okada, M., Ahmad, R., Fischer, A.J., Jasieniuk, M., 2011. Genetic diversity and spread of thiobencarb resistant early watergrass (*Echinochloa oryzoides*) in California. *Weed Sci.* 59, 195–201.
- Osuna, M.D., Romano, Y., Quiles, J.M., 2012. Principales malas hierbas y métodos de control en el cultivo de arroz en España. *Vida Rural* 339, 74–77.
- Powles, S.B., Yu, Q., 2010. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose-response analysis using R. *PLoS One* 10, e0146021.
- Romano, Y., Mendoza, F., Palmerín, J.A., Quiles, J.M., Amaro-Blanco, I., Osuna, M.D., 2017. Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura: “*Echinochloa* spp.” y “*Leptochloa* spp.” in: XVI Congreso de La Sociedad Española de Malherbología: Actas: Pamplona-Iruña, 25-27 Octubre, 2017. Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra, pp. 337–342.
- Saavedra, M., Cortés, J.A., GÓMEZ, D.E.B.D., Rodríguez-Bernabé, J.A., TABENER, A., Castejón, M., Montserrat, A., Zaragoza, C., 1995. Malas hierbas de difícil control. Minist. Agric. Pesca y Aliment. Madrid.
- Smith, R.J., 1988. Weed thresholds in southern US rice, *Oryza sativa*. *Weed Technol.* 2, 232–241.
- Smith, R.J., 1983. Competition of bearded sprangletop (*Leptochloa fascicularis*) with rice (*Oryza sativa*). *Weed Sci.* 31, 120–123.
- Stauber, L.G., Nastasi, P., Smith, R.J., Baltazar, A.M., Talbert, R.E., 1991. Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and bearded sprangletop (*Leptochloa fascicularis*) control in rice (*Oryza sativa*). *Weed Technol.* 5, 337–344.
- Team, R.C., 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.
- Tehranchian, P., Norsworthy, J.K., Korres, N.E., McElroy, S., Chen, S., Scott, R.C., 2016.

- Resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in Amazon sprangletop: Confirmation, control, and molecular basis of resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 133, 79–84.
- Yu, Q., Han, H., Powles, S.B., 2008. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. *Pest Manag. Sci. Former. Pestic. Sci.* 64, 1229–1236.
- Yuan, J.S., Tranel, P.J., Stewart, C.N., 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci.* 12, 6–13.
- Zagnitko, O., Jelenska, J., Tevzadze, G., Haselkorn, R., Gornicki, P., 2001. An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6617–6622.
- Zhang, X., Powles, S.B., 2006. Six amino acid substitutions in the carboxyl-transferase domain of the plastidic acetyl-CoA carboxylase gene are linked with resistance to herbicides in a *Lolium rigidum* population. *New Phytol.* 172, 636–645.

VII.6. Referencias Bibliográficas

- Aguilar, M. (2001). *Cultivo del arroz en el sur de España*. Caja de Ahorros El Monte.
- Barrett, S. H. (1983). Crop mimicry in weeds. *Economic Botany*, 37(3), 255-282.
- Carretero, J. (1981). El género *Echinochloa* Beauv. en el suroeste de Europa. *An. Jard. Bot. Madrid*, 38, 91-108. Recuperado de <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2987498.pdf>
- Chauhan, B. S., & Johnson, D. E. (2009). Ecological studies on *Cyperus difformis*, *Cyperus iria* and *Fimbristylis miliacea*: three troublesome annual sedge weeds of rice. *Annals of Applied Biology*, 155(1), 103-112.
- Chin, D. Van. (2001). Biology and management of barnyardgrass, red sprangletop and weedy rice. *Weed Biology and Management*, 1(1), 37-41.
- Coria, S. (2017). Respuesta de diferentes biotipos de *Echinochloa* spp. a los herbicidas clomazona, pendimetalina y penoxsulam.
- Danquah, E. Y., Hanley, S. J., Brookes, R. C., Aldam, C., & Karp, A. (2002). Isolation and characterization of microsatellites in *Echinochloa* (L.) Beauv. spp. *Mol. Ecol. Notes.*, 2, 54-56. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00144.x>
- Danquah, E. Y., Johnson, D. E., Riches, C., Arnold, G. M., & Karp, A. (2002). Genetic diversity in *Echinochloa* spp. collected from different geographic origins and within rice fields in Cote d'Ivoire. *Weed Research*, 42(5), 394-405. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.2002.00300.x>
- de Prado, R., & de Prado, J. L. (2005). Caracterización y control de *Echinochloa* spp. resistente a herbicidas en arroz. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (173), 108-114.
- Del Monte, J. P., & Cortés, J. A. (2000). Acerca de las especies del género *Leptochloa*, como malas hierbas de los arrozales y su distribución en España. *Bol. San. Veg. Plagas*, 26, 599-604.
- Fernández-Cavada, S., Cirujeda, A., Carmelo, M., Salas, I., Aibar, J., & Zaragoza, C. (2008). *Leptochloa*. *Leptochloa uninervis* (C. Presl) Hitch. & Chase. Dirección General de Alimentación. Centro de Producción Vegetal. Gobierno de Aragón. Recuperado de http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Sanidad_Vegetal/Proteccion_Vegetal/Publicaciones/Informaciones_Tecnicas/HOJAS_INFORMATIVAS_MALAS_HIERRBAS_LEPTOCLOA_2008.pdf

- Fisher, A. J., Ateh, C. M., Bayer, D. E., & Hill, J. E. (2000). Herbicide-resistant *Echinochloa oryzoides* and *E. phylloponon* in California *Oryza sativa* fields. *Weed Science*, 48(2), 225-230.
- Fuentes, C. L. (1991). Notas sobre aspectos taxonómicos y biológicos de *Echinochloa* Beauvois. *Comalfi*, (18), 38-46.
- Heap, I. (2018). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Recuperado 30 de octubre de 2018, de <http://www.weedscience.org>
- Holm, L., Plucknett, D., Pancho, J., & Herberger, J. (1977). The World's Worst Weeds: Distribution and Biology. *University Hawaii Press*, p. 609.
- Lopez-martinez, N., Pujadas- Salva, A., Finch, R. P., Marshall, G., & De Prado, R. (1999). Molecular Markers Indicate Intraspecific Variation in the Control of *Echinochloa* spp. with Quinclorac, 47(3), 310-315.
- MAPAMA. (2017). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Recuperado 24 de agosto de 2018, de <https://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/arroz/>
- Merotto, A., Jasieniuk, M., & Fischer, A. J. (2009). Estimating the outcrossing rate of *Cyperus difformis* using resistance to ALS-inhibiting herbicides and molecular markers. *Weed research*, 49(1), 29-36.
- Merotto, A., Jasieniuk, M., & Fischer, A. J. (2010). Distribution and cross-resistance patterns of ALS-inhibiting herbicide resistance in smallflower umbrella sedge (*Cyperus difformis*). *Weed science*, 58(1), 22-29.
- Michael, P. W. (1983). Taxonomy and distribution of *Echinochloa* species with special reference to their occurrence as weeds of rice. En *Proceeding of the Conference on Weed Control in Rice* (Vol. 31, pp. 291-306).
- Mitich, L. W. (1990). Barnyardgrass. *Weed Technology*, 4(4), 918-920.
- Norris, R. F. (1996). Morphological and phenological variation in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in California. *Weed science*, 804-814.
- Ortiz, R., Contreras, J. M., Ruiz, A., Sanz, M. A., Romero, M., Gordillo, M., ... Urbano Fuentes-Guerra, J. M. (2015). Malas hierbas preocupantes en España. En *XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología: La Malherbología y la transferencia tecnológica: Sevilla, 19-22 octubre 2015*, 497-503. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.

- Osuna, M. D., Okada, M., Ahmad, R., Fischer, A. J., & Jasieniuk, M. (2011). Genetic diversity and spread of thiobencarb resistant early watergrass (*Echinochloa oryzoides*) in California. *Weed Science*, 59(2), 195-201.
- Osuna, M. D., Romano, Y., & Quiles, J. M. (2012). Principales malas hierbas y métodos de control en el cultivo de arroz en España. *Vida Rural*, 339, 74-77.
- Rao, A. N., Johnson, D. E., Sivaprasad, B., Ladha, J. K., & Mortimer, A. M. (2007). Weed management in direct-seeded rice. *Advances in Agronomy*, 93, 153-255.
- Romano García, Y., Amaro Blanco, I., Quiles Pecos, J. M., Palmerín Romero, J. A., Torcea, L., & Osuna Ruiz, M. D. (2017). Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campaña 2017). *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, (406), 378-381.
- Ruiz-Santaella, J. P., Bastida, F., Franco, A. R., & De Prado, R. (2006). Morphological and molecular characterization of different *Echinochloa* spp. and *Oryza sativa* populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1166-1172. <https://doi.org/10.1021/jf0520746>
- Saavedra, M., Cortés, J. A., GÓMEZ, D. E. B. D., Rodríguez-Bernabé, J. A., TABENER, A., Castejón, M., ... Zaragoza, C. (1995). Malas hierbas de difícil control. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid*.
- Sanders, B. A. (1994). The life cycle and ecology of *Cyperus difformis* (rice weed) in temperate Australia: a review. *Australian journal of experimental agriculture*, 34(7), 1031-1038.
- Swain, D. J., Nott, M. J., & Trounce, R. B. (1975). Competition between *Cyperus difformis* and rice: the effect of time of weed removal. *Weed Research*, 15(3), 149-152.
- Tabacchi, M., Mantegazza, R., Spada, A., & Ferrero, A. (2006). Morphological traits and molecular markers for classification of *Echinochloa* species from Italian rice fields. *Weed Science*, 54(6), 1086-1093. <https://doi.org/10.1614/WS-06-018R1.1>
- Vidotto, F., Tesio, F., Tabacchi, M., & Ferrero, A. (2007). Herbicide sensitivity of *Echinochloa* spp. accessions in Italian rice fields. *Crop Protection*, 26(3), 285-293



VIII. DISCUSIÓN GENERAL



VIII. Discusión General

VIII.1. Discusión de los estudios de *Conyza* spp. (Capítulos 1 y 2)

Conyza spp. es una mala hierba de hoja ancha que está presente en cultivos leñosos principalmente en olivar y frutales. Esta mala hierba es un gran problema para los agricultores. Prueba de ello es que las especies de *Conyza* se encuentran entre las más problemáticas en todo el mundo (Eubank et al., 2008; Shrestha, 2008; Shrestha et al., 2010; Baliouis, 2014; Heap, 2018).

Sin embargo, su aparición no sólo se reduce al ámbito de los sistemas de cultivo, sino que también está presente en márgenes de carretera, en vías del tren y en zonas urbanas como jardines públicos (Owen et al., 2009; Filibeck et al., 2012; Amaro Blanco et al., 2017). En nuestro estudio “Distribución de especies de *Conyza* spp. en zonas urbanas de la provincia de Badajoz” se comprobó que incluso en áreas residenciales está presente este género de mala hierba.

Existen métodos mecánicos para la eliminación de *Conyza* spp., pero el uso de herbicidas es el método de control rentable y rápido. Uno de los principales herbicidas utilizados para controlar *Conyza* spp. es el glifosato, que se ha convertido en el herbicida más utilizado del mundo debido a su eficacia, económica y benigna para el medio ambiente (Dill et al., 2008; Duke and Powles, 2008).

Dentro del género *Conyza*, se han descrito 61 casos de resistencia al glifosato para sus tres especies más comunes (Heap, 2018) y cada día va más en aumento. El uso repetido de herbicidas da lugar a que las malas hierbas, en este caso *Conyza* spp., desarrollen mecanismos de resistencia para evadir la acción de estos herbicidas.

En nuestro estudio “Mecanismos de resistencia a glifosato y respuesta al control con herbicidas alternativos en poblaciones de las tres especies de *Conyza* introducidas en el sur de España”, caracterizamos la presencia de los mecanismos más frecuentes: los dependientes del sitio de acción (TSR) y los independientes del sitio de acción (NTSR). Los resultados revelaron que los mecanismos NTSR explican la resistencia en *C. bonariensis* y *C. canadensis*, mientras que los mecanismos NTSR y TSR contribuyen a la resistencia en *C. sumatrensis*. Por lo tanto, podemos ver que *Conyza* spp. puede desarrollar diferentes mecanismos de resistencia, lo que la hace una mala hierba potencialmente peligrosa.

A diferencia de otras especies, las del género *Conyza* producen una gran cantidad de semillas que son fácilmente dispersadas por el viento (Shields et al., 2006), y colonizan rápidamente los campos de cultivos, los márgenes de carreteras y las zonas urbanas exclusivamente mediante la propagación de semillas (Khan et al., 2013). Asimismo, Shields et al. (2006) describió que las semillas de *Conyza* spp. pueden alcanzar alturas superiores a 141 m sobre el nivel del suelo y recorrer distancias de hasta 500 km con la ayuda del viento. Por lo tanto, la altura y la distancia de dispersión de su semilla aumentan el potencial de transferencia de resistencia.

En nuestro estudio “Selección de resistencia a glifosato en *Conyza* spp en la red ferroviaria del sur de España”, se ha demostrado que incluso en las vías ferroviarias se puede encontrar *Conyza* spp. resistente a glifosato. Esto puede llevar a dos consecuencias limitantes. En primer lugar, las plantas de *Conyza* spp. pueden ocasionar problemas durante el tránsito de los trenes. En segunda instancia, por las características de sus semillas, éstas pueden dispersarse hacia campos de cultivo colindantes y dar lugar a una reducción en el rendimiento de la producción de los agricultores.

Asimismo, en nuestro estudio de *Conyza* spp. en vías urbanas se encontró biotipos que lograron sobrevivir a la dosis de glifosato recomendada por el fabricante.

Esto lleva a buscar una solución que pueda controlar la dispersión de la resistencia de *Conyza* spp. a glifosato mediante el uso de otras herramientas. Aquí entra de lleno el control integrado de malas hierbas (CIM).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio “Mecanismos de resistencia a glifosato y respuesta al control con herbicidas alternativos en poblaciones de las tres especies de *Conyza* introducidas en el sur de España” sugieren que el problema de resistencia para esta mala hierba se puede resolver a través del CIM. Se pudo comprobar que el uso, en todos los campos, de flazasulfuron + glifosato y iodosulfuron + diflufenican + glifosato resultaron en el mejor control de las poblaciones resistentes tanto a nivel de reducción de biomasa como reducción de la producción de semillas.

VIII.2. Discusión de los estudios de *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp. (Capítulos 3, 4, 5 y 6)

El arroz es uno de los principales cultivos a nivel mundial. En España, Extremadura es la segunda comunidad autónoma con más producción de arroz después de Andalucía (MAPAMA, 2018). El control de las malas hierbas en el cultivo es un tema que preocupa a los agricultores, siendo para ello su principal y más eficaz herramienta los herbicidas (Romano García et al., 2017).

Osuna et al. (2012) destaca *Echinochloa* spp., *Leptochloa* spp., *Oryza sativa* var., *Cyperus* spp. como las principales malas hierbas en la producción de arroz a nivel nacional. Dentro de la Comunidad Autónoma de Extremadura, Romano García et al. (2017) resalta a *Leptochloa* spp. y *Echinochloa* spp. como los géneros que más problemas generan a los agricultores de la región y que pueden desarrollar resistencias a herbicidas.

En el estudio “Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campana 2017)” analizamos la dificultad en el control de malas hierbas en este cultivo. El problema radica en que hay, principalmente, herbicidas pertenecientes a dos modos de acción (inhibidores ALS e inhibidores de la ACCasa) para combatir las especies de malas hierbas del arroz. El uso repetido y continuado puede dar lugar a malas hierbas resistentes y su propagación.

El control químico es más efectivo cuanto más pequeño sea el estado de desarrollo de la planta. En este sentido, hay especies de un mismo género que tienen diferente tolerancia a un mismo herbicida. Asimismo, la similitud morfológica de las especies de un mismo género es muy grande. En nuestro trabajo “Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura: *Echinochloa* spp. y *Leptochloa* spp.” utilizamos los marcadores moleculares para discernir las especies de *Echinochloa* y *Leptochloa* utilizando las técnicas PCR-RFLP y AFLP, respectivamente.

Es cada vez más habitual que los agricultores informen sobre fallos de control con herbicidas en sus campos de arroz. Desde los centros de investigación debemos analizar si esos avisos se deben a resistencias a herbicidas o a un mal uso de los mismos. Los trabajos realizados “Distribution and characterisation of target-site resistance to ALS and ACCase-inhibiting herbicides in *Echinochloa* spp. from Spanish rice fields” y “Caracterización de la resistencia a inhibidores de

la acetolactato sintasa (ALS) y a inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) en *Leptochloa* spp. de arrozales de Extremadura” abordamos esta situación.

En primer lugar, se debe hacer una prospección por los lugares donde los agricultores indican la ineficacia de los herbicidas. En segundo lugar, una caracterización de las muestras recogidas y, por último, analizar las secuencias de los genes de la ALS y ACCase en busca de mutaciones y su respuesta a los herbicidas.

Los resultados que arrojan estos estudios confirmaron poblaciones con mutaciones dependientes del sitio de acción, tanto en el gen de la ALS, como en el gen de la ACCase. Las sustituciones de amino ácidos más frecuentes fueron Pro197Ser en el gen de la ALS y Ile1781 en el gen de la ACCase. La respuesta de las poblaciones con mutación Pro197Ser fue de gran resistencia a las cuatro familias de los inhibidores de ALS ensayados (imidazolinonas, pirimidiniltiobenzoatos, sulfonilaminocarbonil triazolinonas, sulfonilureas y triazolopirimidinas). Del mismo modo, las poblaciones con mutación Ile1781 mostraron ser resistentes a las dos familias de los inhibidores de la ACCase ensayadas (Ariloxifenoxi propiónicos y ciclohexanodionas). En el resto de las poblaciones no se encontraron mutaciones dependientes del sitio de acción, pero estudios de metabolismo serán realizados para ver si hay casos de mecanismos independientes del sitio de acción como describe Iwakami et al. (2015).

Como se refleja en los trabajos realizados, el problema de la resistencia es cada vez mayor y será más acusado en un futuro debido a la falta de materias activas autorizadas de distintos modos de acción. Por ello, hay que buscar alternativas que intenten combatir estas malas hierbas resistentes y su propagación. Un recurso ya utilizado desde la campaña 2017, como se refleja en el trabajo “Problemática de las malas hierbas en el cultivo del arroz en Extremadura (campaña 2017)”, es la siembra en seco. La producción de arroz por esta técnica ascendió a 30-35% en 2017. Esto permite que las condiciones de agua no estén disponibles para las malas hierbas y que sean un condicionante para la proliferación de las malas hierbas en el cultivo del arroz. Por lo tanto, sería importante que los agricultores llevaran a cabo controles integrados de malas hierbas (CIM) que combinaran herramientas químicas y no químicas.



IX. CONCLUSIONES GENERALES



IX. Conclusiones Generales

PRIMERA. Poblaciones de *Conyza* spp. provenientes de muestreos realizados en campos de cultivo leñosos, especialmente frutícolas (ciruelos, melocotoneros y nectarinas principalmente) y olivar han mostrado diferentes respuestas a los herbicidas ensayados. El más efectivo fue glufosinato y la pendimentalina no redujo apenas el crecimiento de las poblaciones. La tónica general fue que, a menor desarrollo de la planta, mayor efectividad del herbicida.

SEGUNDA. Se han detectado poblaciones de *Conyza* spp. en zonas urbanas de Badajoz, predominando la especie *C. bonariensis* frente a *C. canadensis* y *C. sumatrensis* encontrando dos de las 46 poblaciones recogidas resistentes a la dosis comercial de glifosato.

TERCERA. Estudios realizados en poblaciones de *Conyza* spp., provenientes de campos de cítricos y olivares, donde se sospechaba resistencia, han mostrado que los mecanismos resistentes independientes del sitio de acción (NTSR) explican la resistencia en *C. bonariensis* y *C. canadensis*, mientras que los mecanismos NTSR y los dependientes del sitio de acción (TSR) contribuyen a la resistencia en *C. sumatrensis*. Los resultados obtenidos en las pruebas de campo sugieren que el problema de resistencia se puede resolver a través del control integrado de malas hierbas mediante un uso combinado de materias con diferente modo de acción: flazasulfuron + glifosato y iodosulfuron + diflufenican + glifosato.

CUARTA. En los estudios de resistencia a glifosato de poblaciones de *Conyza* spp. recogidas en las vías del tren de Andalucía se determinó que, entre todas las poblaciones de *C. canadensis* recolectadas, el 18.2% era resistente al glifosato, el 45.5% mostró tendencia a desarrollar resistencia y el 36.4% fue susceptible. El 25% de las poblaciones de *Conyza bonariensis* tenía resistencia al glifosato, el 16,7% tenía una resistencia moderada y el 58,3% era susceptible. Por lo tanto, se comprobó que ya existen *Conyza* spp. resistentes a glifosato a lo largo de la red ferroviaria del sur de España. Esto podría llevar a un posible intercambio de semillas entre las vías ferroviarias y los lugares adyacentes.

QUINTA. La técnica PCR-RFLP fue válida para clasificar molecularmente las especies de *Echinochloa* en 3 grupos: *E. oryzicola*/*E. oryzoides*, *E. crus-galli*/*E. hispidula* y *E. colona*.

Asimismo, marcadores tipo AFLP permitieron diferenciar las dos especies de *Leptochloa* presentes en Extremadura: *L. fascicularis* y *L. uninervia*.

SEXTA. Se ha confirmado resistencia a inhibidores de la ALS y de la ACCasa en poblaciones de *Echinochloa* spp. recogidas en campos de arroz de Extremadura, debidas a mutacion en el sitio de acción. Las mutaciones más frecuentes fueron Pro197Ser en el gen de la ALS, dando resistencia cruzada a las diferentes familias químicas y Ile1781Leu en el gen de la ACCasa dando resistencia a herbicidas de las familias Ariloxifenoxi propiónicos y ciclohexanodionas.

SEPTIMA. Se han confirmado, por primera vez en Extremadura, resistencia a inhibidores de la ALS y de la ACCasa en poblaciones de *Leptochloa*. Las mutaciones encontradas son Pro197Ser en el gen de la ALS y Ile1781 en el gen de la ACCasa. Además, la caracterización molecular supone una identificación precoz de las especies de *Leptochloa* en Extremadura para poder realizar tratamientos lo antes posible.

OCTAVA. Se aconseja un control integrado de las malas hierbas combinando control químico y con control no químico. Además, se deben utilizar prácticas que retrasen la evolución de la resistencia. En el caso de *Conyza* spp. se recomienda laboreo, siegas repetidas, rotación de cultivos, cubiertas vegetales, evitar la dispersión de semillas y alternar o mezclar materias activas perteneciente a diferentes grupos según su modo de acción adicionando aceites para mejorar la actividad herbicida. Para malas hierbas del arroz se recomienda laboreo, retraso de la siembra, rotación de cultivos, empleo del barbecho, evitar la dispersión de semillas, emplear densidades de siembra adecuada, realizar una adecuada nivelación del terreno y tratamientos herbicidas en estado fenológico adecuado y con diferentes grupos según su modo de acción.

IX. General Conclusions

FIRST. *Conyza* spp. populations obtained in samplings performed in woody crop fields, especially fruit crops (plum, peach and nectarine, principally), and olive plantations showed different responses to the tested herbicides. The most effective was glufosinate, while pendimethalin barely reduced the growth of the populations. The general trend was for greater herbicide efficacy at lower growth stages.

SECOND. Populations of *Conyza* spp. were detected in urban areas of Badajoz province, far more so in the case of the species *C. bonariensis* compared to *C. canadensis* and *C. sumatrensis*. Two of the 46 populations collected were found to be resistant to glyphosate at commercial doses.

THIRD. Studies undertaken on populations of *Conyza* spp., from different citrus and olive plantations where resistance was suspected, showed that mechanisms of non-target site resistance (NTSR) explain resistance in *C. bonariensis* and *C. canadensis*, and that mechanisms of both target-site resistance (TSR) and NTSR contribute to resistance in *C. sumatrensis*. The results obtained in field trials suggest that the problem of resistance can be resolved through integrated weed control employing a combination of materials with different modes of action: flazasulfuron + glyphosate and iodosulfuron + diflufenican + glyphosate.

FOURTH. In the studies of resistance to glyphosate on *Conyza* spp. populations collected along railway tracks in Andalusia, it was found that 18.2% of all the collected populations of *C. canadensis* were resistant to glyphosate, 45.5% showed a tendency to develop resistance and 36.4% displayed susceptibility to resistance. With respect to *Conyza bonariensis* populations, 25% were resistant to glyphosate, 16.7% showed moderate resistance and 58.3% displayed susceptibility to resistance. It is therefore shown that glyphosate-resistant *Conyza* spp. are already established throughout the railway network of southern Spain. This could lead to a possible transfer of seeds from the railway tracks to nearby sites.

FIFTH. The PCR-RFLP technique was valid for molecular classification of *Echinochloa* species in three groups: *E. oryzicola*/*E. oryzoides*, *E. cruss-galli*/*E. hispidula* and *E. colona*. Likewise, AFLP-type markers enabled differentiation of the two *Leptochloa* species present in Extremadura: *L. fascicularis* and *L. uninervia*.

SIXTH. Resistance to ALS and ACCase inhibitors was confirmed in populations of *Echinochloa* spp. collected in rice fields in Extremadura. The resistance found was due to mutations at the site of action. The most common mutations were Pro197Ser in the ALS gene, giving rise to cross resistance to different chemical families, and Ile1781Leu in the ACCase gene, conferring resistance to herbicides of the aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione families.

SEVENTH. For the first time in Extremadura, resistance to ALS and ACCase inhibitors is confirmed in populations of *Leptochloa*. The mutations found are Pro197Ser in the ALS gene and Ile1781 in the ACCase gene. In addition, the molecular characterization led to an early identification of *Leptochloa* species in Extremadura. This will allow to decide the treatments as soon as possible.

EIGHTH. Integrated weed control is recommended, combining both chemical and non-chemical control methods. Practices should be used which delay the evolution of resistance. In the case of *Conyza* spp. the employment is recommended of tilling, repeated roguing, crop rotation, vegetation cover, seed dispersal avoidance techniques, and the alternation or mixture of active materials pertaining to different groups according to their mode of action with the addition of oils to improve herbicide activity. For rice crop weeds, the employment is recommended of tilling, delaying seeding, crop rotation, fallow techniques, seed dispersal avoidance, appropriate seeding densities, land levelling, and herbicide treatments at the appropriate phenological stage and with different groups according to their mode of action.