

UN SISTEMA DE DETECCIÓN *IN VITRO* DE BIOTIPOS RESISTENTES DE *Cyperus difformis* L. A SULFONILUREAS

M. León, D. Maestre, J. Aibar¹, C. Zaragoza

Unidad de Sanidad Vegetal del Servicio de Investigación Agroalimentaria.

¹Escuela Politécnica Superior de Huesca. Ctra Cuarte s/n 22.071 Huesca.
jaibar@posta.unizar.es

Resumen: Se ha puesto a punto un sistema para detectar resistencias a sulfonilureas empleando tres poblaciones de *Cyperus difformis* L. (Aragón, Inglaterra y Uruguay), consistente en la germinación y el desarrollo de las plántulas en placa Petri en medio acuoso y con diferentes concentraciones de herbicida. Al cabo de 15 días se observa el estado de las plántulas y la longitud de sus raíces. Los resultados se comprobaron mediante pulverización de precisión sobre plántulas en condiciones controladas. Una población de Uruguay resultó sensible a todas las dosis de metil-bensulfuron y cinosulfuron, mientras que las otras dos poblaciones resultaron ser resistentes al primero y, en menor grado, a cinosulfuron.

Palabras clave: Arroz, bensulfuron, cinosulfuron, resistencia herbicida

INTRODUCCIÓN

Cyperus difformis L. es una de las 10 malas hierbas más importantes del mundo (HOLM *et al.* 1977) siendo la especie más abundante del banco de semillas junto con *Elatine gratioloides*, seguidas de *Echinochloa crus-galli*, en los arrozales a nivel mundial. Esta Ciperácea anual se encuentra muy extendida en todas las zonas arroceras españolas, siendo especialmente importante en Andalucía, Badajoz, y en los arrozales del valle del Ebro. Comúnmente es llamada “juncia”, “punta d'espasa”, “tinya”, “jonça”, “marjalita”, “buriol”, “cabeçuda”, “castanyola”...

En los últimos años, se han detectado ecotipos de esta especie resistentes a las sulfonilureas en arrozales de California (1993), Australia (1994), Brasil (2000), Italia (2001) y Corea del Sur (2002) (HEAP, 2003). En España está citado en 2000 un biotipo resistente a bensulfuron en un lugar no determinado, y recientemente se ha encontrado un biotipo de *C. difformis* resistente a este producto en Badajoz (J. BAKKALI, com. pers.). Algunos distribuidores de productos fitosanitarios en Huesca han recibido quejas por la falta de control de esta especie con herbicidas sulfonilureas que antes la

eliminaban. En este trabajo se pretende poner a punto un test rápido y sencillo para la detección de resistencias de biotipos de *C. difformis* a algunas sulfonilureas.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se pretende analizar una posible resistencia de las semillas de *C. difformis* a los herbicidas bensulfuron-metil (alfa-((4,6-dimetoxipirimidin-2-ilo)ureidosulfonilo)-0-toluato de metilo) y cinosulfuron (-((4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-ilo)-1-(2-(metoxi-etoxi)fenisulfonilo) urea)). Para ello, se ha realizado una prueba con poblaciones distintas de semillas de *C. difformis*.

Se utilizaron tres ecotipos de esta especie:

Población A: semillas procedentes de una parcela de arrozales de Aragón (sospechosas de resistencia).

Población I: semillas adquiridas en la empresa Herbiseed de UK.

Población U: semillas procedentes de campos de arroz del INIA de Treinta y tres (Uruguay). Se trata de campos ocasionalmente tratados con sulfonilureas. Encontrar semillas de campos no tratados entraña grandes dificultades.

a) Ensayos "in vitro".

Los tres ecotipos fueron germinados en placas Petri con agua destilada, selladas con Parafilm y mantenidas durante 5 días en una cámara de cultivo con las siguientes condiciones: Temperatura constante de 26,5 °C., fotoperiodo: 16 h de luz / 8 h de oscuridad e intensidad de luz (medida con ceptómetro): 206 micromol CO₂ m⁻² s⁻¹

Cada placa de Petri tenía 30 semillas que germinaron transcurridos 5 días. Entonces se les puso un papel de filtro en la base y, una vez aplicado la correspondiente dosis de herbicida se sellaron con Parafilm a fin de evitar la evaporación. A todas las placas se les añadió inicialmente 5 ml de agua destilada (para conseguir la pregerminación, ya que son semillas que germinan en suelo inundado (Cox, 1984)) y posteriormente el herbicida que se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos aplicados a las semillas de *C. difformis*.

Nº	Agua destilada	Bensulfuron (280 mg/l)	Cinosulfuron (1000 mg/l)	Dosis teóricas en campo (kg/ha)
1 (testigo)	15 ml			
2	5 ml	5 ml		70
3	5 ml	10 ml		93
4	5 ml	20 ml		112
5	5 ml		5 ml	250
6	5 ml		10 ml	333
7	5 ml		20 ml	400

Las dosis teóricas en el campo, si aplicáramos las dosis de los tratamientos de las placas Petri, serían mucho mayores que las recomendadas, de forma que si nuestras semillas sobreviven no habría duda de la existencia de una resistencia (PRATLEY *et al.*, 2001). Se hicieron 2 ó 3 repeticiones de cada tratamiento, dependiendo del número de semillas pregerminadas disponibles. Una vez preparadas todas las placas se llevaron a la cámara de cultivo, con las mismas condiciones que para la germinación.

Transcurridos 15 días se valoraron visualmente atendiendo a dos criterios: el aspecto general de la planta y/o los daños producidos y la longitud de su raíz. Para ello se ha empleado la siguiente tabla, con puntuaciones de 0 a 5 para cada una de las observaciones. Se realizaron 6 ensayos de los que se presentan sólo los resultados del último.

Tabla 2. Escala utilizada para evaluar la fitotoxicidad y desarrollo de la raíz.

Aspecto/ daño producido	Longitud de la raíz
5 Verdes y sanas	Todas las plántulas de la placa ≥ 10 mm
4 Ligera decoloración o depresión	Mayoría (más del 50%) ≥ 10 mm
3 Apreciable decoloración o depresión	Mayoría entre 5-10 mm
2 Decoloración y aspecto débil (retorcimiento). Posible recuperación	Mayoría entre 2-5 mm y alguna > 5 mm
1 Daños importantes (recuperación muy dudosa). Solo alguna superviviente o sin daños.	Mayoría ≤ 2 mm
0 Todas muy dañadas o muertas.	Sin crecimiento ó muertas

b) Comprobación “in vivo”.

Para comprobar los resultados “in vitro” con la realidad se sembraron los mismos ecotipos en macetas y se trataron con 170 g.ha⁻¹ de bensulfuron metil (Londax 60 de DuPont , dosis recomendada 80-100 g p.c./ha) y 1000 g.ha⁻¹ de cinosulfuron (Setoff 20 WG de Syngenta, dosis recomendada 400-500 g p.c.ha⁻¹) con un pulverizador fijo de precisión (volumen 685 l.ha⁻¹, boquillas Tjet 11003, presión 2 bar) cuando las plántulas tenían 2-3 hojas. Estas se dejaron crecer en las condiciones controladas descritas y se valoró la fitotoxicidad a los 15 días, así como el peso seco y el rebrote (datos no presentados)

Los datos obtenidos se han estudiado con el programa de estadística SYSTAT 7.0.

RESULTADOS

a) Ensayos “in vitro”:

En la figura 1 se pueden observar dos cuadros, uno en el que se muestran los resultados de la evaluación del aspecto de las plantas y otro que muestra los resultados de la medición de la raíz en esas mismas plántulas.

En las semillas pertenecientes a la población de Aragón se puede observar que el tratamiento con bensulfuron no ha sido efectivo en el control de la mala hierba mientras que cinosulfuron ha conseguido decolorar la planta dándole un aspecto débil pero con una posible recuperación incluso con niveles muy altos de herbicida. Las semillas de *C. difformis* pertenecientes a una población de Inglaterra también muestran una clara resistencia al bensulfuron, sin embargo a la dosis de tratamiento más elevada con cinosulfuron se paraliza el crecimiento de las raíces y se registran daños importantes en la planta. La población procedente de Uruguay se mostró sensible a ambos herbicidas, tanto desde el punto vista de su aspecto como de la longitud de la raíz de las plántulas.

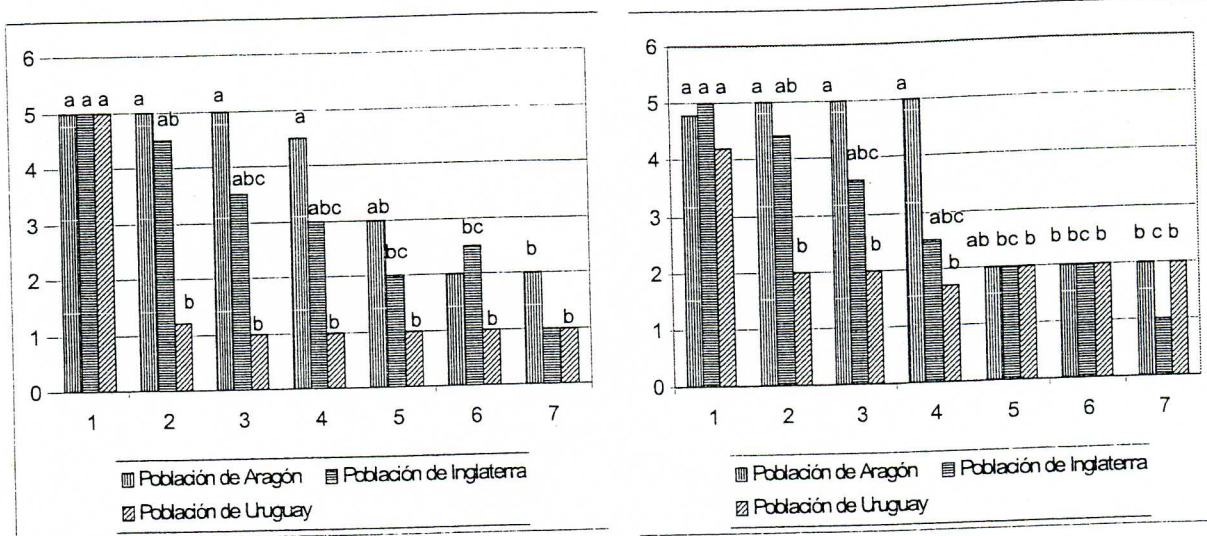


Figura 1. Evaluación del aspecto de las plantas (izda) y de la longitud de sus raíces (dcha). Para cada una de las poblaciones, columnas con letras iguales no difieren significativamente en el test de Tukey ($p < 0,05$).

b) Ensayo "in vivo":

Se ha comprobado la fitotoxicidad de estos herbicidas sobre plantas tratadas con pulverizador y los resultados de fitotoxicidad se presentan en la figura 2.

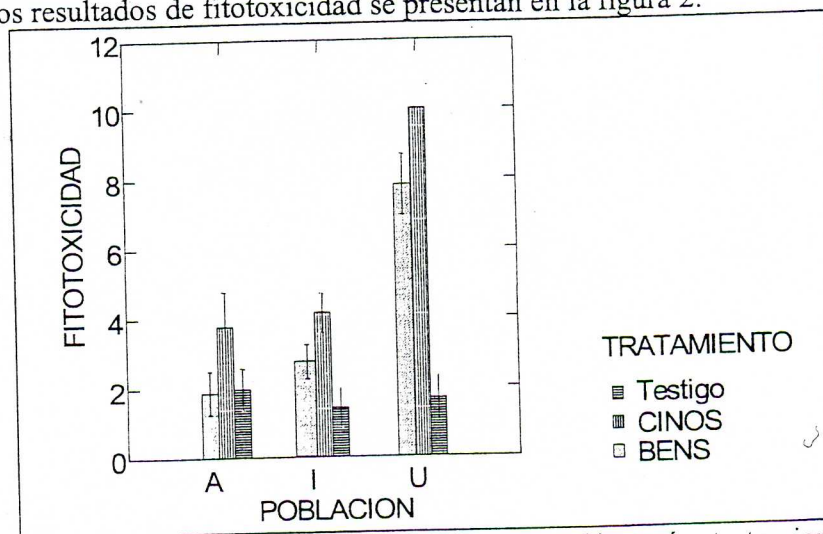


Figura 2. Fitotoxicidad observada en plantas (2-4 h) según tratamiento con pulverizador (cinosulfurón 1000 g ha^{-1} , bensulfurón 170 g ha^{-1}). Medias de 3 ensayos.

CONCLUSIONES

La población de Aragón resultó resistente al herbicida bensulfuron sin mostrar síntoma alguno de afección. En cuanto al herbicida cinosulfuron, se produjeron daños y decoloración en la planta, además de una parada en el crecimiento de las raíces, pero estos daños no fueron suficientes como para matar la mala hierba. La población de Inglaterra se mostró resistente al herbicida bensulfuron, aunque se observaron daños

mayores que los que se produjeron en la población de Aragón. Esta población se mostró sensible al cinosulfuron. La población utilizada como testigo, procedente de Uruguay, resultó sensible a ambos herbicidas.

El método de detección de la resistencia es muy útil, en especial porque las semillas de *C. difformis* no tuvieron problemas para germinar y no se debieron aplicar métodos para romper su latencia. El test es razonablemente fiable si lo comparamos con los tratamientos de precisión sobre plántulas que crecen en condiciones controladas. Es interesante ver que algunas poblaciones procedentes de campos donde se han realizado numerosos tratamientos con sulfonilureas y otros herbicidas han generado una resistencia manifiesta en pocos años, así como hay otras poblaciones de tolerancia intermedia y otras sensibles, donde apenas se ha tratado y se realiza una rotación más acertada, como en los arrozales de Uruguay, donde se alterna con pastos naturales.

Agradecimientos

El Ingeniero Enrique Deambrosi del INIA de Treinta y tres (Uruguay) que amablemente nos envió las semillas del biotipo sensible. Al Ingeniero Agrónomo Facundo Stamatti de Argentina que nos ayudó en la redacción de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- COX, B. (1984). Weeds. Citado por Sanders, B.A. 1994. The life cycle and ecology of *Cyperus difformis* (rice weed) in temperate Australia: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture, 1031-1038.
- CPRH (1999). Detecting Herbicide Resistance. Guidelines for conducting diagnostic test and interpreting results. On line: [http:// www.plantprotection.org/HRAC](http://www.plantprotection.org/HRAC).
- HEAP, I. (2003). Herbicide resistant smallflower umbrella sedge (*Cyperus difformis*). On line: www.weedscience.org/in.asp (12/06/2003)
- HOLM, L.R.G.; PLUCKNETT, D.L.; PANCHO, J.V.; HERBERGER, J.P. (1977). The World Worst Weeds: distribution and biology. The University Press of Hawaii. 600-610.
- PRATLEY, J.E.; BROSTER, G.E.; FLOWER, G.E.; FLOWER, R. (2001). Herbicide resistance in the rice growing regions of Southern Australia. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication N° 01/40. On line: <http://www.rirdc.gov.au/reports/RIC/01-40.pdf>

Summary: An "in vitro" detection system for sulfonilurea resistant biotypes of *Cyperus difformis* L.

A resistant detection test was prepared using three biotypes of *Cyperus difformis* L. from Aragón (Spain), UK and Uruguay. It consists in germination and growth of plantlets in Petri dish in water medium with different herbicide concentrations. After 15 days the plantlet state and its root longitude is evaluated. Results were tested with precision sprayed plantlets grown in controlled conditions. The Uruguay biotype resulted susceptible to all dose applied of bensulfuron-methyl and cinosulfuron while the other biotypes were resistant to bensulfuron and, in a smaller degree, to cinosulfuron.

Key words: rice, bensulfuron, cinosulfuron, herbicide resistance.