

***Echinochloa* spp. en campos de arroz de Aragón y Navarra: Susceptibilidad actual a distintos tratamientos herbicidas en función de la especie y mutación**

IBAÑEZ C¹, GARNICA I², MARÍ AI¹, CIRUJEDA A¹, ROMANO Y³, OSUNA MD³,
PARDO G^{1*}

¹ Unidad de Sanidad Vegetal. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Avda. Montañana , 930

*gpardos@aragon.es

² INTIA (Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias). Aranaz y Vides, 11 bajo. 31500 Tudela (Navarra)

³ Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Guadajira (Badajoz)

Resumen: Plantas de 28 poblaciones de *Echinochloa* spp. de arrozales de Aragón y Navarra fueron tratadas con 6 herbicidas, a dosis estándar, en un ensayo de invernadero diseñado para 7 tratamientos: A) testigo, B) clomazona, preemergencia C) cihalofop, estadio BBCH 11-12, D) imazamox, BBCH 11-12 y 13 y E) penoxulam, F) penoxulam (doble dosis), G) profoxidim en BBCH 13. Por otro lado, utilizando técnicas moleculares, esas mismas poblaciones fueron identificadas a nivel de especie en dos grupos: *crus-galli-hispidula* u *oryzicola-oryzoides*. Asimismo, se analizaron las secuencias de ADN de la ALS y de la ACCasa para ver si presentaban alguna mutación ligada a mecanismos de resistencia. Los resultados mostraron que las 9 poblaciones de Huesca pertenecen al grupo *crus-galli-hispidula* y las 8 de Zaragoza y 11 de Navarra al *oryzicola-oryzoides* y que solo 5 de éste último grupo presentaron mutación, siendo la más frecuente pro/leu 197 con 3 casos en Navarra. Estas tres poblaciones fueron significativamente menos sensibles al imazamox, respecto a las que no mostraron mutación. Clomazona, cihalofop y profoxidim consiguieron significativamente más afecto en poblaciones del grupo *crus-galli-hispidula* e imazamox en el grupo *oryzicola-oryzoides* salvo en las poblaciones con mutación. Penoxsulam, incluso a dosis doble, apenas logró control alguno.

Palabras clave: eficacia, control, malas hierbas, materias activas, resistencia a herbicidas.

1. Introducción

En España, las especies del género *Echinochloa* spp. son las más frecuentes y las que requieren mayor control en cultivo de arroz (Osuna *et al.*, 2012). Su manejo resulta muy complejo porque se trata de especies gramíneas muy similares al cultivo, con gran diversidad genética, germinación escalonada y gran capacidad de ahijamiento (Vidotto, 2013). Además, se sabe que las distintas especies de *Echinochloa* spp. muestran desigual sensibilidad a los herbicidas que se usan en arroz (Salguero *et al.*, 2015; Vidotto *et al.*, 2007) pero sin embargo no existe demasiada información al respecto, entre otros motivos, por la dificultad de identificarlas correctamente.

La mayoría de herbicidas usados para controlar *Echinochloa* spp. en el cultivo del arroz son del grupo A o B (Pardo et al., 2015). Con tan poca variedad de materias activas es fácil que se generen resistencias (Heap, 2019). Tal es así que en España, en zonas de Extremadura, ya se han detectado biotipos resistentes de *Echinochloa* spp. a herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa (Romano et al., 2017). En relación a este tema, se sabe que mutaciones en el ADN de la ALS y de la ACCasa pueden ser responsables de la aparición de fenómenos de resistencia en *Echinochloa* spp. (Romano et al., 2017).

Con todo esto, las quejas sobre la falta de eficacia de los herbicidas y escasez de materias activas sobre *Echinochloa* spp. en campos de arroz cada vez son más frecuentes en Aragón, (Susana Hernández y M^a Carmelo García, com. pers.) por lo que es necesario evaluar la eficacia de tratamientos herbicidas con las poblaciones actuales.

En el presente trabajo se analiza la eficacia de distintos tratamientos herbicidas sobre poblaciones de *Echinochloa* spp. recogidas en campos de Aragón y Navarra relacionándolas con el grupo de especie a que pertenecen y con la presencia o no de diversas mutaciones en su ADN asociadas al fenómeno de resistencia.

2. Material y Métodos

Como material vegetal se utilizó semillas de 28 poblaciones de *Echinochloa* spp. recogidas en octubre de 2017 en campos de arroz de Aragón y Navarra, y que por tanto habían sobrevivido a los tratamientos que los agricultores habían efectuado durante la campaña. En concreto 9 poblaciones provinieron de la provincia de Huesca, 8 de la de Zaragoza y 11 de Navarra. Una muestra de cada población se envió al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX) para su identificación a nivel grupo de especie (*crus-galli-hispidula* u *oryzicola-oryzoides*) por métodos moleculares. Asimismo, se analizaron las secuencias de ADN de la ALS y de la ACCasa para estudiar si presentaban alguna mutación ligada a mecanismos de resistencia. La técnica utilizada para ambos objetivos se describe en Romano et al. (2017).

El ensayo se desarrolló en uno de los invernaderos del CITA en julio-agosto de 2018. La refrigeración se programó para que no se superaran los 35°C en ningún momento. La semillas de *Echinochloa* se colocaron en macetas de plástico de 7 x 7 x 8 cm rellenas previamente con sustrato hortícola (90% materia orgánica, 10% cenizas y 0,2% nitrógeno y 0,1% fósforo) a razón de unas 12-18 semillas de acuerdo a la capacidad germinativa de cada población, evaluada previamente en un ensayo para tal fin. Antes de realizar los tratamientos de postemergencia y en los testigos se realizaron aclareos limitando la densidad a 10 plantas/maceta. Las macetas se colocaron en bandejas, manteniendo una elevada lámina de agua para simular las habituales condiciones de inundación del cultivo de arroz. Los tratamientos (Tabla 1) se realizaron con un equipo de pulverización experimental aplicando cada herbicida con un volumen de caldo de 300 l/ha, usando boquillas Teejet® XR 110 a presión de 2 bar.

El diseño experimental para cada población fue de bloques al azar con 6 repeticiones y los 7 tratamientos descritos en la tabla 1. La parcela elemental fue la maceta con 10 plantas de *Echinochloa*. Los parámetros evaluados al finalizar el ensayo fueron: eficacia a los 28 días después de los últimos tratamientos (42DDS) calculada como porcentaje de plantas muertas en cada maceta respecto al total (10) y biomasa seca, expresada en porcentaje sobre la del testigo (A). Para el tratamiento de preemergencia (B) la eficacia se calculó en base al nº de plantas emergidas en las macetas testigo (A) antes de realizar el aclareo descrito.

Tabla 1: Características de los tratamientos efectuados

Tratamiento	Nombre comercial	Ingrediente activo (%)	Dosis producto (l/ha)	Fenología <i>Echinochloa</i> (BBCH)	DDS
A	-	-	-	-	-
B	Command	clomazona (36%)	1,0	0	3
C	Clincher plus	cihalofop-butil (20%)	1,5	11-12	11
D*	Pulsar 40	imazamox (4%)	0,875	11-12	11
			0,875	13	14
E	Viper max	penoxsulam (2,04%)	2	13	14
F	Viper max	penoxsulam (2,04%)	4	13	14
G	Aura	profoxidim (20%)	1	13	14

DDS: días después de la siembra, 6 de julio de 2018. *Se aplicó 2 veces.

Los datos se analizaron en función del grupo de especie (*crus-galli-hispidula* u *oryzicola-oryzoides*) una vez identificada cada población, para ver el efecto de los tratamientos en ambos grupos. Asimismo, dentro de cada grupo de especie se comparó, por separado, la eficacia de cada tratamiento en poblaciones que presentaban mutación en las secuencias de ADN de la ALS o de la ACCasa frente a las que no tenían mutación.

Como con las habituales transformaciones usadas en malherbología no fue posible normalizar los datos se optó por realizar una estadística descriptiva representándolos en gráficos de cajas y bigotes o *boxplot*. En ellos, aparte de mostrar su información intrínseca (mediana, cuartiles, límite superior e inferior y datos atípicos) se añadió la media aritmética. Estos gráficos se realizaron con ayuda del software R (R Core Team, 2014).

3. Resultados y discusión

En cuanto a la identificación por grupo de especie, éstas, estuvieron totalmente condicionadas por la ubicación. Así, las 9 poblaciones de Huesca pertenecen al grupo *crus-galli-hispidula* (Cg/h) mientras que las 8 de Zaragoza y 11 de Navarra al *oryzicola-oryzoides* (O/o). Esto puede tener cierta lógica, ya que las zonas arroceras de Huesca son más recientes y en zonas nuevas de cultivo de arroz la especie predominante es *E. crus-galli*, menos adaptada a las inundaciones y probablemente más sensible a la mayoría de herbicidas que se aplican en arroz. Las otras especies se adaptan mejor y en zonas más viejas de cultivo de arroz, como las navarras y las de Zaragoza, acaban predominando. En cinco poblaciones se detectaron mutaciones, siendo la más frecuente pro/leu 197 con 3 casos en Navarra y 2 pro/ser 197 con un caso en Zaragoza y otro en Navarra. Estas mutaciones pueden explicar la falta de eficacia de algunos tratamientos por ser responsables de los denominados mecanismos de resistencia “target-site”. No obstante, puede haber mutaciones distintas a las analizadas en este trabajo asociadas a la resistencia o también que la resistencia sea de otro tipo, como metabolismo o transporte, etc. que no se han estudiado por ahora.

En relación a la eficacia en el control, hay que señalar que generalmente fue muy baja prácticamente en todos los casos (figura 1). Este hecho sugiere que la falta de eficacia observada en campo no se debe, normalmente, a fallos de aplicación. Hay que tener en cuenta que, si un tratamiento no funciona en condiciones controladas, con planta pequeña y equipo preciso, todavía menos lo hará en condiciones de campo con plantas más heterogéneas, algunas más desarrolladas y endurecidas y aplicaciones en peores condiciones. Aunque sería recomendable llevar a cabo ensayos más específicos para confirmar y cuantificar la resistencia, todo indica que nos encontramos ante casos, cuando

menos, muy problemáticos. El caso más extremo es el penoxsulam que incluso al doble dosis de la recomendada (tratamiento F) apenas consigue un 10 % de eficacia en el mejor de los casos (grupo *oryzicola-oryzoides*). En la dosis estándar (tratamiento E) incluso parece manifestarse un proceso de hormesis, pues en muchos casos la biomasa es mayor que en el testigo.

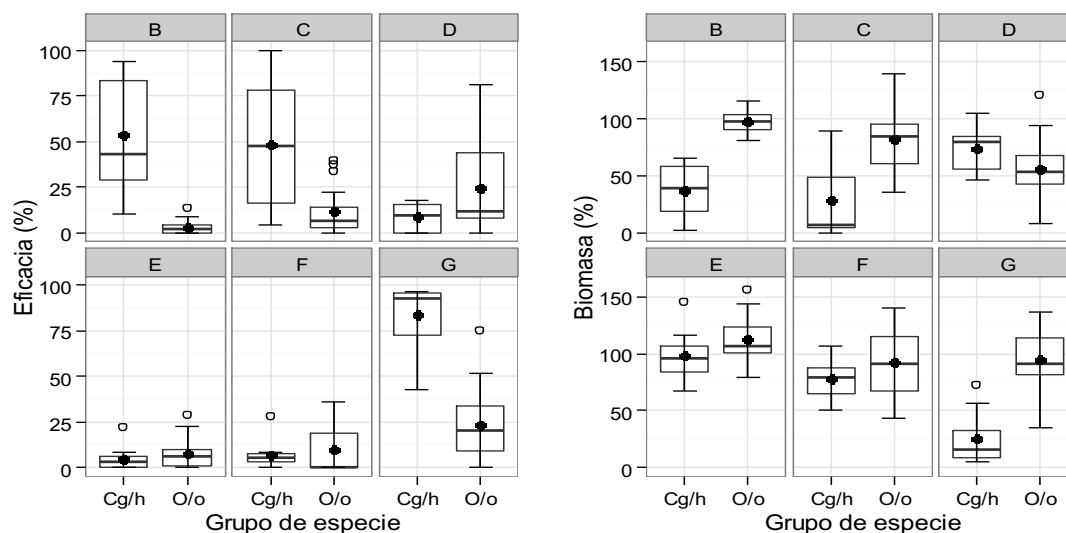


Figura 1: Resultados de eficacia (izquierda) y biomasa, en % sobre testigo (derecha) según tratamiento (B: clomazona, C: cihalofop-butil, D: imazamox, E: penoxsulam, F: penoxsulam (doble) G: profoxidim) y grupo de especie de *Echinochloa* (Cg/h: *crus-galli/hispidula*, 9 poblaciones, O/o: *Oryzicola/oryzoides*, 19 poblaciones).

Sí se ha observado, no obstante, que la eficacia de algunas materias activas varía notablemente según al grupo de especie a que pertenece. Así, clomazona (B), cihalofop (C) y profoxidim (G) consiguieron significativamente mayor eficacia en poblaciones del grupo *crus-galli-hispidula* tanto en eficacia como en biomasa (figura 1) El resultado está en la línea de lo que afirma Taberner (2006) para cihalofop y profoxidim, mientras que para clomazona, Coria (2017) encontró algo parecido en alguno de sus ensayos. Imazamox (D), por el contrario, fue más efectivo en el grupo *oryzicola-oryzoides* salvo en las 3 poblaciones con mutación pro/leu 197 del gen de la ALS, en las que no consiguió efecto alguno (figura 2). Esto confirmaría un mecanismo *target-site* en estas tres poblaciones. Del mismo modo, dichas poblaciones también empeoraron los ya de por sí malos resultados del penoxsulam (trat E y F). Sin embargo, hubo otras dos poblaciones con mutación pro/ser 197 que no tuvieron un comportamiento peor que el resto de poblaciones (figura 2).

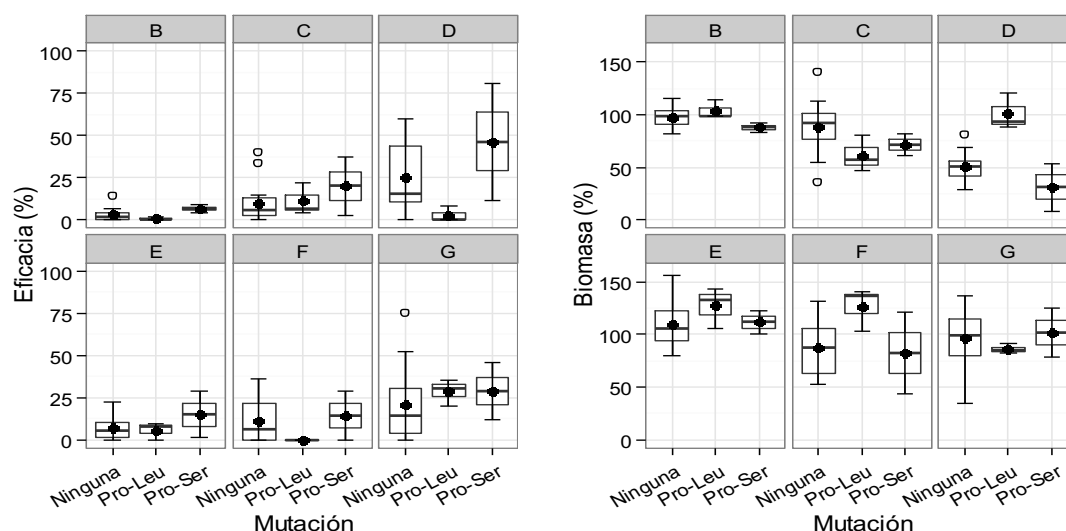


Figura 2: Resultados de eficacia (izquierda) y biomasa en % sobre testigo (derecha) en poblaciones de *Echinochloa*, grupo *Oryzicola/oryzoides* según tratamiento: (**B**: clomazona, **C**: cihalofop-butil, **D**: imazamox, **E**: penoxsulam **F**: penoxsulam (doble) **G**: profoxidim) y tipo de mutación: (**Ninguna**, 13 poblaciones, **Pro-Leu**: prolina-leucina 197, 3 poblaciones, **Pro-Ser**: prolina-serina 197, 2 poblaciones)

En resumen, los resultados indican (i) que el control de *Echinochloa* con las materias activas probadas en este trabajo está seriamente comprometido en muchas zonas de cultivo arroz de Aragón y Navarra, siendo los indicios de aparición de resistencia muy altos, sobre todo para el herbicida penoxsulam. (ii) que las especies del grupo *crus-galli-hispidula* son más susceptibles a clomazona, cihalofop y profoxidim, mientras que las del grupo *oryzicola-oryzoides* lo son al imazamox. (iii) que la mutación pro-leu 197 sería responsable de aumentar la insensibilidad del imazamox a poblaciones del grupo *oryzicola-oryzoides*.

Agradecimientos

Al proyecto RTA2014-0333-C03-03, la financiación. A Susana Hernández y M^a Carmelo García Floria, la localización de las parcelas, a Cristina Prado y Ester Armero, la toma de datos y a José Ángel Alins y Fernando Arrieta la aplicación de los herbicidas.

Referencias

- CORIA S (2017) Respuesta de diferentes biotipos de *Echinochloa* spp. a los herbicidas clomazona, pendimetalina y penoxsulam. Trabajo Fin de Master. Universitat Politecnica de Valencia, 24pp.
- HEAP I (2019) The international survey of herbicide resistant weeds. Online. Internet. Available www.weedscience.com
- OSUNA MD, ROMANO Y & QUILES JM (2012) Principales malas hierbas y métodos de control en el cultivo de arroz en España. *Vida Rural*, 339: 74-77
- PARDO G, MARÍA, FERNÁNDEZ-CAVADA S, GARCÍA-FLORIA C, HERNÁNDEZ S, ZARAGOZA C & CIRUJEDA A (2015) Alternativas al penoxsulam para control de *Echinochloa* spp. y ciperáceas en cultivo de arroz en el nordeste de España. *ITEA*, vol. 111 (4), pp. 295-309
- ROMANO, Y, MENDOZA F, PALMERÍN JA, QUILES JM, AMARO I, OSUNA MD (2017). Distribución de poblaciones resistentes de *Echinochloa* spp. a herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa

en Extremadura. Actas del XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, 269-273 Pamplona, España.

R CORE TEAM (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

SALGUERO J, ROMANO Y, ÁLVAREZ-BARRIENTOS A, TORRALBO P, ALARCÓN, MV, AMARO-BLANCO I & OSUNA, MD (2015) Identificación de especies de *Echinochloa* spp. en arrozales de Extremadura mediante citometría de flujo. XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología. pp. 451-457.

TABERNER A, (2006) Control de malas hierbas en arroz. Dossier Tecnic 12: 19-24. https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf/DT%2FDT_2006_12_19_24.pdf

VIDOTTO F & FERRERO A (2013) Weed management in Italian Rice. Actas del XIV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, 139-144. Valencia, España.

VIDOTTO F, TESIO F, TABACCHI M & FERRERO A (2007) Herbicide sensitivity of *Echinochloa* spp. accessions in Italian rice fields. *Crop Protection*, **26**: 285-293.

***Echinochloa* spp. in rice fields in Aragon and Navarre: Current susceptibility to different herbicide treatments depending on the species and mutation.**

Summary: Plants from 28 populations of *Echinochloa* spp. provenient from rice fields in Aragon and Navarra were treated with 6 herbicides, at standard doses, in a greenhouse trial designed for 7 treatments: A) Control, B) clomazone in pre-emergence C) cyhalofop-butyl, stage BBCH 11-12 D) imazamox, stage BBCH 11-12 y 13 and E) penoxsulam, F) penoxulam (double dose) G) profoxydim at stage BBCH 13. On the other hand, the same populations were identified at the species level in two groups by using molecular techniques: *crus-galli-hispidula* or *oryzicola-oryzoides*. The ALS and ACCasa DNA sequences were also analyzed in order to seek for mutations linked to resistance mechanisms. The results showed that the 9 populations of Huesca belong to the *crus-galli-hispidula* group while the 8 of Zaragoza and 11 of Navarra to the *oryzicola-oryzoides* and that only 5 of these presented mutation, being the most frequent pro/leu 197 with 3 cases in Navarra and pro/ser 197 the other identified mechanism with one population from Navarra and the other from Zaragoza. The three first populations were significantly less sensitive to imazamox than those that showed no mutation. Clomazone, cyhalofop and profoxydim had significantly more effect on populations of the *crus-galli-hispidula* group and imazamox in the *oryzicola-oryzoides* group except in mutated populations. Penoxsulam, even at double dose, had an effect on very few populations

Keywords: efficacy, weed control, active ingredient, herbicide resistance.