

# EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA ACETIL COENZIMA A CARBOXILASA Y ACETOLACTATO SINTASA Y LA PRESENCIA DE RESISTENCIA EN *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.

## BIOLOGICAL EFFICACY OF THE INHIBITOR HERBICIDES OF ACETYL COENZYME A CARBOXYLASE AND ACETOLACTATE SYNTHASE AND THE PRESENCE OF RESISTANCE IN *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.

Jovany Bolaños-Jiménez<sup>1</sup>, Ebandro Uscanga-Mortera<sup>1\*</sup>, J. Antonio Tafoya-Razo<sup>2</sup>,  
Josué Kohashi-Shibata<sup>1</sup>, Jesús R. Torres-García<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Botánica. Campus Montecillo. Colegio de Posgraduados, 56230. Montecillo, Estado de México. (jovanybolanos@gmail.com; euscanga@colpos.mx; jkohashi@colpos.mx).  
<sup>2</sup>Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. (atafoyarazo@yahoo.com.mx). <sup>3</sup>Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato. Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, Km. 9.6, Irapuato, Guanajuato. CP 36821. (ruben.torres@cinvestav.mx).

### RESUMEN

En Guanajuato, *Echinochloa crus-galli* es la principal maleza en el trigo y se controla con herbicidas inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa (ACCase) y la acetolactato sintetasa (ALS), pero se ha observado un control deficiente. El objetivo de esta investigación fue determinar la efectividad biológica de los herbicidas usados en el trigo y la presencia de resistencia en *E. crus-galli*. El experimento se realizó en dos fases: 1) efectividad biológica y, 2) presencia de resistencia. Para evaluar efectividad biológica, en seis biotipos (un bioensayo por biotipo) se aplicaron clodinafop propargil y pinoxaden, inhibidores de la ACCase, y flucarbazone sódico y mesosulfuron metil+iodosulfuron metil, inhibidores de la ALS, en dosis de 60, 55, 28 y 15 g de a.i. ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Cada herbicida fue un tratamiento más un testigo, y el diseño fue completamente al azar con cuatro repeticiones. Para presencia de resistencia se evaluó el efecto de dosis crecientes de flucarbazone sódico y mesosulfuron metil+iodosulfuron metil en la producción de biomasa seca de los seis biotipos y se calculó el índice de resistencia, y el diseño fue bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Efectividad biológica: la aplicación de los inhibidores de la ACCase en los biotipos mostró un control de 99 % y el peso de biomasa seca fue menor, mientras que la aplicación de los inhibidores de la ALS causó un control de 42 %, excepto en un biotipo que fue 77 % y se consideró como susceptible, y el peso seco de la biomasa en algunos casos fue similar a la del testigo. Presencia de resistencia:

### ABSTRACT

In the state of Guanajuato, Mexico, *Echinochloa crus-galli* is the main weed in wheat and is controlled with inhibitors herbicides of acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) and acetolactate synthetase (ALS), but its control is poor. The objective of this research was to determine the biological efficacy of the herbicides used in wheat and the presence of resistance in *E. crus-galli*. The experiment was carried out in two phases: 1) biological efficacy and, 2) presence of resistance. To evaluate the biological efficacy in six biotypes (one bioassay per biotype) we applied clodinafop propargil and pinoxaden, ACCase inhibitor herbicides, and sodium flucarbazone and mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl, ALS inhibitor herbicides, in doses of 60, 55, 28 and 15 g of a.i. ha<sup>-1</sup>, respectively. Each herbicide was one treatment plus a control, and the design was completely randomized with four replications. Regarding the presence of resistance we evaluated the effect of increasing doses of sodium flucarbazone and mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl on the production of dry biomass of the six biotypes, and calculated the resistance index. A completely randomized blocks design was used with four replications. Biological efficacy: the application of the ACCase inhibitor herbicides in the biotypes showed a control of 99 %, and the weight of dry biomass was lower, while the application of the ALS inhibitors caused a control of 42 %, except in one biotype, which was 77 % and it was considered as susceptible. The dry weight of the biomass in some cases was similar to that of the control. Presence of resistance: the resistance index to mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl was greater than 2.0 in two biotypes, while for sodium flucarbazone the resistance indices

\* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2017. Aprobado: septiembre, 2017..

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 713-723. 2018.

el índice de resistencia a mesosulfuron metil+iodosulfuron metil fue mayor a 2.0 en dos biotipos, mientras que para el flucarbazone sódico los índices de resistencia fueron menores de 1.35. Por lo tanto, se confirmó la resistencia de *E. crus-galli* a mesosulfuron metil+iodosulfuron metil.

**Palabras claves:** *Echinochloa crus-galli*, control-químico, efectividad, resistencia, dosis-respuesta.

## INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los tres cereales de mayor producción en el mundo junto con el maíz y el arroz, y se usa para elaborar productos alimenticios y dietas balanceadas en la ganadería. En 2016, en México, la superficie cosechada de trigo de grano fue 612, 866 ha con una producción de 3, 606, 144 t. Los estados con mayor superficie sembrada en ese año fueron Sonora, Baja California, Sinaloa, Guanajuato y Michoacán (SIAP, 2016).

La producción de trigo es afectada por la interferencia de las malezas que son una de las limitantes principales que disminuyen los rendimientos por unidad de superficie (Ross y Lembi, 2009). Cruz *et al.* (2004) demostraron que cuando las malezas compiten durante todo el ciclo con el trigo, su rendimiento disminuyó 90 %. Dentro del cultivo se presenta una gran variedad de malezas que difieren según la región del país, pero algunas muy agresivas están en la mayoría de las zonas productoras de este cereal. En el estado de Guanajuato, las malezas más importantes en el cultivo de trigo son: de hoja angosta, *Avena fatua* L., *Phalaris minor* Retz., *P. paradoxa* L. y *Echinochloa* spp; y de hoja ancha, *Bidens* spp., *Rhaphanus raphanistrum* L., *Brassica campestris* L., *Helianthus annuus* L., *Brassica nigra* (L.) W.G.J. Koch, *Chenopodium album* L. Bosc ex Moq., *Sonchus oleraceus* L. y *Malva parviflora* L. *Echinochloa crus-galli* se presenta principalmente en el ciclo agrícola de temporal y puede causar pérdidas totales en el rendimiento, si no se realiza un buen control.

Debido al tipo de siembra del trigo, es difícil aplicar un método de control alternativo al uso de herbicidas (Tafoya *et al.*, 2009; Tafoya y Carrillo, 2009). El control químico es práctico, eficiente y relativamente económico, pero el uso reiterado, selecciona poblaciones de malezas resistentes (Powles y Yu, 2010). El

were lower than 1.35. Therefore, the *E. crus-galli* resistance to mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl was confirmed.

**Key words:** *Echinochloa crus-galli*, chemical control, efficacy, resistance, response dose.

## INTRODUCTION

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the three highest production cereals in the world along with corn and rice, and it is used to produce food products and balanced diets in livestock. In 2016, in Mexico, the harvested area of wheat grain was 612, 866 ha with a production of 3, 606, 144 t. The states with the largest area sown that year were Sonora, Baja California, Sinaloa, Guanajuato and Michoacán (SIAP, 2016).

Wheat production is affected by the interference of weeds, which are one of the main limitations that reduce yields per surface unit (Ross and Lembi, 2009). Cruz *et al.* (2004) showed that when weeds competed with wheat throughout the cycle, yield decreased by 90 %. Within the crop there is a great variety of weeds that differ according to the region of the country, but there are some very aggressive in most of the producing areas of this cereal.

In the state of Guanajuato, the most important weeds in the wheat crop are: of narrow leaf, *Avena fatua* L., *Phalaris minor* Retz., *P. paradoxa* L. and *Echinochloa* spp; and of broad leaf, *Bidens* spp., *Rhaphanus raphanistrum* L., *Brassica campestris* L., *Helianthus annuus* L., *Brassica nigra* (L.) W.G.J. Koch, *Chenopodium album* L. Bosc ex Moq., *Sonchus oleraceus* L., and *Malva parviflora* L. *Echinochloa crus-galli* occurs mainly in the rainy season and can cause total losses in yield if no efficient control is carried out.

Due to the type of wheat planting, it is difficult to apply an alternative control method to the use of herbicides (Tafoya *et al.*, 2009; Tafoya and Carrillo, 2009). Chemical control is practical, efficient and relatively inexpensive, but its repeated use leads to a selection of resistant weed populations (Powles and Yu, 2010). The development of resistant populations occurs through the selection pressure imposed by the frequent use of one or more herbicides with the same action mode (Christoffers, 1999, Fischer, 2013), the biological characteristics of the weed, the specificity

desarrollo de poblaciones resistentes ocurre mediante la presión de selección impuesta por el uso frecuente de uno o más herbicidas con el mismo modo de acción (Christoffers, 1999; Fischer, 2013), a las características biológicas de la maleza, especificidad del herbicida, diversidad de los genes de resistencia involucrados y eficiencia del herbicida (Valverde *et al.*, 2000; Cerdeira y Duke, 2006).

Heap (2016) señala que en el mundo hay 47 especies de malezas resistentes a herbicidas inhibidores de la enzima acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) y 159 resistentes a los herbicidas inhibidores de la enzima acetolactate synthase (ALS), en ambos casos se incluyen a especies del género *Echinochloa*. De éstas, 19 biotipos han desarrollado resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS y 17 a herbicidas inhibidores de la ACCase. *Echinochloa crus-galli* es considerada la sexta maleza más resistente a herbicidas después de *Lolium rigidum* Gaud., *Amaranthus palmeri* S. Watson, *Conyza canadensis* (L.) Cronquist, *Avena fatua* y *A. tuberculatus* (Moq.) J.D. Sauer (Heap, 2014).

Mallory-Smith *et al.* (1990) y Devine (1997) mencionan que algunos herbicidas, como los inhibidores de la ACCase, pueden seleccionar biotipos resistentes en una a cinco generaciones. Este limitado número de generaciones se debe a la elevada especificidad del sitio de acción, a la frecuencia alta de mutaciones en el gen nuclear que codifica a la enzima y a la posibilidad de que distintas mutaciones semi dominantes alteren el sitio de acoplamiento del herbicida en la enzima (Gressel, 2002; Tranel y Wright, 2002; Délye, 2005). El aumento rápido de la resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS, se atribuye en parte a la frecuencia alta de mutación natural en el centro de acción de la enzima (Devine y Preston, 2000).

En el estado de Guanajuato el control de *E. crus-galli* ha sido deficiente (apreciación visual del primer autor), lo cual se atribuye al desarrollo de resistencia de esta especie a los herbicidas de uso tradicional en la región, pero no hay evidencia científica. El conocimiento de la presencia de la resistencia es necesario para determinar las acciones en el control de las malezas, las cuales van desde el uso de herbicidas con diferente modo de acción, hasta métodos de control alternativos (mecánico, manual, biológico y legal).

Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue determinar la efectividad biológica de los herbicidas de uso común en el cultivo de trigo y la presencia de

of the herbicide, the diversity of the resistance genes involved and herbicide efficacy (Valverde *et al.*, 2000; Cerdeira and Duke, 2006).

Heap (2016) points out that in the world there are 47 weed species resistant to inhibitor herbicides of the enzyme acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) and 159 resistant to herbicides inhibitors of the enzyme acetolactate synthase (ALS), in both cases species of the genus *Echinochloa* are included. Of these, 19 biotypes have developed resistance to herbicides that inhibit ALS and 17 to herbicides that inhibit ACCase. *Echinochloa crus-galli* is considered the sixth weed most resistant to herbicides after *Lolium rigidum* Gaud., *Amaranthus palmeri* S. Watson, *Conyza canadensis* (L.) Cronquist, *Avena fatua* L. and *A. tuberculatus* (Moq.) J.D. Sauer (Heap, 2014).

Mallory-Smith *et al.* (1990) and Devine (1997) mention that some herbicides, such as ACCase inhibitors, can select resistant biotypes in one to five generations. This limited number of generations is due to the high specificity of action site, the high frequency of mutations in the nuclear gene that encodes the enzyme and the possibility that different semi-dominant mutations alter the site of coupling of the herbicide in the enzyme (Gressel, 2002, Tranel and Wright, 2002, Délye, 2005). The rapid increase in resistance to ALS inhibitor herbicides is attributed in part to the high frequency of natural mutation in the center of action of the enzyme (Devine and Preston, 2000).

In the state of Guanajuato the control of *E. crus-galli* has been deficient (visual appreciation of the first author), which is attributed to the resistance development of this species to the herbicides of traditional use in the region, however there is no scientific evidence. Knowledge of the presence of resistance is necessary to determine the actions in the weed control, which range from the use of herbicides with different modes of action, to alternative control methods (mechanical, manual, biological and legal). Therefore, the objective of the present research was to determine the biological efficacy of the herbicides commonly used in wheat crop and the resistance presence to these herbicides in *E. crus-galli* collected in the state of Guanajuato. The hypothesis was that there are biotypes of *E. crus-galli* that have developed resistance to the herbicides used in Guanajuato for the control of narrow leaf weeds in cereals.

resistencia a dichos herbicidas en *E. crus-galli* recolectada en el estado de Guanajuato. La hipótesis fue que existen biotipos de *E. crus-galli* que han desarrollado resistencia a los herbicidas utilizados en Guanajuato para el control de malezas de hoja angosta en cereales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante la primavera de 2015, en el estado de Guanajuato se recolectaron mediante un muestreo en cinco de oros, infrutescencias de *E. crus-galli* en parcelas comerciales de trigo en las cuales se habían aplicado herbicidas y esta especie no fue controlada (Cuadro 1). El biotipo considerado susceptible fue recolectado en un área circundante al inicio de un canal de distribución de agua de riego, donde se tuvo certeza de que nunca se habían aplicado herbicidas. Después, la semilla (aproximadamente 200 g por sitio de recolección) fue separada del resto de la infrutescencia mediante tamices de acero inoxidable y se guardó en bolsas de papel en condiciones de laboratorio hasta su uso.

Las semillas se colocaron en una cámara de germinación (APT.line® KBWF E5.2, Binder, Tuttlingen, Alemania), y se expusieron a 38 °C por 24 h. Después de retirarlas de la cámara, se colocaron en cajas Petri de 10 cm de diámetro sobre papel filtro (Whatman No. 1), y en cada caja Petri se aplicaron 20 mL de solución de KNO<sub>3</sub> al 0.3 % p/v. Las cajas se colocaron de nuevo en la cámara de germinación a 30 °C por 24 h, bajo luz constante y 80 % de humedad relativa; después las semillas se lavaron con agua destilada, para retirar los restos de la solución de KNO<sub>3</sub> y se mantuvieron en la cámara de germinación, en las mismas condiciones durante 6 d.

Cuando las semillas germinaron y las plántulas alcanzaron 2 cm de altura, se trasplantaron en macetas de plástico con capacidad de 500 mL llenadas con una mezcla de tierra del campo y sustrato peat moss (Promix flex®) en una proporción de 7:3.

## MATERIALS AND METHODS

During the spring of 2015, in the state of Guanajuato, we collected samples of five biotypes of *E. crus-galli* in commercial wheat plots in which herbicides were applied, and this species was not controlled (Table 1). The biotype considered susceptible was collected in an area surrounding the initial section of an irrigation water distribution channel, where we were certain that no herbicides were used before. Then, we separated the seeds (approximately 200 g per collection site) from the rest of the infrutescence by using stainless steel sieves and stored them in paper bags under laboratory conditions until they were used.

We placed the seeds in a germination chamber (APT.line® KBWF E5.2, Binder, Tuttlingen, Germany), and exposed them at 38 °C for 24 h. After removing them from the chamber, we placed them in 10 cm diameter Petri dishes on filter paper (Whatman No. 1), and in each Petri dish we applied 20 mL of 0.3 % p/v KNO<sub>3</sub> solution.

We put the boxes again in the germination chamber at 30 °C for 24 h, under constant light and 80 % relative humidity; then we washed the seeds with distilled water to remove the remains of the KNO<sub>3</sub> solution and kept them in the germination chamber, under the same conditions for 6 d. When the seeds germinated and the seedlings reached 2 cm in height, we transplanted them in plastic pots with a capacity of 500 mL filled with a mixture of field soil and peat moss substrate (Promix flex®) in a ratio of 7:3.

### Biological efficacy

At the greenhouse of the weeds and pesticides area of the Department of Agricultural Parasitology of the Universidad Autónoma Chapingo, we conducted six bioassays, in which we evaluated the biological efficacy of four herbicides (Table 2) commonly used in Guanajuato in each of the biotypes (population

**Cuadro 1. Ubicación geográfica de los sitios y fecha de recolecta de los biotipos de *Echinochloa crus-galli* en el estado de Guanajuato.**

**Table 1. Geographical location of sites and date of collection of *Echinochloa crus-galli* biotypes in the state of Guanajuato.**

| Biotipo           | Fecha de recolección | Latitud N   | Longitud O   | Altitud (m) | Localidad               |
|-------------------|----------------------|-------------|--------------|-------------|-------------------------|
| I                 | 12/04/15             | 20° 33' 05" | 101° 26' 53" | 1715        | Munguía, Irapuato       |
| II                | 01/05/15             | 20° 23' 10" | 101° 39' 53" | 1697        | La Granjera, Pénjamo    |
| III               | 01/05/15             | 20° 21' 37" | 101° 34' 50" | 1704        | La Lobera, Huanímaro    |
| IV                | 02/05/15             | 20° 39' 37" | 101° 08' 19" | 1737        | La Ordeña, Salamanca    |
| V                 | 02/05/15             | 20° 25' 32" | 101° 24' 05" | 1704        | Piedras Negras, Abasolo |
| Sus. <sup>†</sup> | 19/05/15             | 20° 29' 59" | 101° 28' 55" | 1700        | Los Juanes, San Felipe  |

<sup>†</sup>Biotipo susceptible. ♦ Susceptible biotype

### Efectividad biológica

En el invernadero del área de malezas y plaguicidas del Departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo, se realizaron seis bioensayos, en los cuales se evaluó la efectividad biológica de cuatro herbicidas (Cuadro 2) de uso común en Guanajuato en cada uno de los biotipos (población por sitio de recolección). En cada bioensayo el diseño experimental fue completamente al azar con cinco tratamientos (aplicación de cuatro herbicidas), incluido el testigo absoluto con cuatro repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue una maceta con tres plantas de *E. crus-galli*. Los herbicidas se aplicaron cuando las plantas presentaron de tres a cinco hojas liguladas y se utilizó un equipo de aspersión presurizado con base en CO<sub>2</sub> (Modelo TS), equipado con una punta de abanico plano de la serie TeeJet 8002VS. Previo a la aplicación, se calibró el equipo de aspersión para determinar el volumen de agua, el cual fue 200 L ha<sup>-1</sup>.

Las variables fueron porcentaje de daño a los 10, 20 y 30 d después de la aplicación (DDA), mediante la evaluación visual con la escala de la EWRS (European Weed Research Society) (Burrill *et al.*, 1976) y producción de biomasa seca de las plantas a los 30 DDA. Para determinar la biomasa seca, se cortó a nivel del suelo la parte aérea de las tres plantas de cada maceta, después se puso en una estufa de secado ("Robert Shaw") a 70 °C por 72 h y se pesó con una balanza digital (Ohaus, modelo TAJ602). Con los datos se realizó un ANDEVA con SAS®, versión 9.0. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Previo al análisis los porcentajes se transformaron a la función arcoseno de la raíz cuadrada para cumplir con la normalidad y homogeneidad de varianza.

**Cuadro 2. Nombre común, dosis de aplicación y modo de acción de los herbicidas usados en la fase de efectividad biológica.**

**Table 2. Common name, dose of application and action mode of the herbicides used in the biological efficacy phase.**

| Nombre común                               | Dosis<br>(g i.a. ha <sup>-1</sup> ) | Modo de acción,<br>inhibidores de: |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Flucarbazone sódico                        | 28.0                                | ALS                                |
| Mesosulfuron metil +<br>iodosulfuron metil | 15.0                                | ALS                                |
| Clodinafop propargil                       | 60.0                                | ACCasa                             |
| Pinoxaden                                  | 55.0                                | ACCasa                             |
| Testigo absoluto                           | —                                   | —                                  |

i.a.: ingrediente activo. ♦ i.a.: active ingredient.

per collection site). In each bioassay, the experimental design was completely randomized with five treatments (application of four herbicides), including the untreated control with four repetitions per treatment. The experimental unit was a pot with three plants of *E. crus-galli*.

The herbicides were applied when the plants presented three to five ligulated leaves. A pressurized spray equipment based CO<sub>2</sub> (TS Model) was used, equipped with a flat fan tip from the TeeJet 8002VS series. Prior to the application, we calibrated the spray equipment to determine the volume of water, which was 200 L ha<sup>-1</sup>.

The variables were the damage percentage at 10, 20 and 30 d after application (DAA), through visual evaluation with the EWRS (European Weed Research Society) scale (Burrill *et al.*, 1976) and dry biomass production of the plants at 30 DAA. To determine the dry biomass, we cut the above-ground part of the three plants of each pot at ground level, then placed them in a drying oven ("Robert Shaw") at 70 °C for 72 h and weighed them with a digital scale (Ohaus, model TAJ602).

With the data we performed an ANOVA with SAS®, version 9.0. Means comparison was carried out with the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). Prior to the analysis, we transformed the percentages to the arcsine function of the square root to comply with the normality and homogeneity of variance.

### Presence of resistance

We used the herbicides with deficient control in the previous phase to determine the resistance presence. We conducted two bioassays to evaluate the effect of increasing doses of sodium flucarbazone and mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl (one per herbicide) on the production of dry biomass of the six biotypes of *E. crus-galli* at 30 DAA.

The experimental design was randomized complete blocks with four replications. The plant material, application equipment and conditions were similar to those used in bioassays of biological efficacy. The treatments evaluated are shown in Table 3.

With the dry biomass values we calculated the ED50 (value that represents the dose of herbicide that inhibits 50 % of the growth of the plants treated in relation to the control plants). For the calculation of this parameter, we used the non-linear model of the dose-response relationship (Valverde *et al.*, 2000). We estimated the resistance index (IR) as the quotient of the ED50 obtained for the presumed resistant population and the ED50 of the population known as susceptible. In our study, we considered populations as resistant when the IR values were equal to or greater than 2.0 (Valverde *et al.*, 2000).



### Presencia de resistencia

Los herbicidas con controles deficientes en la fase anterior se usaron para determinar la presencia de resistencia. Dos bioensayos se realizaron para evaluar el efecto de dosis crecientes de flucarbazone sódico y mesosulfuron metil+iodosulfuron metil (uno por herbicida) en la producción de biomasa seca de los seis biotipos de *E. crus-galli* a los 30 DDA. El diseño experimental fue bloques completos al zar con cuatro repeticiones. El material vegetal, equipo de aplicación y condiciones fueron similares a los usados en los bioensayos de efectividad biológica. Los tratamientos evaluados se muestran en el Cuadro 3.

Con los valores de biomasa seca se calculó la  $ED_{50}$  (valor que representa la dosis de herbicida que inhibe el 50 % del crecimiento de las plantas tratadas en relación con las plantas testigo). Para el cálculo de dicho parámetro se utilizó el modelo no lineal de la relación dosis-respuesta (Valverde *et al.*, 2000).

El índice de resistencia (IR) se estimó como el cociente del  $ED_{50}$  obtenido para la población presuntamente resistente y el  $ED_{50}$  de la población conocida como susceptible. En nuestro estudio se consideraron poblaciones resistentes cuando los valores del IR fueron iguales o mayores a 2.0 (Valverde *et al.*, 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efectividad biológica

En la fase de efectividad biológica de los cuatro herbicidas se observaron diferencias estadísticas significativas por efecto de los herbicidas en el control de los biotipos de *E. crus-galli* a los 30 DDA. Los herbicidas inhibidores de la ACCasa (clodinafop propargil y pinoxaden), mostraron un control bueno de todos los biotipos de *E. crus-galli* examinados en ésta y en las dos evaluaciones previas (datos no mostrados). El control fue 99 % en promedio, con excepción del biotipo III, donde el control fue 95 % (Cuadro 4 y Figura 1). Estos resultados fueron determinantes para descartar la sospecha de resistencia a estos herbicidas.

Los herbicidas inhibidores de la ALS (flucarbazone sódico y mesosulfuron metil+iodosulfuron metil) proporcionaron un control promedio de 77 % en el biotipo susceptible (Cuadro 4). Este porcentaje de control es considerado como regular, según la escala europea en uso; sin embargo, con excepción del biotipo I, en los demás biotipos su efectividad fue baja (Figura 2), por lo que se confirmó la sospecha de resistencia de estos biotipos a los herbicidas antes mencionados.

**Cuadro 3. Nombre común, y dosis de aplicación de los herbicidas empleados en la determinación de la resistencia.**

**Table 3. Common name and application dose of the herbicides used in the determination of resistance.**

| Tratamiento | Flucarbazone sódico<br>(g de i.a. ha <sup>-1</sup> ) | Mesosulfuron metil+<br>iodosulfuron metil<br>(g de i.a. ha <sup>-1</sup> ) |
|-------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 1           | 0                                                    | 0.00                                                                       |
| 2           | 7                                                    | 3.12+0.62                                                                  |
| 3           | 14                                                   | 6.25+1.25                                                                  |
| 4           | 28                                                   | 12.50+2.50                                                                 |
| 5           | 56                                                   | 25.00+5.00                                                                 |
| 6           | 112                                                  | 50.00+10.00                                                                |
| 7           | 224                                                  | 100.00+20.00                                                               |
| 8           | 448                                                  | 200.00+40.00                                                               |

i.a.: ingrediente activo. ♦ i.a. active ingredient.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Biological efficacy

In the biological efficacy phase of the four herbicides, we observed significant statistical differences due to the effect of the herbicides in the control of *E. crus-galli* biotypes at 30 DDA. ACCase-inhibiting herbicides (clodinafop propargyl and pinoxaden) showed good control of all the *E. crus-galli* biotypes examined in this evaluation and in the two previous ones (data not shown). The control was on average 99 %, with the exception of biotype III, where the control was 95 % (Table 4 and Figure 1). These results were decisive to rule out the suspicion of resistance to these herbicides.

The ALS inhibitor herbicides (sodium flucarbazone and mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl) provided an average control of 77 % in the susceptible biotype (Table 4).

This percentage of control is considered regular, according to the European scale in use. However, with the exception of biotype I, in the other biotypes its effectiveness was low (Figure 2), so we could confirm the suspicion of resistance of these biotypes to the aforementioned herbicides.

The determinations of dry biomass confirmed the results obtained from the final visual evaluation. The biotypes treated with pinoxaden and clodinafop

**Cuadro 4. Porcentajes de control (30 DDA) de los biotipos de *E. crus-galli* del estado de Guanajuato por los herbicidas evaluados.**  
**Table 4. Control percentages (30 DDA) of the *E. crus-galli* biotypes of the state of Guanajuato for the evaluated herbicides.**

| Tratamiento              | Biotipo |         |         |         |         |                      |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------------------|
|                          | Sus     | I       | II      | III     | IV      | V                    |
| Flucarbazone sódico      | 75.00 b | 60.00 c | 42.75 b | 25.50 b | 34.12 b | 55.12 b <sup>†</sup> |
| Clodinafop propargil     | 99.50 a | 99.50 a | 99.50 a | 94.43 a | 95.50 a | 99.50 a              |
| Pinoxaden                | 99.50 a | 99.50 a | 99.50 a | 95.83 a | 99.50 a | 99.50 a              |
| Meso.+Iodos <sup>‡</sup> | 79.37 b | 79.37 b | 42.75 b | 25.50 b | 34.12 b | 25.50 c              |
| Testigo absoluto         | 0.50 c  | 0.50 d  | 0.50 c  | 0.50 c  | 0.50 c  | 0.50 d               |

<sup>†</sup>Medias con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). ♦ Means with different letter in a column are statistically different (Tukey;  $p \leq 0.05$ ).

<sup>‡</sup>Mesosulfuron metil+iodosulfuron metil. ♦ Mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl

Las determinaciones de biomasa seca confirmaron los resultados obtenidos de la evaluación visual final. Los biotipos tratados con pinoxaden y clodinafop propargil, presentaron la menor biomasa seca, es decir, fueron los tratamientos que exhibieron mayor control. Por el contrario, la biomasa seca registrada para flucarbazone y la combinación de mesosulfuron metil+iodosulfuron metil fue alta en los biotipos con sospecha de resistencia (Figura 3).

Las observaciones del primer autor acerca de la ineffectividad biológica de los herbicidas inhibidores

propargil had the lowest dry biomass, that is, they were the treatments that exhibited the greatest control.

In contrast, the dry biomass recorded for flucarbazone and the combination of mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl was high in the biotypes suspected of having resistance (Figure 3).

The first author's observations about the biological efficacy of ACCase-inhibitor herbicides can be attributed to poorly performed applications when not using the appropriate equipment, particularly



**Figura 1. Efectos a los 30 días después de la aplicación de los herbicidas inhibidores de la ACCasa (clodinafop propargil y pinoxaden) en los biotipos de *E. crus-galli*, colectado en Guanajuato.**

**Figure 1. Effect at 30 d after of the application of ACCase inhibitor herbicides (clodinafop propargil and pinoxaden) on the biotypes of *E. crus-galli*, collected in Guanajuato.**



Figura 2. Efectos a los 30 días después de la aplicación de los herbicidas inhibidores de la ALS (Meso.+Iodo.=mesosulfuron-metil+iodosulfuron-metil y flucarbazone sódico) en los biotipos de *E. crus-galli*, colectados en Guanajuato.

Figure 2. Effect at 30 d after of the application of the herbicides inhibitors of ALS (Meso.+Iod.=Mesosulfuronmetil+ iodosulfuron-methyl and sodium flucarbazone) in the biotypes of *E. crus-galli*, collected in Guanajuato.

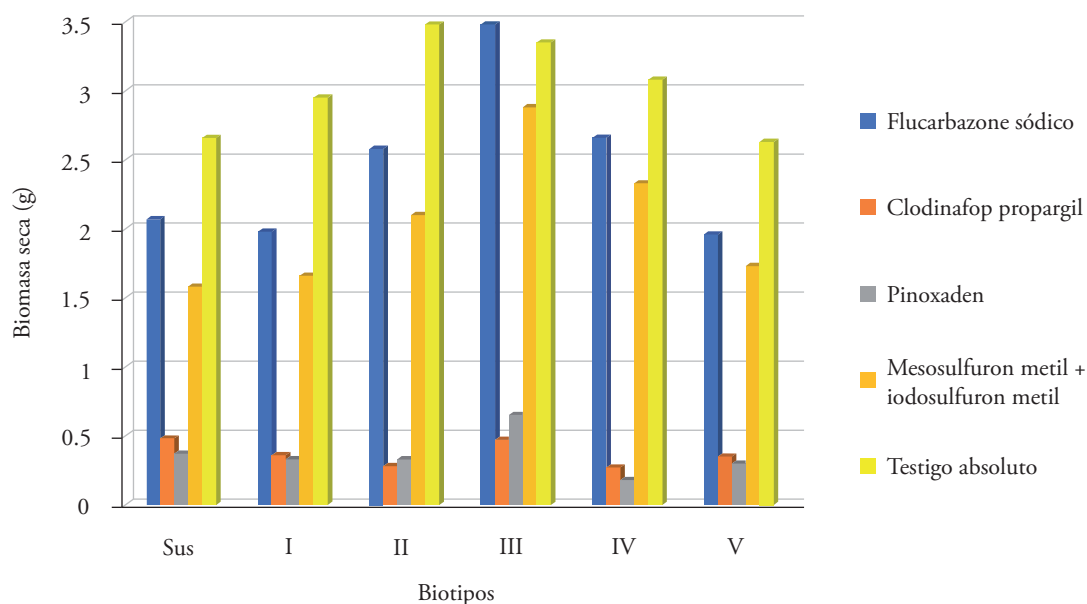


Figura 3. Biomasa seca de plantas de los biotipos de *E. crus-galli* por unidad experimental, 30 días después de la aplicación de los herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa. Sus = susceptible.

Figure 3. Dry biomass of plants from the biotypes of *E. crus-galli* per experimental unit 30 d after the application of the herbicides inhibitors of ALS and ACCase. Sus = susceptible.



de la ACCasa se pueden atribuir a aplicaciones mal realizadas al no usar el equipo adecuado, en particular, las puntas de abanico plano recomendadas para la aplicación de herbicidas y, además, a que no realizan la calibración de los equipos, lo cual puede originar la aplicación de dosis no adecuadas (Salas, 2001).

### Presencia de resistencia

#### Resistencia a mesosulfuron metil + iodosulfuron metil

La  $ED_{50}$  en el biotipo susceptible fue 9.34 g de i.a. de mesosulfuron metil + iodosulfuron metil, mientras que la dosis comercial es 28 g i.a.  $ha^{-1}$ . El biotipo V mostró una  $ED_{50}$  similar a la del biotipo susceptible, lo que confirmó que este biotipo fue susceptible (Cuadro 5). Para los otros biotipos, los índices de resistencia calculados con base a las  $ED_{50}$  obtenidas a partir de la biomasa, fueron superiores a uno; es decir, se necesita una mayor cantidad de ingrediente activo de esta mezcla para inhibir el 50 % del crecimiento de estas poblaciones, con respecto al biotipo susceptible.

Los resultados confirman que los biotipos III y IV fueron resistentes a mesosulfuron metil + iodosulfuron metil; sin embargo, los biotipos I y II no se consideran como poblaciones resistentes, de acuerdo con los índices obtenidos. El aumento en la  $ED_{50}$  es un indicativo de iniciar programas de manejo de resistencia de malezas, ya que se necesita mayor cantidad de ingrediente activo para inhibir el 50 % del crecimiento de estas poblaciones. Además, una de las causas de la resistencia es la sobredosisación y el uso reiterado de herbicidas con el mismo modo de acción, por lo cual no se recomienda aplicar esta mezcla de herbicidas u otros inhibidores de la ALS, para el control del *E. crus-galli*, y se sugiere aplicar los herbicidas inhibidores de la ACCasa que, en nuestro estudio, mostraron un control eficiente de la especie. El éxito del manejo de la resistencia depende de un programa de manejo diversificado que reduzca la presión de selección sobre las malezas y que incluya prácticas como la rotación de herbicidas, el uso de combinaciones de herbicidas con múltiples mecanismos de acción, la rotación de cultivos y el uso de métodos de control no químicos.

**Cuadro 5.  $ED_{50}$  e índice de resistencia (IR) de los biotipos de *E. crus-galli* colectados en el estado de Guanajuato, para la mezcla de los ingredientes activos mesosulfuron-metil + iodosulfuron-metil.**

**Table 5.  $ED_{50}$  and resistance index (IR) of the *E. crus-galli* biotypes collected in the state of Guanajuato for the mixture of the active ingredients mesosulfuron methyl + iodosulfuron-methyl.**

| Biotipo | $ED_{50}$ <sup>□</sup> | IR   |
|---------|------------------------|------|
| Sus     | 7.02                   | 1.00 |
| I       | 8.74                   | 1.24 |
| II      | 12.63                  | 1.79 |
| III     | 21.78                  | 3.10 |
| IV      | 15.59                  | 2.21 |
| V       | 8.36                   | 1.19 |

Sus = susceptibilidad. ♦ Sus = susceptible.

the flat fan tips recommended for the application of herbicides. In addition, bad equipment calibration, which can lead to the application of inadequate doses (Salas, 2001).

### Presence of resistance

#### Resistance to mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl

The  $ED_{50}$  in the susceptible biotype was 9.34 g of i.a. of mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl, while the commercial dose is 28 g i.a.  $ha^{-1}$ . The V biotype showed an  $ED_{50}$  similar to that of the susceptible biotype, which confirmed that this biotype was susceptible (Table 5).

For the other biotypes, the resistance indices calculated based on the  $ED_{50}$  obtained from the biomass were greater than one; that is, a greater quantity of active ingredient of this mixture is needed to inhibit 50 % of the growth of these populations with respect to the susceptible biotype.

Results confirm that biotypes III and IV were resistant to mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl; however, biotypes I and II were not considered as resistant populations, according to the indices obtained.

### Resistencia a flucarbazone sódico

Los resultados obtenidos del bioensayo dosis-respuesta con el herbicida flucarbazone sódico indicaron que ningún biotipo mostró algún grado de resistencia significativo a flucarbazone. El biotipo II presentó un índice de resistencia de 1.35; sin embargo, no es suficiente para considerarse como tal. Los otros biotipos se comportaron como susceptibles al compararlos con el biotipo testigo (Cuadro 6).

Los factores involucrados en el desarrollo y aparición de la resistencia están relacionados con la biología de la maleza, el cultivo, las prácticas de manejo, la residualidad del herbicida, la susceptibilidad del biotipo, la densidad de población de la maleza y su aptitud para producir semillas, del reservorio y la latencia de semillas susceptibles en el suelo, la dosis de aplicación, el número de aplicaciones por ciclo, las condiciones ambientales y los mecanismos de acción de los herbicidas. Por lo tanto, los controles deficientes y el riesgo en la evolución de los biotipos resistentes se deben al manejo inadecuado de los factores en los cuales es posible intervenir.

La resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS, como mesosulfuron-metil+iodosulfuron-metil, se debe a la frecuencia alta de mutaciones (Devine y Preston, 2000) en el sitio de acción (Corbett y Tardif, 2006) a la escasa absorción, transporte o degradación metabólica de los herbicidas (Hatzios, 2001; Osuna *et al.*, 2002) o a la sobreexpresión de la enzima ALS (Yasuor *et al.*, 2009). Por lo tanto, si se quiere conocer las causas de la resistencia, se deben abordar los temas antes mencionados.

**Cuadro 6. ED<sub>50</sub> e índice de resistencia (IR) de los biotipos de *E. crus-galli* colectados en el estado de Guanajuato, para el ingrediente activo flucarbazone sódico.**  
**Table 6. ED<sub>50</sub> and resistance index (IR) of *E. crus-galli* biotypes collected in the state of Guanajuato, for the active ingredient sodium flucarbazone.**

| Biotipo | ED <sub>50</sub> | IR   |
|---------|------------------|------|
| Sus     | 202.8            | 1    |
| I       | 69.80            | 0.34 |
| II      | 275.4            | 1.35 |
| III     | 75.43            | 0.37 |
| IV      | 146.6            | 0.72 |
| V       | 31.50            | 0.15 |

Sus = susceptibilidad. ♦ Sus = susceptible.

The increase in ED<sub>50</sub> is an indicative of initiating weed resistance management programs, since more active ingredient is needed to inhibit 50 % of the growth of these populations.

In addition, one of the causes of resistance is the overdose and repeated use of herbicides with the same mode action, so it is not recommended to apply this mixture of herbicides or other ALS inhibitors for the control of *E. crus-galli*, and it is suggested to apply the ACCase inhibitor herbicides that in our study showed an efficient control of the species. The success of resistance management depends on a diversified management program that reduces selection pressure on weeds and includes practices such as herbicide rotation, the use of combinations of herbicides with multiple mechanisms of action, crop rotation and the use of other non-chemical control methods.

### Resistance to sodium flucarbazone

The results obtained from the dose-response bioassay with the sodium flucarbazone herbicide indicated that no biotype showed any significant degree of resistance to flucarbazone. Biotype II presented a resistance index of 1.35; however, it is not enough to be considered as such. The other biotypes behaved as susceptible when compared with the control biotype (Table 6).

The factors involved in the development and emergence of resistance are related to weed biology, cultivation, management practices, herbicide residuality, biotype susceptibility, weed population density and its ability to produce seeds, the reservoir and dormancy of susceptible seeds in the soil, the application dose, the number of applications per cycle, the environmental conditions and the action mechanisms of the herbicides. Therefore, poor controls and the risk in the evolution of resistant biotypes are due to the inadequate management of the factors in which it is possible to intervene.

Resistance to ALS inhibiting herbicides, such as mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl, is due to the high frequency of mutations (Devine and Preston, 2000) at the action site (Corbett and Tardif, 2006) and the low absorption, transport or metabolic degradation of herbicides (Hatzios, 2001; Osuna *et al.*, 2002) or the overexpression of the ALS enzyme (Yasuor *et al.*, 2009). Therefore, if you want to know the causes of resistance, you must address the aforementioned issues.

## CONCLUSIONES

Los herbicidas clodinafop propargil y pinoxaden mostraron efectividad biológica buena sobre biotipos de *E. crus-galli* provenientes de Guanajuato; los herbicidas flucarbazone y mesosulfuron metil+iodosulfuron metil mostraron una efectividad aceptable sobre el biotipo susceptible y baja en los biotipos con sospecha de ser resistentes. En dos de los seis biotipos estudiados se confirmó resistencia de *E. crus-galli* al herbicida mesosulfuron metil+iodosulfuron metil.

## LITERATURA CITADA

- Burrill, L. C., J. Cárdenas, and E. Locatelli. 1976. Field Manual for Weed Control Research. International Plant Protection Center. Oregon State University. Corvallis, OR, USA. 59 p.
- Cerdeira, A. L., and S. O. Duke. 2006. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: A review. *J. Environ. Qual.* 35: 1633-1658.
- Christoffers, M. J. 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technol.* 13: 647-652.
- Corbett, C., and F. Tardif. 2006. Detection of resistance to acetolactate sintase inhibitors in weed with emphasis on DNA-based techniques: A review. *Pest Manag. Sci.* 62: 584-597.
- Cruz V., M., G. Martínez D., R. Cinco C., y L. Avendaño R. 2004. Periodo crítico de competencia de malezas en trigo (*Triticum aestivum* L.). *Agric. Téc. Méx.* 30: 223-234.
- Délye, C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: An update. *Weed Sci.* 53: 728-746.
- Devine, M. D. 1997. Mechanisms of resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors: A review. *Pestic. Sci.* 51: 259-264.
- Devine, M. D., and C. Preston. 2000. The molecular basis of herbicide resistance. In: Cobb, A. H., and R. C. Kirkwood (eds). *Herbicides and their Mechanisms of Action*. Academic Press. Sheffield, Inglaterra. pp: 72-104.
- Fischer, A. J. 2013. Resistencia a herbicidas: mecanismos y mitigación. *Revista Especial de Malezas. AAPRESID.* 29: 3-19.
- Gressel, J. 2002. *Molecular Biology of Weed Control*. Taylor and Francis. London. 504 p.
- Hatzios, K. K. 2001. Mechanism of resistance to herbicides. In: De Prado, R., y J. V. Jorrin (eds). *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España. pp: 275-278.
- Heap, I. 2014. Herbicide resistant weeds. In: Pimentel, D., and R. Pashin (eds). *Integrated Pest Management*. Springer. New York, USA. pp. 281-301.
- Heap, I. 2016. International survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.com/summary/home.aspx>. (Consulta: octubre 2016).
- Mallory-Smith, C. A., D. C. Thill, and M. J. Dial. 1990. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technol.* 4: 163-168.

## CONCLUSIONS

The clodinafop propargil and pinoxaden herbicides showed good biological effectiveness on *E. crus-galli* biotypes from Guanajuato; the herbicides flucarbazone and mesosulfuron methyl+iodosulfuron methyl showed an acceptable effectiveness on the susceptible biotype and low on the biotypes with suspected resistance. In two of the six biotypes studied, we confirmed the *E. crus-galli* resistance to the herbicide mesosulfuron methyl + iodosulfuron methyl.

—End of the English version—



- Osuna, M. D, F. Vidotto, A. J. Fischer, D. E. Bayer, R. De Prado, and A. Ferrero. 2002. Cross-resistance to bispyribac-sodium and bensulfuron-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pest Biochem. Physiol.* 73: 9-17.
- Powles, S. B., and Q. Yu. 2010. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 61: 317-347.
- Ross, M. A., and C. A. Lembi. 2009. *Applied Weed Science: Including the Ecology and Management of Invasive Plants*. 3rd. ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, USA. 561 p.
- Salas, M. 2001. Resistencia a herbicidas, detección en campo y laboratorio. In: De Prado, R., y J. V. Jorrin (eds). *Uso de Herbicidas en el Siglo XXI*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España. pp. 251-261
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Producción Agrícola. Cíclicos 2016. Trigo grano. [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do). (Consulta: julio 2017).
- Tafoya R., J. A., y R. M. Carrillo M. 2009. Control de la maleza en el cultivo de cebada en el altiplano. In: *Resúmenes del XXX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. 21-23 de octubre. Culiacán, Sin., México. p. 29.
- Tafoya R., J. A., A. Ocampo R., y R. M. Carrillo M. 2009. Control de la maleza en el cultivo de trigo en el altiplano. In: *Resúmenes del XXX Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza*. 21-23 de octubre. Culiacán, Sin., México. p. 33
- Tranel, P. J., and T. R. Wright. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Sci.* 50: 700-712.
- Valverde, B. E., C. R. Riches, y J. C. Caseley. 2000. Prevención y Manejo de Malezas Resistentes a Herbicidas en Arroz: Experiencias en Centro América con *Echinochloa colona*. Cámara de Insumos Agropecuarios. San José, Costa Rica. 136 p.
- 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* (Stapt) Koss.). *J. Agric. Food Chem.* 57: 3653-3660.