

## MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LAS MALEZAS A LOS HERBICIDAS

J. L. De Prado, H. Cruz-Hipolito y R. De Prado

Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Córdoba, España [qe1pramr@uco.es](mailto:qe1pramr@uco.es)

Resumen: La introducción de las auxinas sintéticas fue una revolución en la agricultura mundial para controlar las malas hierbas dicotiledóneas en cereales. A partir de ese momento las compañías de agroquímicos invirtieron cuantiosas sumas en producir nuevos herbicidas para controlar diferentes especies de malas hierbas en distintos cultivos. Sin embargo, una de las desventajas del uso de estos productos es la evolución de malas hierbas resistentes a herbicidas. La última revisión realizada por el Dr. Ian Heap (2009) señala 331 biotipos resistentes pertenecientes a 189 especies, de las cuales 113 son dicotiledóneas y 76 monocotiledóneas, distribuidas en más de 300.000 campos. El conocimiento de los procesos biológicos responsables de la resistencia a herbicidas en una determinada mala hierba es fundamental para el diseño de una estrategia de control. Dependiendo del tipo de mecanismo de resistencia detectado, la mala hierba presentará un patrón específico en su tolerancia 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. La resistencia a herbicidas puede deberse a dos mecanismos básicos, aquellos referidos al sitio de acción por pérdida de afinidad entre la proteína de enlace y el herbicida o por una sobreexpresión de esa proteína. El segundo grupo de mecanismos básicos pertenecen a aquellos donde no está involucrado el sitio de acción, también llamados mecanismos por exclusión del herbicida, principalmente debido a un incremento de la detoxificación metabólica del herbicida en productos no tóxicos y en una falta de absorción / penetración del herbicida y posterior pérdida de transporte vía xilema / floema del herbicida a la proteína de enlace. En el presente capítulo se realiza una revisión de los mecanismos involucrados en la resistencia de las plantas a los herbicidas, haciendo mayor referencia a aquellos que no están involucrado al sitio de acción.

Palabras clave: Resistencia, herbicidas, malezas, mecanismos, sitio de acción.

Summary: Mechanism of herbicide resistance in weeds. The introduction of synthetic auxins caused a revolution in the agricultural world in the effective and economic control of broad-leaved weeds in cereals. From that moment on, agrochemical companies invested huge sums in producing new herbicides to control different weed species in different crops. However, one of the disadvantages of the continued use of these products was the evolution/selection of weeds tolerant/resistant to herbicides. The last review made by Dr. Ian Heap (2009) pointed to 331 resistant biotypes belonging to 189 species, 113 of which are dicotyledons and 76 monocotyledons, distributed over more than 300,000 places in the world. Knowledge of the biological processes responsible for resistance to herbicides in a specific weed is fundamental for the design of a control strategy. Depending on the type of resistance mechanism detected, the weed will present a certain pattern in its tolerance to herbicides, which may vary from a high degree of resistance to specific compounds of a chemical family to a moderate resistance to a wide spectrum of herbicides. Herbicide resistance may be due to two basic mechanisms; those referring to the target site, either from a loss of affinity

between the linking protein and the herbicide, or from an overexpression of that protein. The second group of basic mechanisms belong to those in which the target site is not involved, also called herbicide exclusion mechanisms, mainly because of an increase in the metabolic detoxification of the herbicide in non toxic products and of a lack of absorption/penetration of the herbicide and a subsequent loss of transport via the xylem/phloem of the herbicide at the linking protein. In this chapter a review of the mechanisms involved in the resistance of plants to herbicides is made, making a greater reference to those not involved in the target site.

Key words: Resistance, herbicides, weeds, mechanisms, target sites.

## Introducción

Durante la década de 1940, la introducción de los herbicidas auxínicos, mostró a los agricultores el potencial de los herbicidas para controlar las malas hierbas de hoja ancha en cultivos herbáceos. El uso de estas auxinas sintéticas indujo a las compañías de agroquímicos, a invertir en investigación para sintetizar nuevas moléculas para distintos cultivos y malas hierbas. La comprobada eficacia de los herbicidas modernos les permite a los agricultores producir sus cultivos de forma reiterada y rentable en los mismos terrenos y optimizar sus ingresos. Sin embargo, una de las desventajas del uso de estos productos es la evolución de malas hierbas resistentes a herbicidas.

Aunque existen un número de herbicidas generales o totales que resultan activos frente a cualquier tipo de planta, no cabe duda que, hoy día, los más importantes tanto cualitativa como cuantitativamente, son los herbicidas específicos o productos capaces de controlar un amplio espectro de malas hierbas sin afectar a los cultivos a los que se aplican. La selectividad puede deberse a causas físicas o, más frecuentemente, bioquímicas (JÄGER, 1983), siendo en este último caso consecuencia de las diferencias genéticas existentes entre distintas especies vegetales. Tal acción selectiva supone que determinadas especies de plantas cultivadas, y también de malas hierbas, son capaces de vivir y crecer a las dosis recomendadas de aplicación agrícola del herbicida, aunque puedan ser controladas a dosis varias veces superiores. Este tipo de respuesta se conoce generalmente como **tolerancia natural** y ha sido definida por la HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) como la *habilidad/aptitud heredable de una especie vegetal a sobrevivir y reproducirse después de un tratamiento*, pudiendo considerarse como una característica a nivel de especie. Sin embargo, la variabilidad genética puede darse de forma intraespecífica. Debido a este hecho y como consecuencia de la presión selectiva impuesta por la aplicación continuada de herbicidas que caracteriza a los modernos sistemas de producción agrícola, es posible el desarrollo de biotipos de malas hierbas que dejan de ser controlados por un determinado producto al que originalmente eran susceptibles. Tal respuesta se conoce generalmente como **resistencia**, siendo una característica adquirida por una población (biotipo) de una especie que carecía de ella y ha sido definida por la HRAC como la *habilidad/aptitud heredable de una especie vegetal a sobrevivir y reproducirse después del tratamiento de un herbicida a dosis normalmente letales para la misma especie susceptible. En una planta, la resistencia puede ocurrir de una forma natural o puede ser inducida por técnicas como la ingeniería genética o selección de variantes resistentes obtenidas por cultivos de tejidos o mutagénesis*. Esta definición, bastante completa en sí, presenta el problema de que se asume que la resistencia está asociada únicamente a factores de tipo fisiológico y/o morfológico (MAXWELL y MORTIMER, 1994). A diferencia de las plantas tolerantes,

las resistentes suelen sobrevivir no sólo a las dosis de aplicación agrícola del herbicida sino a otras bastante superiores (DE PRADO *et al.*, 1996).

El término de **tolerancia** se usa frecuentemente no sólo para referirse a variaciones entre especies, sino también en relación con la variabilidad dentro de una especie (LEBARON y GRESSEL, 1982). En este caso, tolerancia y resistencia son expresiones que denotan diferencias en intensidad de un mismo fenómeno, considerándose la resistencia como un caso extremo y menos frecuente de tolerancia (HOLT y LEBARON, 1990) o considerando la tolerancia un mecanismo poligénico y la resistencia uno monogénico (GRESSEL, 1985).

El término **resistencia** suele ir adjetivado con diversos modificadores que hacen alusión a la posible pluralidad existente tanto en los mecanismos de resistencia que posee un individuo como en los herbicidas a los que éste es resistente. Surgen así los conceptos de **resistencia cruzada** y **resistencia múltiple**. Dependiendo de los autores consultados, estas definiciones se asociarán a mecanismos de resistencia (JUTSUM y GRAHAM, 1995):

- **Resistencia cruzada:** Aquella por la que un individuo es resistente a dos o más herbicidas debido a un solo mecanismo de resistencia.
- **Resistencia múltiple:** Aquella por la que un individuo posee más de un mecanismo de resistencia a uno o varios herbicidas.

La **resistencia cruzada negativa** se refiere a aquellos casos en que un biotipo resistente a un herbicida exhibe un aumento en la sensibilidad a otros herbicidas con distinto modo de acción o de degradación (DE PRADO *et al.*, 1992). Por último, los **cultivos resistentes** a herbicidas, son cultivos que poseen genes insertos que les confieren resistencia a cierto herbicida al que habían sido previamente sensibles.

Las características de las malas hierbas y del herbicida influyen en la tasa de evolución de la resistencia. En el caso de la mala hierba, las características más importantes son la frecuencia de genes, el tamaño y la viabilidad del banco de semillas del suelo y la adaptabilidad al medio. En el herbicida se deben considerar factores como eficacia, dosis, frecuencia de aplicación y persistencia en el suelo. La importancia relativa de estos factores se ha tratado de determinar mediante el uso de modelos (GRESSEL y SEGEL, 1990; MORRISON y FRIESEN, 1996). Estos modelos y la experiencia práctica indican que el factor principal en la evolución de la resistencia es la presión de selección impuesta por el herbicida. En la práctica, la presión de selección depende de la dosis de herbicida utilizada, su eficacia y la frecuencia de aplicación. Por lo tanto, se puede disminuir la presión de selección mediante la aplicación de mezclas de herbicidas con distintos mecanismos de acción y degradación que sean eficaces contra el mismo espectro de malas hierbas (WRUBEL y GRESSEL, 1999). La rotación de herbicidas basados en estos mismos criterios también atenúa la presión de selección. Los herbicidas persistentes imponen una mayor presión de selección que los no persistentes. La disminución de la dosis de herbicida puede agravar los problemas en vez de disminuirlos porque puede propiciar la selección de resistencia poligénica, es decir la resistencia que depende de más de un gen y se manifiesta como un incremento progresivo en el grado de resistencia de la planta de una generación a la siguiente (COUSENS y MORTIMER, 1995).

Cada especie tiene una constitución genética particular y se considera que los genes de resistencia están presentes en las poblaciones silvestres, aunque en una proporción muy baja. Si la presión de selección asociada a la frecuencia de uso es la misma para dos herbicidas, entonces la frecuencia inicial de genes influirá sobre el tiempo requerido para que se detecten individuos resistentes. Se estima que la frecuencia de genes de resistencia a las triazinas, que se heredan a través del genoma de los plástidos, es de aproximadamente  $10^{-8}$  (GRESSEL, 1991), mientras que la de las sulfonilureas es de alrededor  $10^{-6}$  (CHALEFF y DAY, 1984). Esta proporción se incrementa conforme la presión de selección aumenta por el uso continuado del mismo herbicida o de compuestos que pertenecen a la misma familia química o que comparten el mismo modo de acción, o de herbicidas que son metabolizados de manera similar en la planta. A medida que aumenta la tasa de mortalidad obtenida con el herbicida, aumenta también la presión de selección. El tiempo requerido para que se reconociera la resistencia a clorsulfurón y simazina en el campo fue de 3-5 años y 10 años, respectivamente, lo que refleja la estimación inicial de la frecuencia de genes (MAXWELL y MORTIMER, 1994).

La última revisión realizada por HEAP (2009) ([www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)) señala 331 biotipos resistentes pertenecientes a 189 especies, de las cuales 113 son dicotiledóneas y 76 monocotiledóneas distribuidas en más de 300.000 campos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resumen de malezas resistentes a herbicidas (HEAP, 2009).

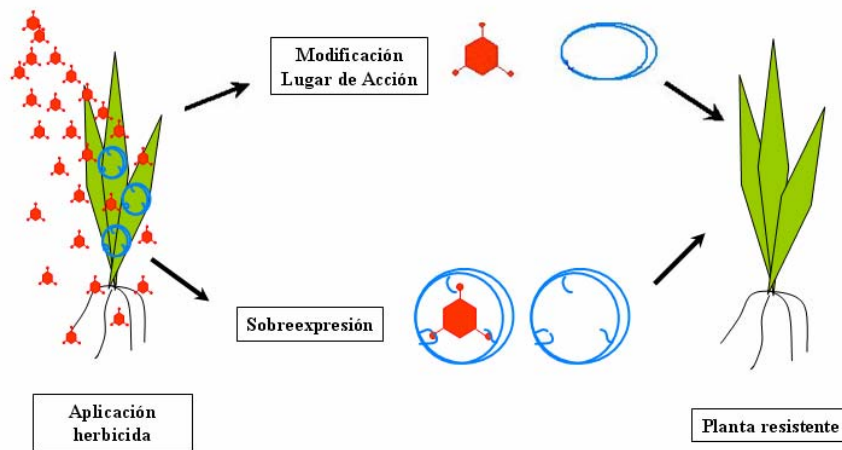
Grupo de herbicidas	Modo de Acción	Grupo HRAC	Ejemplo de Herbicidas	Total
Inhibidores de la ALS	Inhibición de la acetolactato sintetasa ALS (acetohidroxiácido sintetasa AHAS)	B	Clorsulfuron	101
Inhibidores del Fotosistema II	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	C1	Atrazina	68
Inhibidores de la ACCasa	Inhibición de la acetil coenzima carboxilasa (ACCasa)	A	Diclofop-metil	36
Auxinas Sintéticas	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético AIA)	O	2,4-D	28
Bipiridilos	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema I	D	Paraquat	24
Ureas y Amidas	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	C2	Clorotoluron	21
Glicinas	Inhibición de la EPSP sintasa	G	Glifosato	16
Dinitroanilinas y otros	Inhibición de la unión de los microtúbulos en la mitosis	K1	Trifluralina	10
Tiocarbamatos y otros	Inhibición de la síntesis de los lípidos (no ACCasa)	N	Triallato	8
Triazoles, Ureas, Isoxazolidionas	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides (punto desconocido)	F3	Amitrol	4
Inhibidores de la PPO	Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	E	Oxifluorfen	3
Cloroacetamidas y otros	Inhibición de la división celular	K3	Butaclor	3

Inhibidores de la biosíntesis de Carotenoides	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	F1	Flurtamon	2
Acidos arilaminopropiónicos	Desconocido	Z	Flamprop-metil	2
Nitrilos y otros	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	C3	Bromoxinil	1
Inhibidores de la Mitosis	Inhibición de la mitosis	K2	Profam	1
Inhibidores de celulosa	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	L	Diclobenil	1
Desconocido	Desconocido	Z	(cloro) - flurenol	1
Organoarsenicales	Desconocido	Z	MSMA	1
<b>Número total de biotipos resistentes.</b>				<b>331</b>

El conocimiento de los procesos biológicos responsables de la resistencia a herbicidas en una determinada mala hierba es fundamental para el diseño de una estrategia de control (FISCHER, 2008; POWLES, 2009). Dependiendo del tipo de mecanismo de resistencia detectado, la mala hierba presentará un patrón específico en su tolerancia 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. Asimismo el conocimiento de estos mecanismos nos permitirá prever la posible respuesta de la población resistente al conjunto de mecanismos químicos/mecánicos/culturales seleccionados para su control, la efectividad a corto y largo plazo de los mismos y la posible aparición de nuevos problemas. Actualmente hay más de 900 plaguicidas y casi 600 ingredientes activos en el mercado (HALL *et al.*, 2001). Millones de toneladas de plaguicidas se aplican anualmente, se ha estimado que un pequeño porcentaje de estos productos alcanzan el organismo diana depositando el resto en el suelo y en otros organismos, así como a la atmósfera y al agua (PIMENTAL y LEVITAN, 1986).

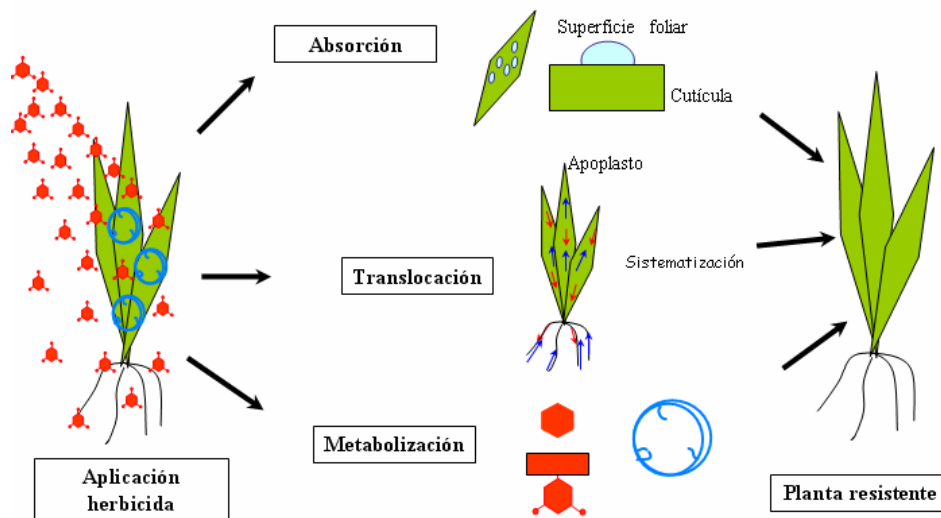
La degradación abiótica es debida a una transformación química y física del plaguicida por procesos como la fotólisis, hidrólisis, oxidación y reducción. Además, los plaguicidas pueden no estar disponibles biológicamente debido a la compartimentalización que ocurre como resultado de una adsorción del plaguicida al suelo y a los coloides sin alterar la estructura original de la molécula plaguicida.

Sin embargo, las reacciones enzimáticas que son principalmente el resultado de procesos bióticos mediados por plantas y microorganismos es la ruta de detoxificación más importante. Existen al menos cinco mecanismos generales, no necesariamente excluyentes que podrían justificar la resistencia a herbicidas (SHERMAN *et al.*, 1996). De todos los mecanismos detectados en malezas el/los cambio/s aminoácido/s que conlleva un cambio estructural en el sitio de acción (proteína) y una pérdida de afinidad por el herbicida, es el mecanismo más determinante en malezas resistentes (Figura 1). La sobreexpresión de esta proteína no es un mecanismo bien conocido y de forma natural no ha sido detectado en malezas. Sin embargo si ha sido utilizado en OMG (Organismos Modificados Genéticamente), en cultivos resistentes a glifosato.



**Figura 1.** Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas dependiente del sitio de acción. En la figura: representa la proteína diana, la proteína diana modificada y la molécula herbicida.

La figura 2 muestra el diferente comportamiento de un herbicida entre una planta sensible y una resistente (R), pudiéndose observar que en la maleza R cambios fisiológicos (cambios en la cutícula y/o menor movimiento del herbicida vía xilema o floema) y/o una mayor actividad enzimática capaz de inactivar el herbicida hacen que la maleza sobreviva al herbicida.



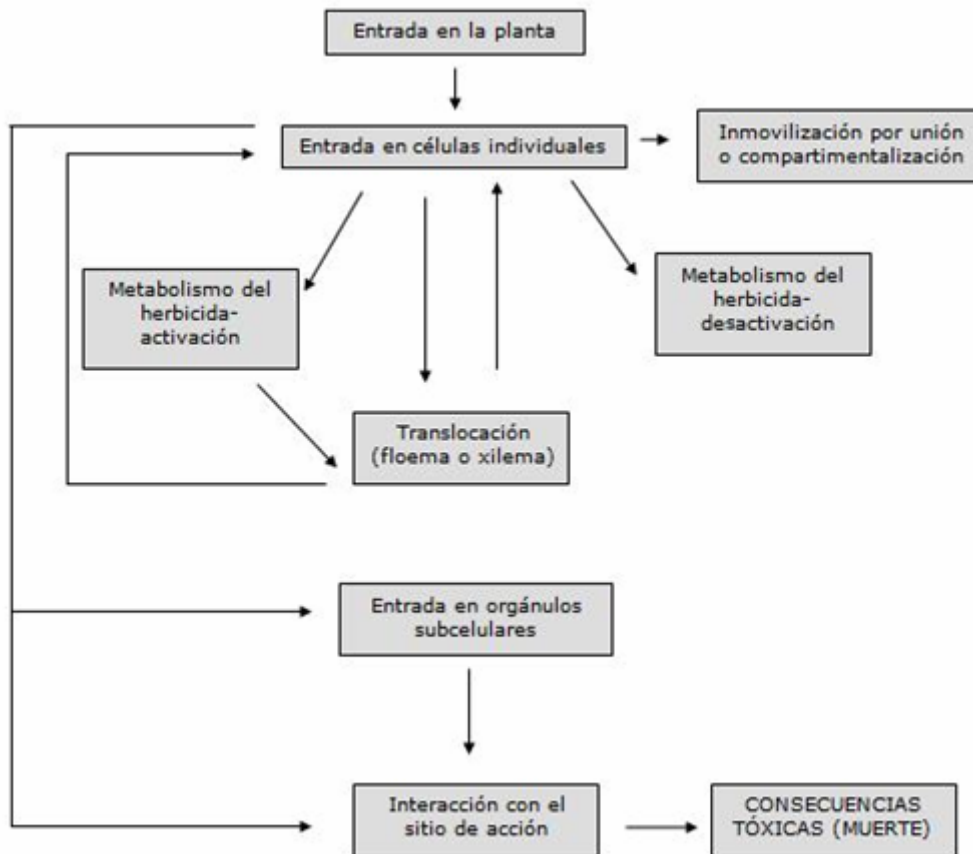
**Figura 2.** Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas independiente del sitio de acción.

## **Resistencia de sitio de acción**

***Pérdida de afinidad por el sitio de acción.*** Los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su actuación sobre un sitio de acción primario, generalmente una proteína, de especial relevancia biológica (Figura 3 y 5). Este sitio primario suele ser específico y la acción del herbicida sobre él (efecto primario), suele conducir al desarrollo de efectos secundarios, de naturaleza mucho más general que normalmente acaban produciendo la muerte de la planta (CORBETT *et al.*, 1994). Una o varias mutaciones en la secuencia aminoacídica del sitio primario de acción pueden resultar en una pérdida de afinidad del herbicida por éste, imposibilitando la unión efectiva de ambos e impidiendo así la continuidad del proceso vital mediado por dicho sitio (GRONWALD, 1994, DÉLYE *et al.*, 2005, WHALEY *et al.*, 2007). Este tipo de mecanismo, caracterizado en la mayoría de los biotipos resistentes descritos hasta el momento, se caracteriza por conferir un alto grado de resistencia al herbicida empleado, pudiéndose extender ésta a otras moléculas pertenecientes a la misma familia química (CRUZ-HIPOLITO *et al.*, 2009a).

## **Resistencia fuera del sitio de acción**

***Metabolización a compuestos no tóxicos.*** La degradación de los herbicidas a compuestos no fitotóxicos es la base de la selectividad que presentan muchas materias activas en cultivos tolerantes frente a las malas hierbas sensibles (Figura 3). En los procesos de detoxificación metabólica, entendido como aquellos procesos biológicos en los que las moléculas fitotóxicas son metabolizadas a compuestos inocuos o menos tóxicos, los biotipos resistentes son capaces de degradar el herbicida antes de que éste cause daños irreversibles. La velocidad de degradación enzimática puede variar con factores endógenos y exógenos, tales como el estadio de crecimiento de la planta y las condiciones climáticas.



**Figura 3.** Esquema de secuencias de la entrada de un herbicida desde su absorción / penetración hasta la unión a la proteína de enlace y posterior muerte de la planta (Adaptado de DEVINE *et al.*, 1993).

Los procesos de detoxificación metabólica de herbicidas en tejidos vegetales pueden dividirse en tres fases (SHIMABUKURO, 1985; HATZIOS, 1991) (Tabla 2). En la fase I (conversión) las propiedades iniciales del plaguicida de partida son transformadas a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis para producir un compuesto más soluble en agua y menos tóxico. La segunda fase implica la conjugación del herbicida o sus metabolitos con un azúcar, aminoácido o glutatión, incrementando su solubilidad en agua y reduciendo la toxicidad del compuesto. Generalmente, los metabolitos formados en la fase II tienen poca o nula fitotoxicidad y pueden ser almacenados en orgánulos celulares. La fase III implica la transformación de los metabolitos de la fase anterior a conjugados secundarios con nula fitotoxicidad (HATZIOS, 1991). Esta división no constituye una regla general dado que alguna de las fases puede no estar presente en los procesos de detoxificación; o la molécula herbicida puede ser un pro-herbicida inactivo que debe ser enzimáticamente convertido en un compuesto activo; o a veces ciertos procesos de conjugación son de carácter reversible, por lo que sólo afectan de manera parcial a la cantidad de herbicida libre intracelular.

**Tabla 2.** Resumen de las tres fases del metabolismo de plaguicidas (Adaptado de SHIMABUKURO, 1985; DE PRADO *et al.*, 2004)

Características	Propiedades iniciales	Fase I	Fase II	Fase III
Reacciones	Compuesto inicial	Oxidación, hidrólisis, reducción	Conjugación	Conjugación secundaria o incorporación a biopolímeros
Solubilidad	Lipofílico	Anfófilico	Hidrofílico	Hidrofílico o insoluble
Fototoxicidad	Tóxico	Modificado o menos tóxico	Muy reducida o no tóxico	No tóxico
Movilidad	Selectiva	Modificada o reducida	Limitada o inmóvil	Inmóvil

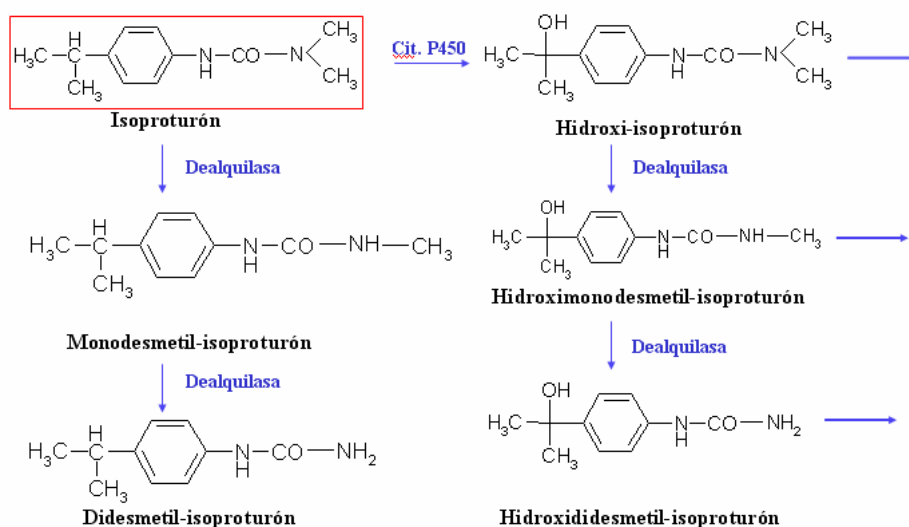
Fase I o conversión. Si bien algunos herbicidas pueden ser conjugados directamente, muchos otros no poseen sustituyentes disponibles en sus moléculas (grupos amino, hidroxilo, sulfhidrilo, etc.) que pueden reaccionar para formar conjugados con constituyentes celulares. Dichos herbicidas deberán ser convertidos en metabolitos mediante algunas de las siguientes reacciones:

1. Hidrólisis: Estas reacciones están catalizadas por enzimas hidrolíticas (esterasas, fosfatasas o amidasas, dependiendo del sustrato). En las transformaciones hidrolíticas se rompen los enlaces de un sustrato por adición a cada producto de H u OH proveniente del H<sub>2</sub>O. Hay muchas enzimas hidrolíticas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos particularmente aquellos que contienen grupos funcionales amida, carbamatos o éster. Estas enzimas pueden estar compartimentalizadas o ser extracelulares y las reacciones pueden ocurrir tanto en condiciones aerobias como anaerobias. La hidrólisis de enlaces éster de herbicidas han sido ampliamente estudiadas y revisadas en plantas y microorganismos (INCLEDON y HALL, 1997; HOAGLAND y ZABLOTOWICZ, 2001). La hidrólisis del enlace éster es llevada a cabo por esterasas y en menor medida por lipasas y proteasas. Con respecto a la hidrólisis de enlaces amida el propanil es el herbicida más estudiado. La base de la selectividad del arroz (*Oryza sativa* L.) es debida a los altos niveles que posee de la enzima aril acilamidasa, las cuales rompen el enlace amida formando ácido propiónico y 3,4-dicloroanilina (FREAR Y STILL, 1968).

2. Reducciones: La metabolización reductora de herbicidas es un proceso que raramente se da en plantas, pudiéndose destacar únicamente la desaminación reductora de las s-triazinonas (metamitrona y metribuzina), en cultivos tolerantes y malas hierbas resistentes (FEDTKE, 1983).

3. Oxidaciones, oxigenaciones e hidroxilaciones: Todas ellas se pueden incluir dentro del grupo denominado transformaciones oxidativas. La oxigenación es el primer paso más frecuente en la biotransformación de herbicidas siendo las hidroxilaciones las más observadas en plantas. La detoxificación por hidroxilación y la posterior formación

de un conjugado glicósido son especialmente importantes como mecanismo de selectividad y resistencia a herbicidas en monocotiledóneas. Muchas de estas reacciones están mediadas por enzimas oxidativas por ejemplo, citocromo P<sub>450</sub>, que son las enzimas más importantes en la primera fase del metabolismo de un herbicida (BARRETT, 2000) (Figura 4). La regulación y expresión de P<sub>450</sub> no se conocen bien en plantas, principalmente porque en las células que no están expuestas a ningún tipo de estrés fisicoquímico, fisiológico o xenobiótico las cantidades que se encuentran de esta enzima son muy pequeñas. Los agroquímicos pueden influir en los sistemas citocromo P<sub>450</sub> actuando como efectores, modificando o regulando así el metabolismo de los herbicidas en una planta.



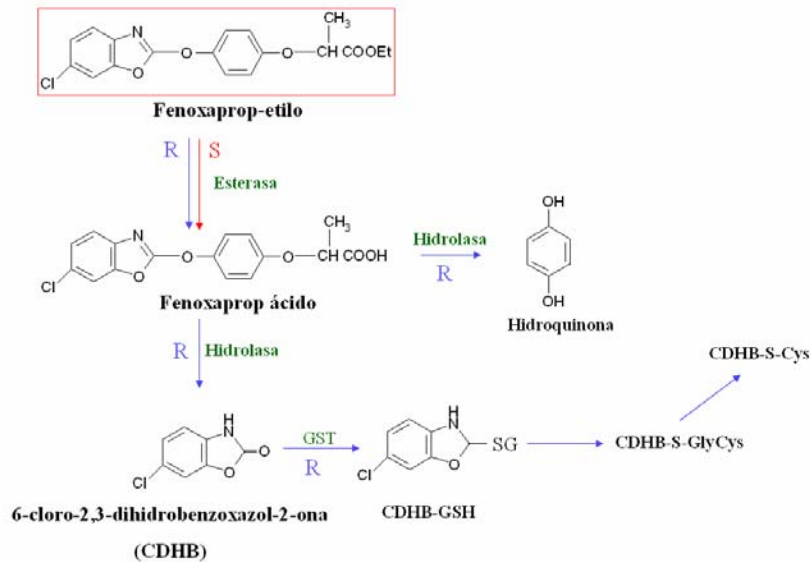
**Figura 4.** Ruta metabólica de detoxificación de isoproturon en *Lolium rigidum*.

Además de las enzimas citocromo P<sub>450</sub> las plantas producen otras enzimas oxidativas (peroxidasas, polifenoloxidasas, lacasas y tirosinasas) las cuales catalizan la polimerización de varias anilinas y fenoles (DEC y BOLLAG, 2001). Por ejemplo, las peroxidasas que median el metabolismo de herbicidas que funcionan de manera similar a las P<sub>450</sub> incluye descarboxilaciones, oxidaciones sulfúricas, N-desmetilaciones, hidroxilaciones del anillo y oxidaciones aromáticas del grupo metilo (LAMOUREUX y FREAR, 1979). En plantas, a menudo las enzimas peroxidasas funcionan en la tercera fase del metabolismo por ejemplo, formación de residuos ligados. *Amorocia lapathifolia* Gilib. contiene en las raíces gran cantidad de peroxidasas.

**Fase II ó conjugación.** Los conjugados suelen ser los metabolitos finales en los procesos de detoxificación de herbicidas. La naturaleza de estos conjugados suele ser muy diversa, con azúcares, aminoácidos, péptidos y lignina como grupos orgánicos y enlaces de tipo éster, éter, tioéter, amida o glicosídico.

1. Conjugación con glutatión: Constituye un mecanismo de detoxificación de gran importancia en muchos tejidos vegetales. Se trata de una sustitución nucleofílica en el que el anión glutatión GS<sup>-</sup> sirve de nucleófilo, actuando los grupos cloro, *p*-nitrofenol o alquil-sulfóxido como posibles grupos a sustituir en la molécula herbicida (LAMOUREUX y FREAR, 1987).

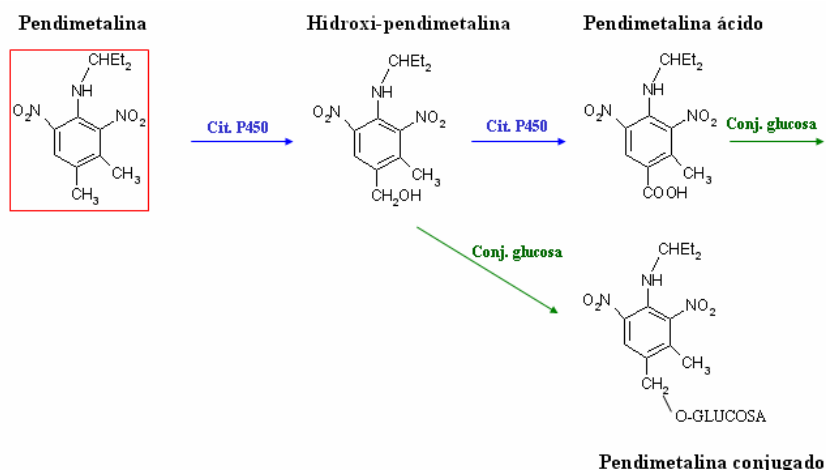
La conjugación con glutatión está catalizada por una familia de enzimas glutatión-S-transferasas más o menos específicas que se encuentran de manera constitutiva o inducible en muchos tejidos vegetales (DEVINE *et al.*, 1993) (Figura 5).



**Figura 5.** Ruta metabólica de detoxificación de fenoxaprop-etilo en *Lolium rigidum*.

2. Conjugación con aminoácidos: De forma general, la hidrólisis del glutatión en este tipo de conjugados suele producir un conjugado de cisteína, el cual puede ser posteriormente malonizado. Sin embargo, en el caso del herbicida clorfemprop sólo el conjugado de cisteína y no el de glutatión ha sido descrito en trigo (PONT Y COLLET, 1980), siendo posible que la cisteína pueda actuar como nucleófilo en una reacción de conjugación similar a la descrita en el glutatión.

3. Conjugación con azúcares: Los conjugados glicósidos más frecuentemente encontrados en plantas son los  $\beta$ -D-glucopiranosidos, junto con los N-glicósidos, O-glicósidos y ésteres de glucosa (Fig. 6). Este tipo de reacciones está catalizada por glucosil-transferasas que utilizan UDP-glucosa como donante de glucosa (MANSAGER *et al.*, 1983). De todas estas reacciones, la formación de O-glicósidos es la más común, la cual sigue normalmente a la introducción de grupos hidroxilo en la molécula herbicida por monooxigenación.

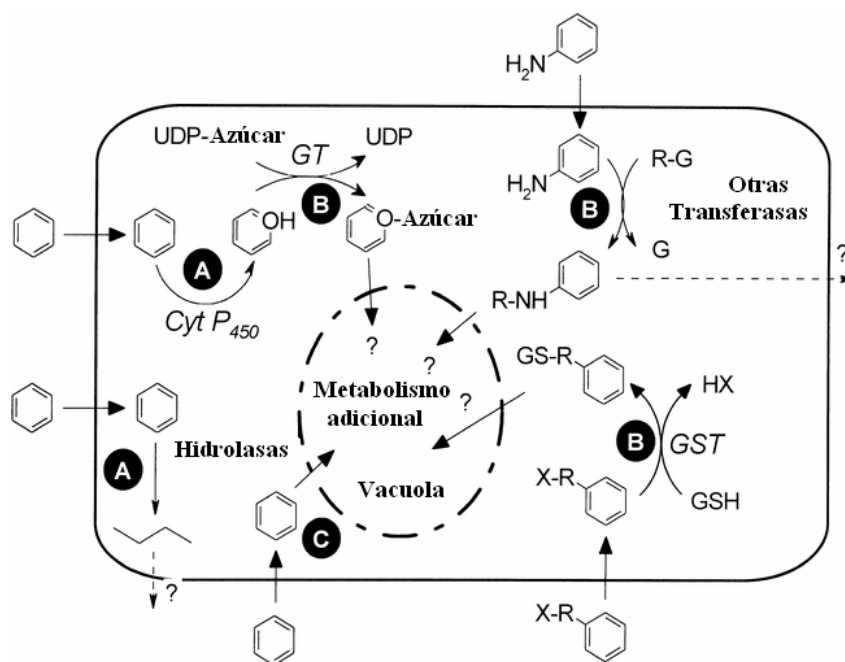


**Figura 6.** Ruta metabólica de detoxificación de pendimetalina en *Lolium rigidum* resistente a dinitroanilinas.

Fase III o deposición. La ruta metabólica seguida por un herbicida afecta de gran manera el uso final de los metabolitos terminales y conjugados. Los conjugados glicósidos son depositados en la vacuola donde quedan almacenados, mientras que los conjugados de origen aminoacídico son excretados a la pared celular donde se integran en el componente de lignina de éstas, formando un residuo insoluble (PILLMOOR *et al.*, 1984) (Figura 7). Si bien estos procesos de deposición no son completamente irreversibles, la reentrada de los aglicones herbicidas o sus productos de conversión en el pool de herbicida activo intracelular es muy lenta (DEVINE *et al.*, 1993). Como puede observarse en la figura el herbicida una vez que entra en la planta puede ser metabolizado (activando o desactivando el herbicida) y posteriormente pasar a la vacuola como material de deshecho o bien directamente pasar a la vacuola donde queda secuestrado y lentamente degradado.

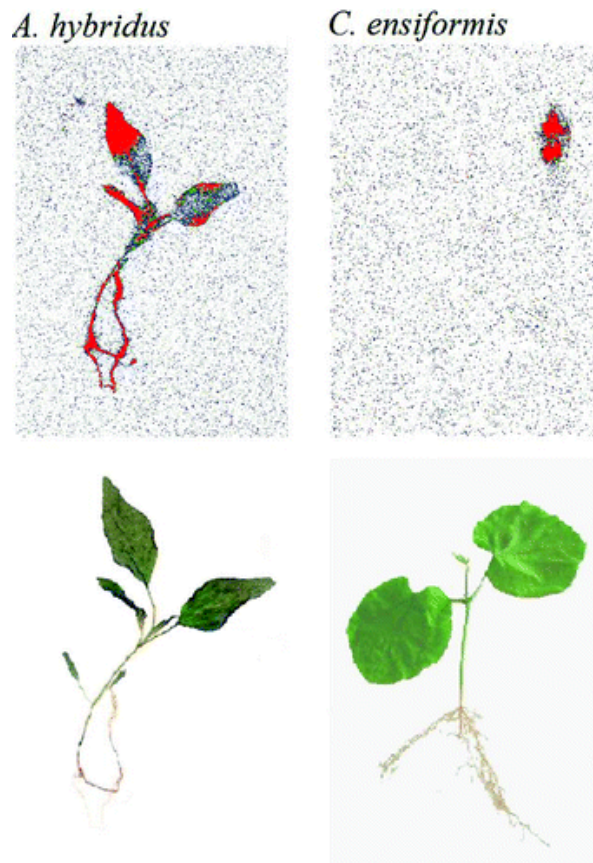
La resistencia a herbicidas por detoxificación es un proceso muy frecuente. Sin embargo, este mecanismo suele venir asociado a fenómenos de resistencia cruzada, lo que implica que un mismo individuo tiene la capacidad de metabolizar moléculas muy diferentes pertenecientes a diversas familias químicas. Esta moderada resistencia a un amplio espectro de productos hace extremadamente difícil el control de estos biotipos de malas hierbas mediante el sólo uso de métodos químicos.

**Resistencia asociada a procesos de secuestación o compartimentación.** Los fenómenos de compartimentación entendidos como la secuestación del herbicida o sus metabolitos en un lugar específico de la célula, son mecanismos de resistencia/tolerancia poco conocidos debido a que las evidencias que los apoyan son en muchos casos circunstanciales (COUPLAND, 1991; OWEN, 1991). Los escasos casos en la bibliografía relacionan este tipo de mecanismos de resistencia con herbicidas de acción hormonal e inhibidores del fotosistema I, justificando la resistencia tanto en líneas de cultivos celulares como en plantas enteras como un incremento en la capacidad de secuestrar el herbicida o los metabolitos potencialmente fitotóxicos dentro de la vacuola celular (Figura 7). Sin embargo, los procesos subyacentes a estos mecanismos de secuestación son todavía desconocidos.



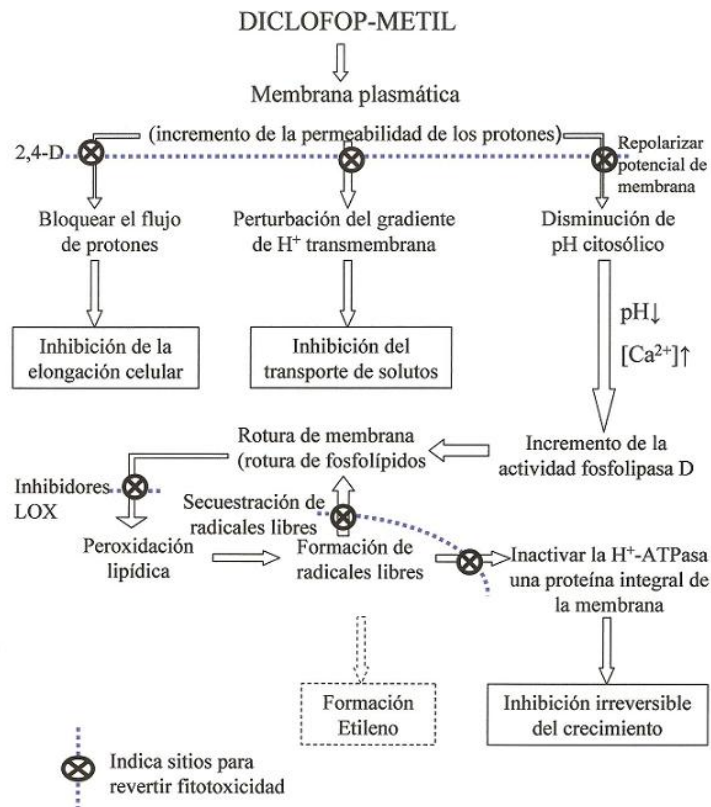
**Figura 7.** Rutas metabólicas de detoxificación de herbicidas en malezas (Adaptado de DE PRADO y FRANCO, 2004). A: reacciones no sintéticas (oxidación, reducción, hidrólisis); B: reacciones sintéticas (naturaliza química del herbicida se modifica); C: secuestro del herbicida. Cyt P<sub>450</sub>: Citocromo P<sub>450</sub>; GT: glicosil transferasas; GST: glutatión-S-transferasas; c1ccccc1: Molécula herbicida.

**Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción.** Una condición necesaria para lograr la efectividad de un herbicida es que éste alcance su sitio de acción en una concentración suficiente como para que su efecto sea letal. La falta de movimiento de un herbicida posibilitará reducir la concentración de éste en el sitio de acción, lo que permitirá al último mantenerse funcional. Estas bajas concentraciones pueden lograrse ya sea mediante una reducción en la penetración, absorción o translocación o por la existencia de fenómenos de secuestro en orgánulos celulares más o menos translocables. La falta de absorción/penetración/translocación de herbicidas es básicamente un mecanismo de tolerancia existente en numerosos cultivos y algunas malas hierbas (HESS, 1985; DE PRADO *et al.*, 2001; MICHITTE *et al.*, 2004; RUIZ-SANTAELLA *et al.*, 2006; CRUZ-HIPOLITO *et al.*, 2009b) (Tabla 2 y Figura 8). Aun cuando pueden estudiarse por separado, estos mecanismos resultan difíciles de diferenciar entre sí, dado que una absorción diferencial suele implicar una translocación diferencial, y una translocación diferencial puede derivar de la diferente degradación del herbicida en el sitio de absorción, la cual resulta en metabolitos más o menos translocables.



**Figura 8.** Penetración y translocación de  $^{14}\text{C}$ -glifosato en plantas sensibles (izquierda) y tolerantes (derecha) a glifosato (CRUZ-HIPOLITO *et al.*, 2009b). Las zonas coloreadas en rojo indican el movimiento de  $^{14}\text{C}$ -glifosato.

**Reparación de efectos fitotóxicos.** Algunos herbicidas ariloxifenoxipropanoatos (inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa), como diclofop-metil y haloxyfop, despolarizan el potencial de la membrana plasmática en células parenquimáticas de *Avena sativa*, *Triticum aestivium*, *Lolium rigidum*, etc. La capacidad despolarizadora del diclofop-metil se atribuye al flujo específico de protones que este compuesto produce hacia el interior de la célula (SHIMABUKURO y HOFFER, 1997) (Figura 9). Recientemente han sido identificados biotipos de malas hierbas cuyo mecanismo de resistencia al diclofop-metil parece ser debido a la capacidad de recobrar el potencial de membrana una vez que se ha retirado el herbicida causante de la despolarización (DE PRADO *et al.*, 1999).



**Figura 9.** Representación gráfica de los múltiples efectos ocurridos en gramíneas tratadas con diclofop-metil (Adaptado de SHIMABUKURO y HOFFER, 1997).

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el M.E.C (proyecto AGL2007-0835). Parte de este capítulo pertenece a la Tesis Doctoral de Don José L. De Prado Ruiz-Santaella.

## Bibliografía

BARRETT, M. (2000). The role of cytochrome P450 enzymes in herbicide metabolism. En: *“Herbicides and Their Mechanisms of Action”*, (eds. Cobbs AH y Kirkwood RC), Sheffield, Great Britain, Sheffield Academic, pp. 25-37.

CORBETT, J.R.; WRIGHT, R.; BAILIE, A.C. (1994). The biochemical mode of action of pesticides, (eds. Academic Press, London), 382 pp.

COUSENS, R. ; MORTIMER, M. (1995). Dynamics of weed populations, Cambridge University Press, Cambridge, England, 332 pp.

COUPLAND, D. (1991). The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. En: *“Herbicide Resistance in Weeds and Crops”*, (eds. Caseley JC, Cussans GW y Atkin RK), Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, pp. 263-278.

- CRUZ-HIPOLITO, H.; OSUNA, M.D.; VIDAL, R.A.; DE PRADO, R. (2009a). Resistance mechanism to bensulfuron-methyl in biotypes of *Scirpus mucronatus* L. collected in Chilean rice fields. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:4273-4278.
- CRUZ-HIPOLITO, H.; OSUNA, M.D.; HEREDIA, A.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; DE PRADO, R. (2009b). Nontarget mechanisms involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:4844-4848.
- CHALEFF, R.S.; DAY, E.B. (1984). Herbicide resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science*, 223:1148-1151.
- DEC, J.; BOLLAG, J.M. (2001). Use of enzymes in bioremediation. En: "*Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganism: Similarities and Divergences*", (eds. Hall JC, Hoagland RE y Zablutowicz RM), ACS Symposium Series 777. Washington DC, American Chemical Society, pp. 182-193.
- DÉLYE, C.; ZHANG, X.Q.; CHALOPIN, C.; MICHEL, S.; MATÉJICEK, A.; POWLES, S.B. (2005). Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiology*, 137:794-806.
- DE PRADO, R.; FRANCO, A. (2004). Cross resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Science*, 52:441-447.
- DE PRADO, R.; SÁNCHEZ, M.; JORRÍN, J.; DOMÍNGUEZ, C. (1992). Negative cross-resistance to bentazone and pyridate in atrazine-resistant *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus hybridus* biotypes. *Pesticide Science*, 35:131-136.
- DE PRADO, R.; ROMERA, E.; MENENDEZ, J. (1996). Chlortoluron resistance in a *Bromus tectorum* L. biotype is due to an enhanced detoxification processes. En: "*Proceedings of the International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides*" (eds. DE PRADO, R.; JORRÍN, J.; GARCÍA-TORRES L.; MARSHALL G), Universidad de Córdoba, España, pp. 62-64.
- DE PRADO, R.; DE PRADO, J.L.; OSUNA, M.D.; TABERNER, A.; HEREDIA, A. (2001). Is diclofop-methyl resistance in *Lolium rigidum* associated with a lack of penetration?. En: "*Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference*", pp. 545-550.
- DE PRADO, J.L.; DE PRADO, R.; SHIMABUKURO, R.H. (1999). The effect of diclofop on membrane potential, ethylene induction and herbicide phytotoxicity in resistant and susceptible biotypes of grasses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63:1-14.
- DE PRADO, R.; OSUNA, M.D.; FISCHER, A.J. (2004). Resistance to ACCase inhibitor herbicides in green foxtail (*Setaria viridis*) biotype in Europe. *Weed Science*, 52:506-512.

DEVINE, M.D.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. (1993). Physiology of herbicide action, (eds. Prentice Hall), Englewood Cliffs, pp, 441.

FEDTKE, C. (1983). Leaf peroxisomes deaminate *as*-triazinone herbicides. *Naturwissenschaften*, 70:199-200.

FISCHER, A.J. (2008). Mecanismos de resistencia: Las bases para definir estrategias. Seminario Internacional “Viabilidad del Glifosato en Sistemas Productivos Sustentables”. INIA. Colonia, Uruguay, 27-44.

FREAR, D.S.; STILL, G.G. (1968). The metabolism of 3,4-dichloropropionanilide in plants. Partial purification and properties of an aryl acylamidase from rice. *Phytochemistry*, 7:913-920.

GRESSEL, J. (1985). Herbicide tolerance and resistance: alteration of site of activity. En: “*Weed Physiology*”, Vol II (ed. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, pp. 160-184.

GRESSEL, J. (1991). Why get resistance? It can be prevented or delayed. En: “*Herbicide Resistance in Weeds and Crops*”, (eds. CASELEY, J. C.; CUSSANS, G. W.; ATKIN, R. K.), Butterworth-Heinemann, Oxford, England, pp. 1-26.

GRESSEL, J.; SEGEL, L.A. (1990). Interrelating factors controlling the rate of appearance of resistance: the outlook for the future. En: “*Herbicide Resistance in Plants*”, (eds. LEBARON, H. M.; GRESSEL, J.), John Wiley and Sons, New York: 325-347.

GRONWALD, J.W. (1994). Herbicides inhibiting acetyl CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 22:153-161.

HALL, J.C.; WICKENDEN, J.S.; KYF, Y. (2001). Biochemical conjugation of pesticides in plants and microorganisms: an overview of similarities and divergences. En: “*Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences*”, (eds. Hall JC, Hoagland RE y Zablutowicz RM), Washington, DC: *American Chemical Society*, pp. 89-118.

HATZIOS, K.K. (1991). Biotransformations of herbicides in higher plants. En: “*Environmental Chemistry of Herbicides*”, (eds. Grover R y Cessna AJ), Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 141-185.

HEAP, I. (2009). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. October, 2009. Available [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com).

HESS, F.D. (1985). Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerance and susceptibility. En: “*Weed Physiology: Herbicide Physiology*”, vol. II, (eds. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, pp. 192-214.

HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.M. (2001). The role of plant and microbial hydrolytic enzymes in pesticide metabolism. En: “*Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms: Similarities and Divergences*”, (eds. Hall JC, Hoagland RE y Zablutowicz RM), ACS Symposium Series 664, Washington DC, American Chemical

Society, pp. 58-88.

HOLT, J.S.; LEBARON, H.M. (1990). Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology*, 4:141-149.

INCLEDON, B.J.; HALL, J.C. (1997). Enzymatic de-esterification of xenobiotics in plants. En: "*Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*", (ed. Hatzios KK), NATO ASI Series, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 67-82.

JÄGER, G. (1983). Herbicides. En: "*Chemistry of Pesticides*" (ed. Büchel KH), John Wiley and Sons, New York, pp. 322-392.

JUTSUM, A. R.; GRAHAM, J. C. (1995). Managing weed resistance: the role of the agrochemical industry. En "*Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Weeds*". pp. 557-566.

LAMOUREUX, G.L. ; FREAR, D.S. (1987). Current problems, trends and developments in pesticide metabolism in plants. En: "*Pesticide Science and Biotechnology*", (eds. Greenhalgh R y Roberts TR), Blackwell, Oxford, pp. 455-462.

LAMOUREUX, G. L. ; FREAR, D.S. (1979). Pesticide metabolism in higher plants: *in vitro* enzyme studies. En: "*Xenobiotic Metabolism: In Vitro Methods*", (eds. Paulson GD, Frear DS y Marks EP), ACS Symposium Series 97, Washington DC, American Chemical Society, pp. 77-128.

LEBARON, H.M.; GRESSEL, J. (1982). Herbicide Resistance in Plants, John Wiley and Sons, New York: 325-347.

MAXWELL, B.D.; MORTIMER, A.M. 1994. Selection for herbicide resistance. pp. 1-25 in S. B. Powles y J.A.M. Holtum, eds. *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers. Boca Raton.

MANSAGER, E.R.; SWANSON, H.R.; TANAKA, F.S. (1983). Metribuzin metabolism in tomato: isolation and identification of *N*-glucoside conjugates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 19:270-281.

MICHITTE, P.; GAUVRIT, C.; HEREDIA, A.; DE PRADO, R. (2004). Resistance to glyphosate in *Lolium multiflorum*: involvement of epicuticular waxes?. En: "*XII Colloque International Sur La Biologie Des Mauvaises Herbes*", pp. 597-602.

MORRISON, I.N.; FRIESEN, L.F. (1996). Herbicide resistant weeds: mutation, selection and misconceptions. En: "*Proceedings of the Second International Weed Control Congress*", Copenhagen, Denmark, 2, pp. 377-386.

OWEN, W. J. (1991). Herbicide metabolism as a basis for selectivity. En: "*Target Sites for Herbicide Action*", (ed. Kirkwood RC), Pleum Press, New York, pp. 285-314.

- PILLMOOR, J.B.; GAUNT, J.K.; ROBERTS, T. R. (1984) Examination of bound (non-extractable) residues of MCPA and flamprop in wheat straw. *Pesticide Science*, 15: 375-381.
- PIMENTAL, D.; LEVITAN, L. (1986). Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Biosciences*, 36:86-91.
- PONT, V.; COLLET, G.F. (1980). Métabolisme du chloro-2-(*p*-chlorophényl)-3 propionate de méthyle et problème de sélectivité. *Phytochemistry*, 19:1361-1363.
- POWLES, S.B. 2009. Evolution in action: plants resistant to herbicides: AFPP-XIII<sup>th</sup> International Conference on Weed Biology. September 2009. Dijon. France.
- RUIZ-SANTAELLA, J.P.; HEREDIA, A.; DE PRADO, R. (2006). Basis of selectivity of cyhalofop-butyl in *Oryza Sativa* L. *Planta*, 223:191-199.
- SHERMAN, T.D.; VAUGHN, K.C.; DUKE, S.O. (1996). Mechanism of action and resistance to herbicides. En: “*Herbicide Resistant Crops*”, (ed. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, pp. 14-28.
- SHIMABUKURO, R.H. (1985). Detoxification of herbicides. En: “*Weed Physiology*”, Vol. 2, (ed. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, pp. 215-240.
- SHIMABUKURO, R.H.; HOFFER, B.L. (1997). Perturbation of the transmembrane proton gradient and resistance to AOPP herbicides. En “*Weed and Crop Resistance to Herbicides*” (eds. De Prado R, Jorin J y García-Torres L), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.71-79.
- WHALEY, C.M.; WILSON, H.P.; WESTWOOD, J.H. (2007). A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. *Weed Science*, 55: 83-90.
- WRUBEL, R.P.; GRESSEL, J. (1999). Are herbicide mixtures useful for delaying the rapid evolution of resistance? A case study. *Weed Technology*, 8:635-648.